



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

REGENERACIÓN MUSCULAR POR INYECCIÓN LOCAL DE CÉLULAS
MESENQUIMALES HUMANAS ESFEROIDES 3D (AT-hMSCs-3D) EN UN
MODELO MURINO DE LESIÓN MUSCULAR SEVERA

Memoria para optar al título de Bioquímica

Verónica Patricia Villalobos González

Profesor patrocinante

Dr. Dante Miranda W.

Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas

Universidad de Chile

Director de Memoria

Dra. Mariana Casas A.

Laboratorio de Fisiología de Células
Musculares

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

Julio 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el cariño y la confianza que siempre me han otorgado, que me ha permitido seguir adelante con paso firme todo proyecto que se ha cruzado por mi camino. A mis padres por la comprensión, compañía, soporte y todas enseñanzas que me han dado. A mis hermanos que siempre han estado conmigo dándome apoyo. A mis primos, tíos y tías que también se hicieron parte de este proceso y me dieron ánimo por montón.

A mi Mimi, gracias por darme tanto amor, risas y alegrías. Además de refugio cada vez que necesité estudiar.

A mis amigos de la vida, Fer gracias por estar siempre ahí acompañándome en todas las aventuras, desde el colegio hasta la universidad. Mica por tu preocupación y amistad siempre.

Dani, Frani, Clau, Javo gracias por las noches de estudio infinitas que ayudaran a que los ramos fueran más llevaderos y a los innumerables maratones de tesis de este último año. A los Bachis Negro, Repo, Juano, Amaru.

A las chicas superpoderosas, Gaby y Lore ustedes hicieron que toda mi vida universitaria fuera inolvidable, mis favoritas compañeras de clases, realmente les agradezco por todos los años de amistad.

Al "Team Casas", Carlos, Jaque, Cristián, Gerardo, David, Jenny por el apoyo tanto científico como emocional. Hicieron de ese espacio de trabajo un lugar maravilloso.

A mi tutora y guía Dra. Mariana Casas, gracias por tu tiempo, por creer en mí, apoyarme siempre y enseñarme tanto. Agradezco haber tenido el honor de trabajar contigo y conocer no solo a la increíble científica sino también a la maravillosa persona que eres.

Al equipo completo del laboratorio de fisiología del músculo. Dr. Enrique Jaimovich y Mónica por la ayuda otorgada en el desarrollo de esta Memoria.

Y al equipo de Cellus Medicina Regenerativa S.A. que me dieron la oportunidad y financiamiento para desarrollar este trabajo a través del proyecto "17PIDE-80689".

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 MÚSCULO ESQUELÉTICO	12
1.2 LESIONES MUSCULARES	14
1.3 CÉLULAS MADRE	16
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVO GENERAL	20
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 ANIMALES	21
5.2 MODELO DE LESIÓN MUSCULAR PARA CARACTERIZACIÓN E INYECCIÓN DE AT-HMSCs-3D	21
5.3 INYECCIÓN EN MÚSCULOS LESIONADOS	21
5.4 CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL MODELO DE LESIÓN POR CONGELACIÓN	21
5.5 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA REGENERACIÓN MUSCULAR EN MÚSCULOS LESIONADOS Y TRATADOS CON AT-HMSCs-3D	22
5.6 ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA IN VITRO	22
5.7 ENSAYOS DE COCULTIVO	23
5.8 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE MÚSCULO ESQUELÉTICO CON RT-QPCR	23
5.9 INMUNOFLUORESCENCIA	24
5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
6. RESULTADOS	26
6.1 CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE MÚSCULOS A 7 Y 21 DÍAS PL POR CONGELACIÓN	26
6.2 CAMBIOS EN LA VELOCIDAD DE REGENERACIÓN POR INYECCIÓN DE AT-HMSCs-3D	29
6.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESFEROIDES 3D EN LA REGENERACIÓN MUSCULAR	35
6.4 ADQUISICIÓN DE COMPROMISO MIOGÉNICO DE LOS ESFEROIDES 3D	36

7. DISCUSIÓN	40
7.1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE DAÑO MUSCULAR POR CONGELACIÓN	40
7.2 EFECTO DE LAS AT-HMSCS-3D EN LA REGENERACIÓN MUSCULAR.....	41
7.3 ADQUISICIÓN DE COMPROMISO MIOGÉNICO DE LAS CÉLULAS AT-HMSCS-3D	45
8. CONCLUSIONES	48
9. REFERENCIAS	49
10. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: ACTIVACIÓN, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SATÉLITE.	13
FIGURA 2: FACTORES REGULATORIOS DE LA HOMEOSTASIS DE LAS CÉLULAS SATÉLITE.	14
FIGURA 3: CRIOSECCIONES DE MÚSCULO GASTROCNEMIO DAÑADO POR CONGELACIÓN CON TINCIÓN DE HEMATOXILINA & EOSINA.	26
FIGURA 4: CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA NECRÓTICA EN LAS SECCIONES DE MÚSCULO LESIONADO 7 Y 21 DÍAS PL.	27
FIGURA 5: ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LOS MÚSCULOS GASTROCNEMIOS SIN LESIÓN, 7 Y 21 DÍAS PL.	28
FIGURA 6: PORCENTAJE DE FIBRAS CENTRO NUCLEADAS DURANTE LA REPARACIÓN MUSCULAR.	29
FIGURA 7: TINCIÓN CON H&E EN CRIOSECCIONES DE MÚSCULOS LESIONADOS E INYECTADOS CON AT-HMSCs-3D O SOLUCIÓN SALINA 7 Y 14 DÍAS PL.	30
FIGURA 8: CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA DE NECROSIS POST INYECCIÓN DE CÉLULAS AT-HMSCs-3D 7 DÍAS PL.	31
FIGURA 9: ÁREA TRANSVERSAL DE FIBRAS MUSCULARES DE MÚSCULOS INYECTADOS CON AT-HMSCs-3D 7 DÍAS PL.	31
FIGURA 10: CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA DE NECROSIS POST INYECCIÓN DE CÉLULAS AT-HMSCs-3D LUEGO DE 14 DÍAS PL..	32
FIGURA 11: ÁREA TRANSVERSAL DE FIBRAS MUSCULARES DE MÚSCULOS INYECTADOS CON AT-HMSCs-3D 14 DÍAS PL.	33
FIGURA 12: CONTENIDO DE FIBRAS REGENERATIVAS 7 Y 14 DÍAS PL EN MÚSCULOS INYECTADOS CON AT-HMSCs-3D.	34
FIGURA 13: CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA FIBRÓTICA EN LAS SECCIONES DE MÚSCULO LESIONADO 14 DÍAS PL.	35
FIGURA 14: INTEGRACIÓN DE CÉLULAS AT-HMSCs-3D INYECTADAS EN MÚSCULOS LESIONADOS.	36
FIGURA 15: EXPRESIÓN DE MYOD EN AT-HMSCs-3D IN VITRO.	37
FIGURA 16: EXPRESIÓN DE MYH1 EN AT-HMSCs-3D IN VITRO.	37
FIGURA 17: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MRNA DE MYH1 EN LOS CULTIVOS INDUCIDOS A DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA.	38
FIGURA 18: EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE MIOTUBOS HÍBRIDOS EN COCULTIVOS DE CÉLULAS C2C12 CON AT-HMSCs-3D	39
FIGURA SUPLEMENTARIA 1: TINCIÓN DE VAN GIESON PARA DETECTAR FIBROSIS EN CORTES DE MÚSCULO DAÑADO E INYECTADO 14 DÍAS PL.	55
FIGURA SUPLEMENTARIA 2: ESFEROIDES 3D DE CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS EN CULTIVO.	55
FIGURA SUPLEMENTARIA 3: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MRNA DE MYOD EN LOS CULTIVOS INDUCIDOS A DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA.	56

ABREVIATURAS

ADSCs: Células madre de tejido adiposo	MD: Medio de diferenciación
AINE: Antiinflamatorio no esterooidal	MGF: Factor de crecimiento mecánico
AT-hMSCs-3D: Células madre mesenquimales de tejido adiposo humano en esferoides	MNCs: Células mononucleares
bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico	MPC: Células progenitoras musculares
BM-MSCs: Células madre mesenquimales de medula ósea	MRFs: Factores reguladores miogénicos
BSA: Albumina de suero bovino	mRNA: RNA mensajero
CCL-2: Ligando de quimioquinas 2	MSCs: Células Madre Mesenquimales
cDNA: DNA codificante	MYH: Miosina
CO₂: Dióxido de carbono	MyoD: Proteína 1 de diferenciación miogénica
CSA: Área de sección transversal	NO: Óxido nítrico
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol	PBS: Buffer fosfato salino
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium	PCR: Polimerase chain reaction
DNA: Ácido desoxirribonucleico	PD-L1: Ligando 1 de muerte programada
ESCs: Células madre embrionarias	PFA: Paraformaldehído
ECM: Matriz extracelular	PGE2: Prostaglandinas E2
FBS: Suero fetal bovino	PL: Post lesión
FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos	PLA: Lipoaspirado procesado
hfMSCs: Células madre mesenquimales fetales humanas	qPCR: PCR cuantitativo
HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos	RNA: Ácido ribonucleico
H&E: Hematoxilina y eosina	RT-qPCR: quantitative reverse transcription polimerase chain reaction
HS: Suero de caballo	TSG6: TNF α -stimulated gene-6
IDO: Indolamina 2,3 dioxigenasa	TA: Tibialis anterior
IGF1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1	VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
iPSCs: Células madre pluripotentes inducidas	VML: Pérdida muscular volumétrica

RESUMEN

El músculo se caracteriza por tener una robusta capacidad regenerativa frente a lesiones menores, pero dependiendo del tipo, gravedad y cantidad de tejido afectado, la recuperación podría ser incompleta y no recobrar la funcionalidad original.

Las terapias actuales no garantizan una completa recuperación. Lo que supone un reto para el desarrollo de nuevos tratamientos que permitan recuperar la musculatura lesionada de forma expedita, resultando en un tejido de calidad y funcional

La investigación biomédica trabaja en el desarrollo de tecnologías que apuntan a la recuperación del tejido dañado a nivel funcional, estructural y estético. Siendo el principal enfoque la terapia con células madre mesenquimales (MSCs) como coadyuvantes para la reparación tisular.

El desarrollo de nuevas formas de cultivo de MSCs en conformación esférica (3D) ha tomado gran atractivo como herramienta para potenciar sus características inmunomoduladoras, proangiogénicas y capacidad de diferenciación, entre otras.

Por tanto, se plantea que la inyección local de esferoides de células madre mesenquimales provenientes de tejido adiposo humano (AT-hMSCs-3D) favorecerían la regeneración muscular en un modelo murino de lesión muscular severa.

En este trabajo se caracterizó un modelo de daño muscular por congelación para probar el potencial regenerativo de una nueva formulación de esferoides de MSCs de tejido adiposo humano (AT-hMSCs-3D).

Para lo anterior se estandarizaron las formas de medición y análisis histológicos para determinar la magnitud y progresión de la lesión. Y se realizó un estudio a nivel celular y molecular sobre el potencial miogénico de las AT-hMSCs-3D tanto *in vitro* como en cocultivo con células musculares.

Nuestros resultados arrojan que luego de un daño severo por congelación, el músculo lesionado se recupera casi por completo a los 21 días post lesión, presentando importantes zonas de necrosis y fibrosis que van disminuyendo con el tiempo, para dar paso a un tejido muscular de reparación.

Se observó que la inyección de las AT-hMSCs-3D logra inducir una leve mejoría en la velocidad de recuperación de las zonas dañadas en el modelo de lesión por congelación, medidas a los 14 días post lesión.

Finalmente, pese a que las AT-hMSCs-3D tienen potencial miogénico cuando son estimuladas con medios adecuados *in vitro*, no se pudo observar integración alguna de las células AT-hMSCs-3D a estructuras musculares tanto en los ensayos *in vivo* como en cocultivo *in vitro*. Por lo que, las mejorías observadas en la progresión de la reparación luego de la lesión dejan suponer un mecanismo más relacionado con el efecto de moléculas secretadas por las AT-hMSCs-3D.

ABSTRACT

MUSCLE REGENERATION BY LOCAL INJECTION OF SPHEROIDAL HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS (AT-hMSCs-3D) IN A MURINE MODEL OF SEVERE MUSCLE INJURY.

Skeletal muscle is characterized by a robust regenerative potential when exposed to minor injuries although the grade of functional recovery depends on the type, severity and amount of affected tissue.

At present, full recovery cannot be guaranteed with standard therapies. In that way, novel treatments have the purpose of accelerating muscle regeneration and producing a higher quality and functional muscle tissue.

Biomedical research follows that goal through technologies meant to recover tissues at functional, structural and esthetic level. The most used approach is mesenchymal stem cells (MSCs) therapy as a coadjuvant of regenerating tissue.

The development of new strategies of MSCs culture on a spheroidal shape (3D) has emerged as an attractive tool to potentiate immunomodulator, proangiogenic and differentiation capacities of MSCs.

We hypothesize that local injection of MSCs cultured in tridimensional-shape spheroids obtained from human adipose tissue (AT-hMSCs-3Ds) improve muscle regeneration in a murine model of severe injury.

In this work, a model of severe muscle cryoinjury was characterized in order to assess the regenerative potential of a new spheroidal culture formulation of AT-hMSCs.

For this purpose, the measures and histologic analysis were standardized to determine the magnitude and progression of injury. Also, we studied the myogenic potential of AT-hMSCs-3Ds *in vitro* and co-cultured with muscle cells conditions at the cellular and molecular level.

Our results show that at 21 days after severe muscle injury by freezing, the muscle seemed to be almost fully recovered, exhibiting major zones of necrosis and fibrosis that were decreasing over time, giving rise to a muscle tissue in repair.

The injection of AT-hMSCs-3Ds produced a mild improvement in regeneration time of damage zones measured at 14 days post-injury.

Although the AT-hMSCs-3Ds have myogenic potential when stimulated properly *in vitro*, we did not observe integration of these cells in either, damaged tissue *in vivo* or co-culture with muscle cells *in vitro* conditions. Thus, the likely mechanism whereby AT-hMSCs-3Ds produce an improvement in regenerating tissue can be associated with the trophic factors released by them.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Músculo esquelético.

El músculo esquelético es uno de los tejidos más abundantes del cuerpo humano, y cumple importantes funciones como generar movimiento, fuerza y regular el metabolismo (Frontera & Ochala, 2015; Yin et al., 2013). Su unidad básica es la miofibra, célula multinucleada de forma alargada con característica contráctil que se forma durante el desarrollo embrionario por fusión de mioblastos (progenitores mesodérmicos) (Yin et al., 2013)

El músculo se caracteriza por tener una robusta capacidad regenerativa frente a lesiones menores, pero dependiendo del tipo, gravedad y cantidad de tejido afectado, la recuperación podría ser incompleta y no recobrar la funcionalidad original (Caseiro et al., 2015).

Independiente del tipo de lesión, el proceso de reparación luego de un daño en el músculo consta de 3 fases principales: (1) Degeneración e inflamación, primera semana post lesión. Se caracteriza por la ruptura y necrosis de miofibras, inflamación y formación de hematoma (Delos et al., 2013). (2) Entre la segunda y cuarta semana comienza la fase de Regeneración, donde se produce la fagocitosis del tejido dañado, seguido de la regeneración de las miofibras por activación, proliferación y diferenciación de las células satélite en nuevas miofibras (Delos et al., 2013; Huard et al., 2002; Laumonier & Menetrey, 2016). Junto con esto, a partir de la segunda semana en adelante se produce tejido conectivo fibroso, proceso que dificulta la regeneración muscular y evita la recuperación de la fuerza total en el músculo esquelético lesionado (Sato et al., 2003). (3) La fase de Remodelación ocurre a partir de la tercera semana y puede tomar desde semanas a meses en finalizar (Delos et al., 2013). En esta última fase ocurre la maduración de las miofibras regeneradas, la recuperación de la capacidad funcional del músculo y formación del tejido cicatrizante (Huard et al., 2002; Laumonier & Menetrey, 2016)

En 1961 Alexander Mauro describe por primera vez a las células satélite, denominándolas como tal por su ubicación periférica entre el sarcolema y la lámina basal. Además de ser el primero en señalarlas como las posibles responsables de la regeneración muscular (Mauro, 1961).

Las células satélites se encuentran mitóticamente quiescentes en el tejido muscular sano y se activan frente a diversos estímulos de estrés o daño, desencadenando una serie de eventos que recapitulan en parte lo que se observa en la miogénesis embrionaria: proliferación, generación de mioblastos

comprometidos, diferenciación a miocitos y fusión, entre sí para formar nuevas fibras o con el tejido dañado para repararlo (Figura 1) (Chang & Rudnicki, 2014; Yin et al., 2013).

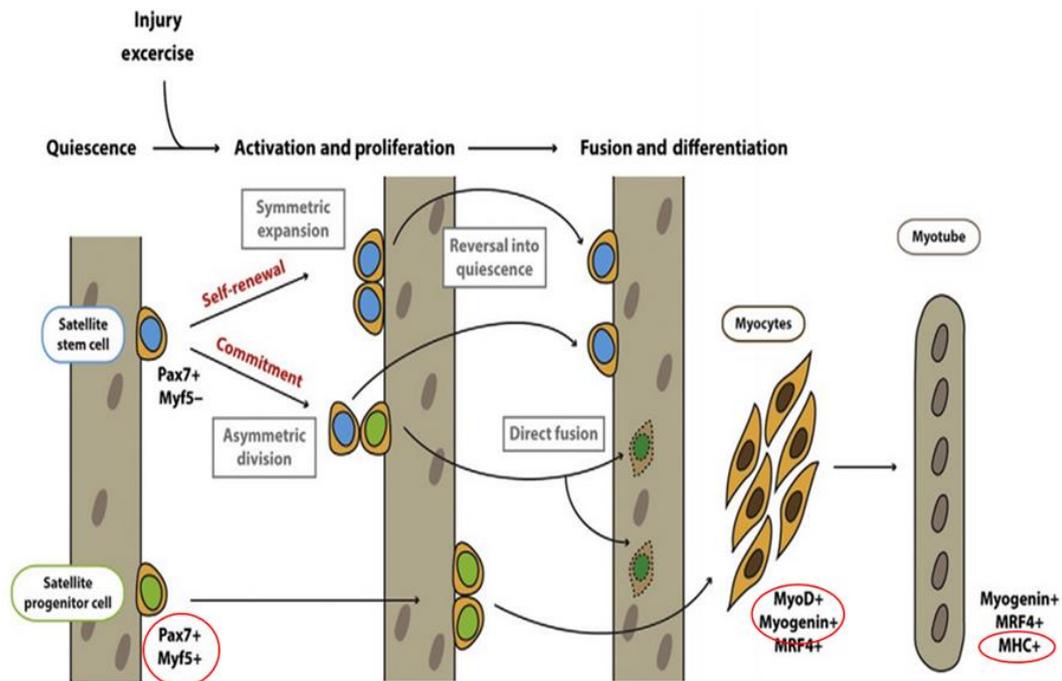


Figura 1: Activación, proliferación y diferenciación de células satélite. Modificado de Chang, N.C., & Rudnicki, M.A. (2014)

Es posible identificar a las células satélite por la expresión de marcadores específicos que incluyen los factores de transcripción Pax-7, Pax-3, Myf5 y cMet, entre otros. Pax7 es el biomarcador canónico expresado tanto en su estado quiescente como proliferativo a lo largo de múltiples especies, incluida el ser humano (Yin et al., 2013).

Rio abajo de Pax-7, los factores regulatorios miogénicos (MRFs, por sus siglas en inglés) son los responsables de la especificación de las células satélite a linajes miogénicos, así como de la regulación de la diferenciación miogénica (ver Figura 1). *MYF5* y/o *MYOD* son rápidamente regulados positivamente seguido de la activación de las células satélite. Por otra parte, *MYOG* es un blanco directo de MyoD y se expresa en las etapas terminales de la diferenciación donde ya no hay expresión de Pax-7 (Chang & Rudnicki, 2014)

Las células satélite se ven influenciadas por una variedad de señales estructurales y bioquímicas procedentes de las estructuras que componen el entorno, su nicho, tales como las miofibras; motoneuronas; células vasculares y matriz extracelular (ECM), entre otros. Estas interacciones célula – célula o mediante moléculas difusibles generan una dinámica regulatoria en ambas direcciones que

mantiene la homeostasis y regeneración del tejido muscular, además de influir específicamente sobre la quiescencia, auto renovación, proliferación y diferenciación de las células satélite (Bentzinger et al., 2010; Pisconti et al., 2016; Yin et al., 2013).

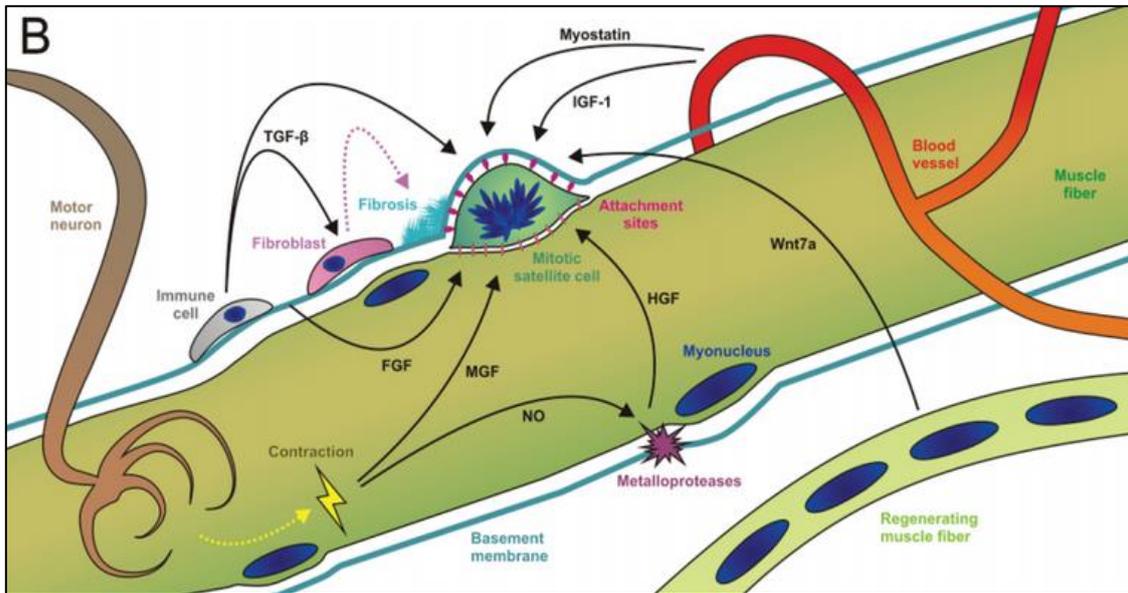


Figura 2: Factores regulatorios de la homeostasis de las células satélite. Modificado de Bentzinger, C.; Von Maltzahn, J. & Rudnicki, M. A. (2010).

Algunas de estas señales son factores que promueven la activación de las células satélite como por ejemplo el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) que tienen acción sobre la proliferación y diferenciación de mioblastos. Por otra parte, el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β, por sus siglas en inglés) inhibiría la proliferación y diferenciación *in vitro*. Otros factores que influyen el nicho de maneras similares son el factor de crecimiento mecánico (MGF, por sus siglas en inglés), Miostatina y Wnt7a (ver Figura 2) (Bentzinger et al., 2010; Laumonier & Menetrey, 2016; Yin et al., 2013).

La comprensión de la dinámica de interacción entre las células progenitoras musculares y su nicho es un paso ineludible para el desarrollo de terapias que promuevan la regeneración muscular para tratar enfermedades o afecciones musculares de cualquier tipo.

1.2 Lesiones Musculares.

Las lesiones musculares son observadas comúnmente en todo ser humano activo, siendo mayormente asociadas a las prácticas deportivas, y pueden implicar daño de las fibras musculares y/o del tejido conectivo que las rodea. Sin embargo, existen otros escenarios traumáticos que pueden

llevar a generar lesiones musculares severas, tales como los accidente vehiculares, laborales y lesiones de guerra. Así también podemos mencionar aquellas lesiones “intencionales” causadas en las intervenciones quirúrgicas masivas (cirugías de vesícula, apéndice, reemplazo de cadera, cesáreas, etc.).

En Estados Unidos, 1 de cada 10 personas reportaron una lesión músculo esquelética que causó faltas al trabajo en el 2005; esta cantidad equivale a 72.1 millones de días de trabajo perdido. Todos los atletas, sean profesionales o recreativos, son potencialmente afectados por lesiones. Las lesiones deportivas contribuyen a perder tiempo de trabajo, salarios perdidos y cambios en la salud emocional y social debido a deficiencias en la función y movilidad (Ajibade et al., 2014).

Las lesiones tienden a ocurrir a través de 2 mecanismos principales; el músculo es sometido a una súbita y directa fuerza de compresión, dando como resultado una lesión traumática (contusión, distensión o desgarro) o es sometido a una excesiva fuerza de tensión, resultando en el daño de las miofibras y posible ruptura del tejido (Delos et al., 2013).

El tratamiento estándar para las lesiones de tejidos blandos y lesiones deportivas consiste en la técnica “RICE”, acrónimo en inglés de “Rest, Ice, Compression, and Elevation” (Mirkin & Hoffman, 1978). Junto con el RICE también pueden utilizarse antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inyección de corticosteroides y terapia física (Baoge et al., 2012). Ciertos estudios muestran que el bloqueo de la inflamación con AINE incluso retrasaría la reparación de la herida (Dueweke et al., 2016). En el caso de lesiones severas, estos tratamientos conservadores no logran la regeneración de un tejido completamente funcional, lo que incrementa el riesgo de sufrir nuevas lesiones en el mismo sitio, aumentando la gravedad y el tiempo de recuperación de estas y pudiendo transformarse, incluso, en lesiones crónicas.

Actualmente, la investigación biomédica desde distintas áreas (biomateriales, aplicación de sistemas celulares y moléculas bioactivas) trabaja en el desarrollo de tecnologías que apuntan a la recuperación del tejido dañado a nivel funcional, estructural y estético.

Clínicamente, la calidad de la curación del tejido es importante para el rendimiento de un atleta; La curación puede potenciarse y acelerarse mediante la adición de células madre a entornos locales para promover la curación (Ajibade et al., 2014).

1.3 Células Madre.

Las células madre se han posicionado como una de las principales alternativas en la estrategia terapéutica más recientes.

Estas se caracterizan por: (1) Su capacidad para mantenerse en estado quiescente e indiferenciado hasta que es estimulada; (2) su habilidad para diferenciarse en múltiples linajes de tejido; (3) y su capacidad para auto renovarse. Este tipo de células son variadas y tienen diferente capacidad de diferenciación. La totipotencialidad es una característica única de las células embrionarias, presente exclusivamente en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario, quiere decir que el cigoto y el blastómero tempranos son los únicos tipos de células totipotenciales y son capaces de formar todos los tipos de tejidos y células de un organismo además del tejido extraembrionario necesario para su desarrollo. En las siguientes etapas del desarrollo el embrión pierde su totipotencialidad y pasa a tener un potencial de diferenciación denominado pluripotente, lo que quiere decir que tienen la capacidad de diferenciarse a todos los tipos de células del organismo, generando las 3 líneas germinales; mesodermo, endodermo y ectodermo. Las células madre multipotenciales son aquellas que pueden diferenciarse en solo una de las líneas germinales y las células unipotentes, también denominadas células precursoras, solo pueden generar un tipo de células (Ajibade et al., 2014; Archacka et al., 2018).

Todos los tipos de tejidos de interés en la medicina deportiva, como son el cartílago, hueso, músculo, tejido adiposo y fibroblastos, son derivados de las células madre mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés) de la capa de células germinales mesodérmicas. Por lo que las MSCs son de particular interés por su capacidad terapéutica (Ajibade et al., 2014).

Se ha explorado tanto el uso de células madre residentes en el músculo como no musculares en búsqueda de una recuperación más rápida y efectiva para lesiones severas, y que sean capaces de restablecer la estructura y función.

Las primeras terapias celulares en músculo fueron desarrolladas a partir del uso de progenitores del músculo esquelético (MPCs, por sus siglas en inglés) como de células satélite, sin embargo, su uso se vio limitado debido a su disminuida viabilidad, baja estabilidad en su obtención y pérdida de potencial regenerativo al expandirse en cultivo (Caseiro et al., 2015).

Dado estos resultados se optó por probar con otras fuentes celulares no musculares con capacidad de diferenciación hacia linaje miogénico como por ejemplo las células madre embrionarias (ESCs, por

sus siglas en inglés), las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, por sus siglas en inglés) y también con las MSCs con característica de diferenciación multipotente.

Si bien, tanto las ESCs como iPSCs tienen un gran potencial de diferenciación, es necesario ser muy cuidadoso en su utilización debido al efecto que pueden generar las modificaciones genéticas empleadas en estas células para guiar su diferenciación a tejidos específicos, tales como la formación de teratomas en el tejido trasplantado (Forcales 2015). Por estos antecedentes es que se ha preferido guiar la investigación hacia la utilización de las MSCs, una alternativa más segura y éticamente aceptable.

Las MSCs tienen la ventaja de ser células no especializadas capaces de auto renovarse, mantener la habilidad para diferenciarse a diferentes tipos celulares *in vitro* y es posible obtenerlas de diversas fuentes tales como: medula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical, membrana sinovial, pulpa dental, entre otros (Caserio et al., 2015).

Además, las células MSCs apoyan la regeneración tisular mediante diferenciación directa gracias a su potencial multilíneas y vía secreción de factores tróficos que estimulan el proceso natural de reparación del tejido (Wei et al., 2013; Karimineko et al., 2016).

Algunos de los factores tróficos secretado por las células MSCs coinciden con los mediadores antes mencionados y que participan en la regulación de las células satélite y su nicho: IGF-1; factores de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, por sus siglas en inglés); HGF; mediadores inmunosupresores inducibles bajo estímulos inflamatorios, óxido nítrico (NO). Además de otros que también promueven la reparación: IL-6, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO); prostaglandinas E2 (PGE2); proteína del gen 6 inducible por el factor de necrosis tumoral (TSG6, por sus siglas en inglés); ligando de quimioquinas 2 (CCL-2 por sus siglas en inglés) y el ligando 1 de muerte programada (PD-L1, por sus siglas en inglés) (Hofer & Tuan 2016; Wei et al., 2013; Karimineko et al., 2016).

Las MSCs de la medula ósea (BM-MSCs) son a la fecha las más caracterizadas y clínicamente usadas, por ser la primera fuente desde donde se aislaron por Friedenstein y colaboradores en 1976 (Forcales 2015; Friedenstein et al., 1976). Sin embargo, su método de obtención resulta doloroso e invasivo, por lo que se ha trabajado en la utilización de MSCs provenientes de otras fuentes.

Las MSCs de tejido adiposo (ADSCs, por sus siglas en inglés) aisladas por primera vez por el equipo de Zuk el 2001 resultan tener el mismo potencial de diferenciación antes descrito para las BM-MSCs, mostrando su multipotencialidad no solo hacia linaje adipogénico, sino también osteogénico, condrogénico, neurogénico y miogénico en cultivos con medios definidos (Zuk et al., 2001). Además de presentar propiedades inmunosupresoras, antiinflamatorias y angiogénicas mediante la liberación de mediadores solubles de manera paracrina. Lo anterior junto con la facilidad de su aislación y su gran abundancia hacen de las ADSCs una atractiva y práctica fuente de células madre multipotentes en el campo de la regeneración (Varghese et al., 2017).

Mizuno y colaboradores el 2002 lograron *in vitro* la expresión de uno de los marcadores tempranos de diferenciación miogénica, MyoD, luego de 1 semana de cultivo de ADSCs de lipoaspirado humano en medios de diferenciación. Luego de 6 semanas observaron la expresión de miosina, marcador característico de una etapa más terminal de la diferenciación hacia músculo (Mizuno et al., 2002).

Otros grupos de investigadores utilizando el mismo protocolo descrito por Zuk y colaboradores (2001), lograron resultados similares en cuanto a la expresión de genes miogénicos tanto con ADSCs de ratón como de humano *in vitro*, también bajo el mismo protocolo de cultivo se probaron ADSCs *in vivo* (Forcales 2015).

Se ha probado también este tipo de células *in vivo* en modelos de distrofia muscular (ratones mdx) y modelos de daño muscular (cardiotoxina, mioectomias, entre otros), incluso en modelos caninos de desgarramiento muscular (De La Garza-Rodea et al., 2012; J. Hwang et al., 2013; Forcales 2015; Huang et al., 2017; Brown et al., 2012).

Sin embargo, la baja eficiencia terapéutica debido a la morbilidad de las células trasplantadas, a causa de las condiciones hipóxicas e inflamatorias de un tejido lesionado es una de las principales limitaciones en las terapias celulares (Bhang et al., 2012; Petrenko et al., 2017).

Uno de los ejes de la investigación que se ha abordado para superar estas limitaciones se relaciona con la mejora en las condiciones de entrega de las células (cantidad, vía de inyección, vehículo y tiempo adecuado) así como la estandarización del proceso de manufactura mismo de las células extraídas de los distintos tejidos para potenciar sus capacidades regenerativas e inmunomoduladoras.

Bajo esta noción varias publicaciones reportan que el procedimiento de cultivo en agregados de MSCs incrementaría su potencial terapéutico (Bartosh et al., 2010; Bhang et al., 2012; Laschke & Menger 2017), incluyendo estudios preclínicos en modelos animales de desórdenes osteocondrales, cardiovasculares e isquémicos y cicatrizantes (Petrenko et al., 2017).

Se describe que la organización celular en 3D potencia la interacción célula – célula e imita las condiciones fisiológicas de los tejidos, comprado con los cultivos en monocapa 2D tradicionales. Además, se potencian las propiedades antiinflamatorias y angiogénicas de las MSCs mediante la expresión y liberación de factores de crecimiento y citoquinas; incrementa sus características de células madre, “stemness” y se facilita la diferenciación a diferentes linajes celulares, así como mejora la sobrevivencia de las células trasplantadas (Petrenko et al., 2017; Laschke & Menger 2017).

Las MSCs como esferoides son una aproximación prometedora para mejorar la eficiencia del trasplante de células en la terapia celular debido a las condiciones hipóxicas que se establecen en el núcleo de estas estructuras por la limitada difusión de nutriente que preconditiona las células para resistir en microambiente hipóxico e inflamatorio de los tejidos isquémicos. Este proceso resulta en una potenciada secreción de factores antigénicos como antiapoptóticos, así como describe en su investigación el grupo de Bhang (Bhang et al., 2012).

De acuerdo con todo lo descrito anteriormente es que nace la oportunidad de desarrollar un proyecto que se enfoca en aprovechar los beneficios de utilizar una nueva tecnología de manufactura para potenciar la terapia de células madre en un tejido fundamental en el diario vivir, como lo es el músculo esquelético. Y se postula la siguiente hipótesis.

2. HIPÓTESIS

La inyección local de esferoides de células madre mesenquimales provenientes de tejido adiposo humano (AT-hMSCs-3D) favorece la regeneración muscular en un modelo murino de lesión muscular severa.

3. OBJETIVO GENERAL

Medir la efectividad de la inyección intramuscular con AT-hMSCs-3D en el favorecimiento de la reparación del tejido muscular y proponer mecanismo de acción.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar los cambios morfológicos asociados al daño muscular severo producidos por congelación en cepa BalbC.
2. Medir los efectos en la regeneración muscular luego de la inyección local de AT-hMSCs-3D y la presencia de AT-hMSCs-3D en el tejido dañado post lesión mediante análisis histológicos.
3. Determinar la capacidad de diferenciación miogénica de AT-hMSCs-3D *in vitro* con medio de diferenciación y en cocultivo con células musculares.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales.

Se utilizaron ratones machos Balb/C de 6 a 8 semanas, provenientes del bioterio central de la facultad de medicina de la Universidad de Chile, acorde a los protocolos aprobados por el comité de bioética de la facultad de medicina, Universidad de Chile. Se mantuvieron en una habitación con temperatura constante entre 21-23°C y ciclos de luz-oscuridad de 12:12 hrs.

5.2 Modelo de lesión muscular para caracterización e inyección de AT-hMSCs-3D.

Los animales fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina y Xilacina (Dosis anestésica: 100mg/kg + 10mg/kg respectivamente). El músculo gastrocnemio derecho fue expuesto mediante una pequeña incisión en la piel, previamente afeitada. Para generar la lesión por congelación se utilizó una paleta de material quirúrgico de 1 cm de largo y 0,5 cm de ancho, la cual se colocó en nitrógeno líquido por 10 segundos para luego inmediatamente posarse sobre el músculo expuesto por 15 segundos sin presionar. Este procedimiento se repitió 3 veces. Al finalizar se cerró la piel con hilo de sutura absorbible Safil[®] 4/0 (n = 3 a 4, por grupo de observación. Ver figuras).

5.3 Inyección en músculos lesionados.

AT-hMSCs-3D/100 µl de solución salina fueron inyectadas 24 hr post lesión (PL) del músculo gastrocnemio. Se utilizó como control músculos lesionados inyectados sólo con solución salina. n = 3 o 4 para cada grupo de observación. Las células AT-hMSCs-3D fueron obtenidas, procesadas y caracterizadas por Cellus Medicina Regenerativa S.A. El mismo día de inyección fueron trasladadas y entregadas.

5.4 Caracterización histológica del modelo de lesión por congelación.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a los 7 y 21 días PL. Ambos músculos gastrocnemios fueron diseccionados, lesionado y contralateral sano, e inmediatamente congelados en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Se cortaron secciones de 12µm de espesor con criostato (Criostato Leica CM1510 S), se realizó 1 corte a 3 profundidades distintas a lo largo del músculo (3 cortes por n). Las secciones fueron teñidos con Hematoxilina de Harris y Eosina (H&E) y con la tinción de Van Gieson de acuerdo con los protocolos convencionales de histología (López, Leyton and Graf, 1982). Los cortes fueron visualizados con microscopio de campo claro (Leica DM1000 LED, Leica Microsystems) a un aumento de 4x barriendo el área completa de al menos 3 secciones diferentes por músculo y 20x de al menos 5 áreas representativas del corte. Las imágenes fueron capturadas

con cámara Leica (Leica DFC295, Leica Microsystems) Para procesar las imágenes se utilizó el programa ImageJ (NIH). Para cuantificar el área necrótica/fibrótica del área completa del músculo se utilizó la extensión “color deconvolution”, que permite separar los componentes de la tinción. El área total del tejido fue determinada con la imagen original, mientras que el área del tejido sano fue determinada mediante el umbral de señal (threshold) automático medido sobre el componente de eosina luego de aplicar “color deconvolution” para la tinción específica de H&E en ImageJ (van Putten et al. 2010). La fibrosis se determina midiendo directamente el contenido colágeno en los cortes preparados con la tinción de Van Gieson, utilizando el mismo procedimiento. De esta forma se obtiene el total de área necrótica/fibrótica: $(\text{área total} - \text{área sana}) / \text{en el área total}$ y área fibrótica/área total respectivamente (Grounds, 2010). El área positiva para necrosis o fibrosis en los músculos sin lesión fue tomada como falso positivo producido por el umbral de detección, es decir, el área que el software interpreta como necrosis/fibrosis sin serlo fue restado de los valores obtenidos para las mediciones a 7, 14 y 21 días PL según corresponda. La determinación de la distribución del área de la sección transversal de las fibras se realizó mediante la cuantificación del área de al menos 1000 fibras por animal, provenientes de tres cortes a distintas posiciones del eje anteroposterior del músculo, teñidos con H&E como fue descrito anteriormente (n=3 por grupo de observación). A partir de las mismas imágenes se obtuvo el porcentaje de fibras centro nucleadas en los cortes a 7 y 21 días PL. Todos los parámetros analizados fueron comparados con el músculo gastrocnemio contralateral sano.

5.5 Evaluación histológica de la regeneración muscular en músculos lesionados y tratados con AT-hMSCs-3D.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a los 7 y 14 días PL. Los músculos gastrocnemios lesionados y tratados con AT-hMSCs-3D o solución salina fueron diseccionados e inmediatamente congelados en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Se cortaron secciones de 12µm de espesor con criostato (Criostato Leica CM1510 S) 3 cortes en 3 puntos de profundidad a lo largo del músculo para realizar los análisis histológicos utilizando las tinciones de H&E o de Van Gieson de acuerdo a la metodología descrita anteriormente y para realizar las evaluaciones de integración por inmunofluorescencia.

5.6 Ensayos de diferenciación miogénica in vitro.

Las células mesenquimales esferoides 3D fueron diluidas en 200µl de medio para ser sembrados en placas de 35mm o cubre objetos de vidrio de 25mm pretratados con matriz de matrigel para su

adhesión a 37°C (aproximadamente 150 esferoides por placa). Luego de 1 hora se adicionó el total de medio de mantención compuesto por DMEM alto en glucosa (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. GIBCO) suplementado con penicilina, estreptomina (P/E) y 10% suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés). 24 horas posterior a la siembra se cambió el medio de diferenciación (MD): DMEM + 10% FBS + 5 % suero de caballo (HS, por sus siglas en inglés. Gibco) y se agregó hidrocortisona 50 µM (Merck) y dexametasona 0.1 µM (Merck) de acuerdo al protocolo de Zuk y colaboradores (Zuk et al., 2001). Se mantuvieron con MD por 3 semanas 37°C y 5% CO₂ con cambio de medio cada 2-3 días. Al final de este período las placas con cubre objeto fueron fijadas para su evaluación por inmunofluorescencia, mientras que el otro grupo de placas fue tratado con TRIzol® reagent (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA, USA) para proceder con la extracción de RNA total y su posterior evaluación por RT-qPCR.

5.7 Ensayos de cocultivo.

Las células mesenquimales esferoides 3D fueron diluidas en 200µl para ser sembradas en cubreobjetos de plástico de 25mm pretratados con matriz de matrigel para su adhesión a 37°C. Luego de 1 hora se adicionaron mioblastos de línea celular C2C12 con el total de medio de mantención compuesto por DMEM + P/E + 10% FBS. Las células C2C12 previamente fueron crecidas en medio de proliferación (DMEM+10% FBS) hasta alcanzar confluencia y tripsinizadas para su coincubación con los esferoides. 24 horas posterior a la siembra se cambió el medio a uno bajo en suero compuesto por DMEM + P/E + 2% HS, utilizado para inducir la diferenciación a miotubos de las células C2C12 y se mantuvo por 7 días a 37°C y 5% CO₂ con cambios de medio cada 2 días. Terminado el periodo de cultivo las placas fueron fijadas en PFA 4% para su evaluación por inmunofluorescencia.

5.8 Análisis de expresión de genes de músculo esquelético con RT-qPCR.

Para cuantificar la expresión de genes de compromiso miogénico a nivel del mRNA en los cultivos de AT-hMSCs-3D, se aplicó el método de RT-qPCR. El RNA total de las células cultivadas por 3 semanas se obtuvo empleando el reactivo TRIzol® reagent de acuerdo con el protocolo del fabricante. Previo a la síntesis de cDNA, se trató el RNA total extraído con TURBO DNA-free Kit (Invitrogen) para eliminar cualquier posible contaminación con DNA genómico, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración del RNA fue determinada mediante el espectrofotómetro para placas Epoch (BioTek Instruments, Inc.). La reacción de transcripción reversa se realizó con la enzima SuperScript II (Invitrogen) con hexámeros de secuencia aleatoria como partidores (Thermo Scientific) a partir de 0,5 µg de RNA total, de acuerdo con el protocolo del fabricante. La reacción para el PCR en tiempo

real se realizó con 1µl cDNA, 5x HOT FIREpol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) y los siguientes partidores (0,25µM cada uno): MyoD1: 5' - GCCACAACGGACGACTTCTA - 3' (sentido), 5'-GTGCTCTTCGGGTTTCAGGA - 3' (antisentido) generando un fragmento de 200pb; Myh1: 5' - CTCTCCTCTTTGTTGGGGCA - 3' (sentido), 5' - AGCACACCGTTACACCTCAG - 3' (antisentido) generando un fragmento de 247pb; P0: 5' - CTCCAAGCAGATGCAGCAGA - 3' (sentido), 5' - ATAGCCTTGCGCATCATGGT - 3' (antisentido) generando un fragmento de 87pb. Se utilizó el equipo Stratagene Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA, USA) para la amplificación con el siguiente ciclo: 1 ciclo de 95 °C durante 15 min; 40 ciclos de 95°C durante 15 s; 60°C durante 20 s; 72°C durante 20 s. La expresión relativa del mRNA de los genes blanco, se normalizaron con el control interno P0 y se analizaron los ΔC_t del grupo control y tratado con medio de diferenciación. El valor de CT fue determinado por el software MXPro. Los productos fueron resueltos en un gel de agarosa al 1,5% teñido con GelRed®.

5.9 Inmunofluorescencia.

Para evaluar la integración de las células AT-hMSCs-3D en los músculos inyectados, se realizó una tinción inmunofluorescente sobre 3 cortes de distinta profundidad a los músculos lesionados e inyectados 7 días PL (n=3). Las secciones fueron fijadas en paraformaldehído (PFA 4% en PBS), tratadas con glicina 100mM, permeabilizadas con 0,2% Triton X-100 en PBS, seguido por incubación con buffer de bloqueo (BSA 5% y 0,1% saponina en PBS) 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron diluidos 1:300 en buffer de bloqueo y las secciones incubadas toda la noche a 4°C. Se lavaron las secciones con PBS 1X y las secciones fueron incubadas en oscuridad a temperatura ambiente por 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes, diluidos 1:500 en buffer de bloqueo. Se utilizó DAPI (Invitrogen) para marcar los núcleos. Los anticuerpos primarios fueron anti-Laminina beta 1 producida en rata (dilución 1:300, ab44941, Abcam) y anti-Lamina A+C producida en conejo (dilución 1:300, ab108595, Abcam). Los anticuerpos secundarios fueron anticonejo H&L producida en burro (Alexa Fluor® 594) y antirata IgG H&L producida en cabra (Alexa Fluor® 488). Los cortes fueron montados con DAKO (Dako Fluorescent Mounting Medium, DAKO North América, Inc.) Fue usado un microscopio confocal C2 plus (Nikon Instruments Inc.) para la adquisición de imágenes.

En el caso de los cultivos de diferenciación y cocultivos, se realizó el mismo protocolo de inmunofluorescencia descrito anteriormente utilizando los siguientes anticuerpos primarios: anti-MyH producida en ratón (dilución 1:250, sc-376157, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-MyoD

producido en ratón (dilución 1:400, sc-377460, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y anti-Lamina A+C producida en conejo (dilución 1:300, ab108595, Abcam). En ambos casos se utilizó DAPI para marcar los núcleos. Fue utilizado un microscopio de epifluorescencia Cell Observer® con el sistema de registro EM-CCD (Carl Zeiss).

5.10 Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado mediante el programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los resultados de los ensayos se presentaron como promedio \pm error estándar del promedio (SEM). Se utilizó el test Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos. De acuerdo a los resultados de la prueba de normalidad se evaluaron los datos utilizando test no paramétrico Kruskal-Wallis o ANOVA de una vía para evaluar la caracterización histológica del modelo de lesión. Para evaluar los efectos del tratamiento y ensayos de diferenciación se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney o la prueba paramétrica t test de acuerdo a los resultados de la prueba de normalidad. Se consideró una diferencia significativa para valores de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización histológica de músculos a 7 y 21 días PL por congelación.

La evolución de la regeneración muscular se cuantificó midiendo el tamaño de la lesión según lo descrito en la metodología, a 7 y 21 días PL. En la Figura 3 se observan criosecciones de músculo gastrocnemio con tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E) de un músculo sano (A), 7 días PL (B) y 21 días PL (C). Se puede observar la magnitud del área dañada y la presencia de un frente regenerativo en el músculo (flechas negras. Figura 3B), lo que indica la zona desde donde comienza la regeneración. A 21 días PL (Figura 3C y D), se observa la disminución del área de tejido infiltrada y la aparición de numerosas fibras musculares con núcleos centrales (flecha amarilla), característica propia de fibras de reciente formación, concordante con el aspecto de un músculo en regeneración.

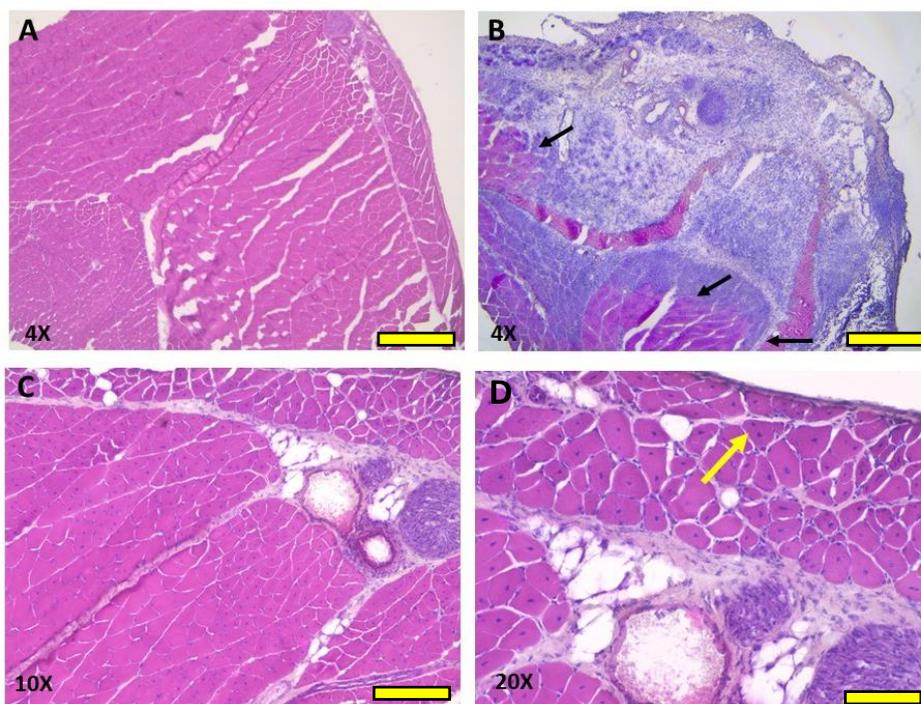


Figura 3: Criosecciones de músculo gastrocnemio dañado por congelación con tinción de Hematoxilina & Eosina. A) Músculo sano. Barra escala = 500 μ m B) 7 días PL. Barra escala = 500 μ m C) 21 días PL. Barra escala = 200 μ m y D) 21 días PL. Barra escala = 100 μ m. Las flechas negras indican el frente regenerativo. La flecha amarilla indica miofibra con nucleación central.

Del análisis cuantitativo de las imágenes de los cortes con tinción H&E, se observa que el músculo lesionado a los 7 días presenta una región que se asocia a necrosis que corresponde al 35,54 \pm 2.69 % del área total del corte transversal, mientras que a los 21 días PL el músculo se ha recuperado disminuyendo este valor a un 3.93 \pm 0.99 % del área total (Ver Figura 4).

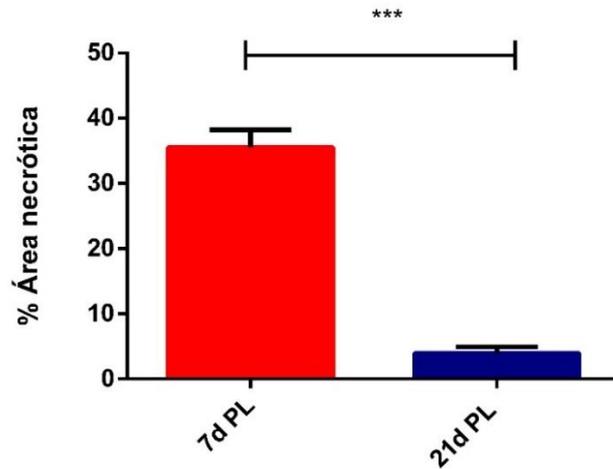


Figura 4: Cuantificación del área necrótica en las secciones de músculo lesionado 7 y 21 días PL. Se analizaron secciones provenientes de 3 puntos de profundidad distinta a lo largo del músculo gastrocnemios de cada n. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar (SEM) (n=4 para cada tiempo de estudio). ***: $p < 0,001$. Analizado con t test.

Con el fin de determinar cómo varía el tamaño de las fibras a medida que la lesión en el músculo va evolucionando, se midió el área de las secciones transversales de músculos sanos, a los 7 y 21 días PL. Se obtuvo también el porcentaje de fibras centro-nucleadas con respecto al total de fibras medidas. En el histograma de la Figura 5A, se observa que a 21 días PL, las fibras van retomando su distribución de tamaño a lo observado en la condición inicial sin lesión, mientras que a los 7 días esta distribución de tamaños se ve desplazada hacia valores de área más pequeños, indicando que un gran número de fibras tienen un tamaño menor al músculo sin lesionar, debido a que hay nuevas fibras en formación. Para cuantificar estas diferencias se graficó el área transversal promedio de las fibras por cada grupo (Figura 5B). Se observa una diferencia significativa entre los 3 tiempos de análisis (Sin lesión, $1994 \pm 9,896 \mu\text{m}^2$; 7 días PL, $1133 \pm 6,366 \mu\text{m}^2$; 21 días PL $1640 \pm 8.299 \mu\text{m}^2$).

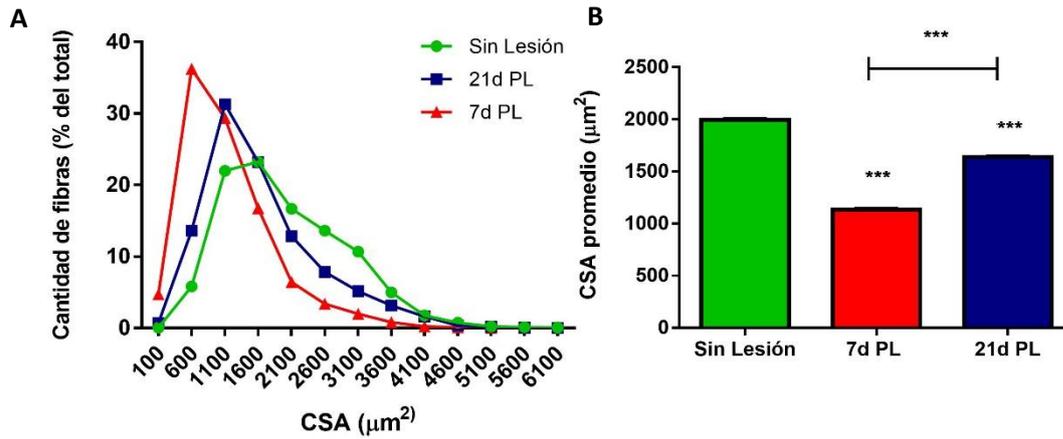


Figura 5: Análisis morfométrico de los músculos gastrocnemios sin lesión, 7 y 21 días PL. A) Histograma muestra la distribución del área transversal de fibras (CSA) (en μm^2) en el músculo gastrocnemio para cada tiempo de estudio: sin lesión (círculos verdes), 7 días PL (triángulos rojos) y 21 días PL (cuadrados azules). B) El gráfico muestra el área de sección transversal promedio de fibra (en μm^2) para cada grupo. Al menos 1000 fibras por n fueron medidas (obtenidas a partir de 5 fotos representativas de 3 secciones a distinta profundidad a lo largo del músculo gastrocnemio para cada n). Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n=3 para cada tiempo de estudio). ***: $p < 0,001$. Analizado con test de Kruskal-Wallis.

En la Figura 6 se puede ver que los porcentajes de fibras con núcleos centrales, marcador de reparación muscular en curso, a 7 y 21 días PL son significativamente elevados con $34.30 \pm 0.19\%$ y $27.10 \pm 1.41\%$ respectivamente de las fibras totales, comparado con músculos que no se encuentran en proceso regenerativo, los que presentan fibras con núcleos centrales en un $0.85 \pm 1.99\%$ de las fibras totales. Se evidencia además que, entre los dos tiempos de recuperación, 7 y 21 días, hay una disminución en el porcentaje de fibras centro nucleadas.

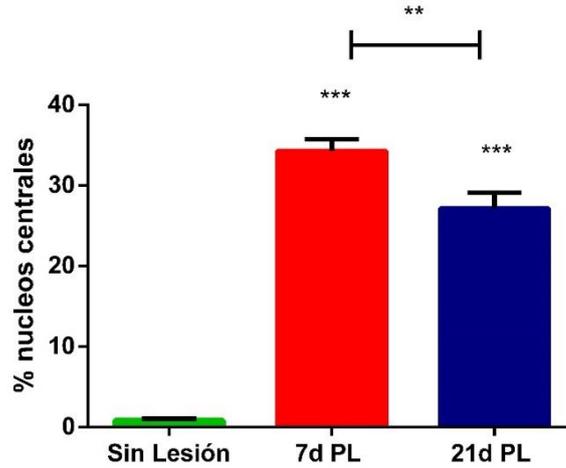


Figura 6: Porcentaje de fibras centro nucleadas durante la reparación muscular. El gráfico presenta el porcentaje de fibras que presentaron nucleación central en relación al total de fibras contadas. Para esto se contaron al menos 1000 fibras por n. Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n=3 para cada tiempo de estudio). ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$. Analizado con ANOVA de una vía.

6.2 Cambios en la velocidad de regeneración por inyección de AT-hMSCs-3D.

Con el objetivo de determinar si existen cambios en la velocidad de regeneración del músculo producto de la inyección de esferoides, se midió el área necrótica y fibrótica en secciones de músculo dañado con y sin inyección de AT-hMSCs-3D. Dado que a los 21 días PL el área que correspondía a tejido necrosado se encuentra prácticamente regenerada, se evaluó el efecto de la inyección de AT-hMSCs-3D a 7 y 14 días PL. En la Figura 7 se muestran las imágenes representativas de los cortes transversales de músculos dañados e inyectados con AT-hMSCs-3D o solución salina 7 y 14 días PL luego de una tinción de H&E.

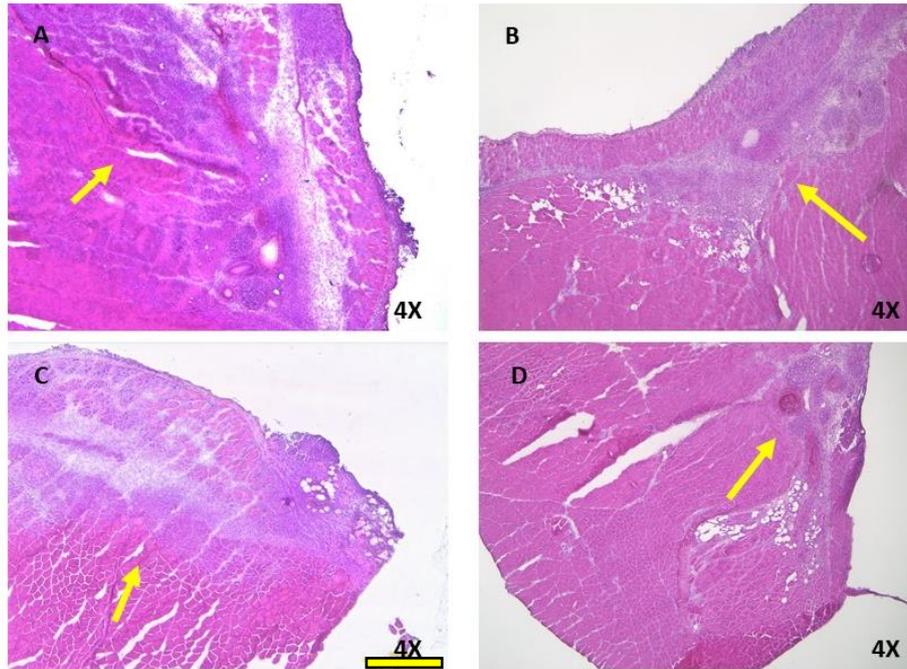


Figura 7: Tinción con H&E en criosecciones de músculos lesionados e inyectados con AT-hMSCs-3D o solución salina 7 y 14 días PL. Los paneles superiores corresponden a los músculos inyectados con AT-hMSCs-3D observados a los 7 (A) y 14 (B) días PL. Los paneles inferiores corresponden a los músculos control inyectados con solución salina a los 7 (C) y 14 (D) días PL. Las flechas amarillas indican las zonas de daño y tejido necrótico. Barra escala = 500 μm .

Al analizar los músculos lesionados e inyectados con solución salina o AT-hMSCs-3D 7 PL no se observan diferencias significativas entre ambos grupos, que presentan un área de necrosis de alrededor del 20% (Figura 8). Además, tanto el grupo tratado como el control presentan una distribución de tamaños de fibras casi idénticos (Figura 9A). Al graficar el promedio de áreas transversales tampoco se evidenció alguna diferencia significativa entre ambas condiciones (AT-hMSCs-3D, $1464 \pm 0.13,85 \mu\text{m}^2$; vehículo, $1453 \pm 13,17 \mu\text{m}^2$) (Figura 9B) a este tiempo de evaluación.

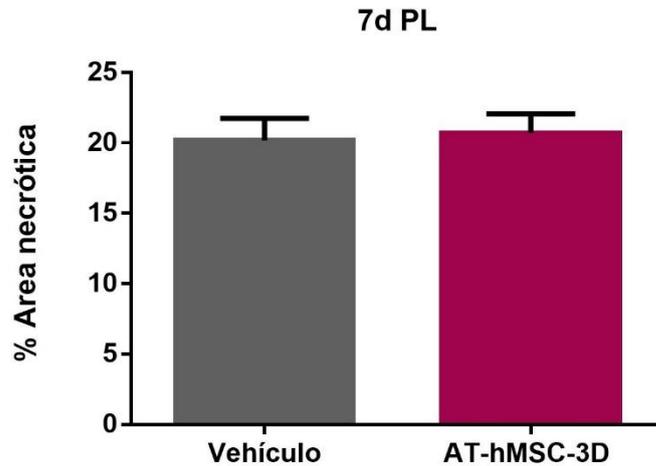


Figura 8: Cuantificación del área de necrosis post inyección de células AT-hMSCs-3D 7 días PL. En el gráfico se observa el porcentaje que corresponde al área de necrosis calculado para criocortes de músculos gastrocnemios que fueron lesionados e inyectados con células AT-hMSCs-3D (barra morada) o solución salina (barra gris) y analizado 7 días PL. Para esto se evaluaron al menos 3 cortes a distinta profundidad para cada n. Los resultados están expresados como porcentaje de área lesionada con respecto al área total del corte de músculo transversal \pm SEM (n=3 para cada grupo de estudio). Analizado con test de Mann-Whitney.

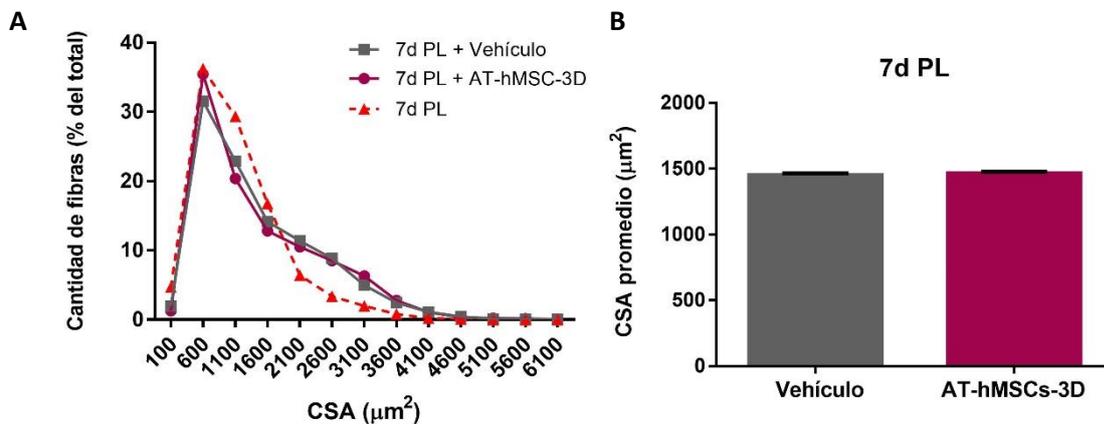


Figura 9: Área transversal de fibras musculares de músculos inyectados con AT-hMSCs-3D 7 días PL. Análisis morfométrico de los músculos gastrocnemios a los 7 días PL inyectado con AT-hMSCs-3D o solución salina (vehículo). A) Área de sección transversal de fibras individuales de los músculos gastrocnemios para cada condición: vehículo (cuadrados grises), esferoides 3D (círculos morados) y lesión sin inyección (triángulos rojos). Al menos 1000 fibras por n fueron medidas. B) El gráfico muestra el área de sección transversal promedio de fibra (en μm^2) para cada grupo. Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n=3 por grupo). Analizado con test de Mann Whitney.

Por otra parte, a los 14 días PL los músculos de los animales inyectados con AT-hMSCs-3D presentan una disminución significativa del área necrótica comparado con el grupo control. En este punto, los músculos inyectados con solución salina presentan un área necrótica promedio de $10.28 \pm 0.86 \%$, mientras que en el músculo inyectado con AT-hMSCs-3D, esta área disminuye a un $7.42 \pm 0.94 \%$ (Figura 10). Además, se observan diferencias entre los dos grupos en cuanto a su distribución de área transversal, donde los músculos inyectados con AT-hMSCs-3D presentan un área promedio de $1781 \pm 13,96 \mu\text{m}^2$, mientras que los músculos que recibieron la inyección con el vehículo tienen un área promedio de $1716 \pm 14,05 \mu\text{m}^2$ (Figura 11).

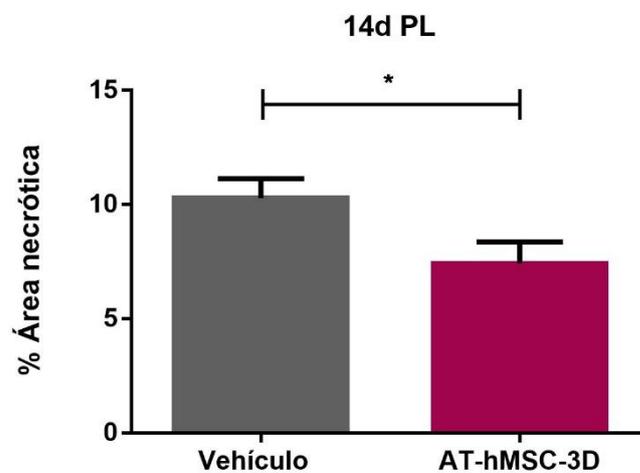


Figura 10: Cuantificación del área de necrosis post inyección de células AT-hMSCs-3D luego de 14 días PL. En el gráfico se observa el porcentaje que corresponde al área de necrosis calculado para criocortes de músculos gastrocnemios que fueron lesionados e inyectados con células AT-hMSCs-3D (barra gris) o solución salina (barra amarilla) y analizado a los 14 días posteriores de realizada la lesión. Para esto se evaluaron al menos 3 cortes en distinta profundidad para cada n. los valores están expresados como porcentaje de área lesionada con respecto al área total del corte de músculo transversal \pm SEM (n=3 para grupo inyectado con solución salina, n=4 para el grupo inyectado con AT-hMSC3D 14 días PL). *: $p < 0,05$. Analizado con test de Mann-Whitney.

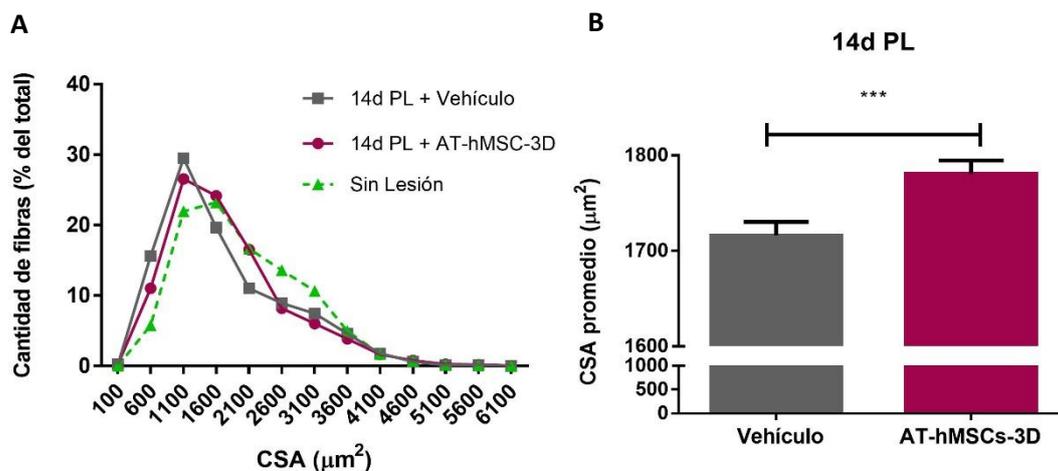


Figura 11: Área transversal de fibras musculares de músculos inyectados con AT-hMSCs-3D 14 días PL. Análisis morfométrico de los músculos gastrocnemios a los 14 días post criolesión inyectado con AT-hMSCs-3D o solución salina (vehículo). A) Área de sección transversal de fibras individuales de los músculos gastrocnemios para cada condición: vehículo (cuadrados grises), esferoides 3D (círculos morados) y sin lesión (triángulos verdes). B) El gráfico muestra el área de sección transversal promedio de fibra (en μm^2) para cada grupo. Al menos 1000 fibras por n fueron medidas (obtenidas a partir de 5 fotos representativas de 3 secciones a distinta profundidad a lo largo del músculo gastrocnemio para cada n). Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n=3 por grupo). ***: $p < 0,001$. Analizado con test de Mann Whitney.

Tanto a los 7 como a los 14 días PL, no se reportan diferencias significativas en el número de miofibras regenerativas post tratamiento en comparación con la condición control (Figura 12). Podemos ver que a los 7 días PL, el porcentaje de fibras regenerativas es de $36.41 \pm 6.21\%$ para el grupo control, mientras que en el caso de los músculos que recibieron inyección con células AT-hMSCs-3D, se ve una tendencia al aumento en el porcentaje de fibras regenerativas el cual es de $39.54 \pm 2.5\%$. Sin embargo, a los 14 días PL, el número de fibras con núcleos centrales es casi idéntico entre ambas condiciones (Vehículo, $45.60 \pm 5.6\%$; AT-hMSCs-3D, $44.72 \pm 3.22\%$). Lo que indica que no existe un efecto observable, en los tiempos estudiados, sobre la magnitud de regeneración del músculo luego de la inyección con esferoides

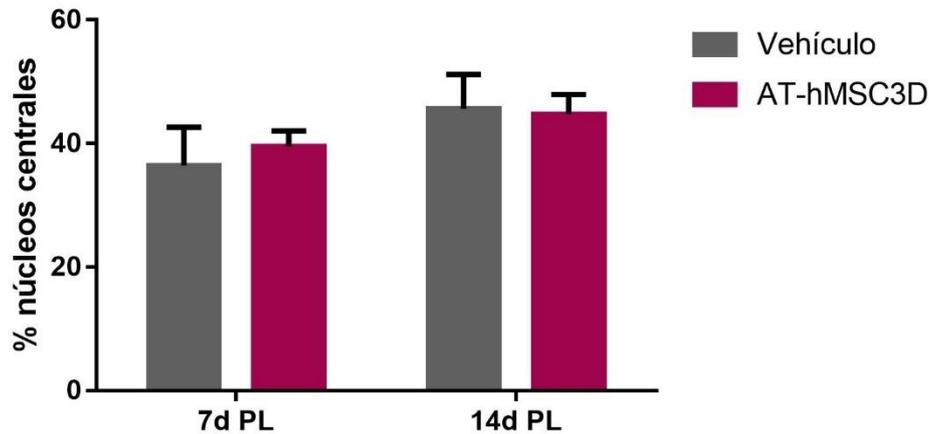


Figura 12: Contenido de fibras regenerativas 7 y 14 días PL en músculos inyectados con AT-hMSCs-3D. Gráfico del porcentaje de fibras que presentan nucleación central en relación al total de fibras contadas en los criocortes de músculos tratados con AT-hMSCs-3D (barra morada) o con el vehículo (barra gris). Se contaron al menos 1000 fibras por n. Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n=3 por grupo). Analizado con t test.

Para la evaluación del contenido de tejido fibrótico, se realizaron cortes histológicos de los músculos dañados con inyección de AT-hMSCs-3D o solución salina a los que se le realizó una tinción de Van Gieson. Se observó el contenido de fibras de colágeno (en rojo) a un tiempo de 14 días PL tratados con AT-hMSCs-3D o solución salina y en músculos sin lesionar (Figura suplementaria 1).

A partir de estos cortes se obtuvo que el área fibrótica en el músculo lesionado e inyectado con solución salina 14 días PL es de un $6,71 \pm 1,63\%$, mientras que en los músculos inyectados con AT-hMSCs-3D fue de $9,78 \pm 2,57\%$ (Figura 13). El análisis de estos resultados no arrojó diferencias significativas en el contenido fibrótico entre ambos grupos.

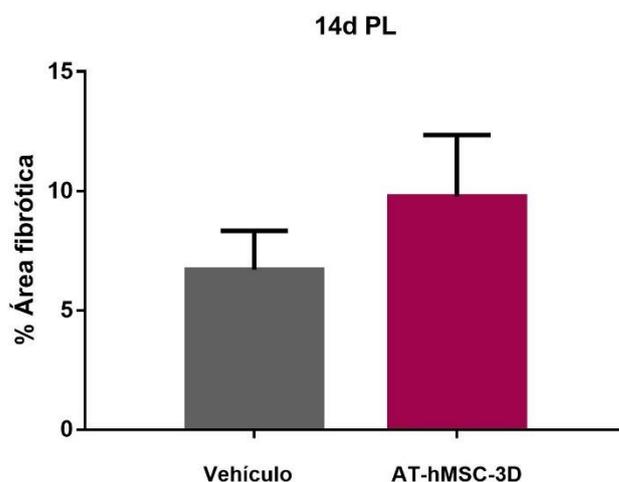


Figura 13: Cuantificación del área fibrótica en las secciones de músculo lesionado 14 días PL. Los músculos fueron inyectados con AT-hMSCs-3D (Barra morada) o solución salina (vehículo. Barra gris) y evaluados 14 días luego de realizada la criolesión. Los datos están expresados como promedio \pm SEM (n=3 para grupo inyectado con solución salina, n=4 para el grupo inyectado con AT-hMSCs-3D 14 días PL). Analizado con t test.

6.3 Mecanismo de acción de los esferoides 3D en la regeneración muscular.

Para investigar el mecanismo por el cual las AT-hMSCs-3D pudieran afectar la velocidad de regeneración, se evaluó el potencial de integración de los esferoides 3D en el tejido muscular dañado, mediante inmunofluorescencia de cortes de músculo lesionados por congelación e inyectados con AT-hMSCs-3D o solución salina (control) a 7 días de realizada la lesión. Se buscó la presencia de la proteína lámina A/C humana y se marcaron los bordes de la célula muscular mediante detección de la proteína laminina LT3. Se consideró como célula integrada aquellos núcleos (DAPI positivos) con presencia de lámina humana y que estuvieran dentro del tejido muscular. La Figura 14 muestra una imagen representativa de los ensayos de inmunofluorescencia obtenidas de los criocortes de músculos gastrocnemios lesionados e inyectados con AT-hMSCs-3D. En el panel 14D, se ve la imagen superpuesta correspondiente a laminina/lámina nuclear y DAPI. Se evaluaron 3 cortes completos para cada animal y se observó un número muy limitado de núcleos en el tejido que son positivos para lamina nuclear humana (Figura 14C), el promedio calculado fue de 4 células/cm². Lo anterior indica una presencia marginal de células humanas en el tejido inyectado que pudieran asociarse a núcleos de miofibras, considerando que el área transversal de un corte completo de músculo gastrocnemio tiene un área total que comprende entre 0,17 y 0,25 cm².

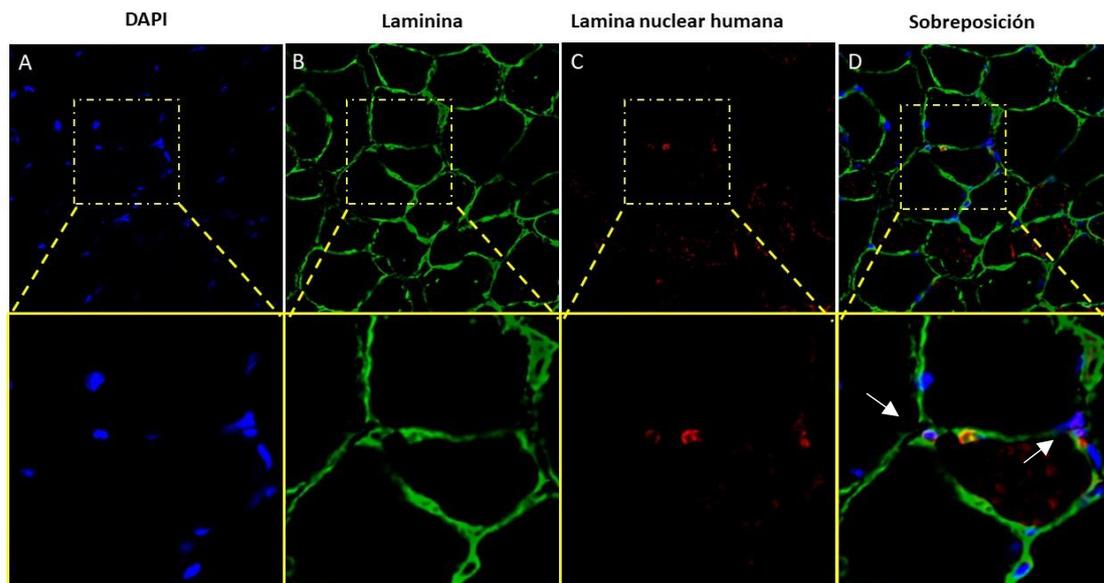


Figura 14: Integración de células AT-hMSCs-3D inyectadas en músculos lesionados. Inmunofluorescencia de criosecciones de músculo gastrocnemio a 7 días PL inyectados con AT-hMSCs-3D. Anti-hLamin A/C (rojo), anti-Laminina LT3 (verde), DAPI (azul). Las flechas blancas indican núcleos positivos para células humanas.

6.4 Adquisición de compromiso miogénico de los esferoides 3D.

Para evaluar si las células AT-hMSCs-3D tienen la capacidad de adquirir un compromiso miogénico, se estimularon con dexametasona e hidrocortisona, fármacos previamente descritos como inductores de compromiso miogénico *in vitro* (Zuk et al., 2001; Mizuno et al., 2002). Se observa que la conformación tridimensional de las células AT-hMSCs-3D se pierde con el paso de los días en cultivo, esto debido a que las células mesenquimales fueron sembradas en una matriz que permitió su adherencia y posterior interacción (Figura suplementaria 2)

A las 3 semanas de cultivo en diferenciación las células fueron fijadas con PFA 4 % para evaluar mediante inmunofluorescencia la expresión del factor de transcripción MYOD, marcador temprano de diferenciación muscular y MYH1, marcador de etapas más tardías de la diferenciación (Figura 15 y 16 respectivamente).

En la Figura 15 se muestran 2 experimentos independientes que dan cuenta de la expresión de MYOD en los núcleos de algunas células (panel A y B), lo que no se observa en las células de los cultivos controles cuyos medios no fueron suplementados con dexametasona e hidrocortisona (Panel C). De forma paralela se evaluó de la misma manera la expresión de MYH1 en cultivos estimulados con medio de diferenciación (Figura 16) en donde no se observa expresión de miosina en ninguna de las placas en estudio.

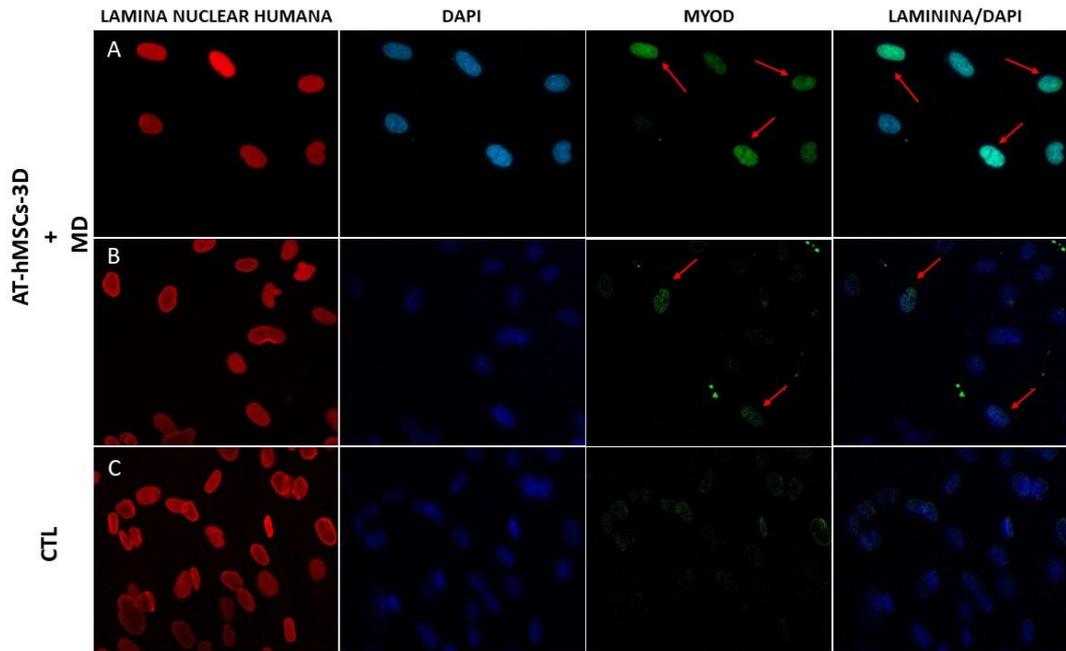


Figura 15: Expresión de MYOD en AT-hMSCs-3D in vitro. Inmunofluorescencia contra MYOD (verde), anti-lamina humana (rojo) y DAPI (azul). La inmunofluorescencia fue realizada sobre 2 lotes de AT-hMSCs-3D provenientes de 2 donantes diferentes (A y B). la imagen superpuesta de MYOD y DAPI se observa en el último panel de cada fila. AT-hMSCs-3D del donante 2 tratada con medio control se muestra en C. Se observa que en A y B existe una marca positiva para MYOD (flechas rojas) que colocaliza con la marca nuclear de DAPI, mientras que en C (cultivo con medio control) no existe marca positiva para MYOD en los núcleos.

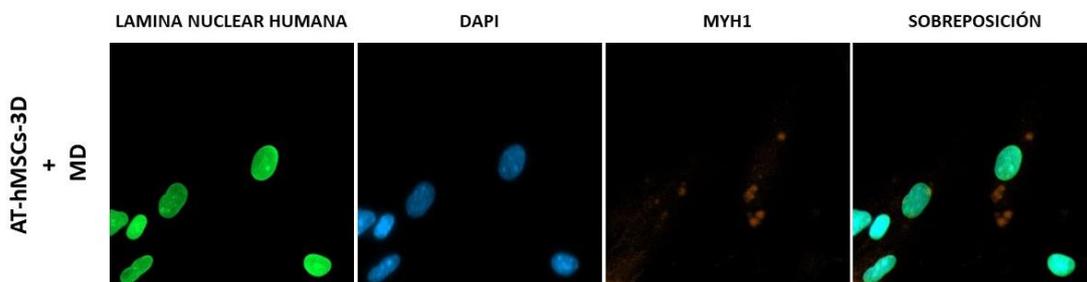


Figura 16: Expresión de MYH1 en AT-hMSCs-3D in vitro. Inmunofluorescencia contra MYH1 (naranja), anti-lamina humana (verde) y DAPI (azul). Se observa que no hay marca positiva contra el anticuerpo para miosina para las células que fueron tratadas con medio de diferenciación y cultivadas por 3 semanas.

Para confirmar la adquisición del compromiso miogénico de los esferoides, otro grupo de células estimuladas con medio de diferenciación fueron tratadas con TRIzol a las 3 semanas de cultivo para proceder con la extracción de RNA. Se evaluó mediante ensayos de RT-qPCR la expresión de genes de diferenciación miogénica temprana y tardía *MYOD1/MYH1*. Como control de expresión se usaron partidores para el gen *RPLPO*.

Los resultados del análisis por RT-qPCR da cuenta que existe expresión de *MYH1* tanto en las células tratadas con medio de diferenciación como las que estuvieron en medio de cultivo control (Figura

17A). Se corroboraron los resultados obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de qPCR (Figura 17B). Si bien se puede observar que el estímulo con dexametasona/hidroocortisona genera leves variaciones en la expresión del mRNA de miosina (Figura 17A), esto no se puede apreciar a nivel de la expresión proteica a las 3 semanas de estudio.

Por otra parte, al evaluar los niveles de expresión del mRNA de *MYOD* por qPCR, no se obtuvieron resultados concluyentes. Se realizó la electroforesis en gel de agarosa de los productos de qPCR, donde se observó que si hubo amplificación para el gen *MYOD* (Figura suplementaria 3A), pero que la expresión fue muy baja. Se repitió esta evaluación con productos de qPCR de muestras de un lote celular distinto, y a diferencia de los resultados anteriores, no se aprecia amplificación para *MYOD* (Figura suplementaria 3B).

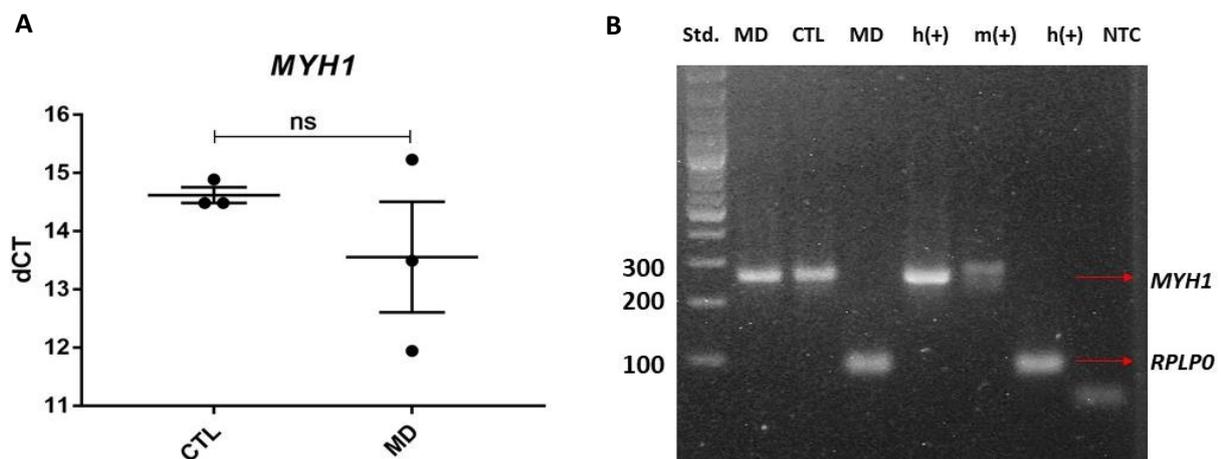


Figura 17: Análisis de la expresión de mRNA de MYH1 en los cultivos inducidos a diferenciación miogénica. A) cDNA obtenido de AT-hMSCs-3D tratadas fueron sometidos a análisis por qPCR para determinar la expresión de mensajeros del gen MYH1. El gráfico se expresa como ΔC_t del grupo tratado y control. Como housekeeping se utilizó el mRNA de la proteína ribosomal RPLP0. B) Electroforesis en gel de agarosa de productos de qPCR contra gen MYH1 para cultivos tratados con medio de diferenciación (MD) o con medio control (CTL). Como controles positivos de los partidores se realizó la qPCR para el gen MYH1 a partir de cDNA obtenido de biopsia muscular humana (h+) y de línea celular muscular de ratón, C2C12 (m+). NTC: producto de qPCR resultante del control sin templado. Como control de la electroforesis se cargó en el gel los productos del qPCR del housekeeping RPLP0. Los datos se expresan como promedios \pm SEM (n=3). Analizado con test de Mann Withney.

Lo anterior indica que, en presencia de medios de diferenciación, las AT-hMSCs-3D son capaces de expresar compromiso miogénico mediante la expresión de transcritos, así como de proteínas relacionadas con etapas tempranas de diferenciación muscular.

Otra manera de explorar la capacidad de las células AT-hMSCs-3D para diferenciarse hacia linaje músculo esquelético es mediante cocultivos con mioblastos esqueléticos de la línea celular C2C12.

En la Figura 18 se muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos de los cocultivos C2C12/AT-hMSCs-3D incubados durante 7 días. Se buscó determinar si las AT-hMSCs-3D eran capaces de integrarse al proceso de formación de miotubos *in vitro*. Si bien se observa que existen núcleos positivos para lamina nuclear humana (indicador de la presencia de AT-hMSCs-3D en el cocultivo) (marcas en rojo, Figura 18) en contacto con miotubos e inmediaciones, no se puede establecer que estas células estén integradas o formen parte de algún miotubo.

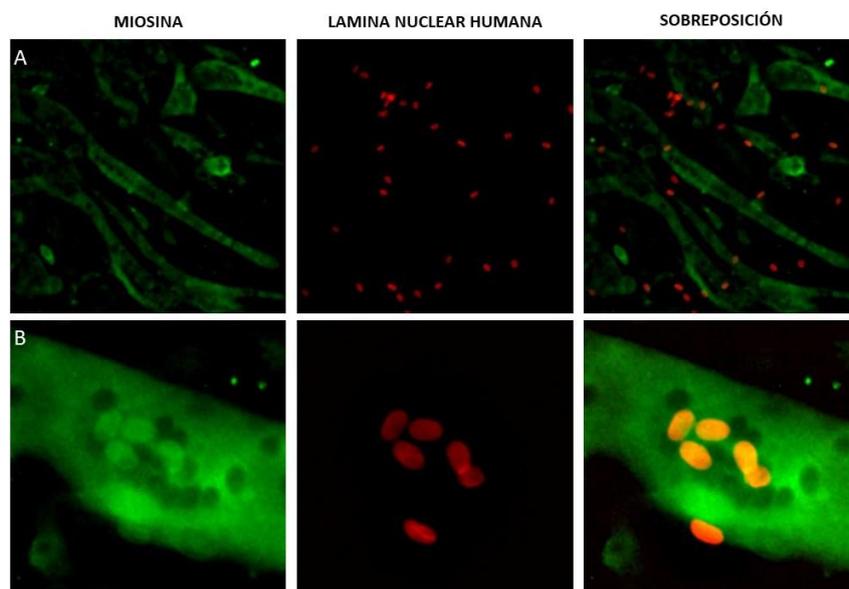


Figura 18: Evaluación de la formación de miotubos híbridos en cocultivos de células C2C12 con AT-hMSCs-3D. Mediante inmunofluorescencia se evaluó la integración de las células AT-hMSCs-3D en los miotubos resultantes de la fusión de las células C2C12. Myh1 (verde) se utilizó como marcador de miotubos y la proteína lamina nuclear humana (rojo) para detectar las AT-hMSCs-3D. El panel A y B corresponden a imágenes representativas a distinta magnificación. Se puede observar que solo algunas de las células positivas para lámina nuclear humana se encuentran en las inmediaciones o en contacto con los miotubos formados (A). En la imagen B, se observa un grupo de núcleos que podrían estar formando parte de un miotubo.

7. DISCUSIÓN

7.1 Caracterización del modelo de daño muscular por congelación.

El modelo de lesión por congelación es uno de los modelos de lesión muscular utilizados para los estudios asociados a la comprensión del proceso de regeneración muscular y el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas que mejoren y/o aceleren los resultados de este proceso de reparación.

Al trabajar con modelos de lesión muscular lo principal a considerar es el tipo de daño que se busca replicar y si el modelo es capaz de recapitular las etapas fisiológicas claves para responder a los objetivos planteados en la investigación (Hardy et al., 2016). Este modelo de criolesión se caracteriza por ser un modelo de lesión física, localizado, de fácil implementación que tiene como característica relevante la eliminación de cualquier tipo de célula residente en la zona de daño (músculo, neurona, vasos sanguíneos, células inmunes, etc) dando como resultado una base amplia para investigar la participación de células implantadas en la regeneración muscular y su contribución sobre las distintas estructuras celulares comprometidas por la lesión (Morgan et al., 1987; Schultz et al., 1986). Este modelo permite también seguir el frente regenerativo característico de las criolesiones, donde se puede apreciar claramente ambas fases de la regeneración muscular de manera simultánea: fase degenerativa/necrótica y fase regenerativa/miogénica (Chargé & Rudnicki, 2004; Juhas & Bursac, 2013; Sato et al., 2003). Esto fue observado en el presente trabajo con el análisis histológico realizado a los 7 y 21 días PL. Se observa que a los 7 días PL existe una gran área de tejido necrótico e infiltrado inflamatorio en la zona afectada, mientras que a tiempos posteriores estos eventos ya no se aprecian de manera importante, presentándose principalmente fibras regenerativas, reconocidas por presentar núcleos centrales, que ya están alcanzando un tamaño similar al de las fibras maduras que las rodean (ver Figuras 3 - 6). Estos resultados concuerdan asimismo con reportes previos en los que se utilizó el modelo de criolesión (Hardy et al., 2016). El grupo de Hardy evaluó el estado histológico del músculo tibialis anterior (TA) post criolesión a los 4, 12 y 28 días. En el trabajo describen que entre el 50 y el 80% del tejido se encontraba necrosado a los 4 días de realizada la lesión y que a los 28 días este evento era ocasionalmente observado. Otro marcador de regeneración importante y que da cuenta de un proceso de miogénesis en curso es el número de fibras que presentan nucleación central (Coletti et al., 2013; Folker & Baylies, 2013). Este grupo observa que a los 12d este evento es poco recurrente e incrementa de forma importante con el tiempo, presentándose sobre un 80% de fibras regenerativas a 1 mes de realizada la lesión. A diferencia de lo observado en el trabajo del grupo de Hardy, aquí reportamos un porcentaje menor de $34.30 \pm 0.19\%$ a los 7 días PL y 27.10 ± 1.41

% a los 21 días PL, así como una temporalidad más acelerada en este evento en particular. Esto se puede deber principalmente a que el modelo de criolesión en el caso de nuestro trabajo fue ejecutado en un músculo distinto (gastrocnemio) proveniente de una cepa de ratón diferente a la utilizada por Hardy y colaboradores. Se ha descrito en varias oportunidades que existen importantes diferencias en la velocidad de regeneración no solo entre músculos distintos sino también entre cepas de ratones distintas (Irintchev & Wernig, 1987; Lefaucheur & Sébille, 1995; Mitchell et al., 1992; Pavlath et al., 1998; Roberts et al., 1997). Por lo mismo es importante considerar estos puntos a la hora de comparar resultados, y seguir trabajando para generar un modelo de estudio que sea lo más reproducible y adecuado para las diferentes investigaciones en el área de la regeneración muscular.

Es importante destacar que, si bien los modelos de lesión por toxinas resultan ser más fáciles de analizar en laboratorio por el efecto degenerativo uniforme sobre los músculos en estudio, el modelo de criolesión, así como otros modelos de lesión localizado (VML, lesión por aplastamiento, etc.), resulta ser una aproximación más cercana a la realidad fisiológica de una lesión de carácter traumático en el ser humano y por lo tanto conlleva una ventaja seguir desarrollándolo para poder aplicarlo en la investigación con células madre en esta arista de la terapia regenerativa.

7.2 Efecto de las AT-hMSCs-3D en la regeneración muscular.

Los avances de los últimos años en el área de la terapia celular con células madre mesenquimales las ha situado como una atractiva alternativa terapéutica en el ámbito de las lesiones y/o disfunciones musculares para restaurar el tejido muscular lesionado y devolver la funcionalidad original del músculo, la cual se ve disminuida por la formación de tejido fibrótico postrauma.

Se hipotetiza que existen dos mecanismos principales por los cuales estas células madre mesenquimales participarían en la regeneración de los tejidos: directa diferenciación de las células trasplantadas en células del órgano huésped y/o mediante la liberación de factores secretados que promueven la reparación intrínseca del tejido (Phinney & Prockop, 2007).

Por su fácil obtención y gran potencial miogénico, largamente descrito en la literatura (Forcales, 2015; de La Garza-Rodea et al., 2011; J. Hwang et al., 2013; Mizuno et al., 2002; Varghese et al., 2017; Zuk et al., 2001), las células mesenquimales de tejido adiposo se han abierto paso como una de las favoritas en la investigación de la regeneración muscular. Publicaciones de su uso en varios modelos de daños dan cuenta de los efectos benéficos de la inyección de células madre derivadas de tejido

adiposo (ADSCs por sus siglas en inglés) en la reparación del tejido muscular, tanto a nivel histológico como funcional (Forcales, 2015; De La Garza-Rodea et al., 2011; J. Hwang et al., 2013; Mizuno et al., 2002; Varghese et al., 2017; Zuk et al., 2001). Mori y colaboradores en el 2015 realizaron inyecciones locales de ADSCs humanas (h-ADSCs) en un modelo murino de daño por laceración observando que, a diferencia de los músculos inyectados con vehículo o células mononucleares de medula ósea (MNCs, por sus siglas en inglés), los músculos que recibieron el tratamiento con ADSCs presentaron una acelerada recuperación de la fuerza muscular a la primera y cuarta semana PL. Además, se encontró una importante cantidad de fibras regenerativas en las regiones lacerada, así como menos formación de tejido fibrótico (Mori et al., 2015).

En otros estudios de modelos murinos se obtuvieron resultados similares al utilizar ADSCs, demostrando en ambos casos que existe formación de tejido muscular *de novo*, mejoras funcionales en los músculos lesionados, además de revascularización y reinervación vía mecanismos directos como indirectos de células donantes (J. Hwang et al., 2013; Kesireddy, 2016).

En el presente trabajo evaluamos la velocidad de regeneración mediante la cuantificación de la evolución del frente regenerativo, comparando la cantidad de tejido necrótico y área transversal de fibras musculares a 7 y 14 días de realizada la lesión e inyectados los músculos con células madre o suero salino. A los 14 días PL se evidenció una disminución significativa en el área de tejido necrótico remanente entre los músculos inyectados con AT-hMSCs-3D comparado con los que recibieron solo solución salina (ver Figura 10). Lo anterior da cuenta de una recuperación acelerada del músculo lesionado por efecto del tratamiento con las células AT-hMSCs-3D de acuerdo a parámetros histológicos. Sin embargo, no pudimos observar si la inyección de estas células modula la formación de tejido fibroso en la zona de lesión (Figura 13), posiblemente debido a que a tiempos tan tempranos las diferencias podrían no ser evidentes para este tipo de modelo de lesión, puesto que si se ha podido pesquisar cambios significativos en la disminución de la fibrosis en modelos murinos de pérdida muscular volumétrica (VML en inglés) a partir de una semana de realizada la inyección con ADSCs (Mori et al., 2015).

En los últimos años, la literatura ha crecido hacia la investigación de los efectos tróficos de las ADSCs en las células/tejidos endógenos y su carácter inmunomodulador. Estos efectos están relacionados con el secretoma de las ADSCs y los factores solubles encontrados dentro de ellas, más que en su potencial de diferenciación a diferentes linajes (Assoni et al., 2016; Frazier et al., 2013; Kapur & Katz, 2013; Pawitan, 2014; Salgado et al., 2010). Si bien lo que se ha propuesto es que, los resultados

observados se deben en mayor parte a los factores tróficos de las células mesenquimales, se ha examinado que el solo utilizar los medios condicionados con estos factores secretados no bastaría para obtener los mejores resultados. Lo anterior sugiere que la sobrevivencia de las células donadas jugaría también un rol crítico en el éxito de la terapia celular, existiendo un incremento en su habilidad quimiatractante sobre células endógenas que participan en la regeneración (Gharaibeh et al., 2011). Por lo tanto, el desarrollo de estrategias que favorezcan la permanencia en el tiempo de las MSCs en los tejidos blancos, junto con potenciar la liberación de factores tróficos serían esenciales para el progreso en las terapias celulares.

Un acercamiento importante en dirección a lo antes mencionado ha sido el trabajo realizado en el desarrollo de sustancias biocompatibles con las cuales administrar las células mesenquimales en los tejidos de interés para potenciar así su sobrevivencia y controlar la liberación de los factores. Hwang y colaboradores (2013) reportó mejoras sustanciales al coadministrar MSCs con bFGF en una matriz de gelatina (J. Hwang et al., 2013). Estos resultados tendrían sustento en el efecto sinérgico de utilizar estas 3 aproximaciones terapéuticas (células madre, factores de crecimiento y matrices biocompatibles), de acuerdo a lo concluido por los autores y trabajos posteriores descritos en la literatura (J. Hwang et al., 2013; Jeon & Elisseeff, 2016).

Otra aproximación para optimizar las terapias celulares está orientada a precondicionar las MSCs en cultivo, con el fin de incrementar su sobrevivencia y potencial de diferenciación, así como aumentar sus efectos paracrinos cuando son administradas *in vivo* (Liu et al., 2016). Hace ya unos años ha incrementado investigación que busca dar cuenta del efecto diferencial en el uso de una formulación en agregados celulares de ADSCs en vez de la preparación en suspensión, para tratar lesiones y/o patologías en distintos tejidos (Amos et al., 2010; Cho et al., 2016; Ruehle et al., 2018). Está ampliamente descrito que el cultivo en esferoides 3D tendría importantes efectos sobre la eficiencia en la habilidad de diferenciación previamente descrita para las células madre mesenquimales (Wang et al., 2009), así como también en mejorar su capacidad para secretar factores señaladores responsable de la antiinflamación, agiogénesis y sobrevivencia celular (Bartosh et al., 2010; Bhang et al., 2012; Laschke & Menger, 2017; Petrenko et al., 2017; Xie et al., 2017)

Amos y colaboradores reportaron en 2010 una acelerada mejora sobre lesiones ocasionadas por úlceras diabéticas, sugiriendo que la formulación 3D impactaría favorablemente el genotipo, fenotipo, potencia biológica y efectos terapéuticos *in vivo* de las células ADSCs (Amos et al., 2010).

El 2018, Marissa R. y colaboradores estudiaron la regeneración muscular luego de inyectar células ADSCs cultivadas en agregados. En este trabajo dan cuenta que los agregados pueden permanecer por mayor tiempo en el tejido lesionado (presentes en cortes histológicos hasta 7 días post inyección) en contraste a la completa ausencia de las células inyectadas en suspensión evaluado a la misma fecha (Ruehle et al., 2018).

En el presente trabajo, al evaluar por inmunofluorescencia los cortes histológico 7 días PL de músculos inyectados con células AT-hMSCs-3D, solamente pudimos observar, y de manera muy reducida, núcleos positivos para lámina nuclear humana como células aisladas y no en su conformación tridimensional como era esperado (ver Figura 14). Sin embargo, los resultados obtenidos en relación a parámetros de regeneración, como el aumento en el tamaño de fibra post tratamiento en contraste con los músculos control, va en concordancia con resultados reportados por el grupo de Marissa R. (Ruehle et al., 2018). Pudimos determinar que existe un aumento significativo en el CSA promedio a los 14 días PL en los músculos que recibieron el tratamiento con las células AT-hMSCs-3D en relación a los músculos tratados con solución salina (3,8%) (ver Figura 11), aunque muy leve en comparación a los resultados reportados por Ruehle y cols. (19,6 %). Nuestros resultados podrían indicar que las fibras están recobrando su tamaño original de manera anticipada a lo que se observa cuando el músculo se repara sin tratamiento celular, pero es necesario realizar ensayos funcionales a los músculos estudiados para poder concluir si esta variación en el tamaño promedio de las fibras podría traducirse en una mejora a nivel funcional como por ejemplo un aumento en la fuerza muscular.

Marissa R. y colaboradores atribuyen finalmente al cultivo en esferoides de las ADSCs el aumento en la permanencia y la potenciación de la secreción paracrina (observada in vitro) en la zona lesionada, que se traduce en la rápida recuperación evaluada por pruebas de fuerza e histología en los animales en estudio (Ruehle et al., 2018). Las diferencias entre lo reportado en la literatura con los datos obtenidos en el presente trabajo, en cuanto a la magnitud de la regeneración, podrían deberse principalmente a la poca retención de las células AT-hMSCs-3D en el tejido lesionado. Esta falta presencia de células donantes en el tejido da cuenta de la importancia de trabajar en el perfeccionamiento del cultivo de las células mesenquimales para hacerlas más resistentes e incrementar su estancia, así como evaluar cual sería el medio de suspensión adecuado con el mismo fin de retenerlas por más tiempo en las zonas lesionadas. En el área de la regeneración de tejidos se ha trabajado fuertemente en el desarrollo de biomatrices compatibles con los tejidos blancos en

estudio. Esto debido a los avances en el entendimiento de la delicada dinámica que existe entre los componentes de los nichos celulares. Específicamente, ha cobrado relevancia el rol activo que toma la ECM en la homeostasis y destino celular, controlando y guiando funciones celulares específicas a nivel estructural (direccionamiento de la migración celular) como molecular (entrega de moléculas señalizadoras) (Biondi et al., 2008). Gracias a este conocimiento, es que variadas investigaciones han logrado reportar mejoras sustanciales en las terapias celulares al coadministrar las MSCs con hidrogeles (Ogasawara et al., 2017 Wright et al., 2013; J. Hwang et al., 2013;) En esta línea, es que se ha ido trabajando en el desarrollo de nuevas tecnologías para generar diversas matrices en pos de las necesidades de cada tejido de manera que logren asemejar de la manera más fiel las interacciones células-ECM que se dan en el nicho celular nativo, y de esta forma garantizar una tasa de éxito mayor en los resultados de las terapias con células madre (Cosson et al., 2015).

7.3 Adquisición de compromiso miogénico de las células AT-hMSCs-3D.

La habilidad de las células ADSCs para diferenciarse hacia linaje muscular ha sido ampliamente reportado utilizando medios de cultivos inductores de diferenciación miogénica, así como cocultivo con mioblastos de línea celular, que por liberación de factores propios de las células musculares y por medio del contacto célula - célula son capaces de estimular la conversión miogénica de las ADSCs (Eom et al., 2011; Mizuno et al., 2002; Rocco et al., 2006; Zuk et al., 2001).

La diferenciación miogénica temprana se distingue específicamente por la expresión de varios factores reguladores miogénicos, entre ellos el factor de determinación miogénica 1, MyoD1 (Mizuno et al., 2002; Zuk et al., 2001)

En este marco y con el objetivo de evaluar la adquisición de compromiso miogénico, estimulamos la diferenciación *in vitro* de las AT-hMSCs-3D mediante la adición de dexametasona e hidrocortisona a los medios de cultivo. Estos compuestos fueron utilizados por el grupo de Zuk y cols. (2001) reportando por primera vez el compromiso miogénico adquirido por células obtenidas de lipoaspirado procesado (PLA por sus siglas en inglés) de tejido adiposo humano. Observaron por inmunohistoquímica la expresión de MYOD1 a 1 semana de estimular con medio de diferenciación y a las seis semanas de cultivo pudieron observar la expresión de miosina de cadena pesada (MYH1), marcador utilizado para estudiar etapas tardías de la diferenciación muscular (Zuk et al., 2001).

En nuestro trabajo, luego de tres semanas de cultivo pudimos observar células AT-hMSCs-3D que expresan la proteína MYOD1 (evaluado por IF) (Figura 15), pero no así para la expresión de MYH1

(Figura 16). Publicaciones posteriores han reportado de manera similar al grupo de Zuk y colaboradores la capacidad de adquisición de compromiso miogénico de las ADSCs utilizando diferentes suplementos inductores en los medios de cultivo como por ejemplo: 5-Azacidina; FGF-2; insulina o medios de diferenciación para células músculo esqueléticas comerciales así como también medios condicionados por células progenitoras musculares, entre otros (Eom et al., 2011; Goudenege et al., 2009; María et al., 2004; Rodriguez et al., 2005; Stern-Straeter, 2013; Zuk et al., 2001). Di Rocco y cols. (2006) dio cuenta que estas células pueden diferenciarse espontáneamente en mioblastos, expresando marcadores miogénicos y formando miotubos multinucleados cuando son cocultivos con células miogénica (Rocco et al., 2006) . En nuestros experimentos, al realizar los cocultivos pudimos observar que varios núcleos provenientes de las células donadas se encontraban en las inmediaciones de los miotubos proveniente de las C2C12, pero no se pudo concluir si los núcleos presentes en los miotubos formaban parte de estas estructuras y tampoco pudimos observar estructuras de morfología elongada y multinucleadas positivas para el anticuerpo anti lamina nuclear humana, que diera luces de fusión independiente de las AT-hMSCs-3D (ver Figura 18).

El 2013 un artículo comparó los efectos de distintos medios para inducir la diferenciación miogénica de células ADSCs, dando cuenta que el origen de las células MSCs tienen un impacto sobre la respuesta frente a los medios de cultivo que se utilizan para inducir la diferenciación miogénica, y que además la respuesta a los distintos factores de crecimiento o suplementos adicionados a los medios de cultivo que se utilizan para este propósito genera variación temporal en la expresión de los marcadores miogénicos estudiados, dependiendo del origen de la MSCs. (Stern-Straeter, 2013) El grupo de Okamura obtuvo resultados similares utilizando MSCs de origen bovino (Okamura et al., 2017). Estos antecedentes podrían explicar en parte los resultados obtenidos en este trabajo. Es posible que las células AT-MSCs-3D, ya sea por su origen de extracción o su procesamiento, requieren un mayor tiempo de incubación con el protocolo de diferenciación miogénico utilizado en esta ocasión (se observó solo hasta tres semanas) para observar marcadores tardíos de diferenciación miogénica o el medio de diferenciación no es capaz de inducir la expresión de MYH a tiempos cortos en estas células.

Nuestros resultados del análisis por RT-qPCR revelaron que tanto las células tratadas como las no tratadas con medios de diferenciación expresaban el RNA mensajero del gen *MYH1* y se observa que los cultivos estimulados produjeron un aumento en sus niveles de expresión, aunque no de manera significativa (ver Figura 17 A). Estos resultados se obtuvieron a partir de donantes distintos lo que

podría explicar en gran medida la gran variación en la expresión de este marcador, tal como lo describe de La Garza-Rodea y cols.(2011) en el estudio comparativo de la expresión de marcadores musculares entre MSCs de 3 donantes distintos y origen tisular diferente (de La Garza-Rodea et al., 2011). Por otra parte, llama la atención que un marcador de diferenciación muscular de expresión tardía esté presente en los cultivos controles no estimulados. Existen reportes anteriores donde se han observado estos mismos fenómenos (Liu et al., 2013), tanto desmina como MYH fueron amplificadas por RT-PCR pero la proteína no fue detectada por tinciones inmunohistoquímicas en hfMSCs no estimuladas (Chan et al., 2006). Mediante electroforesis en gel de agarosa se corroboramos los resultados de qPCR obtenidos en este trabajo (Figura 17 B) para la miosina de cadena pesada y también se pudo observar que MYOD1 si fue amplificado (Figura suplementaria 3), pero encontrándose en muy baja cantidad, lo que podría explicar la inconsistencia de los resultados obtenidos por qPCR, pero confirmándose así que las células AT-hMSCs-3D tienen la capacidad de adquirir compromiso miogénico. Además, podemos ver que la expresión de MYOD1 fue inducida de manera diferencial entre un donante y otro, resultado esperable tal y como se discutió con los resultados de expresión de MYH. El año 2002, el grupo de Mizuno detectó elevados niveles de expresión de mRNA de *MYOD1* durante tres semanas de cultivo en diferenciación de células PLA, mientras que el grupo de Gang el 2004 reporta observar que el peak de expresión de *MYOD1* se encuentra a los 3 días de la inducción de la diferenciación y que posterior a 1 semana ya no son detectable los niveles de mRNA de *MYOD1* así como tampoco lo de la proteína(Gang et al., 2004; Mizuno et al., 2002). Estas diferencias reportadas respecto a los tiempos en que se expresa *MYOD1*, nos lleva a suponer una vez más que tanto el origen tisular de las MSCs así como el medio de cultivo en que son incubadas, son factores determinantes a la hora de inducir y evaluar su capacidad de diferenciación miogénica. Tomando en cuenta los antecedentes, es probable que, al evaluar la expresión a tiempos menores, hubiera sido posible encontrar una mayor expresión del mRNA de este factor de transcripción. Lo anterior sugiere que es necesario realizar un barrido temporal creciente en la evaluación de diferenciación celular de las células AT-hMSCs-3D para caracterizar mejor su capacidad de diferenciación a linaje músculo esquelético.

8. CONCLUSIONES

- En el modelo de daño severo realizado por congelación, podemos concluir que a los 21 días el tejido está recuperado casi por completo en términos histológicos. Este modelo permite hacer el seguimiento de las etapas características del proceso de regeneración muscular, siendo de utilidad para el estudio de tratamientos que busquen modificar ya sea la velocidad de regeneración, así como la calidad del tejido final luego de un trauma o lesión en el tejido músculo esquelético.
- A los 14 días PL, los animales lesionados por congelación muestran una disminución en el porcentaje de área necrótica, así como un aumento en el tamaño de fibras. Estos cambios histológicos dan cuenta de un aumento en la velocidad de regeneración debido al tratamiento con AT-hMSCs-3D. Por otra parte, no se logró reportar mejorías en la calidad del tejido muscular en términos de cantidad de tejido fibroso al tiempo de evaluación de 14 días PL.
- Para determinar si las células inyectadas tienen un efecto benéfico sobre el tejido muscular lesionados a nivel global es preciso realizar ensayos funcionales específicos para el músculo en cuestión, como por ejemplo evaluar la capacidad contráctil pre y post lesión midiendo el torque isométrico máximo para el músculo gastrocnemio.
- Las células AT-hMSCs-3D presentan potencial de diferenciación miogénica al ser estimuladas con los medios de cultivos utilizados, expresando genes tempranos y tardíos de compromiso miogénico. Una evaluación a tiempo mayores es necesaria para un mejor análisis de las características en la expresión tanto a nivel de mRNA como proteico de los marcadores de compromiso muscular.
- Las células AT-hMSCs-3D no se integran al tejido muscular en el proceso de regeneración y tampoco forman miotubos en cocultivo con células C2C12. Esto sugiere que los mecanismos por los cuales se observan efectos benéficos con la inyección de las células AT-hMSCs-3D está relacionado principalmente con su capacidad de secreción de factores tróficos.
- En base a los resultados, es posible concluir que el tratamiento con las células AT-hMSCs-3D tienen un efecto parcial en la regeneración muscular, particularmente en la velocidad de recuperación, apreciable a partir de las 2 semanas de realizada la lesión muscular, probablemente vía secreción de factores tróficos. Si bien el cultivo celular en 3D permite acrecentar las características secretoras de las MSCs, aún es una incógnita el cómo utilizar estas nuevas herramientas de forma eficaz para la terapia celular.

9. REFERENCIAS

- Ajibade, D. A., Vance, D. D., Hare, J. M., Kaplan, L. D., & Lesniak, B. P. (2014). Emerging Applications of Stem Cell and Regenerative Medicine to Sports Injuries. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 2(2), 2325967113519935. doi:10.1177/2325967113519935
- Amos, P. J., Kapur, S. K., Stapor, P. C., Shang, H., Bekiranov, S., Khurgel, M., ... Katz, A. J. (2010). Human Adipose-Derived Stromal Cells Accelerate Diabetic Wound Healing: Impact of Cell Formulation and Delivery. *Tissue Engineering Part A*, 16(5), 1595–1606. doi:10.1089/ten.tea.2009.0616
- Archacka, K., Brzoska, E., Ciemerych, M. A., Czerwinska, A. M., Grabowska, I., Kowalski, K. K., & Zimowska, M. (2018). Pluripotent and Mesenchymal Stem Cells—Challenging Sources for Derivation of Myoblast. In *Cardiac Cell Culture Technologies* (pp. 109-154). Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-319-70685-6_6
- Assoni, A., Castello, G., Valadares, M., Beccari, M., Gomes, J., Pelatti, M., ... Zatz, M. (2016). Different donors Mesenchymal Stromal Cells secretomes reveal heterogeneous profile of relevance for therapeutic use. *Stem Cells and Development*. doi:10.1089/scd.2016.0218
- Baoge, L., Steen, V. E., Rimbaut, S., Philips, N., Witvrouw, E., Almqvist, K., ... Bossche, V. L. (2012). Treatment of Skeletal Muscle Injury: A Review. *ISRN Orthopedics*, 2012, 1–7. doi:10.5402/2012/689012
- Bartosh, T. J., Ylöstalo, J. H., Mohammadipoor, A., Bazhanov, N., Coble, K., Claypool, K., ... Prockop, D. J. (2010). Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31), 13724–13729. doi:10.1073/pnas.1008117107
- Bentzinger, F. C., von Maltzahn, J., & Rudnicki, M. A. (2010). Extrinsic regulation of satellite cell specification. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(3), 27. doi:10.1186/scrt27
- Bhang, S., Lee, S., Shin, J.-Y., Lee, T.-J., & Kim, B.-S. (2012). Transplantation of Cord Blood Mesenchymal Stem Cells as Spheroids Enhances Vascularization. *Tissue Engineering Part A*, 18(19–20), 2138–2147. doi:10.1089/ten.tea.2011.0640
- Biondi, M., Ungaro, F., Quaglia, F., & Netti, P. A. (2008). Controlled drug delivery in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 60(2), 229-242. doi:10.1016/j.addr.2007.08.038
- Briggs, D. & Morgan, J. (2014). Skeletal muscle stem cells. *Stem Cells: From Basic Research to Therapy, Volume Two: Tissue Homeostasis and Regeneration during Adulthood, Applications, Legislation and Ethics (Vol. 2)*, CRC Press, 174-215.
- Brown, G. S., Harman, R. J., & Black, L. L. (2012). Adipose-derived stem cell therapy for severe muscle tears in working German shepherds: Two case reports. *Stem Cell Discovery*, 2012(02), 41–44. doi:10.4236/scd.2012.22007.
- Caseiro, A. R., Pereira, T., Bártolo, P. J., Santos, J. D., Luís, A. L., & C. Maurício, A. (2015). Trends in mesenchymal stem cells' applications for skeletal muscle repair and regeneration. *Progress in Stem Cell Transplantation, Taner Demirer, IntechOpen*. doi:10.5772/60919
- Chan, J., O'Donoghue, K., Gavina, M., Torrente, Y., Kennea, N., Mehmet, H., ... Fisk, N. M. (2006). Galectin-1 Induces Skeletal Muscle Differentiation in Human Fetal Mesenchymal Stem Cells

- and Increases Muscle Regeneration. *STEM CELLS*, 24(8), 1879–1891. doi:10.1634/stemcells.2005-0564
- Chang, N. C., & Rudnicki, M. A. (2014). Current Topics in Developmental Biology. *Current Topics in Developmental Biology*, 107, 161–181. doi:10.1016/b978-0-12-416022-4.00006-8
- Chargé, S. B., & Rudnicki, M. A. (2004). Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiological Reviews*, 84(1), 209–238. doi:10.1152/physrev.00019.2003
- Cho, R., Kim, Y.-S., Kim, J.-Y., & Oh, Y.-M. (2016). Human adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids improve recovery in a mouse model of elastase-induced emphysema. *BMB Reports*, 50(2), 79–84. doi:10.5483/bmbrep.2017.50.2.101
- Coletti, D., Teodori, L., Lin, Z., Beranudin, J., & Adamo, S. (2013). Restoration versus reconstruction: cellular mechanisms of skin, nerve and muscle regeneration compared. *Regenerative Medicine Research*, 1(1), 4. doi:10.1186/2050-490x-1-4
- Cosson, S., Otte, E. A., Hezaveh, H., & Cooper-White, J. J. (2015). Concise review: tailoring bioengineered scaffolds for stem cell applications in tissue engineering and regenerative medicine. *Stem cells translational medicine*, 4(2), 156-164. doi:10.5966/sctm.2014-0203
- De La Garza-Rodea, A. S., Van Der Velde-Van Dijke, I., Boersma, H., Gonçalves, M. A., Van Bekkum, D. W., De Vries, A. A., & Knaän-Shanzer, S. (2012). Myogenic properties of human mesenchymal stem cells derived from three different sources. *Cell transplantation*, 21(1), 153-173. doi: 10.3727/096368911X580554.
- Delos, D., Maak, T. G., & Rodeo, S. A. (2013). Muscle Injuries in Athletes. *Sports Health: A Multidisciplinary Approach*, 5(4), 346–352. doi:10.1177/1941738113480934
- Dueweke, J. J., Awan, T. M., & Mendias, C. L. (2016). Regeneration of Skeletal Muscle Following Eccentric Injury. *Journal of Sport Rehabilitation*, 1–24. doi:10.1123/jsr.2016-0107
- Eom, Y., Lee, J., Yang, M., Jang, I., Kim, H., Lee, D., ... Kim, H. (2011). Effective myotube formation in human adipose tissue-derived stem cells expressing dystrophin and myosin heavy chain by cellular fusion with mouse C2C12 myoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408(1), 167–173. doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.002
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., & Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*, 4(5), 267-274.
- Hofer, H. R., & Tuan, R. S. (2016). Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem cell research & therapy*, 7(1), 131. doi: 10.1186/s13287-016-0394-0.
- Folker, E. S., & Baylies, M. K. (2013). Nuclear positioning in muscle development and disease. *Frontiers in Physiology*, 4, 363. doi:10.3389/fphys.2013.00363
- Forcales, S.-V. (2015). Potential of adipose-derived stem cells in muscular regenerative therapies. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 123. doi:10.3389/fnagi.2015.00123
- Frazier, T. P., Gimble, J. M., Kheterpal, I., & Rowan, B. G. (2013). Impact of low oxygen on the secretome of human adipose-derived stromal/stem cell primary cultures. *Biochimie*, 95(12), 2286–2296. doi:10.1016/j.biochi.2013.07.011

- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcified Tissue International*, *96*(3), 183–195. doi:10.1007/s00223-014-9915-y
- Gang, E., Jeong, J., Hong, S., Hwang, S., Kim, S., Yang, I., ... Kim, H. (2004). Skeletal Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Umbilical Cord Blood. *STEM CELLS*, *22*(4), 617–624. doi:10.1634/stemcells.22-4-617
- Gharaibeh, B., Lavasani, M., Cummins, J. H., & Huard, J. (2011). Terminal differentiation is not a major determinant for the success of stem cell therapy - cross-talk between muscle-derived stem cells and host cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *2*(4), 31. doi:10.1186/scrt72
- Goudenege, S., Pisani, D. F., Wdziekonski, B., Santo, J. P., Bagnis, C., Dani, C., & Dechesne, C. A. (2009). Enhancement of Myogenic and Muscle Repair Capacities of Human Adipose-derived Stem Cells With Forced Expression of MyoD. *Molecular Therapy*, *17*(6), 1064–1072. doi:10.1038/mt.2009.67
- Grounds, M. (2010). Quantification of histopathology in haematoxylin and eosin stained muscle sections. *Standard Operating Procedures; TREAT-NMD: Washington, DC, USA*.
- Hardy, D., Besnard, A., Latil, M., Jouvion, G., Briand, D., Thépenier, C., ... Chrétien, F. (2016). Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLOS ONE*, *11*(1), e0147198. doi:10.1371/journal.pone.0147198
- Huang, H., Liu, J., Hao, H., Chen, D., Zhizhong, L., Li, M., ... Han, W. (2017). Preferred M2 Polarization by ASC-Based Hydrogel Accelerated Angiogenesis and Myogenesis in Volumetric Muscle Loss Rats. *Stem Cells International*, *2017*, 1–13. doi:10.1155/2017/2896874
- Huard, J., Li, Y., & Fu, F. H. (2002). Muscle injuries and repair: current trends in research. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, *84-A*(5), 822–832. doi:10.2106/00004623-200205000-00022
- Hwang, J., Kim, I., Piao, S., Jung, A., Lee, J., Park, K., & Lee, J. (2013). Combination therapy of human adipose-derived stem cells and basic fibroblast growth factor hydrogel in muscle regeneration. *Biomaterials*, *34*(25), 6037–6045. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.049
- Irintchev, A., & Wernig, A. (1987). Muscle damage and repair in voluntarily running mice: strain and muscle differences. *Cell and Tissue Research*, *249*(3), 509–521. doi:10.1007/bf00217322
- Jeon, O., & Elisseeff, J. (2016). Orthopedic tissue regeneration: cells, scaffolds, and small molecules. *Drug Delivery and Translational Research*, *6*(2), 105–120. doi:10.1007/s13346-015-0266-7
- Juhas, M., & Bursac, N. (2013). Engineering skeletal muscle repair. *Current Opinion in Biotechnology*, *24*(5), 880–886. doi:10.1016/j.copbio.2013.04.013
- Kapur, S. K., & Katz, A. J. (2013). Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie*, *95*(12), 2222–2228. doi:10.1016/j.biochi.2013.06.001
- Kariminekoo, S., Movassaghpour, A., Rahimzadeh, A., Talebi, M., Shamsasenjan, K., & Akbarzadeh, A. (2016). Implications of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, *44*(3), 749–757. doi:10.3109/21691401.2015.1129620.

- Kesireddy, V. (2016). Evaluation of adipose-derived stem cells for tissue-engineered muscle repair construct-mediated repair of a murine model of volumetric muscle loss injury. *International Journal of Nanomedicine, Volume 11*, 1461–1473. doi:10.2147/ijn.s101955
- Laschke, M. W., & Menger, M. D. (2017). Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. *Trends in Biotechnology, 35*(2), 133–144. doi:10.1016/j.tibtech.2016.08.004
- Laumonier, T., & Menetrey, J. (2016). Muscle injuries and strategies for improving their repair. *Journal of Experimental Orthopaedics, 3*(1), 15. doi:10.1186/s40634-016-0051-7
- Lefaucheur, J., & Sébille, A. (1995). The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromuscular Disorders, 5*(6), 501–509. doi:10.1016/0960-8966(95)00012-c
- Liu, S., Zhou, J., Zhang, X., Liu, Y., Chen, J., Hu, B., ... Zhang, Y. (2016). Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences, 17*(6), 982. doi:10.3390/ijms17060982
- Liu, Y., Deng, B., Zhao, Y., Xie, S., & Nie, R. (2013). Differentiated markers in undifferentiated cells: Expression of smooth muscle contractile proteins in multipotent bone marrow mesenchymal stem cells. *Development, Growth & Differentiation, 55*(5), 591–605. doi:10.1111/dgd.12052
- López A, M., Leyton M, C. and Graf V, M. (1982). Técnicas de histología y citología. 2nd ed. Santiago: Univ. de Chile, Facultad de Medicina, Dept. de Biología Celular y Genética, pp.36-37; 44-45.
- María, L., Rojas, C. V., & Minguell, J. J. (2004). Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research, 300*(2), 418–426. doi:10.1016/j.yexcr.2004.07.017
- Mauro, A. (1961). SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 9*(2), 493–495. doi:10.1083/jcb.9.2.493
- Mirkin, G. y Hoffman, M. (1978). The sports medicine book. *Little Brown and Co.*, page 94
- Mitchell, C. A., McGeachie, J. K., & Grounds, M. D. (1992). Cellular differences in the regeneration of murine skeletal muscle: a quantitative histological study in SJL/J and BALB/c mice. *Cell and Tissue Research, 269*(1), 159–166. doi:10.1007/bf00384736
- Mizuno, H., Zuk, P. A., Zhu, M., Lorenz, P. H., Benhaim, P., & Hedrick, M. H. (2002). Myogenic Differentiation by Human Processed Lipoaspirate Cells. *Plastic and Reconstructive Surgery, 109*(1), 199–209. doi:10.1097/00006534-200201000-00030
- Morgan, J., Coulton, G., & Partridge, T. (1987). Muscle precursor cells invade and repopulate freeze-killed muscles. *Journal of Muscle Research & Cell Motility, 8*(5), 386–396. doi:10.1007/bf01578428
- Mori, R., Kamei, N., Okawa, S., Nakabayashi, A., Yokota, K., Higashi, Y., & Ochi, M. (2015). Promotion of skeletal muscle repair in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human adipose tissue-derived regenerative cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 9*(10), 1150–1160. doi:10.1002/term.1659
- Ogasawara, T., Okano, S., Ichimura, H., Kadota, S., Tanaka, Y., Minami, I., ... & Kuwahara, K. (2017). Impact of extracellular matrix on engraftment and maturation of pluripotent stem cell-

derived cardiomyocytes in a rat myocardial infarct model. *Scientific reports*, 7(1), 8630. DOI: 10.1038/s41598-017-09217-x

- Okamura, L., Cordero, P., Palomino, J., Parraguez, V., Torres, C., & Peralta, O. (2017). Myogenic Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells Derived from Fetal Bovine Bone Marrow. *Animal Biotechnology*, 1–11. doi:10.1080/10495398.2016.1276926
- Pavlath, G. K., Thaloor, D., Rando, T. A., Cheong, M., English, A. W., & Zheng, B. (1998). Heterogeneity among muscle precursor cells in adult skeletal muscles with differing regenerative capacities. *Developmental Dynamics*, 212(4), 495–508. doi:10.1002/(sici)1097-0177(199808)212:4<495::aid-aja3>3.0.co;2-c
- Pawitan, J. (2014). Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine. *BioMed Research International*, 2014, 1–14. doi:10.1155/2014/965849
- Petrenko, Y., Syková, E., & Kubinová, Š. (2017). The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 94. doi:10.1186/s13287-017-0558-6
- Phinney, D. G., & Prockop, D. J. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair—Current Views. *STEM CELLS*, 25(11), 2896–2902. doi:10.1634/stemcells.2007-0637
- Pisconti, A., Banks, G. B., Babaeijandaghi, F., Betta, N., Rossi, F. M., Chamberlain, J. S., & Olwin, B. B. (2016). Loss of niche-satellite cell interactions in syndecan-3 null mice alters muscle progenitor cell homeostasis improving muscle regeneration. *Skeletal Muscle*, 6(1), 34. doi:10.1186/s13395-016-0104-8
- Roberts, P., Mcgeachie, J. K., & Grounds, M. D. (1997). The host environment determines strain-specific differences in the timing of skeletal muscle regeneration: cross-transplantation studies between SJL/J and BALB/c mice. *Journal of Anatomy*, 191(4), 585–594. doi:10.1046/j.1469-7580.1997.19140585.x
- Rocco, G., Iachininoto, M., Tritarelli, A., Straino, S., Zacheo, A., Germani, A., ... Capogrossi, M. C. (2006). Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *Journal of Cell Science*, 119(14), 2945–2952. doi:10.1242/jcs.03029
- Rodriguez, A.-M., Pisani, D., Dechesne, C. A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.-Y., Wdziekonski, B., ... Dani, C. (2005). Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(9), 1397–1405. doi:10.1084/jem.20042224
- Ruehle, M. A., Stevens, H. Y., Beedle, A. M., Guldberg, R. E., & Call, J. A. (2018). Aggregate mesenchymal stem cell delivery ameliorates the regenerative niche for muscle repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(8), 1867–1876. doi:10.1002/term.2707
- Salgado, A. J., Reis, R. L., Sousa, N., Gimble, J. M., Salgado, A. J., Reis, R. L., & Sousa, N. (2010). Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 5(2), 103–110. doi:10.2174/157488810791268564
- Sato, K., Li, Y., Foster, W., Fukushima, K., Badlani, N., Adachi, N., ... Huard, J. (2003). Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle & Nerve*, 28(3), 365–372. doi:10.1002/mus.10436

- Schultz, E., Jaryszak, D., Gibson, M., & Albright, D. (1986). Absence of exogenous satellite cell contribution to regeneration of frozen skeletal muscle. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 7(4), 361–367. doi:10.1007/bf01753657
- Stern-Straeter, J. (2013). Evaluation of the effects of different culture media on the myogenic differentiation potential of adipose tissue- or bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Medicine*. doi:10.3892/ijmm.2013.1555
- van Putten, M., de Winter, C., van Roon-Mom, W., van Ommen, G. J., AC't Hoen, P., & Aartsma-Rus, A. (2010). A 3 months mild functional test regime does not affect disease parameters in young mdx mice. *Neuromuscular Disorders*, 20(4), 273-280. doi: 10.1016/j.nmd.2010.02.004.
- Varghese, J., Griffin, M., Mosahebi, A., & Butler, P. (2017). Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 45. doi:10.1186/s13287-017-0483-8
- Wang, W., Itaka, K., Ohba, S., Nishiyama, N., Chung, U., Yamasaki, Y., & Kataoka, K. (2009). 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 30(14), 2705–2715. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.01.030
- Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L., & Shi, Y. F. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), 747. doi: 10.1038/aps.2013.50.
- Wright, B., Mi, S., & Connon, C. J. (2013). Towards the use of hydrogels in the treatment of limbal stem cell deficiency. *Drug discovery today*, 18(1-2), 79-86.
- Xie, L., Mao, M., Zhou, L., Zhang, L., & Jiang, B. (2017). Signal Factors Secreted by 2D and Spheroid Mesenchymal Stem Cells and by Cocultures of Mesenchymal Stem Cells Derived Microvesicles and Retinal Photoreceptor Neurons. *Stem Cells International*, 2017, 1–13. doi:10.1155/2017/2730472
- Yin, H., Price, F., & Rudnicki, M. A. (2013). Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiological Reviews*, 93(1), 23–67. doi:10.1152/physrev.00043.2011
- Zuk, P., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J., Katz, A., ... Hedrick, M. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–28. doi:10.1089/107632701300062859

10. MATERIAL SUPLEMENTARIO

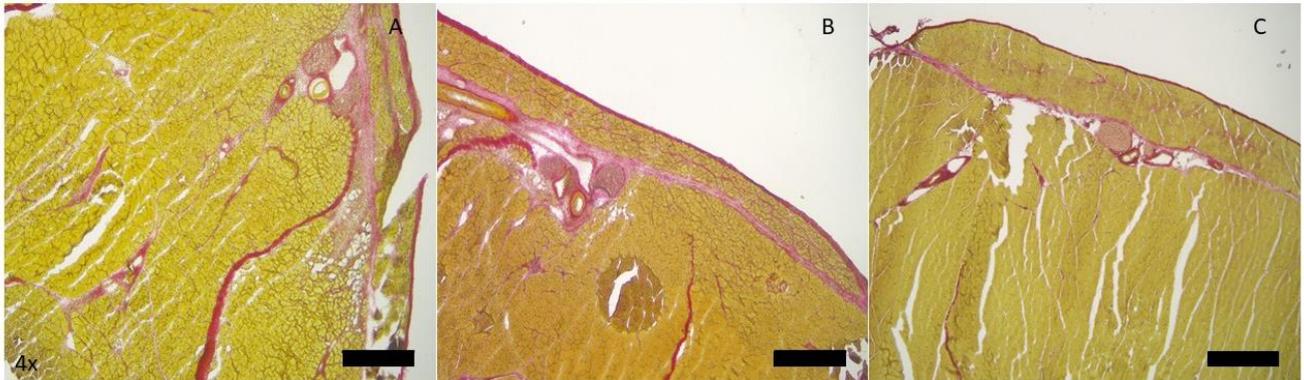


Figura Suplementaria 1: Tinción de Van Gieson para detectar fibrosis en cortes de músculo dañado e inyectado 14 días PL. La imagen muestra la tinción de un músculo 14 PL con inyección de solución salina (A) o con AT-hMSCs-3D (B) y músculo control sano (C) Las fibras de colágeno se aprecian en rojo, mientras que las fibras musculares se observan en amarillo. Barra escala = 500 μ m.

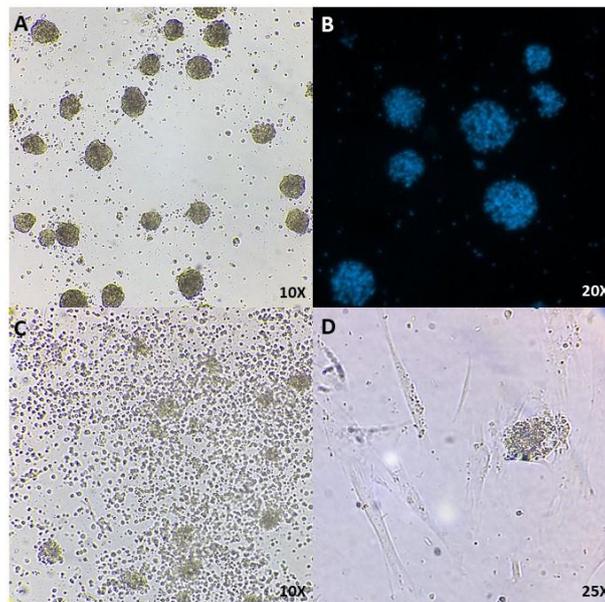


Figura Suplementaria 2: Esferoides 3D de células mesenquimales humanas en cultivo. Fotografía microscopio campo claro representativa de cultivos fresco de AT-hMSCs-3D, día 1 de cultivo (A) e inmunofluorescencia contra marcador nuclear DAPI, fijadas al día 1 de cultivo (B). Esferoides al día 2 (C) y día 21 (D) de cultivo de diferenciación.

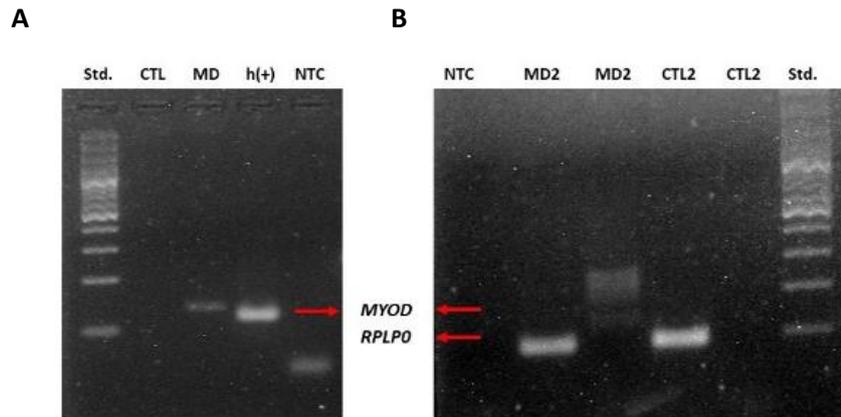


Figura Suplementaria 3: Análisis de la expresión de mRNA de MYOD en los cultivos inducidos a diferenciación miogénica. Detección de la amplificación del gen MYOD por electroforesis en gel de agarosa de productos de qPCR para muestras tratadas con medio de diferenciación (MD y MD2) y con medio control (CTL y CTL2). (h+): Control positivo de la amplificación de MYH1 de cDNA obtenido de biopsia muscular humana. Se utilizaron los productos de la amplificación del gen normalizador (RPLP0) como control de la técnica.