



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Efecto de la expresión de SPARC en células madre mesenquimales y análisis de su potencial para la regeneración de heridas

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Antonella Lombardi

Director: Dr. Carlos Luzzani

Consejera de estudios: Dra. Alejandra Guberman

Lugar de trabajo: INEU-FLENI-CONICET

Buenos Aires, 2023

Resumen

Efecto de la expresión de SPARC en células madre mesenquimales y análisis de su potencial para la regeneración de heridas

Las células madre mesenquimales (CMM) han sido ampliamente estudiadas en los últimos 30 años por su gran potencial clínico. Numerosas evidencias muestran que los efectos restauradores y regenerativos de las CMM se deben principalmente a sus efectos paracrinos mediados por su secretoma. Estas células liberan factores de crecimiento y citoquinas que modulan procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la inmunomodulación, la migración, la angiogénesis y la supervivencia. El secretoma de las CMM está compuesto tanto por factores solubles, como por factores liberados dentro de vesículas extracelulares (VE). Los exosomas, que se encuentran entre las VE secretadas por las CMM, son pequeñas vesículas de entre 50 y 120 nm de diámetro que están demostrando ser una valiosa fuente de información específica así también como huellas digitales de la progresión de enfermedades y como potenciales biomarcadores en diferentes estados fisiopatológicos.

Por otra parte, la regeneración de heridas es un proceso complejo que requiere la migración celular, el desarrollo de un entorno inflamatorio, la angiogénesis, la granulación, la formación de tejido, la re-epitelización y la remodelación de la matriz extracelular (ME). Las CMM y su secretoma tienen un papel activo en este proceso, y se ha demostrado que la aplicación terapéutica de estas células mejora los resultados de la cicatrización de heridas. Por este motivo, en los últimos años se han estudiado diferentes maneras de modificar y aumentar las capacidades regenerativas de las CMM con el objetivo de desarrollar posibles terapias para la curación de heridas cutáneas.

SPARC, también conocida como osteonectina, parece ser un actor clave del proceso regenerativo. SPARC es una glicoproteína multifuncional que se une al Ca^{2+} y pertenece a la familia de las proteínas de la ME. En animales adultos, su expresión se limita en gran medida a los tejidos en reparación o remodelación ya sea por heridas, enfermedades o procesos naturales, como los huesos y la mucosa intestinal. Se ha demostrado que SPARC regula el mecanismo de acción de varios factores de crecimiento y angiogénicos, así como también interactúa con diversas integrinas y proteasas regulando su expresión y actividad. Todas estas proteínas intervienen en numerosos mecanismos asociados al proceso de cicatrización tales como la migración, proliferación, diferenciación, angiogénesis y supervivencia celular, por lo que SPARC podría tener un rol clave en la regulación de este proceso regenerativo.

Como se mencionó anteriormente, las CMM son una herramienta prometedora para el desarrollo de futuras terapias. Hasta la fecha, se ha producido una rápida expansión de los estudios tanto preclínicos como clínicos que utilizan el secretoma derivado de las CMM con las ventajas de un sistema libre de células. Aunque este secretoma parece ser una terapia prometedora para diversas enfermedades y lesiones, todavía resta saber más sobre la generación, la naturaleza y la modificación del mismo. En este trabajo, analizamos el potencial regenerativo del secretoma de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton de cordón umbilical. Dado que SPARC está implicada en la remodelación y ensamblaje de la ME, así como en la regulación de los procesos de migración y proliferación celular, entre otros, hipotetizamos que la sobreexpresión de SPARC en las CMM tiene un efecto directo sobre la composición de su secretoma y potencialmente les conferiría una mayor capacidad regenerativa. Para

abordar nuestra hipótesis, modificamos mediante un sistema lentiviral simple y reproducible a las CMM para que sobreexpresen la proteína de secreción SPARC (+SPARC). Además, generamos una línea de células en las cuales noqueamos parcialmente la expresión de SPARC (KD-SPARC) con el fin de analizar en mayor profundidad el rol de esta proteína en el proceso regenerativo. Por otro lado, en busca de desarrollar en un futuro una plataforma biotecnológica que sea fácilmente trasladable a la clínica, nos propusimos poner a punto un sistema de cultivo en suspensión que permita hacer más eficiente el proceso de cultivar, amplificar y aislar el secretoma de las CMM.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten concluir que el cultivo 3D de CMM puesto a punto es una plataforma eficiente que permite obtener grandes cantidades de células y aislar su secretoma, ahorrando tiempo y espacio de trabajo. Demostramos que modificamos la expresión de la proteína SPARC en las CMM con un protocolo simple y reproducible. Mediante ensayos *in vitro* utilizando queratinocitos y fibroblastos de piel humana tratados con el medio condicionado (MC) de CMM *wild type* (WT) y modificadas, demostramos que el secretoma derivado de las CMM induce cambios sobre la migración y proliferación de las células tratadas. Más aún, estos cambios son SPARC-dependientes y tipo celular-específicos. Asimismo, el tratamiento con los MC de células WT, +SPARC y KD-SPARC en un modelo de cicatrización de heridas *in vivo*, nos permitió reforzar los resultados obtenidos anteriormente, observando una aceleración del proceso regenerativo con MC de células +SPARC y un evidente retraso en la cicatrización de los ratones tratados con el MC derivado de CMM KD-SPARC.

En conjunto, estos hallazgos demuestran que SPARC cumple un clave en el proceso de cicatrización de heridas cutáneas, convirtiéndolo en un blanco terapéutico de interés que debe continuar siendo estudiado y caracterizado con el objetivo de desarrollar a futuro terapias regenerativas más eficientes.

Palabras clave:

Células Madre Mesenquimales, Secretoma, SPARC, Regeneración de heridas.

Abstract

Effect of SPARC expression in Mesenchymal Stem Cells and analysis of their potential for wound regeneration

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been extensively studied in the past 30 years due to their significant clinical potential. Numerous pieces of evidence demonstrate that the restorative and regenerative effects of MSCs are primarily mediated by their paracrine effects through their secretome. These cells release growth factors and cytokines that modulate cellular processes such as proliferation, differentiation, immunomodulation, migration, angiogenesis, and survival. The secretome of MSCs is composed of soluble factors as well as factors released within extracellular vesicles (EVs). Exosomes, which are among the EVs secreted by MSCs, are small vesicles ranging from 50 to 120 nm in diameter that have proven to be a valuable source of specific information as well as fingerprints of disease progression and potential biomarkers in various pathophysiological states.

On the other hand, wound regeneration is a complex process that involves cellular migration, the development of an inflammatory environment, angiogenesis, granulation, tissue formation, re-epithelialization, and remodeling of the extracellular matrix (ECM). MSCs and their secretome play an active role in this process, and therapeutic application of these cells has been shown to improve wound healing outcomes. For this reason, different approaches have been studied in recent years to modify and enhance the regenerative capabilities of MSCs with the aim of developing potential therapies for cutaneous wound healing.

SPARC, also known as osteonectin, appears to be a key player in the regenerative process. SPARC is a multifunctional glycoprotein that binds to Ca^{2+} and belongs to the family of ECM proteins. In adult animals, its expression is largely limited to tissues undergoing repair or remodeling, whether due to wounds, diseases, or natural processes such as bone and intestinal mucosa. It has been demonstrated that SPARC regulates the action mechanism of various growth and angiogenic factors, as well as interacts with diverse integrins and proteases, regulating their expression and activity. All these proteins are involved in numerous mechanisms associated with the wound healing process, such as cell migration, proliferation, differentiation, angiogenesis, and cell survival. Therefore, SPARC could play a key role in the regulation of this regenerative process.

As mentioned earlier, MSCs are a promising tool for the development of future therapies. To date, there has been a rapid expansion of both preclinical and clinical studies using the secretome derived from MSCs, with the advantages of a cell-free system. Although this secretome appears to be a promising therapy for various diseases and injuries, more knowledge is still needed about its generation, nature, and modification. In this study, we analyzed the regenerative potential of the secretome of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of the umbilical cord. Given that SPARC is involved in ECM remodeling and assembly, as well as in the regulation of cell migration and proliferation processes, among others, we hypothesized that the overexpression of SPARC in MSCs has a direct effect on the composition of their

secretome and potentially confers them with greater regenerative capacity. To address our hypothesis, we modified MSCs to overexpress the secreted protein SPARC (+SPARC) using a simple and reproducible lentiviral system. Additionally, we generated a cell line in which SPARC expression was partially knocked down (KD-SPARC) in order to further analyze the role of this protein in the regenerative process. On the other hand, aiming to develop a biotechnological platform that can be easily translated to the clinic in the future, we set out to optimize a suspension culture system that allows for a more efficient process of culturing, amplifying, and isolating the MSC secretome.

The results obtained in this study lead us to conclude that the optimized 3D culture of MSCs is an efficient platform that allows for the generation of large quantities of cells and isolation of their secretome, saving time and workspace. We demonstrated successful modification of SPARC expression in MSCs using a simple and reproducible protocol. Through in vitro assays using human skin keratinocytes and fibroblasts treated with conditioned media (CM) from wild-type (WT) and modified MSCs, we demonstrated that the secretome derived from MSCs induces changes in the migration and proliferation of the treated cells. Furthermore, these changes are SPARC-dependent and cell type-specific. Moreover, treatment with CM from WT, +SPARC, and KD-SPARC cells in an in vivo wound healing model allowed us to reinforce the previously obtained results, observing an acceleration of the regenerative process with CM from +SPARC cells and a clear delay in wound healing in mice treated with CM derived from KD-SPARC MSCs.

Taken together, these findings demonstrate that SPARC plays a crucial role in the process of cutaneous wound healing, making it an interesting therapeutic target that should continue to be studied and characterized with the aim of developing more efficient regenerative therapies in the future.

Agradecimientos

Este trabajo es el resultado de un proceso que formó, forma y siempre formará una parte muy importante de mi vida, durante el cual muchas personas estuvieron presentes acompañándome y quisiera tomarme un momento para agradecerles.

En primer lugar, quiero agradecerle a Charlie, mi director, que a la semana de arrancar a trabajar con él ya se había dado cuenta de que iba a tener una becaria un poco cabeza dura a la que dirigir. Gracias Charlie, por aceptarme como soy y siempre darme mi espacio para pensar y trabajar a mi manera. El camino de dirigir no es nada fácil y si tengo algo para destacar de tu trabajo como director es que hasta el día de hoy seguís teniendo más fe en mí de la que yo tengo en mi misma y siempre voy a agradecerte eso.

A Santiago, que hace 6 años puso su voto de confianza en mi y decidió darme la oportunidad de unirme al laboratorio. Y que siempre estuvo dispuesto a escuchar y aconsejarme cada vez que le pedí su consejo.

También quiero agradecer a mi consejera de estudios, Ale Guberman, que siempre estuvo dispuesta a aconsejarme y guiarme durante mi carrera de doctorado.

Quiero darle un gracias enorme a todo mi grupo de trabajo, investigadores, técnicos, compañeros y compañeras becarios/as, es realmente un privilegio y un placer haber trabajado codo a codo con ustedes. No son sólo excelentes profesionales de los cuales aprendí infinidad de cosas, sino que también son excelentes personas, no importa el momento ni la situación, siempre hay alguien dispuesto a dar una mano, un consejo y hasta para hacer un café o alcanzarte un mate. Va a ser difícil superar este grupo de trabajo, que más que un grupo de trabajo se sintió como una familia, con sus momentos malos y buenos, pero siempre ahí, bancando en todas.

Quiero agradecer porque me llevo amigos y amigas de este lugar. Con los que no solo compartí momentos en el trabajo, sino que compartí mi vida fuera de él. Celes, Sole, Guadi, Ari, Caro, Joaco, Mike y los Fedes gracias por hacer que ir a trabajar sea más que sólo eso. No se imaginan lo mucho que voy a extrañar trabajar con mis amigos.

Celi, que afortunada me siento de haber arrancado este camino de la mano de una amiga. Gracias por estar siempre ahí, por frustrarte conmigo, por maldecir a las células conmigo, por nuestros almuerzos juntas, por la infinidad de charlas sobre en que estado íbamos a terminar el doctorado, por confiar en mí y ser mi espacio de confianza para hablar de lo que sea desde el día uno que arrancamos este proceso. Definitivamente no hubiese sido lo mismo sin vos amiga. Te quiero infinito.

Sole, con pocas personas en la vida me pasó de ser tan compatible y tan complementaria. Creo que nuestra amistad se dio de una manera tan natural que casi no recuerdo en que momento pasó. Lo que sí sé, es que te convertiste en una persona fundamental en mi vida. Si las horas que compartí con vos entre charlas en viaje a Fleni, salidas, mates, trámites, comidas, sesiones fingiendo que sabemos tocar el ukulele, pelis, series y mil cosas más pudiesen canjearse en millas, creo que ya nos podríamos haber ido ambas de viaje a Japón. Gracias por todo eso amiga, sos incondicional en todos los sentidos posibles. Te quiero muchísimo y no te das una idea de lo que voy a extrañar nuestro día a día.

Guadi, lo que te quiero no te das una idea. No importa en que estado emocional esté, hablar con vos siempre me saca una sonrisa. Sos una amiga de oro, siempre ahí, presente y pensando en los demás. Que privilegio ser tu amiga. Lo que voy a extrañar tus gritos y risotadas todo los días no se puede medir. Realmente alegras la vida a los demás con tu chispa.

Ari, mi investigador favorito, al cual tengo el privilegio de llamar amigo. No sólo sos la persona más inteligente que conozco, sino que además sos un crack de persona y un excelente amigo. Gracias por todos estos años explicándome con paciencia y una vocación envidiable miles de cosas. El entusiasmo con el que transmitís las cosas y vivís tu vida es muy contagioso. Gracias por tu amistad.

Joaco, que afortunada me siento de haberte conocido. No recuerdo bien que pasó primero, si nuestra sociedad o nuestra amistad. De lo que sí estoy segura es de que te convertiste en un amigo incondicional, y estuviste para mi en momentos en los que realmente lo necesitaba. Creo que Brick un poco refleja lo que somos y la dinámica que manejamos, no te das una idea de lo mucho que aprendo desde que estamos juntos en esta, haces que me desafíe a mi misma en muchos sentidos y siempre voy a valorar lo genuina y honesta que es nuestra amistad.

También quiero agradecerle a Gabi, que me recibió como si fuera familia cuando fui a USA a hacer mi estancia de investigación. Que pedazo de amigo que sos Gabi, los meses que viví con vos los voy a guardar siempre en mi corazón. Gracias por compartir todo conmigo, por las charlas, por las risas, las clases con Maddie, los bailes, por estar ahí en mis momentos de bajón y por alegrarte por mí cuando las cosas andaban bien. Te quiero y te extraño.

Quiero agradecer también a mis amigas de la vida, Guadi, Domi, Sofi y Celes. Que desde hace más de 10 años me acompañan y me bancan en todas. Creo que no hay nada que no comparta con ellas, son incondicionales y me siento realmente agradecida de haberme cruzado a estas mujeres en la vida. Las quiero con el alma amigas, gracias por esta amistad donde nada se juzga y todo se comparte.

A Rafa, que se convirtió en mi compañero de vida, el que me conoció en mis mejores momentos, pero también en los peores y sigue ahí. Sos mi cable a tierra y al mismo tiempo sos el que me ayuda a desconectarme cuando lo necesito. Gracias por acompañarme hace tantos años y remarla conmigo. Mi vida no sería la misma sin vos.

Por último, quiero agradecer a mi familia, que son la base de todo lo que soy. Los amo y les agradezco el apoyo incondicional que siempre me dan en todos los proyectos que encaro. Que afortunada soy de tenerlos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	6
ABREVIATURAS.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
Células Madre.....	13
Células Madre Mesenquimales.....	14
Fuentes de aislamiento de CMM.....	17
Cultivo a gran escala de CM.....	19
CMM y su uso en terapia regenerativa.....	22
El secretoma de las CMM.....	24
Vesículas extracelulares.....	26
Exosomas.....	28
Exosomas de CMM.....	29
Modificación de CMM y su secretoma.....	33
SPARC.....	35
Interacción con componentes de la ME.....	37
Interacción con factores de crecimiento.....	37
Interacción con integrinas.....	38
Regeneración de heridas cutáneas.....	39
Cicatrización normal de heridas.....	41
Cicatrización patológica de heridas.....	43
CMM en regeneración cutánea.....	45

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
Cultivo celular de CMM-WJ en dos dimensiones (2D).....	49
Cultivo de CMM-WJ en suspensión (3D).....	49
Medición de la concentración de glucosa en cultivos 3D.....	50
Cultivo celular de las líneas celulares HaCat y CCD-32Sk.....	50
Cuantificación del número de células.....	51
Criopreservación y descongelamiento de las líneas celulares utilizadas.....	51
Extracción de ADN genómico.....	51
Detección de contaminación con <i>Mycoplasma sp.</i>	52
Extracción de ARN total.....	52
Tratamiento con DNAsa y Retrotranscripción.....	53
Diseño de <i>primers</i> para analizar los ARNm.....	53
PCR a punto final.....	54
PCR en tiempo real.....	54
Clonado para la generación de los plásmidos.....	55
Clonado del plásmido pLJM1-CMV-SPARC-Puro para la sobreexpresión de SPARC.....	55
Clonado del plásmido pLKO1-shSPARC-Puro para el <i>knockdown</i> de SPARC.....	57
Transformación de bacterias.....	58
Purificación y chequeo de plásmidos clonados.....	58
Producción de partículas lentivirales.....	58
Transducción de células con lentivirus.....	59
Condicionamiento de medio de CMM-WJ.....	59
Aislamiento de exosomas mediante Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC).....	60
Análisis y detección de exosomas por citometría de flujo.....	60
Aislamiento de exosomas mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad.....	61
Visualización de exosomas por microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	62
Ensayo <i>in vitro</i> de cerrado de herida o <i>Wound Healing Assay</i>	62
Ensayo <i>in vivo</i> de cerrado de herida.....	62
Ensayo de incorporación o <i>up-take</i> de exosomas por células receptoras.....	63
Tinción de exosomas.....	63

Ensayo de <i>up-take</i> con células HaCat.....	63
Análisis de marcadores proteicos de membrana por citometría de flujo.....	63
Inmunomarcación y microscopía de fluorescencia.....	64
Inmunomarcación de células crecidas en 2D.....	64
Inmunomarcación de células crecidas en 3D.....	65
Análisis de proteínas por Western Blot	65
Extractos de proteínas de lisados celulares.....	65
Extracto de proteínas de muestras de exosomas.....	66
Ensayo de ciclo celular con ioduro de propidio (IP).....	66
Análisis estadístico.....	67
RESULTADOS.....	68
Capítulo 1	68
1.1 Puesta a punto del cultivo 3D de CMM.....	68
1.2 Caracterización del cultivo 3D de CMM-WJ.....	70
Capítulo 2	75
2.1 Modificación de la expresión de SPARC en CMM-WJ.....	75
2.2 Caracterización de las CMM-WJ +SPARC y KD-SPARC.....	80
2.3 Aislamiento de exosomas derivados de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC.....	85
2.4 Aislamiento de exosomas derivados de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC cultivadas en 3D.....	86
Capítulo 3	87
3.1. Ensayos funcionales <i>in vitro</i> con medio condicionado de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC.....	87
3.2. Ensayo de cicatrización de herida <i>in vivo</i> con medio condicionado de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC.....	96

DISCUSIÓN.....	104
CONCLUSIONES.....	111
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

Abreviaturas

2D: 2 dimensiones

3D: 3 dimensiones

α -MEM: alpha Mínimum Essential Media

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

CCD-32Sk: human normal skin fibroblasts

CMM-WJ: Células Madre Mesenquimales de la gelatina de Warthon

CMM: Células Madre Mesenquimales

CU: Cordón Umbilical

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

D-MEM: Dulbecco animal Essential Media

DMSO: Dimetil Sulfóxido

dNTPs: desoxi-ribonucleótidos-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Fw: Forward

HaCat: Human Epidermal Keratinocytes

MO: Médula Ósea

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polimerase Chain Reaction

PFA: Paraformaldehído

RT-qPCR: Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction

Rv: Reverse

SEC: Size Exclusion Chromatography

SFB: Suero Fetal Bovino

SPARC: Secreted Protein Acidic Rich in Cystein

TA: Tejido Adiposo

WGA: Wheat Germ Agglutinin

VE: Vesículas Extracelulares

Introducción

Células Madre

Las células madre son células con una capacidad única de autorrenovación y diferenciación en más de un linaje celular¹. Se denomina autorrenovación al proceso mediante el cual una célula se divide mitóticamente para dar dos células hijas idénticas entre sí. Por otro lado, la capacidad de diferenciación implica cambios fenotípicos de la célula hacia otro tipo celular bajo la influencia de estímulos específicos, y su especialización para el cumplimiento de una función determinada. Una forma de clasificar estas células se basa en su capacidad de diferenciación^{1,2}.

En primer lugar, las células madre totipotentes pueden dar lugar a cualquier célula de un embrión, pero también a tejido extraembrionario. Tienen su origen luego de la fecundación, en la cual el ovocito y el espermatozoide se unen para formar el cigoto. El mismo sufre una serie de divisiones mitóticas dando origen a células hijas llamadas blastómeros, los cuales conservan la totipotencia hasta el estadio de ocho células. Las células totipotentes tienen la capacidad de diferenciarse hacia cualquier tipo celular y de dar un individuo completo por sí mismas (Fig. 1).

Por otro lado, tenemos las células madre pluripotentes que son capaces de diferenciarse a las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) y en consecuencia a todos los tipos celulares presentes en un individuo adulto. Sin embargo, no pueden diferenciarse en tejidos extraembrionarios como la placenta, por ejemplo. Ejemplos de estas células se encuentran en estadios más avanzados del desarrollo, cuando el cigoto se divide hasta formar una masa compacta de células, la mórula, que luego da origen al siguiente estadio, el blastocisto. Éste consiste en una capa exterior de células llamadas trofoblasto, una masa compacta de células denominada macizo celular interno (MCI) y un espacio o cavidad llamada blastocele. Las células del MCI son pluripotentes y se denominan células madre embrionarias (CME) (Fig. 1)³.

Las células madre multipotentes, con menor potencial de diferenciación, sólo pueden diferenciarse en un tipo de tejido embrionario. Estas células se encuentran en distintos órganos y tejidos del individuo adulto, con la función de dividirse y diferenciarse para mantener la integridad y función de los mismos a lo largo de la vida¹. Ejemplos de estas células son las células madre hematopoyéticas de la médula ósea que dan origen a los distintos linajes sanguíneos. Por otro lado, se encuentran las células madre mesenquimales (CMM) que están presentes en médula ósea y el tejido adiposo y se diferencian a tipos celulares con función estromal, como miocitos, adipocitos, condrocitos y osteocitos^{3,4} (Fig.1).

Por último, las células madre oligopotentes y unipotentes son las que se observan en los tejidos de los órganos adultos, estas células están comprometidas con un linaje celular y sólo pueden diferenciarse en tipos celulares dentro de ese linaje¹. Por ejemplo, debajo de la lámina basal de las fibras musculares se encuentra un grupo de células madre llamadas células satélite, que tienen la capacidad de diferenciarse a fibras musculares para reparar una eventual lesión, así como de autorrenovarse para mantener un conjunto de células indiferenciadas.

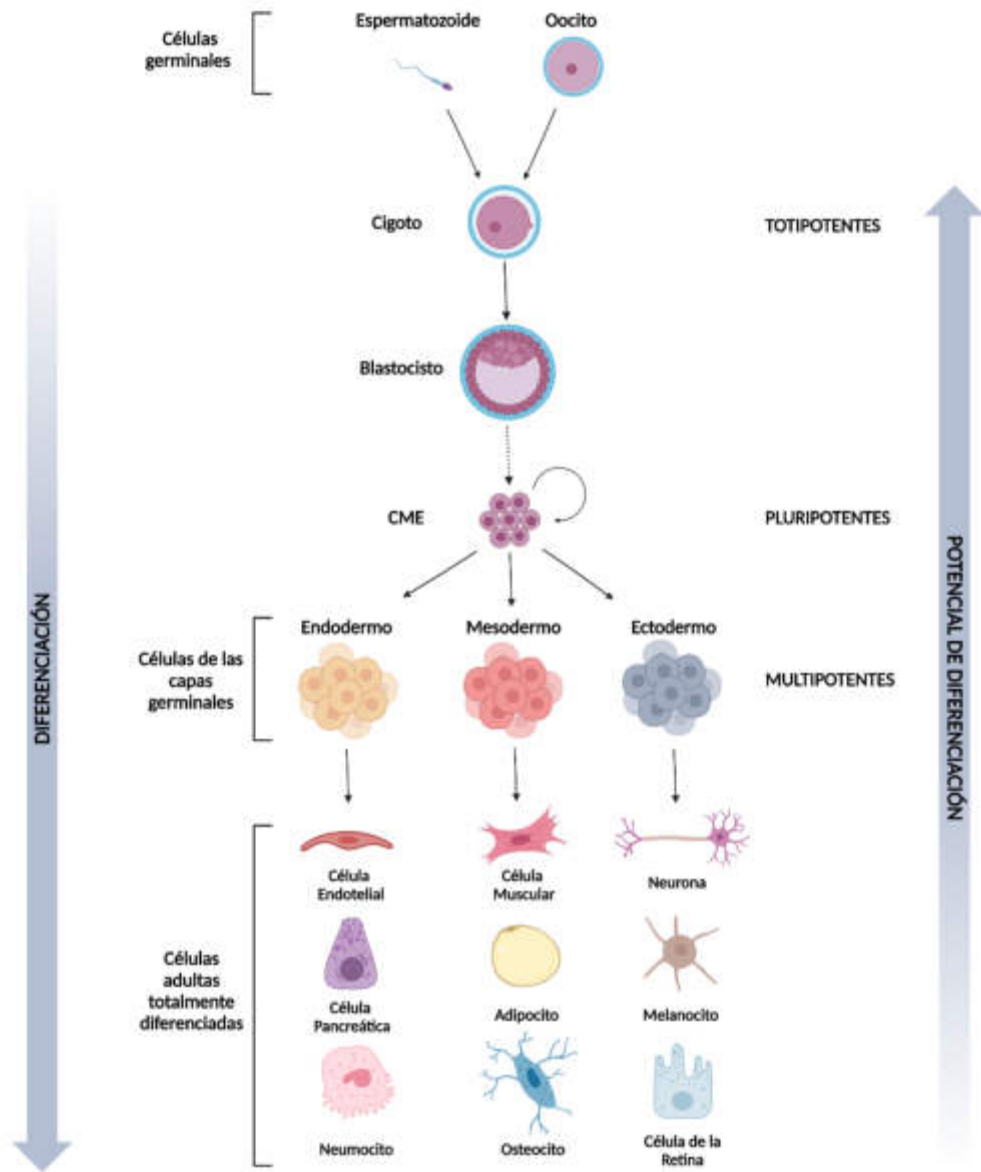


Figura 1. Tipos de células madre y su potencial de diferenciación. CME: Células Madre Embrionarias (figura creada con BioRender.com).

Células Madre Mesenquimales

Las células madre mesenquimales (CMM), también llamadas células madre estromales, son células multipotentes que se definen funcionalmente por su capacidad de autorrenovación y su capacidad para diferenciarse en múltiples tipos celulares, como adipocitos, condrocitos, osteocitos, células musculares lisas, fibroblastos, entre otros. Pueden aislarse de diferentes tejidos tales como músculo

esquelético, tejido adiposo, cordón umbilical, pulpa dental, líquido amniótico, también de sangre fetal, hígado, médula ósea, pulmón y corazón⁴⁻⁶. Debido a la heterogeneidad de su origen, el comité de Células Madre Mesenquimales y de tejido Mesenquimal de la Sociedad Internacional de Terapia Celular estableció un criterio mínimo que debe cumplir una célula para ser llamada CMM. En primer lugar, las CMM deben ser adherentes al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar. En segundo lugar, $\geq 95\%$ de la población de CMM debe expresar los marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90, medido por citometría de flujo. Además, estas células deben carecer de expresión ($\leq 2\%$ positiva) de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA clase II. En tercer lugar, las células deben ser capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos en condiciones estándar de diferenciación in vitro^{7,8}.

Las CMM pueden dividirse en dos clases: CMM adultas y CMM fetales/perinatales, derivadas respectivamente de tejidos adultos, como la médula ósea (MO) y el tejido adiposo (TA), y de tejidos fetales/perinatales, que incluyen células obtenidas del propio embrión/feto y células obtenidas de tejidos extraembrionarios, también conocidos como tejidos asociados al parto, como la placenta, el cordón umbilical (CU), las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton (WJ, del inglés *Wharton jelly*) y la membrana amniótica⁵ (Figura 2).

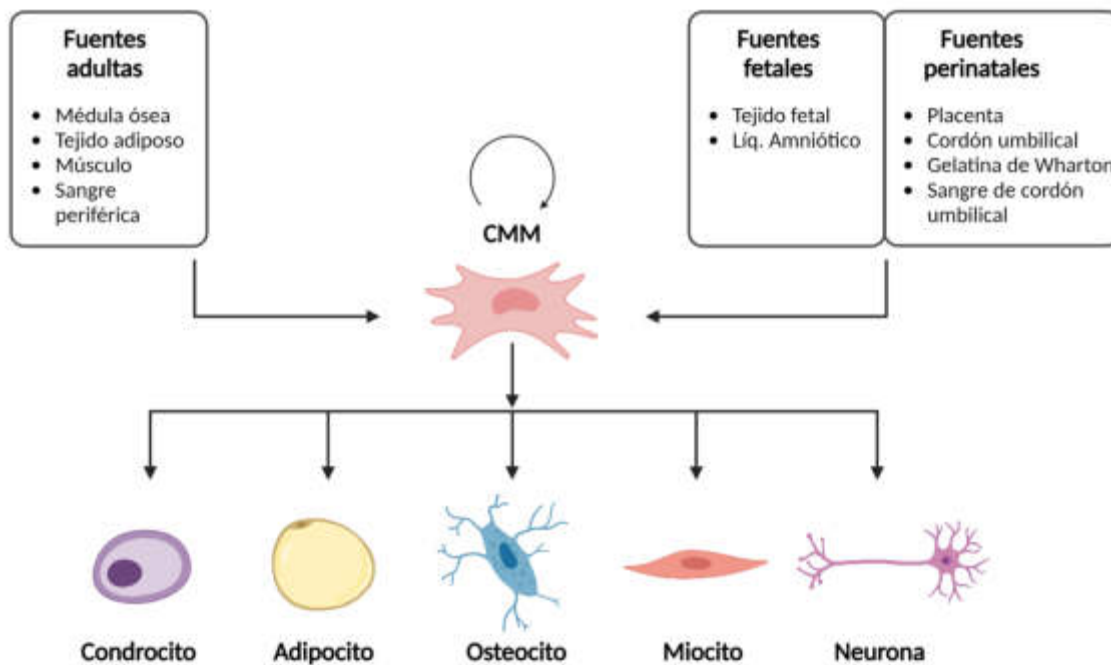


Figura 2. Células Madre Mesenquimales: fuentes de aislamiento y potencial de diferenciación a diferentes linajes (figura creada con BioRender.com).

En los últimos 30 años se ha puesto en foco el estudio de las CMM debido a sus interesantes características biológicas, entre ellas, su capacidad de migración y “*homing*” hacia los sitios de lesión, sus funciones inmunomodulatorias y su potencial de diferenciación a diferentes linajes celulares que les confieren un amplio potencial clínico y un papel fundamental en el creciente campo de la ingeniería de

tejidos⁹. En la actualidad, las CMM están siendo utilizadas en una variedad de ensayos clínicos y preclínicos para el tratamiento de diversas enfermedades (www.clinicaltrials.gov). En un principio, se creía que su función en la regeneración de tejidos se daba mediante su diferenciación a diferentes tipos celulares en el lugar de la lesión y así reemplazar las células del tejido dañado. Actualmente se considera que, al menos en parte, esto no ocurre de esta manera. Se ha demostrado que las CMM secretan una variedad de moléculas entre las cuales se encuentran citoquinas, factores de crecimiento, moléculas antioxidantes y factores pro-angiogénicos que actúan de forma paracrina y contribuyen favorablemente en la regeneración de los sitios lesionados¹⁰. Estos factores aumentan la reparación del tejido dañado disminuyendo la respuesta al estrés y apoptosis de las células dañadas y regulando en forma local y sistémica la respuesta inflamatoria e inmunológica, logrando una mejor reparación de tejido con una mayor persistencia de las células primarias en proceso de apoptosis debido a la respuesta inflamatoria (Fig. 3)¹¹.

Las señales inmunomoduladoras de las CMM no son sólo antiinflamatorias. Se encuentra reportado que las CMM pueden adoptar un perfil proinflamatorio estimulando la supervivencia y función de células inmunes o uno antiinflamatorio, inhibiendo la inflamación y estimulando la reparación según la vía activada a través de la activación de distintos tipos receptores que pueden ser expresados, sugiriendo que la actividad inmunomoduladora de las CMM no se limita a la inmunosupresión, sino que es parte de una compleja red de transducción de señales e interacción con otras células y con el ambiente extracelular (Fig.3)^{11,12}.

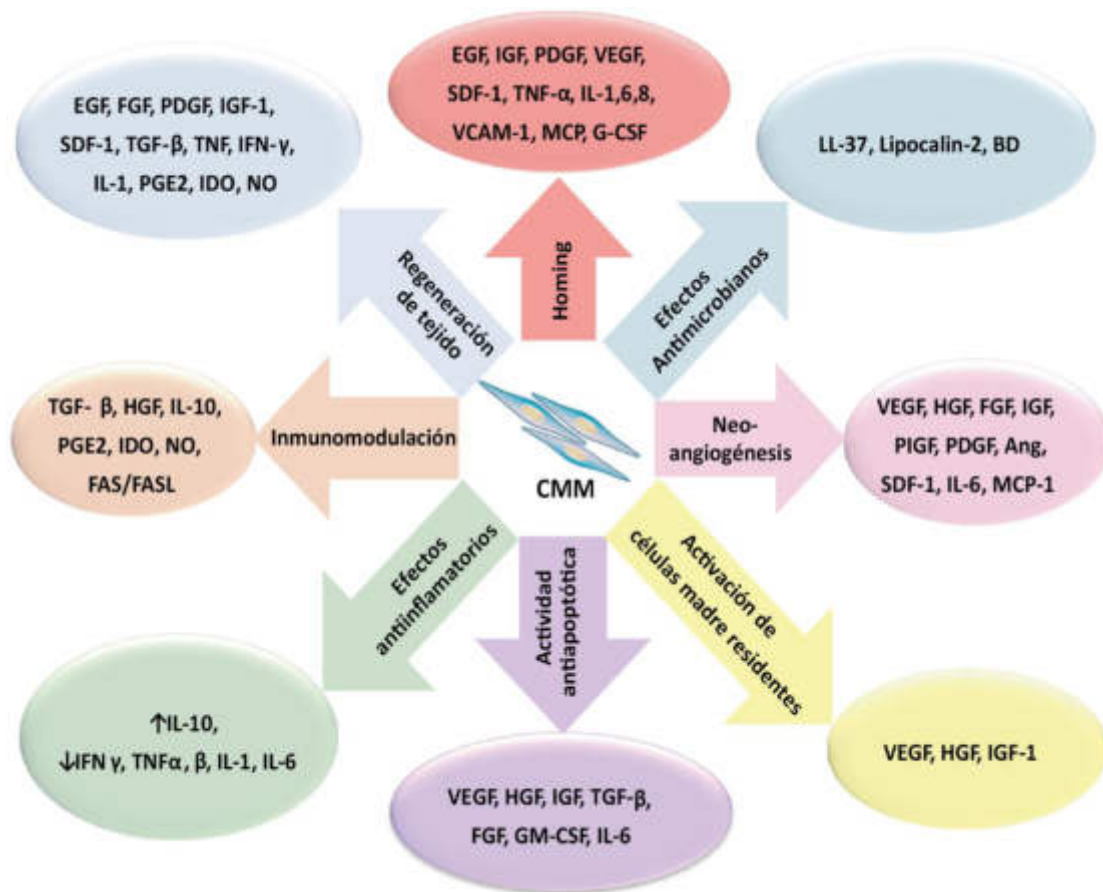


Figura 3: Esquema representativo de las funciones biológicas de las CMM y moléculas/factores implicados en estas funciones. IL: interleuquinas; IFN γ : interferón- γ ; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; TGF: factor de crecimiento transformador; BD: beta defensinas; EGF: factor de crecimiento epidérmico; IGF: factor de crecimiento similar a la insulina; FGF: factor de crecimiento de fibroblastos; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; SDF-1: factor 1 derivado de células estromales; Ang: angiopoyetina; MCP: proteína quimioatrayente de monocitos; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos;IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa; NO: óxido nítrico; PGE2: prostaglandina E2; LL37: catelicidina humana; VCAM-1: proteína de adhesión a células vasculares 1; PIGF: factor de crecimiento placentario (figura adaptada de Saeedi *et al.*, 2019).

Si bien las CMM son una alternativa que ofrece muchas ventajas en el desarrollo de terapias regenerativas e inmunológicas, su aplicación presenta algunos inconvenientes. Por un lado, los protocolos de terapia celular suelen requerir cientos de millones de células por tratamiento y aunque las CMM pueden aislarse de múltiples tejidos adultos, su cantidad global en el organismo es escasa y su extracción puede resultar en procedimientos invasivos y dolorosos. Por otra parte, la edad del paciente y las características clínicas influyen en las condiciones óptimas de cultivo para la producción a escala clínica de CMM humanas^{9,13}. Además, tanto las fuentes de tejido adulto como las perinatales o fetales brindan CMM cuyas propiedades inmunomoduladoras y capacidad de diferenciación se ven notablemente disminuidas con los pasajes *in vitro*, limitando su tiempo de amplificación en cultivo. Por este motivo, se busca no sólo poder aislarlas de fuentes que no requieran un procedimiento invasivo o doloroso para el paciente, sino también desarrollar protocolos de cultivo *in vitro* para amplificar las CMM a mayor escala, de manera más rápida y eficiente, para luego ser utilizadas en diversas aplicaciones.

Fuentes de aislamiento de CMM

Las CMM fueron identificadas inicialmente en la MO, desde entonces se han extraído poblaciones de CMM de fuentes autólogas y alogénicas, como el TA, la sangre periférica, el pulmón, los fluidos sinoviales, el ligamento periodontal y de músculo. Además, también se obtienen de la placenta, el CU y la sangre del CU, así como de la pulpa dental. A pesar de las múltiples fuentes existentes, no todas son clínicamente útiles. La MO es la fuente más caracterizada de CMM y muy enriquecida en éstas (CMM-MO), sin embargo, el aislamiento a partir de esta fuente es un procedimiento complicado, muy invasivo e incluso doloroso^{4,8}. Se obtienen mediante aspiración y el método de aislamiento más típico luego de la aspiración se basa en la capacidad de las CMM para adherirse a placas de cultivo de plástico. Se separan las células mononucleares de los glóbulos rojos, las plaquetas y los granulocitos mediante centrifugación. Posteriormente, la fracción de células que se adhiere a la placa presenta una morfología fibroblástica y luego de 2 o 3 semanas de cultivo, se originan colonias a partir de las células adheridas⁴.

En los últimos tiempos, ha crecido el interés en métodos de aislamiento más sencillos a partir de otras fuentes de CMM, la obtención de células derivadas de TA, es una de ellas. Las CMM derivadas de tejido adiposo (CMM-TA) se aíslan mediante lipoaspiración de tejidos grasos subcutáneos, peritoneo y grasa inguinal. Existen muchos métodos diferentes para aislar y digerir los tejidos adiposos, en general consisten en digestiones enzimáticas y pos-cultivo de las células adherentes⁴. Por otro lado, los tejidos

perinatales como la placenta y el líquido amniótico o los tejidos del CU son otras fuentes fácilmente accesibles de CMM consideradas seguras y de obtención sencilla y no invasiva. Las CMM-CU pueden aislarse por sedimentación y separación de las células sanguíneas en el caso de las obtenidas a partir de la sangre de CU, o a partir del tejido por digestión enzimática o por cultivo de explantes de CU de 1-3 mm^{4,14,15}. Este último procedimiento es el utilizado comúnmente para aislar las CMM derivadas de la gelatina de Wharton (CMM-WJ) como las utilizadas en el presente trabajo (Fig.4).

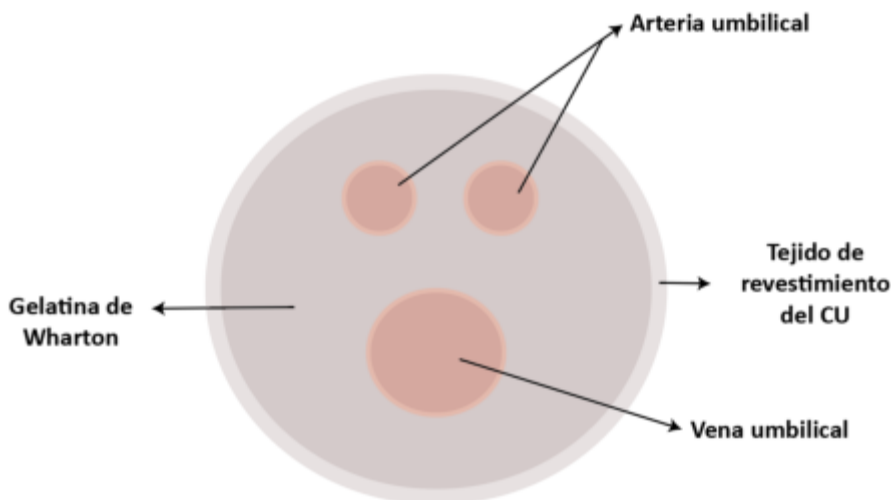


Figura 4. Diagrama de corte transversal de CU que muestra las distintas partes de donde pueden aislarse CMM. Figura adaptada de Ding *et al.*, 2015.

Las CMM-WJ ofrecen varias ventajas con respecto a las CMM derivadas de tejidos adultos como la MO y el TA. La eficiencia de aislamiento es una de ellas, mientras que la cantidad de células que puede obtenerse de MO es muy limitada, entre el 0,001-0,01% de las células mononucleares y con respecto al TA, 1 g de éste produce aproximadamente 5×10^3 CMM-TA (una cantidad 500 veces superior a la de la MO); la eficacia del aislamiento a partir de gelatina de Wharton es mayor que las anteriores y oscila entre 1 y 5×10^4 células/cm de tejido del CU. La capacidad proliferativa es otra de las ventajas a destacar, diferentes grupos de investigación han demostrado que la tasa de proliferación de las CMM difiere en función de la fuente tisular de la cual se derivan, siendo las CMM-WJ las que presentan mayor actividad proliferativa, con un tiempo de duplicación menor y más estable que las CMM-MO y CMM-TA¹⁶. Otro factor, no menor, a tener en cuenta es la exposición a largo plazo (durante la vida de un adulto) de las CMM derivadas de tejidos adultos a factores intrínsecos, por ejemplo, medios inflamatorios y extrínsecos, como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) utilizados habitualmente en pacientes para tratar síntomas de inflamación, dolor y fiebre. Estos factores, a los que las CMM-WJ no se encuentran expuestas, pueden influir enormemente en la viabilidad o plasticidad de las células^{14,17}.

Si bien las CMM-WJ (como las CMM adultas) presentan algunas limitaciones relacionadas al mantenimiento de la actividad biológica, su potencial regenerativo que disminuye con los pasajes y su amplificación en cultivo a fines de obtención a gran escala para uso clínico, las características y ventajas mencionadas previamente las convierte en excelentes candidatas para ser usadas en terapias celulares y medicina regenerativa.

Cultivo a gran escala de CM

Uno de los principales desafíos en el uso de CMM surge de la necesidad de obtener de forma reproducible una cantidad y calidad clínicamente relevantes de células, lo que sólo puede lograrse identificando métodos de cultivo a gran escala apropiados para éstas. Ya sea para la aplicación de las células *per se* (para inyectar en pacientes, por ejemplo) o para aislar y utilizar su secretoma, la atención debe centrarse en que las CMM conserven sus principales atributos de calidad en cuanto a identidad, potencia, pureza y seguridad, independientemente de la aplicación terapéutica prevista. Por otra parte, la expansión de estas células se dificulta por el hecho de que dependen de una superficie de anclaje para adherirse y proliferar, lo cual también constituye un desafío para su expansión a gran escala¹⁸⁻²⁰.

Existe una variedad de técnicas que se emplean actualmente para el escalado de células dependientes de anclaje (o células adherentes), cada una con sus ventajas y desventajas, sin embargo, todas ellas generalmente implican facetas similares, y siguen la premisa de que cuanto más superficie de crecimiento se pueda incorporar a un volumen determinado, más células se podrán producir a partir de ese volumen, creando así un proceso más eficiente. Uno de los enfoques contemporáneos más común para el escalado de cultivos es el de los recipientes multicapa, conocidos como fábricas de células (*Cell stacks* o *Cell factories*) (Fig. 5A), que están diseñados como capas apiladas dentro de una cámara para permitir el manejo de todas las capas al mismo tiempo y proporcionar una mayor eficiencia de espacio (con superficies de hasta 25.440 cm² por unidad) y una expansión más económica que los frascos T o las placas usadas en el cultivo tradicional en monocapa (o cultivo en dos dimensiones (2D)). Sin embargo, su uso plantea algunas desventajas, como la heterogeneidad del entorno físico y químico dentro de la unidad, dado que el sistema es estático, el intercambio gaseoso en el centro de la unidad podría ser distinto al de la parte superior o inferior. Si hay una diferencia significativa, podría afectar a las células y provocar variabilidad. Además, al igual que ocurre con el cultivo tradicional, las fábricas de células no permiten una supervisión o un control rutinario de las condiciones del cultivo^{18,19}. Otro sistema es el de los frascos o botellas giratorias (*Roller bottles*) (Fig. 5B). Son un tipo de cultivo en monocapa que puede proporcionar una superficie de adherencia aún mayor (>350.000 cm²). A diferencia de los frascos T tradicionales o de las fábricas de células, los frascos giratorios permiten agitar el medio de cultivo evitando la acumulación y formación de gradientes que puedan tener un efecto adverso sobre las células. También garantizan que sólo una fina capa del medio cubra las células, lo que permite un mayor intercambio de gases. Entre sus desventajas, están el hecho de que requieren mucha manipulación humana por lo que, de no automatizar el proceso, conllevarían un riesgo alto de posibles contaminaciones; controlar las condiciones de cultivo resulta difícil y por último, pero no menos importante, ocupan mucho espacio en las incubadoras y resulta complicado manipular muchas botellas en tiempos cortos¹⁸.

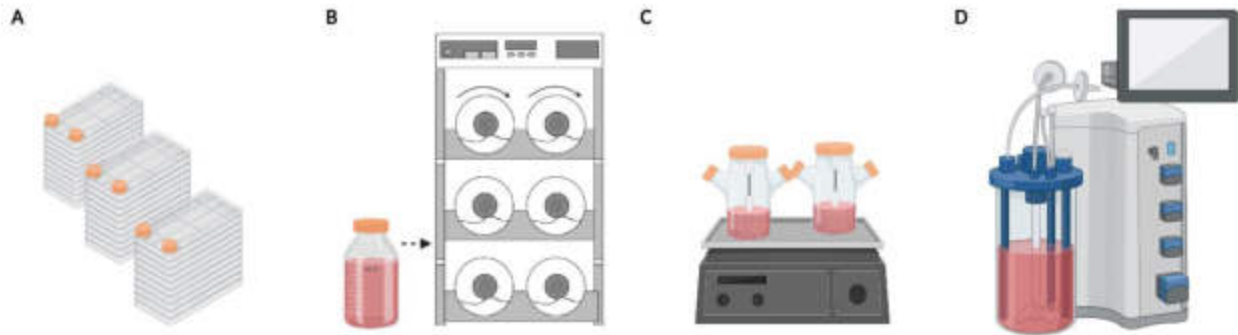


Figura 5. Ilustración de sistemas de cultivo a gran escala. A: *Cell factories*. B: Botellas giratorias en incubadora. C: *Spinners* sobre agitador magnético. D: Biorreactor pequeño con controlador. Figura creada con BioRender.com.

A pesar de los avances de la tecnología de cultivo en monocapa, la relación superficie/volumen que proporcionan los sistemas descritos representa sólo un aumento marginal de la eficiencia. Además, son voluminosos, difíciles de manipular, ocupan mucho espacio en las incubadoras y son difíciles de automatizar, por lo que no terminan siendo las configuraciones más eficientes en términos de escalabilidad. Por otro lado, los sistemas basados en *microcarriers* para la expansión de CMM alivian en gran medida muchos de los principales problemas asociados a los sistemas de cultivo en 2D (Fig. 5C-D). Los *microcarriers* son micropartículas esféricas (también llamadas *beads*) que funcionan como matriz de soporte, pueden ser de distintos materiales y texturas (sólidos ó microporosos) y proporcionan superficies para la adhesión y el crecimiento de las células, aumentando drásticamente la relación superficie/volumen en cultivos en suspensión o 3D^{18,20}. Gracias al reciente aumento del interés en expandir y trasladar el uso de CMM de las fases de investigación y desarrollo a la fabricación comercial para terapias regenerativas, se han realizado numerosos estudios empíricos (principalmente por el sector industrial) que han demostrado que los cultivos en biorreactores con *microcarriers* pueden alcanzar una producción celular volumétrica casi 80 veces mayor, ocupando solamente el 10% del espacio de fabricación actual y con un costo de producción reducido en comparación con los sistemas de cultivo celular en 2D¹⁹. Otra ventaja es que al ser un sistema 3D que requiere un flujo dinámico para mantener en suspensión las *beads*, el medio se homogeniza constantemente, esto permite la transferencia de oxígeno, nutrientes y metabolitos celulares de manera mucho más eficiente que la difusión que se requiere en el cultivo 2D. Además, las condiciones del cultivo pueden controlarse de manera muy simple y una vez puesto en marcha requiere muy poca intervención de operarios, con lo que se reduce la probabilidad de contaminaciones^{18,19}. La Figura 6 muestra el enfoque básico de la producción a mayor escala de CMM en un sistema de cultivo en suspensión basado en *microcarriers*.

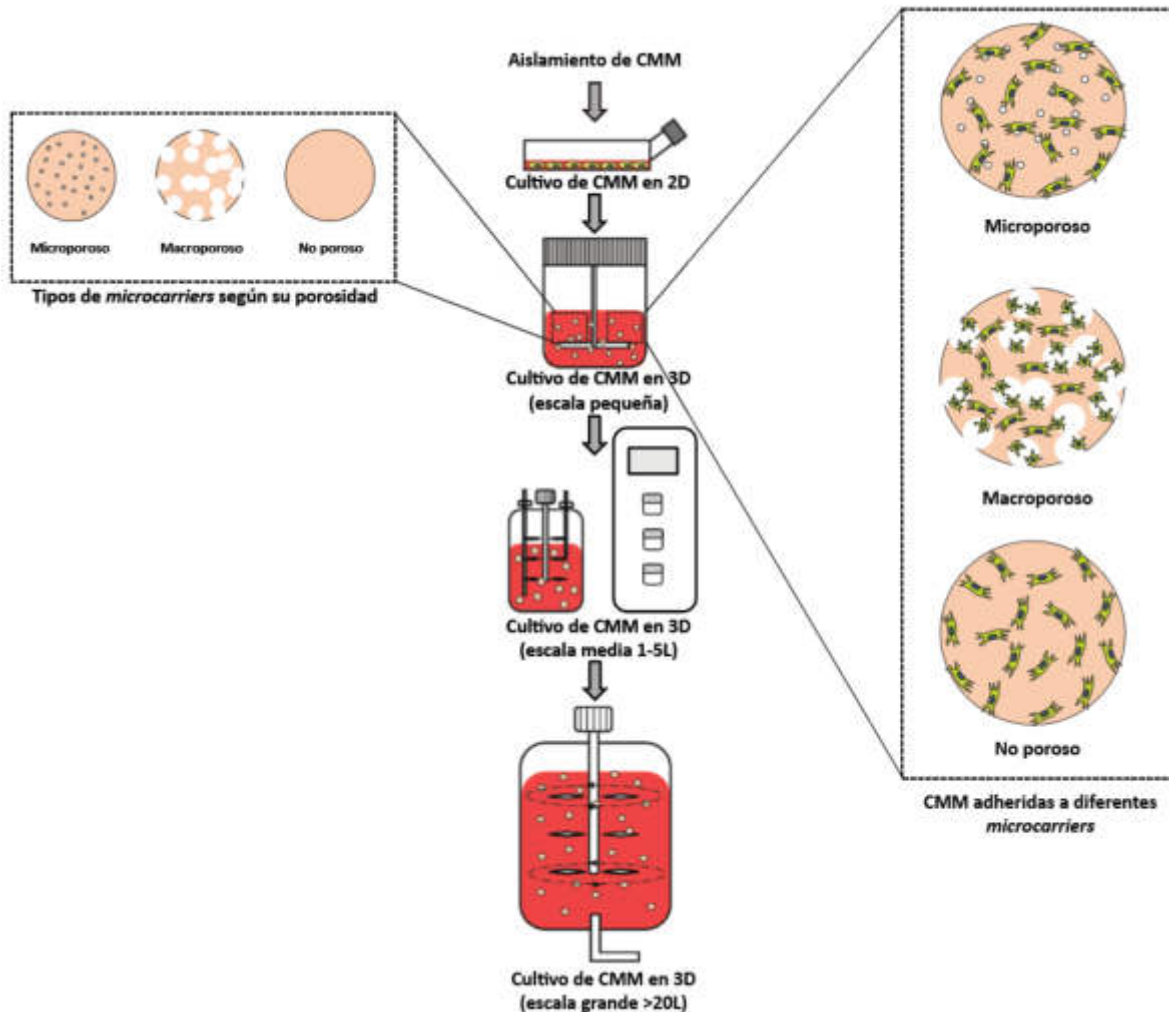


Figura 6. Esquema que ilustra el flujo básico de la amplificación del cultivo de CMM de la escala de laboratorio a la escala industrial (figura adaptada de Koh. *et al.* 2020)

Como cualquier otro sistema, el cultivo 3D basado en *microcarriers* también presenta algunas desventajas y desafíos. El flujo dinámico por sí solo induce una tensión en las células, conocida como *shear stress* y las colisiones célula-*bead* y célula-célula influyen en el crecimiento y la calidad de las células, por lo que controlar muy bien las condiciones de agitación del cultivo es clave. Otro factor a tener en cuenta es que las superficies de crecimiento celular en los cultivos de *microcarriers* son muy diferentes de las superficies planas que ofrecen los frascos T o las placas de Petri, por lo que la densidad de siembra celular y la homogeneidad al adherirse a las beads son cruciales^{19,21}. Mas allá de esto, actualmente se considera como la plataforma más eficiente en términos de escalabilidad y automatización para cultivar y expandir CMM.

CMM y su uso en terapia regenerativa

La medicina regenerativa se centra en la restauración y regeneración de tejidos y órganos dañados. La capacidad de renovación de las células madre y su potencial para diferenciarse en otras células especializadas las convierte en un blanco de estudio en esta área. En 1995, Lazarus et al. planteó el uso de las CMM como terapia celular similar al trasplante de MO, más tarde en la década del 2000, otros estudios sobre algunas funciones de las CMM, en particular su capacidad de migración hacia los sitios de injuria y sus características inmunosupresoras, llamaron mucho la atención de la comunidad. Esto generó un crecimiento amplio en las investigaciones tanto en entornos preclínicos como clínicos para evaluar sus efectos terapéuticos en enfermedades degenerativas y/o inflamatorias que carecían de tratamientos adecuados^{4,22}.

La capacidad terapéutica de las CMM se ve reflejada en las diversas funciones biológicas que desempeñan en los sitios de lesión tisular o inflamación (Fig. 7). Estas actividades terapéuticas implican la modulación de las células inmunitarias locales para inhibir su vigilancia del tejido dañado, inhibiendo así el inicio de actividades autoinmunes. Además, las CMM producen efectos tróficos mediante la secreción de un espectro de moléculas bioactivas que inhiben la apoptosis (especialmente en áreas de isquemia), previenen la formación de cicatrices, remodelando la matriz extracelular (ME) y estimulan la angiogénesis mediante la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés: *Vascular Endotelial Growth Factor*) para atraer a las células endoteliales a formar nuevos vasos sanguíneos, formando contactos perivasculares que estabilizan los vasos recién formados y secretando mitógenos que afectan directamente a los progenitores intrínsecos del tejido^{12,13,23-25}.



Figura 7. Diagrama de las principales funciones biológicas de las CMM de interés terapéutico. El diagrama muestra tres moléculas representativas implicadas en cada una de estas funciones. Adipo: adipocito, condro: condrocito, osteo: osteocito (figura adaptada de Naji, A. et al. 2019).

Estos efectos han dado lugar a terapias clínicamente relevantes y actualmente cientos de ensayos clínicos utilizan CMM, solas o en combinación con otros fármacos, para probar intervenciones terapéuticas en numerosas enfermedades (más de 1500 ensayos clínicos registrados en www.clinicaltrials.gov). Estos ensayos están diseñados principalmente para el tratamiento de ortopedia, enfermedades degenerativas y autoinmunes, procesos inflamatorios severos como también para tratamientos contra el rechazo inmunitario en, por ejemplo, trasplantes alogénicos (Fig. 8)²². La mayoría de las enfermedades para las que se ha publicado una utilidad clínica, son enfermedades que no disponen actualmente de tratamientos específicos con resultados deseables. Dentro del área de la cardiología, por ejemplo, se han encontrado resultados prometedores en enfermedades como miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca isquémica y no isquémica, donde se observaron mejoras tanto clínicas como fisiopatológicas luego de la administración local o intravenosa de CMM (tanto con células provenientes de una fuente autóloga o alogénica de MO). Las lesiones de cartílago y/o artrosis, especialmente en la rodilla son otro potencial terapéutico muy estudiado. Se han publicado dos estrategias de tratamiento con buenos resultados basadas en el uso de CMM: la inyección intraarticular y la sustitución del tejido defectuoso con una estructura de fibrina con condrocitos y CMM-MO alogénicas; ambos enfoques informan mejoras clínicas del dolor, la rigidez y la funcionalidad²⁶.

Como ya se mencionó previamente, los efectos terapéuticos de las CMM se atribuyeron en un principio a su capacidad de homing y diferenciación. Sin embargo, se ha demostrado que el tiempo de implantación de estas células suele ser demasiado corto para tener un efecto eficaz y menos del 1% de las CMM sobreviven más de una semana luego de su administración sistémica, lo que sugiere que los principales efectos de las CMM estarían mediados por mecanismos paracrinos¹³. Por lo tanto, el secretoma de las CMM cumple un rol clave y tiene un gran potencial para ser usado en el desarrollo de terapias libres del componente celular.

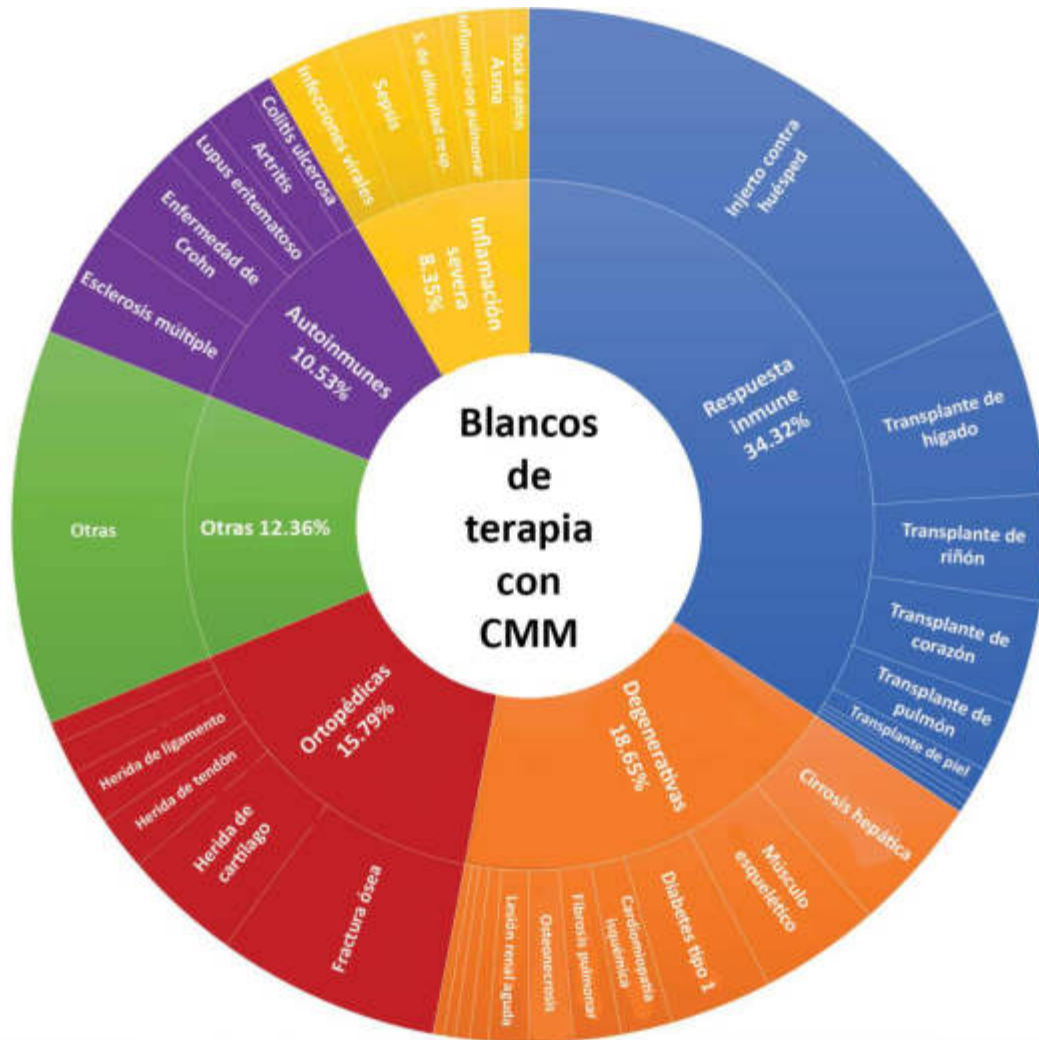


Figura 8. Diagrama de los blancos terapéuticos tratados con CMM por proporción de ensayos. Se muestran los porcentajes de las áreas terapéuticas generales en las cuales las CMM son más utilizadas y ejemplos de diversas condiciones médicas dentro de cada área (figura adaptada de Naji, A. *et al.* 2019).

El secretoma de las CMM

En los últimos años, se afianzó el concepto de un nuevo mecanismo regulatorio que involucra la comunicación entre células a través de las sustancias que éstas secretan, lo que se conoce como secretoma. El secretoma se define como el conjunto de factores/moléculas secretadas al espacio extracelular. Estos factores incluyen, entre otros, proteínas solubles, ácidos nucleicos libres, lípidos y vesículas extracelulares (estas últimas se dividen en apoptosomas, microvesículas y exosomas); es específico de cada célula y tejido y puede cambiar en respuesta a las fluctuaciones de los estados fisiológicos o las condiciones patológicas¹³.

El uso del secretoma derivado de CMM en medicina regenerativa como terapia libre de células ofrece ventajas clave sobre las aplicaciones basadas en células madre: 1) la aplicación del secretoma resuelve varias consideraciones de seguridad potencialmente asociadas al trasplante de poblaciones celulares vivas y proliferativas, como la inmunocompatibilidad, la tumorigenicidad, la formación de embolias y la transmisión de infecciones; 2) el secretoma de las CMM puede evaluarse en cuanto a seguridad, dosificación y potencia de forma análoga a los agentes farmacéuticos convencionales; 3) puede almacenarse sin aplicación de agentes criopreservantes potencialmente tóxicos durante un largo período de tiempo sin que el producto pierda sus cualidades; 4) el uso de secretoma, como el medio condicionado (MC) de CMM (CMM-MC), es más económico y más práctico para la aplicación clínica, ya que evita los procedimientos invasivos de obtención de células de los pacientes; 5) es posible la producción en masa mediante líneas celulares hechas a medida en condiciones controladas de laboratorio, lo que proporciona una fuente conveniente de factores bioactivos; 6) el tiempo y el costo de expansión y mantenimiento de las CMM cultivadas podrían reducirse y se podría disponer inmediatamente de terapias comerciales basadas en el secretoma para el tratamiento de afecciones agudas como la isquemia cerebral, el infarto de miocardio o diversos traumatismos; y 7) por último, el producto biológico obtenido para aplicaciones terapéuticas podría modificarse para obtener los efectos celulares específicos deseados^{10,13,27}.

Como se mencionó previamente, las CMM producen y liberan un amplio repertorio de factores de crecimiento, quimioquinas y citoquinas que modulan la acción de las células adyacentes (Fig. 3). Estos factores secretados aumentan la angiogénesis, reducen la apoptosis y la fibrosis, mejoran la supervivencia y diferenciación neuronal, estimulan la remodelación de la ME, restringen la inflamación local y ajustan las respuestas inmunitarias. De este modo, las CMM, directamente o a través de la secreción paracrina, inducen la regeneración para rescatar las células lesionadas, reducir la lesión tisular y, por último, acelerar la reparación de los órganos^{10,13,28}. El MC representa el medio regenerativo completo del secretoma de origen celular, con los factores solubles y elementos vesiculares. Ambos componentes pueden ser capaces de desencadenar de forma independiente la regeneración y la reparación de tejidos y órganos. Se ha demostrado que el MC derivado de CMM es suficiente para mejorar significativamente múltiples biomarcadores de fisiopatología y, en general, es tan eficaz como el trasplante de las CMM correspondientes en varios modelos animales de enfermedades (Tabla 1)¹³.

Patología	Células donantes
Lesión pulmonar	CMM-MO
Infarto de miocardio	CMM-TA
Lesión cerebral/Isquemia/ACV	CMM-MO
Lesión medular	CMM-MO
Prevención de la degeneración muscular	CMM-TA
Isquemia de extremidades posteriores	CMM-TA
Cicatrización de heridas cutáneas	CMM-TA
Colitis	Líquido amniótico
Lesión/falla hepática	Líquido amniótico
Alzheimer	CMM-PD

Defectos óseos	CMM-MO
Osteoartritis	CMM-WJ
Alopecia	CMM-TA
Fibrosis hepática	CMM-PCU
Parkinson	CMM-WJ

Tabla 1. Estudios en los que se ha utilizado medio condicionado de CMM. CMM-PD: células madre mesenquimales de pulpa dental; CMM-PCU: células madre mesenquimales perivasculares de cordón umbilical (tabla adaptada de Vizoso *et al.*, 2017).

Aunque las diferentes poblaciones de CMM comparten características fenotípicas y poseen potencial regenerativo, residen en diferentes localizaciones anatómicas y su secretoma puede variar. Se han demostrado diferencias en el potencial terapéutico según el origen de las CMM. Por ejemplo, mientras que la CMM-TA secretan factores como HGF, VEGF, SCF (factor de células madre, del inglés “*stem cell factor*”) y NGF (factor de crecimiento nervioso, del inglés “*nerve growth factor*”), las CMM-PCU sólo expresan y secretan NGF y VEGF. Del mismo modo, se han observado diferencias en la composición de los MC de CMM-TA y CMM-MO, así como en los factores secretados por las CMM-WJ y las CMM-MO. Recientemente, se encontraron cambios importantes en el secretoma de las CMM de MO, TA y CU tras un análisis comparativo basado en proteómica por espectrometría de masas^{13,23}. Dado el interés que reside en el desarrollo de futuras aplicaciones clínicas, es importante poder estandarizar la producción de MC derivado de CMM, para esto es necesario profundizar los estudios en relación con el cultivo de estas células, incluyendo los medios de cultivo y suplementos utilizados, la duración del cultivo y las condiciones del mismo.

Vesículas extracelulares

Como se mencionó antes, la producción de factores paracrinos de las CMM puede modular procesos celulares como la proliferación celular, la diferenciación, la inmunomodulación, la migración, la angiogénesis y la supervivencia, sin embargo, ninguno de estos factores explica considerablemente los efectos beneficiosos de las CMM de manera individual. El secretoma de las CMM no solo incluye factores solubles, sino que también está formado por vesículas extracelulares (VE) y los factores y moléculas que componen a estas vesículas. La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, de sus siglas en inglés), define a las VE como partículas formadas por una bicapa lipídica, que se liberan de forma natural de las células y no pueden replicarse. La ISEV también estableció que deben analizarse dos categorías (1 y 2) de marcadores de VE positivos y una tercera categoría de marcadores que deben dar negativos para demostrar la presencia de vesículas. La categoría 1 incluye proteínas transmembrana, lo que indica la estructura de la bicapa lipídica de las VE. La categoría 2 está formada por proteínas citosólicas, como

enzimas, proteínas citoesqueléticas y proteínas que se incorporan activamente a las VE a través de la unión a su membrana. Por otro lado, la categoría 3 está compuesta de proteínas de estructuras no vesiculares que suelen ser co-aisladas con las vesículas, y son un indicador de impureza de la preparación²⁹.

Las VE se clasifican en tres subtipos según su tamaño y mecanismos de biogénesis: los exosomas, que tienen un tamaño de 30 a 120 nm y se originan en el compartimento endosomal, concretamente en los cuerpos multivesiculares (CMVe). Por otro lado, las microvesículas, también conocidas como ectosomas, son más grandes (con un diámetro de 80 a 1.000 nm) y derivan de la gemación directa de la membrana plasmática (Fig. 9A). Por último, están los cuerpos apoptóticos, que tienen un tamaño más heterogéneo de entre 50 y 5.000 nm de diámetro, y se forman por desprendimiento de la membrana durante la apoptosis (Fig. 9B). En cuanto al contenido biológico de las VE, tanto los exosomas como las microvesículas transportan distintos subconjuntos de proteínas, lípidos, ADN, ARNm y micro ARN (miARN). En cambio, los cuerpos apoptóticos tienen principalmente ADN fragmentado y organelas celulares (Tabla 2)^{10,29-32}.

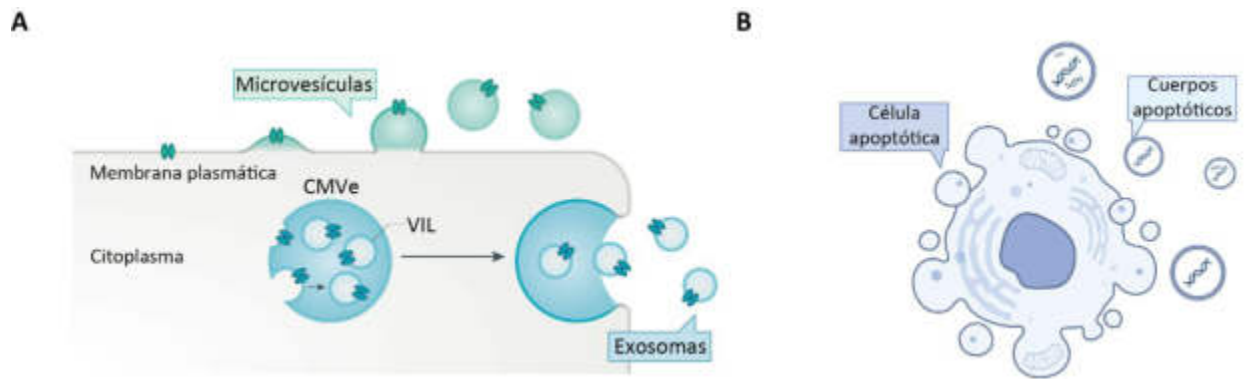


Figura 9. Esquema de los tres subtipos de vesículas extracelulares. **A:** los exosomas que se originan dentro de los cuerpos multivesiculares (CMVe) y antes de ser liberados se denominan vesículas intraluminales (VIL); y las microvesículas que se generan por brotación y fisión de la membrana plasmática (figura adaptada de Van Niel *et al.*, 2018). **B:** Cuerpos apoptóticos que se originan por desprendimiento de la membrana de una célula apoptótica (figura creada con *BioRender.com*).

VE	Origen	Tamaño	Marcadores	Componentes
Exosomas	Vía endocítica, fusión del CMVe con la membrana	30-120 nm	CD9, CD63, CD81 componentes ESCORT, TSG101, flotilina, Anexina	ARNm, miARN y otros ARN no codificantes; proteínas, lípidos y receptores de membrana y citoplasmáticos
Microvesículas	Brotación y fisión directa de la membrana celular	100-1000 nm	CD40	ARNm, miARN y otros ARN no codificantes; proteínas, lípidos y receptores de membrana y citoplasmáticos
Cuerpos apoptóticos	Membrana celular, desprendimiento durante apoptosis	>1µm	Fosfatidil serina, Calreticulina, Calnexina	Fragmentos de ADN nucleares y organelas

Tabla 2. Tabla que resume los tres subtipos de VE, el origen de cada uno, tamaño, los marcadores característicos y la composición de estos (tabla adaptada de Gebara *et al.*, 2020).

Las VE son moléculas mensajeras altamente especializadas que difieren según el tipo de célula de la cual se originan. Se encuentran en todos los fluidos biológicos y son capaces de transmitir mensajes tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. El estudio de la composición de las VE reveló que pueden transportar diversas cargas y que la composición particular afectará directamente al destino y la función de estas, lo que refuerza la importancia de los mecanismos selectivos de clasificación de cargas. Por ejemplo, un factor de estrés ambiental o un tratamiento farmacológico pueden alterar la producción, el perfil de tamaño y la posición de las VE. Además, las VE pueden transmitir mensajes "no deseados" que contribuyan a la propagación de enfermedades^{31,33}.

Exosomas

Los exosomas son, junto con las microvesículas, las principales vesículas secretadas que median la comunicación intercelular. El tamaño relativamente más pequeño y la forma uniforme de los exosomas les permiten escapar con éxito del sistema inmune, lo que no sólo prolonga su tiempo de circulación en el medio, sino que también implica que tienen una ventaja frente a las microvesículas en la comunicación célula-célula³⁴. Por esta razón, en los últimos años ha crecido el interés en investigar la viabilidad de los exosomas como biomarcadores clínicos y el potencial terapéutico de estas vesículas como vehículos para terapias dirigidas.

Los exosomas se generan de forma constitutiva a partir de endosomas tardíos que se forman por gemación hacia el interior de la membrana plasmática (endocitosis). Más tarde, los endosomas maduran convirtiéndose en cuerpos multivesiculares (CMVe), cuyas membranas se invaginan dando lugar a la formación de vesículas intraluminales (VIL) que al ser liberados se denominan exosomas. En este proceso intervienen determinadas maquinarias de clasificación denominadas complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte, o proteínas ESCRT (del inglés, *endosomal sorting complex required for transport*). Están descritas cuatro proteínas ESCRT (0, I, II y III) que trabajan de forma cooperativa para facilitar la formación de CMCVe, el brote de vesículas y la clasificación de la carga proteica. Estos complejos segregan primero las cargas en micro dominios de la membrana limitante de los CMCVe, con la consiguiente gemación hacia el interior y fisión de pequeñas vesículas de membrana que contienen parte del citosol. Durante este proceso, ciertas proteínas se incorporan a la membrana que se invagina, mientras que los componentes citosólicos son envueltos y encerrados en las vesículas intraluminales (VIL) (Fig. 10)^{33,34}. Recientemente, se ha demostrado que existe una vía alternativa de clasificación de la carga o contenido exosomal independiente de la maquinaria ESCRT. Esta vía parece depender de micro dominios enriquecidos en esfingomielinas que se hidrolizan convirtiéndose en ceramidas, estas últimas por un lado generan una curvatura negativa de la membrana endosomal lo que termina en invaginación y fisión para formar las VIL; y por otro, promueven la segregación lateral de la carga dentro de la membrana endosomal activando ciertos receptores involucrados en el proceso de clasificación del contenido exosomal. Además, se ha demostrado que las proteínas Alix y Sintenina junto con proteínas de la familia de las tetraspaninas también regulan la vía de clasificación y biogénesis exosomal independiente de ESCRT. Una de estas proteínas es CD63, especialmente enriquecida en la superficie de los exosomas, CD81 por otra parte, desempeña un papel clave en la clasificación de receptores diana y componentes

intracelulares hacia los exosomas. Finalmente, la mayoría de las VIL se liberan como exosomas al espacio extracelular al fusionarse los CMVe con la membrana plasmática (Fig. 9), de lo contrario, los CMVe son ubiquitinados y enviados a degradación por la vía lisosomal^{31,33}.

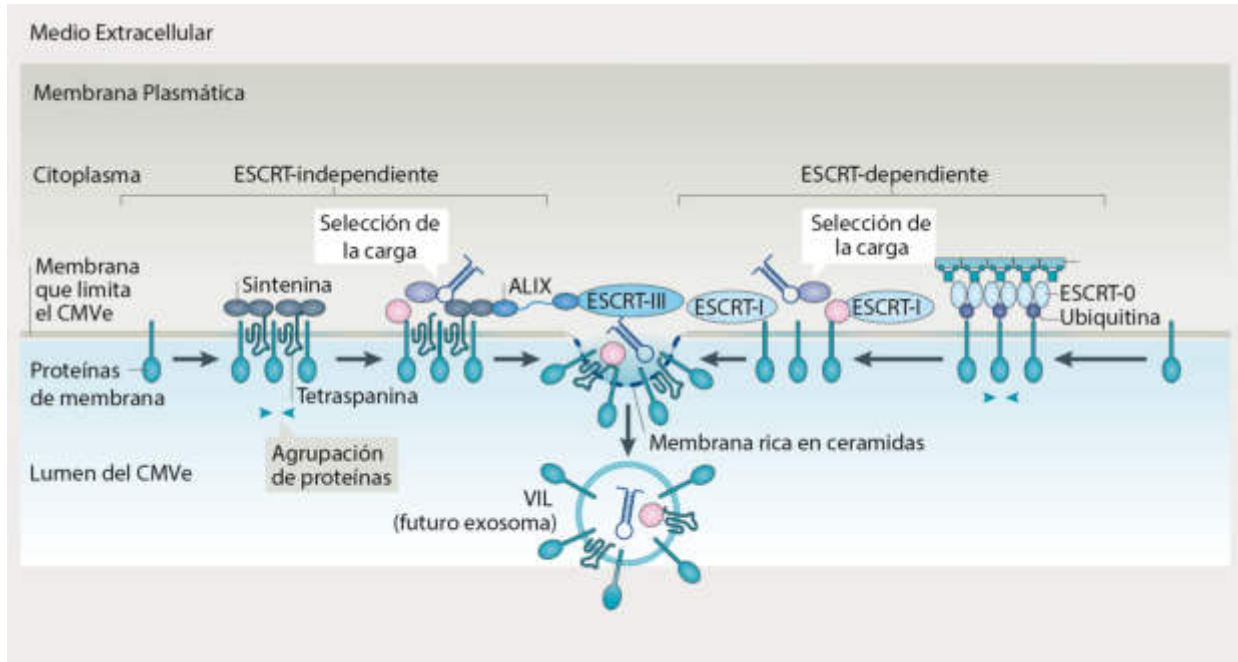


Figura 10. Biogénesis de exosomas por la vía canónica (ESCRT-dependiente) o la vía alternativa (ESCRT-independiente) (figura adaptada de Van Niel *et al.*, 2018).

La composición molecular de los exosomas depende no sólo del tipo de célula de origen, sino también del microambiente. El microambiente incluye las propiedades mecánicas, la topografía y la presencia de estímulos bioquímicos activadores, que a su vez regulan la carga proteica de los exosomas secretados. Estas proteínas pueden ser ubicuas o específicas de cada célula, y algunas se utilizan como marcadores exosomales. Las proteínas ubicuas que suelen utilizarse como marcadores son las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82), las proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90, del inglés “*heat shock proteins*”), el gen de susceptibilidad tumoral 101 (Tsg101, del inglés “*tumour susceptibility gene*”) y Alix/Sintenina. Otras proteínas ubicuas incluyen proteínas citosólicas, flotillinas, anexinas, proteínas Rab, moléculas implicadas en la transducción de señales y enzimas metabólicas. Las caveolinas, la clatrina y los receptores de transferrina también están presentes y desempeñan un papel importante en la captación de las vesículas por las células receptoras^{30,31,33,35}. Las proteínas específicas dependerán del tipo de célula de origen, así como también algunos lípidos y ácidos nucleicos (miARN, ADN, etc) que forman parte del contenido de los exosomas.

Exosomas de CMM

Recientemente se ha demostrado que las CMM liberan numerosos exosomas que participan en la regeneración tisular mediante la transferencia de información a las células o tejidos dañados y ejercen una actividad biológica similar a la de las CMM, por lo que son ampliamente considerados como reemplazo de las células en el desarrollo de aplicaciones clínicas⁴.

Los exosomas derivados de las CMM están compuestos por una compleja gama de moléculas, algunas suelen estar presentes independientemente del origen de las vesículas, mientras que otras moléculas serán específicas de la fuente y de las condiciones a las que estén expuestas. La membrana de los exosomas por un lado, está enriquecida en la familia de las tetraspaninas, entre ellas marcadores específicos exosomales como CD63, CD81, CD9, también pueden presentar marcadores característicos de las CMM, como CD29, CD73, CD90, CD44 y CD105, y proteínas de transporte e integración como Flotilina, Anexina, proteína G y proteínas de choque térmico como Hsp70 y Hsp90^{4,17}. Las proteínas RAB y las anexinas, incluidas las anexinas I, II, V y VI, son algunas proteínas citosólicas presentes que contribuyen a la formación del acoplamiento de los exosomas, la fusión de membranas y la regulación cinética de las membranas citoesqueléticas. Además, también se han identificado moléculas de adhesión como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD58, CD146 y CD166^{17,29}. Podemos encontrar diferentes tipos de lípidos, entre ellos esfingomiélin, y ácidos nucleicos, como ARN no codificantes (ARN estructurales, repeticiones, fragmentos de ARN de transferencia, pequeños ARN de interferencia (siARN), miARN, etc), ARN mensajero (ARNm) y ADN. Entre los miARN, algunos de ellos reportados son miR-1, miR-15, miR-16, miR-17, miR-18, miR-23a, miR-125a, miR-132, miR-181, miR-375 y miR-1246. Además, varias citoquinas como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , siglas en inglés), el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (siglas en inglés, GM-CSF) y las interleuquinas IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-1 β entre muchas otras moléculas (Fig. 11)^{17,28}.

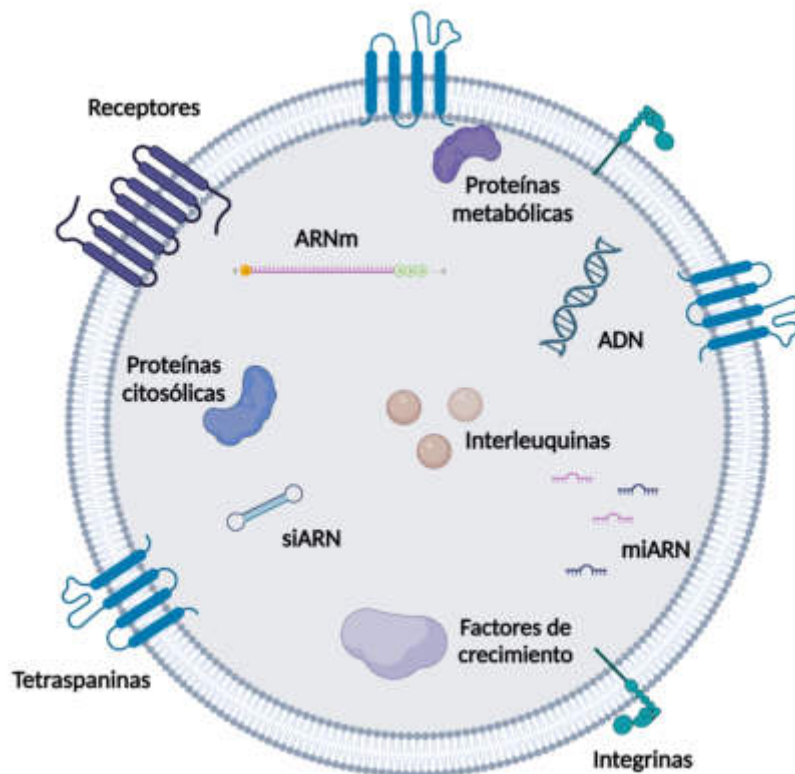


Figura 11. Esquema representativo de la composición de los exosomas (figura creada con *BioRender.com*).

Las actividades terapéuticas de los exosomas derivados de las CMM se producen principalmente a través de la transferencia horizontal de los componentes de su carga, que regulan y modulan el comportamiento de las células receptoras mediante una serie de mecanismos. Estos mecanismos los ejercen específicamente en virtud de las proteínas, ARNm y miARN que transportan. Las proteínas por su parte pueden presentar diversos tipos de actividad funcional, estructural o enzimática, mientras que los miARN son pequeñas secuencias no codificantes que pueden dar lugar a modificaciones epigenéticas mediante el mecanismo de silenciamiento del ARN. Estos miARN pueden escindir o desestabilizar en las células receptoras los ARNm diana o provocar la modulación de la traducción del ARNm a proteína, probablemente reduciendo su eficacia³⁶.

Estudios recientes han demostrado que el tratamiento con exosomas derivados de CMM mejora al menos un parámetro clínicamente relevante asociado a la funcionalidad de los órganos. Se han descrito varias ventajas específicas del uso de exosomas en lugar de MC para la terapia regenerativa. Mediante la encapsulación, las moléculas terapéuticamente relevantes (proteínas y ácidos nucleicos) quedan protegidas de la degradación, además, los exosomas tienen una respuesta tejido-específica al dirigir moléculas informativas a las células blanco, y la posibilidad de actuar como reservorio de biomarcadores, que pueden diferir en función de sus fuentes de aislamiento. Por ejemplo, los exosomas procedentes de TA parecen ser más eficaces en la degradación de complejos β -amiloides en comparación con los exosomas derivados de MO en un modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer. En este sentido, las CMM pueden diseñarse para producir exosomas que contengan la información del ARNm del gen relevante en la carga y, por tanto, conserven la capacidad de dirigirse a los sitios de interés¹³. En la Tabla 3 se muestra un resumen de algunos de los mecanismos y parámetros clínicos que mejoraron frente al tratamiento con exosomas derivados de CMM en diferentes modelos *in vivo* de enfermedades.

Parámetros mejorados	Células donantes de exosomas
Reducción de la apoptosis de cardiomiocitos, vías de señalización AIFM3/p53 y PI3K/Akt en infarto de miocardio. Aumento de la angiogénesis, activación de HIF-1 alfa.	CMM-MO
Regeneración de herida cutánea.	CMM-PCU
Estimula la neurogénesis y la angiogénesis luego de accidente cerebro vascular.	CMM-MO
Activación de las vías de señalización AKT y ERK1/2, reducción de la expresión de HGF en cáncer renal.	CMM-WJ
Disminución de fibrosis hepática por inhibición de la TEM, la inactivación de la	CMM-CU

señalización TGF- β 1/Smad.	
Señalización PI3K, inhibición de las vías de señalización relacionadas con IL-6, supresión de la activación de monocitos/macrófagos. Reducción de la herida hepática.	CMM-CU
Retraso en la aparición de la enfermedad de injerto contra huésped.	CMM-PCU
Recuperación de la función de las CMM de médula ósea en el lupus.	CMM-MO
Prevención de la neurogénesis anormal y la disfunción de la memoria en la epilepsia	CMM-MO
Aumento de la quimiosensibilidad en el carcinoma hepatocelular	CMM-TA
Degradación de péptidos β -amiloides en Alzheimer	CMM-TA
Aumento de la muerte tumoral en el glioblastoma por reducción de miR-9, P-gp en la superficie celular	CMM-MO
Aumento de la proliferación de células epiteliales tubulares renales proximales en lesión renal aguda	CMM-MO
Disminución de CX3CL1 en insuficiencia renal por isquemia/reperfusión	CMM-WJ
Supresión de la expresión de NOX2, reducción del nivel de ROS en insuficiencia renal por isquemia	CMM-WJ
Inhibición de la acumulación y activación de macrófagos, reducción del estroma de citoquinas, reducción de células T CD4+, células T CD8+ en COVID-19	CMM-MO, CMM-TA, CMM-CU y CMM-PD
Supresión de la apoptosis inducida por 6-OHDA en neuronas dopaminérgicas en Parkinson	CMM-PD

Tabla 3. Efectos y mecanismos favorables de exosomas derivados de CMM en modelos de enfermedades *in vivo* (tabla adaptada de Vizoso *et al.*, 2018 y Panda *et al.*, 2021).

El potencial regenerativo de los exosomas puede estar modulado por diversos mecanismos, como la exposición previa de la población celular originaria a estímulos externos; por ejemplo, el condicionamiento de las CMM-CU con IFN- γ (Interferon *gamma*) hace que las CMM sean menos capaces de proteger frente a la lesión renal isquémica aguda *in vivo* que sus homólogas no condicionadas, o la modificación de las células de las cuales derivan las vesículas, por ejemplo, la sobreexpresión en mesenquimales de HIF1- α , les confiere una mayor capacidad angiogénica a los exosomas derivados de estas células. Por otro lado, para aumentar la producción de vesículas y obtener la cantidad necesaria para aplicaciones clínicas, es posible que se necesiten biorreactores tridimensionales que proporcionen una distribución homogénea de nutrientes y oxígeno al tiempo que se pueda controlar el número de células, su viabilidad y proliferación^{13,37}. En el futuro, los esfuerzos deben dirigirse a la estandarización de los métodos de aislamiento, caracterización y administración de los exosomas, con el fin de proporcionar nuevas terapias eficaces, seguras y potentes basadas en los exosomas derivados de CMM.

Modificación de CMM y su secretoma

Con el fin de que la aplicación clínica de los productos derivados de las CMM progrese en el campo de la medicina regenerativa, el principal reto consiste en optimizar las estrategias terapéuticas mediante la identificación de la mejor forma de preparar las CMM y mejorar sus propiedades regenerativas. Se considera cada vez más que la potencia terapéutica puede mejorarse utilizando diversas estrategias, por ejemplo, sometiendo a las células a diferentes condiciones de cultivo en las cuales se promueva la expresión y liberación de factores específicos, preconditionándolas con citoquinas y factores de crecimiento, exponiéndolas a condiciones abióticas, productos farmacéuticos y/o modificándolas genéticamente^{38,39}. La aplicación de distintas estrategias de modificación o estimulación de las CMM ayudó a identificar numerosas proteínas, factores y miARN involucrados en distintas vías y mecanismos que regulan las funciones regenerativas de las CMM (Fig. 12)

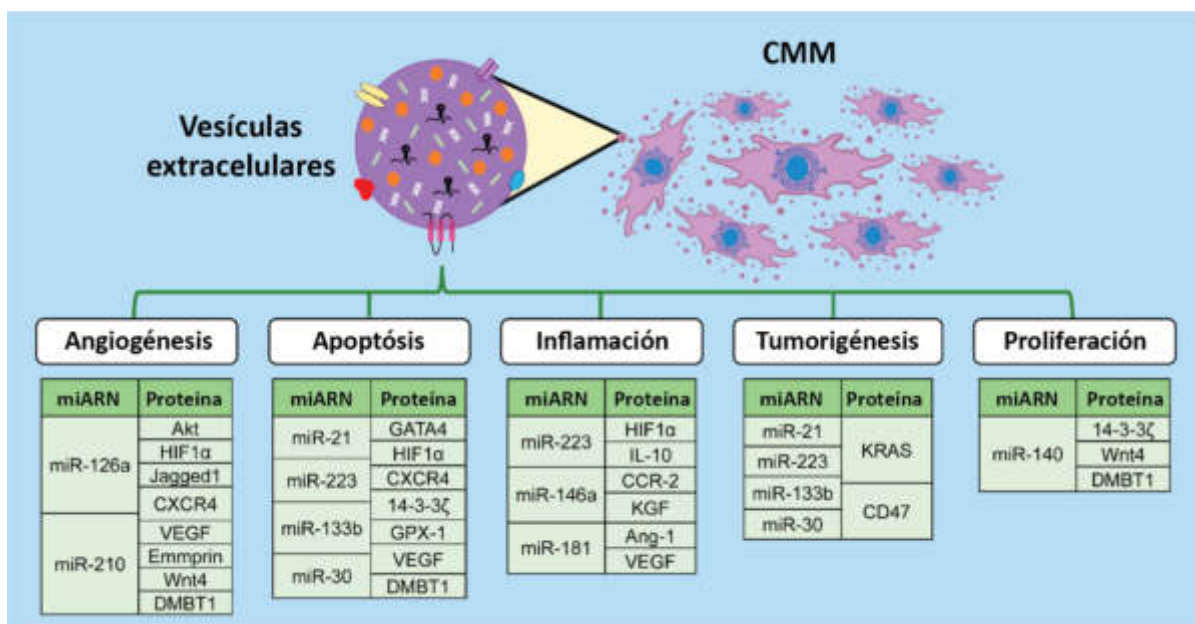


Figura 12. Visión general de los miARN y proteínas que demostraron ser críticos para la eficacia de las vesículas extracelulares (VE) en 113 estudios con animales en los que se investigaron modificaciones de las CMM con el fin de aumentar sus propiedades regenerativas. Las vías celulares más comúnmente atacadas por las VE fueron la angiogénesis, la apoptosis, la inflamación, la tumorigénesis y la proliferación. Akt: proteína quinasa B; HIF1 α : factor inducible por hipoxia 1 α ; CXCR4: receptor de quimiocinas C-X-C de tipo 4; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; DMBT1: proteína eliminada en el tumor cerebral maligno 1; GPX1: glutatión peroxidasa 1; IL-10: interleuquina 10; CCR-2: receptor de quimiocinas C-C de tipo 2; KGF: factor de crecimiento de queratinocitos; Ang-1: angiopoyetina 1.

El preconditionamiento es considerado una herramienta importante para mejorar los efectos de las CMM y de su secretoma en la regeneración y reparación de tejidos lesionados. Las diferentes estrategias de condicionamiento se aplican en función de los tipos celulares blanco en los tejidos lesionados. La hipoxia, es uno de los principales métodos utilizados para estimular a las CMM con el objetivo de enriquecer su MC con factores solubles implicados en la activación y modulación de las células residentes en el sitio de la lesión^{13,39,40}. Se ha demostrado, por ejemplo, que en condiciones de hipoxia las CMM regulan positivamente varios factores que contribuyen a la proliferación de hepatocitos *in vitro* y a la regeneración hepática *in vivo*, liberando factores en su MC como IL-6, TNF- α , HGF y VEGF. Recientemente, también se observó en un modelo *in vivo* de infarto de miocardio que las CMM preconditionadas en hipoxia inhiben la apoptosis cardíaca y estimulan la proliferación de cardiomiocitos. Además, se demostró que los exosomas de las CMM hipóxicas estaban enriquecidos en miR-26a que, a su vez, activa la señalización de Wnt para promover la supervivencia de los cardiomiocitos en un modelo de isquemia-reperfusión cardíaca en ratas³⁹.

Como se mencionó, también se ha estudiado el papel de la estimulación de las CMM con factores y pequeñas moléculas, por ejemplo, se ha demostrado que el MC derivado de CMM preconditionadas con TNF- α mejora la regeneración ósea *in vitro* al regular el aumento de la expresión de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) y estimular así la proliferación celular y la expresión de marcadores de diferenciación ósea. El condicionamiento de las CMM con pequeñas moléculas también representa una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. De hecho, el tratamiento de CMM con AMP cíclico (AMPc), bFGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y Heregulina β 1 estimula la secreción de diferentes factores neurotróficos (NTF), que tienen efectos protectores en varios modelos animales de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple y la enfermedad de Huntington^{39,40}.

Otra estrategia muy utilizada es la modificación *ex vivo* de las CMM para mejorar la función terapéutica *in vivo*, mediante la expresión inducida de genes que favorecen su supervivencia, ligandos de adhesión dirigidos a receptores de la membrana celular, genes específicos para la diferenciación dirigida, o genes que codifican para la producción y secreción de factores de crecimiento, citoquinas y miARN en exosomas. Por este motivo, muchos investigadores analizan métodos para transferir genes a las CMM de forma eficiente⁴¹. Existen diversos métodos, entre ellos, la transfección con *nanocarriers* es una de las estrategias más utilizadas para modificar células genéticamente, aunque no resulta un método eficiente para modificar CMM manteniendo al mismo tiempo una alta viabilidad en comparación con los vectores virales o la electroporación. Muchos grupos continúan buscando maneras de optimizar la eficacia de estas

nanopartículas, por ejemplo, funcionalizándolas con ligandos que favorezcan su captación. Por otra parte, la microinyección y electroporación consisten en la disrupción de las membranas celulares para transferir los ácidos nucleicos dentro de las células. Estos métodos suelen ser más eficientes que la transfección por *nanocarriers*, más aún si el *delivery* del transgén se realiza directamente hacia el núcleo ya que tiene menos probabilidades de ser degradado en el citoplasma. La desventaja de estos métodos es que no son prácticos para modificar grandes cantidades de células y conllevan una baja viabilidad celular post-transfección⁴¹.

Por último, tenemos los sistemas de transducción viral, los cuales utilizan los mecanismos naturalmente eficientes de los virus para transportar los transgenes y mediar su internalización, tráfico y expresión dentro de las células diana. En general, estos vehículos pueden modificarse mediante la adición de genes exógenos y la eliminación de genes virales deletéreos para hacerlos deficientes en la replicación y disminuir su patogenicidad. La administración viral de genes tiene sus desventajas, principalmente las cuestiones de bioseguridad que vienen de la mano de la manipulación de vectores virales en el laboratorio y por la mutagenicidad asociada a la integración del genoma viral al genoma de la célula blanco. Incluso con vectores virales no integrativos, los riesgos de seguridad de la transducción viral se deben a la posible expresión de antígenos virales en las células transducidas que podrían activar una respuesta inmunitaria *in vivo* tras el trasplante de las mismas^{38,41}. Más allá de esto, la transducción viral es altamente eficaz y la viabilidad de las células transducidas es mayor comparada con las otras técnicas mencionadas, por lo que los virus son muy utilizados para sobreexpresar o disminuir la expresión de genes en las células blanco. Existen diferentes vectores virales, con sus ventajas y desventajas, en este trabajo en particular usamos vectores lentivirales (LV) ya que transducen con un alto porcentaje de eficiencia a las CMM, manteniendo una alta viabilidad, y además se integran de forma estable en el genoma de las células, lo que nos garantiza poder seleccionar las células transducidas (por la incorporación de un gen de resistencia a antibiótico junto con el gen de interés) y obtener un pool de células que expresen el transgén de interés de manera estable transmitiéndolo a sus células hijas.

SPARC

SPARC, también conocida como BM-40 u osteonectina (32 kDa), es una glicoproteína asociada a la ME altamente conservada. Está codificada por un único gen localizado en el cromosoma humano 5q31-q33 que genera un polipéptido de secreción y monomérico. Su estructura consiste en un péptido señal que contiene 17 aminoácidos (aa), un dominio N-terminal (I) que comprende 50 residuos aminoácidos, 18 de los cuales están cargados negativamente, seguido de un dominio similar a la Folistatina (II) con 10 cisteínas (Cys) en un patrón típico y un dominio de unión al calcio extracelular (III) con dos motivos del tipo *EF-hand* de unión al calcio. El dominio I (aa 3 a 51) está codificado por los exones 3 y 4, es muy ácido y sensible a los cambios en la concentración de calcio. El NH₂-terminal se une al calcio con baja afinidad e interactúa con la hidroxiapatita regulando los procesos de mineralización de tejidos. El dominio II (aa 52-132) está codificado por los exones 5 y 6. La secuencia rica en Cys codifica una estructura homóloga a un dominio repetido en la Folistatina. La proteólisis de SPARC genera varios péptidos bioactivos con propiedades diferentes a las de la proteína íntegra. En particular, el péptido 2.1 inhibe la proliferación de

células endoteliales, mientras que el péptido (K)GHK estimula la proliferación endotelial y la angiogénesis. Por último, el dominio III (aa 133-285) está codificado por los exones 7-9, constituye la región de unión al Ca^{2+} extracelular y contiene dos motivos *EF-hand*, que consisten en dos hélices alfa y una región de bucle corto. Las proteínas colágeno I, III, IV y V pueden unirse a este dominio, que además contiene el péptido 4.2 que tiene la capacidad de unirse a las células endoteliales e inhibir su proliferación. El dominio ácido (I) es el más divergente entre las proteínas de la familia de SPARC, mientras que los otros dos dominios (II y III) parecen estar bien conservados (Fig. 13)⁴²⁻⁴⁵.

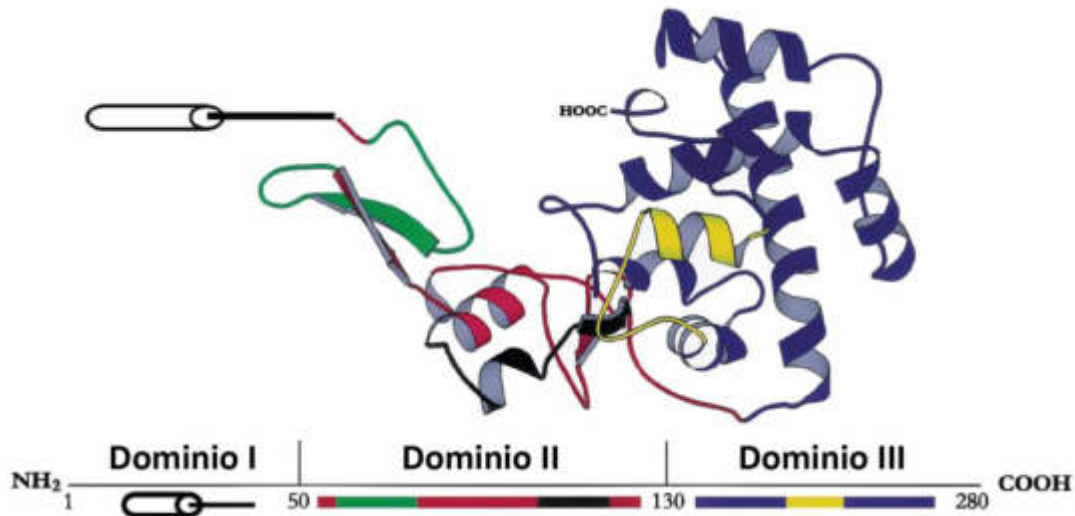


Figura 13. Diagrama de la estructura proteica de SPARC. El dominio I o dominio ácido, ubicado en el extremo N-terminal (aminoácidos ~1-50). El dominio II, o dominio similar a Folistatina, rico en cisteínas (aminoácidos ~50-130). Y por último el dominio III, o dominio de unión a Ca^{2+} extracelular, ubicado en el extremo C-terminal (aminoácidos ~130-280). Figura adaptada de Brekken *et al.*, 2002.

A diferencia de lo que podría sugerir su nombre (osteonectina), la expresión de SPARC no se limita únicamente a los tejidos óseos. SPARC es uno de los principales componentes no colágenos localizados en la ME. Se encontró por primera vez en la ME de los tejidos mineralizados, pero se expresa en diversas localizaciones, como durante la embriogénesis en los plexos coroideos y durante el desarrollo fetal, y en vertebrados adultos, su expresión se limita a los tejidos sometidos a remodelación, tumorigénesis, cicatrización/reparación de heridas o angiogénesis. En humanos, se ha encontrado SPARC en hueso, cartílago y dientes, en órganos como los riñones, gónadas, glándula suprarrenal, pulmón, ojos, hígado e intestinos, así como también en la piel⁴⁵. Esta amplia distribución se correlaciona con las funciones de SPARC durante la embriogénesis, así como durante la reparación tisular, el recambio celular, la diferenciación y la remodelación, que son pasos clave en la regeneración tisular. Por esta razón, la expresión o los niveles de SPARC aumentan, por ejemplo, luego de lesiones miocárdicas, en miopatías y en situaciones (fisiológicas o patológicas) en las que los tejidos sufren cambios (reparación, renovación y remodelación), como durante la obesidad, la regeneración del músculo esquelético, el cáncer, la esclerosis sistémica, la fibrosis hepática y el ejercicio físico. Tales situaciones representan una alteración de la homeostasis que conduce a un entorno de regeneración "negativo". Por lo tanto, se requieren procesos

biológicos que superen dicha alteración homeostática, restauren un entorno adecuado para la regeneración y rescaten los tejidos afectados para permitir mejores patrones de desarrollo⁴⁶.

SPARC es una proteína multifuncional, que se une de manera muy afín a cationes y minerales como hidroxiapatita, proporciona soporte a la ME y media en las actividades de una amplia gama de factores de crecimiento. Si bien muchos de los mecanismos no se conocen en detalle, dado que SPARC se une a un gran número de componentes diferentes de la ME, factores de crecimiento y otras moléculas, se le atribuyen diferentes funciones biológicas. Desde un punto de vista celular, SPARC tiene un amplio campo de acción en la organización de la ME, la migración, la proliferación, la adhesión, la diferenciación y la supervivencia. A continuación, se explican las funciones más importantes de SPARC según el tipo de interacción^{44,47,48}.

Interacción con componentes de la ME

En vertebrados, SPARC es capaz de unirse a diversos componentes de la ME, como la trombospondina 1, la vitronectina, la entactina/nidógeno, los colágenos fibrilares (tipos I, II, III y V) y el colágeno tipo IV, que es el colágeno predominante en las membranas basales. Por lo tanto, SPARC puede contribuir a la organización de la matriz en el tejido conectivo y en las membranas basales. Se ha demostrado que la falta de expresión de SPARC disminuye la acumulación de colágeno maduro en la ME de muchos tejidos conectivos, por ejemplo, los ratones *knockout* (KO) para SPARC muestran una disminución del contenido total de colágeno I en la piel, el hueso y el ligamento periodontal. Estudios en diversos tejidos (cardíaco, dérmico, neoplásico, periodontal) han demostrado una correlación entre el aumento de los niveles de expresión de SPARC y el aumento de la deposición de colágeno y su ensamblaje en la ME^{42,44,49}. Por otra parte, la sobreexpresión de SPARC en *Xenopus* interfiere en la morfogénesis tisular mediante la modificación de la morfología celular, la inhibición de la migración celular, la proliferación y la incapacidad de formar adhesiones focales⁴⁵. Además, enfermedades como la fibrosis o la esclerosis también están causadas por la sobreexpresión de SPARC seguida de una tasa anormalmente alta de deposición de colágeno en la ME, que podría restaurarse mediante la inhibición de SPARC^{50,51}.

También se ha demostrado que SPARC regula la actividad de varias metaloproteinasas (MMP), una familia de enzimas consideradas los principales mediadores de la proteólisis y el recambio de la ME. En fibroblastos sinoviales, por ejemplo, se observó que el agregado de SPARC exógeno al cultivo, indujo la actividad de las MMP-1, MMP-3 y MMP-9. La mayoría de los estudios sobre los efectos de SPARC en la actividad de las MMP se han llevado a cabo en células transformadas y en estudios tumorales. Por ejemplo, se descubrió que SPARC aumentaba la actividad de MT1-MMP y MMP-2 en células de glioma y aumentaba la actividad de MMP-2 en células de cáncer de mama, pero SPARC no tenía ningún efecto sobre la activación de MMP-2 en células de melanoma. De forma similar a los efectos sobre la actividad de las MMP, el papel funcional de SPARC en cáncer depende del tipo de tumor y del entorno tisular, ya que se ha demostrado que promueve e inhibe diferentes tipos de actividades de las células tumorales^{45,50}.

Interacción con factores de crecimiento

La unión a factores de crecimiento es otra característica importante de SPARC. Los factores de crecimiento pueden influir en diversos procesos como la proliferación, migración y diferenciación celular.

Se ha demostrado que SPARC se une a VEGF-A en las células endoteliales humanas. VEGF-A promueve la angiogénesis uniéndose al VEGFR2 (receptor 2 de VEGF-A) y activándolo, lo que provoca la autofosforilación del receptor. Se predice que SPARC unido a VEGF-A disminuye la fosforilación de VEGFR1 (receptor 1 de VEGF-A) mientras que no tiene efecto sobre la fosforilación de VEGFR2. Se observó, en un modelo de neovascularización coroidea, que el bloqueo de la interacción VEGF-A/VEGFR1 por SPARC potencia la señalización VEGF-A/VEGFR2 para inducir la angiogénesis⁵².

La expresión de SPARC y del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es mínima en la mayoría de los tejidos adultos normales, pero aumenta tras una lesión. La interacción de SPARC con la cadena B del PDGF impide la unión a su receptor en fibroblastos, como consecuencia de esta unión, existe una inhibición en la progresión del ciclo celular endotelial, lo que sugiere que SPARC puede controlar los procesos proliferativos en la regeneración de tejidos. Del mismo modo, SPARC inhibe la migración de células endoteliales inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF)⁵².

Además de PDGF, VEGF y bFGF, SPARC también puede modular la actividad de TGF- β . Las evidencias de que SPARC influye en la actividad del TGF- β se han observado en varios tipos celulares diferentes. En células epiteliales y en células mesangiales, se demostró que SPARC aumenta la actividad de TGF- β 1 a través de un mecanismo aún no definido. En estudios con células mesangiales KO para SPARC, se observaron niveles reducidos de ARNm y proteína de TGF- β en comparación con las células mesangiales *wild type* (WT) y al agregarles SPARC recombinante, tanto a las células WT como a las KO, aumentaron los niveles de ARNm y proteína de TGF- β , que también fue asociado a un aumento de la producción de colágeno^{44,49}. En otros estudios sobre un modelo de infarto de corazón en ratones que sobreexpresaban SPARC, se observaron mayores niveles de SMAD2 activado, un elemento de la cascada de señalización de TGF- β 1⁴⁹. La señalización de TGF- β 1/SMAD2, por otra parte, induce la expresión de α -SMA en pericitos así como de componentes de la ME, e inhibe su migración. Chlenski y colaboradores hipotetizaron que SPARC promueve la migración de los pericitos hacia los tubos endoteliales nacientes disminuyendo la activación de la señalización de TGF- β 1. En consonancia con esto, se demostró que la actividad de SPARC promueve el reclutamiento de pericitos en un modelo tumoral ortotópico. Interesantemente, también se vió que SPARC disminuye la actividad de TGF- β 1 en los pericitos de forma dependiente de endoglin e integrina. Por lo que se cree que las acciones contradictorias que presenta la SPARC en términos de la actividad de TGF- β podrían deberse a diferencias en las vías de señalización de TGF- β 1 específicas de cada tipo celular y al microambiente tisular⁵².

Interacción con integrinas

Estudios realizados con células de pulpa dental humana y diversas líneas tumorales han demostrado que SPARC es capaz de modular la expresión y la actividad de las integrinas α V β 3 y α V β 5, y en al menos dos tipos celulares, la expresión de SPARC regula también los niveles de la integrina α 6 y los eventos adhesivos mediados por ésta. En un estudio sobre la metástasis ósea en cáncer de próstata, se demostró que SPARC aumenta la migración de una línea celular de próstata humana. El efecto estimulador sobre la migración celular requiere de las integrinas α V β 3 y α V β 5, ya que el bloqueo específico de cualquiera de estos receptores disminuye significativamente la migración inducida por SPARC. Por el contrario, en células de cáncer de ovario, SPARC parece tener un efecto negativo sobre las integrinas α V, donde se observó un bloqueo de la actividad de α V β 3 y α V β 5 en presencia de SPARC recombinante^{45,52}.

SPARC también interactúa con la integrina $\beta 1$. En mamíferos, promueve la supervivencia de las células epiteliales del cristalino mediante su unión a la integrina $\beta 1$ y la inducción de la actividad de la quinasa ligada a la integrina (ILK). Del mismo modo, se observó una función pro-supervivencia de SPARC en células de melanoma, donde la disminución de la expresión de SPARC condujo a la apoptosis. Por el contrario, el aumento de la expresión de SPARC se asoció con una mayor activación de Akt (efector de la vía de ILK que promueve la supervivencia de las células). En células leucémicas, el aumento de los niveles de SPARC intracelular también se asoció con la supervivencia y, además, el aumento de la resistencia de las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, en otros casos, SPARC pareciera potenciar la apoptosis. En cáncer de colon, de mama y de páncreas, se demostró que SPARC aumenta la apoptosis al favorecer la activación de la caspasa 8. Al igual que ocurre con la actividad de SPARC en la progresión tumoral, la actividad de supervivencia mediada por la expresión de SPARC parece depender en cierta medida del tipo de célula y es probable que esté influida por otros factores del medio extracelular y/o los perfiles de expresión de los receptores de la superficie celular^{44,50,52}.

Regeneración de heridas cutáneas

La regeneración tisular es un proceso vital que permite a los organismos sobreponerse a perturbaciones biológicas y adaptarse a los cambios y al desarrollo fisiológico mediante la renovación, el crecimiento y la restauración de diversas células y tejidos.

Una herida se define como un daño o una alteración de la estructura anatómica y la función normales. Estas pueden ser superficiales o más profundas, extendiéndose a tejidos subcutáneos, con daños en estructuras como tendones, músculos, vasos, nervios, órganos parenquimatosos e incluso huesos. Las heridas surgen de procesos patológicos que se inician externa o internamente en el órgano afectado, de etiología accidental o intencionada, o ser el resultado de un proceso patológico. Las heridas pueden clasificarse según diversos criterios. El tiempo es un factor importante en el tratamiento de las heridas y en su reparación, así pues, las heridas pueden clasificarse clínicamente como agudas y crónicas en función de su tiempo de cicatrización⁵³.

Como barrera externa, la piel es el órgano más afectado por una gama de factores de estrés externos, lo que da lugar a daños frecuentes en las células y la barrera. Como tal, la piel ha desarrollado un conjunto de mecanismos complejos para protegerse y restaurar la integridad del tejido cuando se daña⁵⁴. La piel se compone de tres capas principales: epidermis, dermis e hipodermis (Fig. 14). La epidermis es la capa más externa. Esta tiene una función defensiva muy importante de proteger la piel de los daños y el estrés, al tiempo que limita el paso del agua y la absorción de sustancias químicas. Está constituida predominantemente por queratinocitos que están presentes en diferentes estados de maduración y que producen múltiples queratinas, que son las principales proteínas estructurales que proporcionan resistencia a la piel. La epidermis se subdivide en cinco estratos distintos: estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal. Los progenitores de queratinocitos se localizan en la capa basal y se diferencian gradualmente a lo largo de las capas hasta llegar a su diferenciación terminal en el estrato córneo, siendo sustituidos gradualmente por queratinocitos

provenientes de las capas inferiores. Además, la epidermis también está compuesta por células inmunes, sensoriales y pigmentarias. La dermis desempeña un papel crucial en la amortiguación del cuerpo y la provisión de estructura. Esta capa se organiza como una red en forma de malla formada por tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y mastocitos (células responsables de la respuesta inflamatoria para combatir injurias, alérgenos y microorganismos). El tejido conjuntivo está formado principalmente por fibroblastos, que son responsables de la síntesis de las proteínas elastina y colágeno. Por último, tenemos la hipodermis, la capa más profunda de la piel que está compuesta principalmente por adipocitos. Tiene un plexo vascular amplio que irriga la dermis y, además, la hipodermis establece la conexión de la piel con los músculos. Las heridas profundas que alcanzan la hipodermis, dañándola, constituyen casos complicados para la cicatrización de heridas^{55,56}.

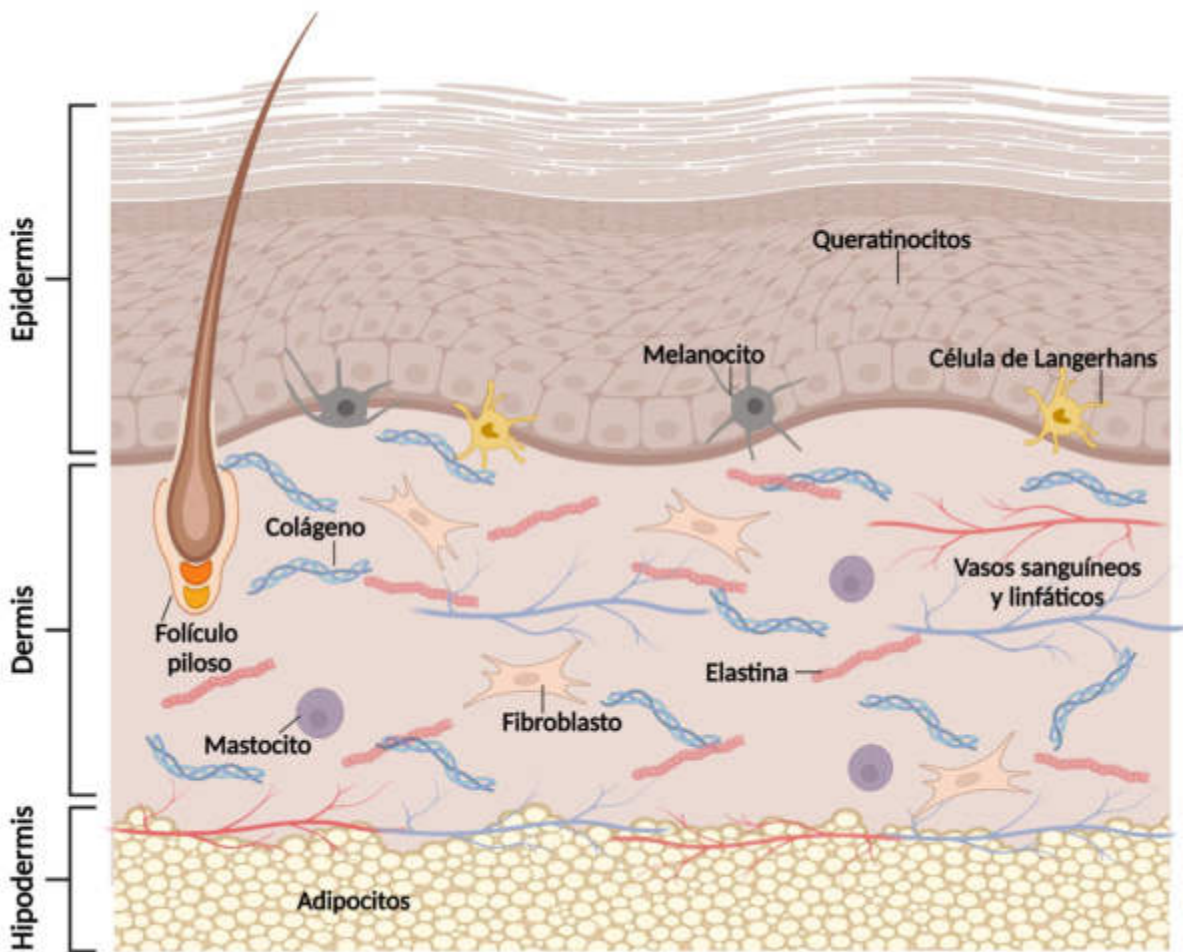


Figura 14. Esquema representativo de la estructura de la piel y sus componentes celulares (figura creada con BioRender.com).

Las heridas y su cicatrización tienen lugar en todos los tejidos y órganos del cuerpo. Muchos de estos procesos de reparación son comunes a todos los tejidos. La regeneración de los tejidos dañados tiene por objetivo restablecer su integridad y consiste en procesos biológicos complejos y estrechamente

regulados en los que intervienen varios tipos de células, factores de crecimiento y citoquinas secretadas por ellas, así como la ME que las rodea⁵⁷. Experimentalmente, por su accesibilidad, la piel es uno de los mejores órganos para estudiar los mecanismos de respuesta al daño tisular y durante su reparación. Los resultados de tales investigaciones en la piel han contribuido a desentrañar principios fundamentales de la biología regenerativa, que tienen relevancia para la función de otros tejidos epiteliales y mesenquimales.

Cicatrización normal de heridas

La cicatrización de las heridas cutáneas en adultos consta de cuatro fases que se solapan parcialmente: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. Las tres últimas fases determinan si la herida cicatriza con normalidad o si un proceso de cicatrización aberrante conduce a una producción excesiva de proteínas de la ME y fibrosis (Fig. 15). La hemostasia comienza con la formación de un coágulo sanguíneo que detiene la hemorragia y protege la zona de la herida frente a la invasión microbiana. La red de fibrina formada almacena factores de crecimiento y sirve de plataforma para la migración de células vasculares, leucocitos y fibroblastos. Los factores de crecimiento (principalmente TGFβ1), las citoquinas (por ejemplo, IL-1 e IL-6) y las quimioquinas (por ejemplo, CX3CL1) liberadas por las plaquetas y los queratinocitos dañados inducen una reacción inflamatoria. Las células inflamatorias infiltrantes eliminan microbios y producen radicales de oxígeno y proteasas para luchar contra los patógenos. También secretan moléculas que activan la fase de proliferación, que comprende la neovascularización, la formación de tejido de granulación y la reepitelización. La formación de nuevos vasos sanguíneos es activada por citoquinas y factores de crecimiento vascular, como VEGF y bFGF, y es importante para la progresión de la cicatrización, ya que la zona de la herida recién formada sufre hipoxia y falta de nutrientes. Los fibroblastos dérmicos empiezan a proliferar y a producir grandes cantidades de componentes de la ME, formando un tejido conjuntivo temporal denominado tejido de granulación rico en capilares, macrófagos y fibroblastos^{53,57}.

La reepitelización comienza cuando los queratinocitos basales y las células madre epidérmicas regenerativas derivadas de la epidermis interfolicular, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas se dividen y se diferencian en los bordes de la herida y migran a lo largo de la superficie del tejido de granulación para cubrirlo y formar la capa protectora más externa de la herida. Los queratinocitos situados en el borde de la herida producen metaloproteasas de la matriz (MMP), como la MMP-1, que degrada la ME y disminuye la adhesión de los queratinocitos, promoviendo así su migración. El estrés mecánico, resultante de la deposición de ME, y los factores secretados, principalmente TGFβ1, activan muchos tipos celulares diferentes, como fibroblastos, pericitos, adipocitos y células progenitoras mesenquimales residentes para formar una población heterogénea de miofibroblastos que proliferan activamente y secretan proteínas de la ME como colágenos I y III y fibronectina. Los miofibroblastos se unen a la MEC mediante integrinas y se contraen a través de las fibras de estrés ricas en actina de músculo liso alfa (αSMA), estrechando la zona de la herida^{57,58}.

La última fase de la cicatrización se caracteriza por la apoptosis de los miofibroblastos y otras células y por la remodelación del tejido conjuntivo, lo cual da lugar a una estructura cicatricial tensa. Por último, la relación entre el colágeno fibrilar I y el colágeno III vuelve al nivel de la piel normal (5:1) desde

el de la matriz de la herida temporal (2:1), y el tamaño de las fibrillas aumenta, correspondiendo a las características de una dermis sana^{53,57}.

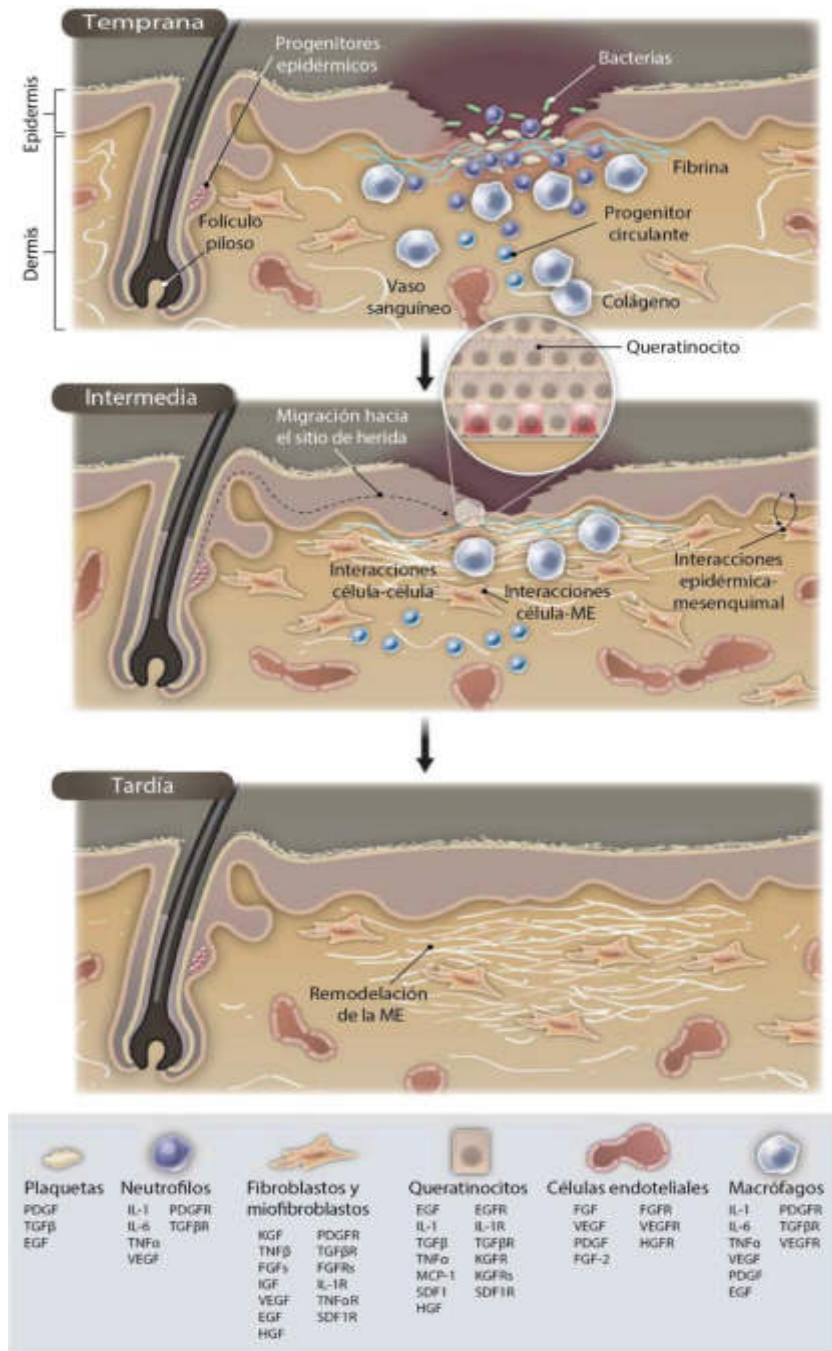


Figura 15. Diagrama que ilustra los mecanismos moleculares y celulares fundamentales para la progresión de la cicatrización de heridas. Las primeras fases de la cicatrización de heridas incluyen la hemostasia y la activación de queratinocitos y células inflamatorias (fase temprana). En la fase intermedia se produce la proliferación y migración de queratinocitos, la proliferación de fibroblastos, la deposición de matriz y la angiogénesis. La fase tardía de cicatrización implica la remodelación de la ME, lo que da lugar a la

formación de cicatrices y la restauración de la barrera. El cuadro inferior muestra las células involucradas en el proceso y los factores que éstas liberan (figura adaptada de Eming *et al.*, 2014).

Cicatrización patológica de heridas

La deposición de ME y la formación temporal de cicatrices forman parte del proceso normal de cicatrización; sin embargo, la acumulación de ME rígida y anormalmente organizada que sustituye al tejido normal es un rasgo característico de las cicatrices fibróticas. Existen dos tipos de trastornos fibróticos de la piel: cicatrices hipertróficas o queloides. Las cicatrices hipertróficas se definen como lesiones protuberantes y eritematosas que no se extienden más allá de los límites de la zona de la herida original. Suelen aparecer cerca de las articulaciones u otras zonas expuestas al estiramiento, crecen rápidamente durante las 4 a 12 semanas posteriores a la herida y tienden a madurar y aplanarse con el tiempo. Por otro lado, los queloides sobresalen de la zona de la herida original, invadiendo la piel circundante, y pueden aparecer incluso años después del traumatismo, se desarrollan más lentamente que las cicatrices hipertróficas y casi nunca involucionan, sino que siguen creciendo como un tumor proliferativo benigno⁵⁷.

La patogénesis tanto de las cicatrices hipertróficas como de los queloides es poco conocida. Según los conocimientos actuales, se cree que el crecimiento excesivo de la cicatriz está controlado por la inflamación en la dermis, con una acumulación de células inflamatorias y fibroblastos en la zona de la cicatriz, además, hay un proceso de neovascularización y formación de fibras de colágeno. En los queloides, la reacción inflamatoria es fuerte, y los niveles de citoquinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 y TNF α , son elevados, esto favorece la inflamación crónica y provoca la protrusión del queloide más allá de la zona de la herida original. Los mastocitos y los linfocitos T y B predominan en las cicatrices queloides, también los macrófagos de tipo M2 activados alternativamente, que se asocian con la activación de fibroblastos, la formación de colágeno y las alteraciones fibrogénicas (Fig. 16)⁵⁴.

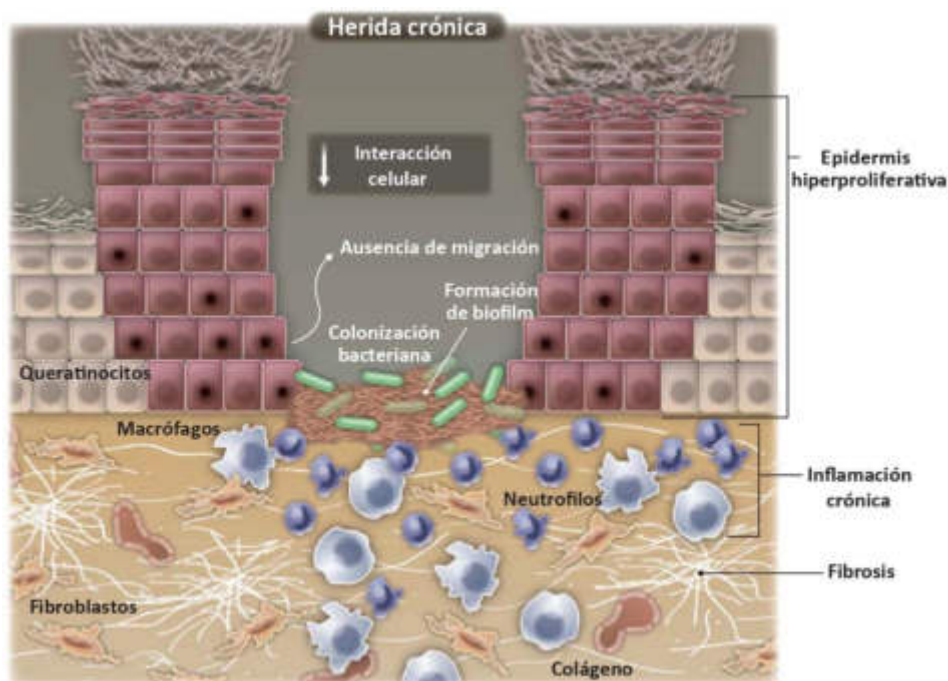


Figura 16. Ilustración que muestra los mecanismos moleculares y celulares que están alterados en las heridas crónicas. Las heridas crónicas muestran una epidermis hiperproliferativa y no migratoria, inflamación no resuelta, presencia de infección y formación de *biofilms*. Aunque hay un aumento de células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos), no todas funcionan correctamente (indicado por células deformes). Las proteasas no controladas interfieren con los mecanismos esenciales de reparación, llevando a una fibrosis y se puede ver como algunos fibroblastos se vuelven senescentes (figura adaptada de Eming *et al.*, 2014).

Las células más importantes que promueven la cicatrización y la fibrosis son los fibroblastos activados (miofibroblastos), que secretan grandes cantidades de componentes de la ME con propiedades estructurales y mecánicas anormales y con una capacidad alterada para unirse a factores de crecimiento. En los queloides, los fibroblastos son más sensibles al TGF β 1 que en la piel normal, y su densidad y tasa de proliferación son elevadas, mientras que la apoptosis es baja. La presencia constante de miofibroblastos contráctiles α SMA positivos es típica de las cicatrices hipertróficas. Los fibroblastos y miofibroblastos, estimulados por varios factores de crecimiento como el TGF β , PDGF y el factor de crecimiento similar a la insulina (siglas en inglés, IGF), producen grandes cantidades de colágeno y otros componentes de la ME, acelerando así la formación de abundante tejido fibrótico en las cicatrices patológicas^{54,57}. Sumado a esto, hay una desregulación de las proteasas y sus inhibidores, las MMP se encuentran elevadas en los fluidos de heridas crónicas, así también como las proteasas de serina, que degradan los componentes de la matriz, incluida la fibronectina, así como diversos factores de crecimiento clave, todos ellos necesarios para la remodelación de la ME y el crecimiento celular. Además, hay un menor reclutamiento de progenitores que contribuyen a la reparación del tejido y menor tasa de angiogénesis debido a la degradación de factores pro-angiogénicos y a la elevada expresión de factores antiangiogénicos lo cual conduce a un aumento de la muerte celular⁵⁴.

CMM en regeneración cutánea

Como ya se mencionó, la cicatrización de las heridas cutáneas comprende cuatro fases superpuestas. Las CMM participan en todas las fases de este proceso regenerativo. Diferentes estudios han demostrado que la aplicación de CMM para el tratamiento de la piel puede mejorar la cicatrización de las heridas y reducir la formación de cicatrices mediante diversos mecanismos involucrados en las distintas fases regenerativas.

En primer lugar, la fase inflamatoria es importante para el proceso de regeneración de heridas, ya que conduce al reclutamiento de células inmunitarias para reducir los patógenos y eliminar la lesión. Sin embargo, la inflamación crónica puede posponer la cicatrización de la piel. Las CMM pueden inhibir las respuestas inflamatorias de varias maneras. Chiossone y colaboradores demostraron que las CMM promueven la polarización de los macrófagos a un fenotipo M2, un tipo de macrófago que reduce la inflamación y la función inmunosupresora. Además, los macrófagos M2 inducidos por las CMM interactúan con las células *natural killer* (NK) e inhiben la expresión de proteínas relacionadas con su

activación, como NKp44, CD25, CD69 e IFN- γ (interferón-gamma). Los macrófagos M2 también pueden inhibir la proliferación de células T promoviendo la multiplicación de células T regulatorias (Tregs), las cuales ayudan a controlar la respuesta inmunitaria⁵⁹. Estudios recientes han revelado que las CMM son capaces de inducir la generación de monocitos que producen altos niveles de interleuquinas IL-10 e IL-6 y promueven también la generación de linfocitos Tregs⁵⁹. Otros estudios aportaron evidencias sobre el papel fundamental del antagonista del receptor de IL-1 (IL1RA) secretado por las CMM en la inducción de los macrófagos M2 y la inhibición de la maduración de células B en un modelo de ratón knock-in IL1RA. La IL-1 acelera la diferenciación de las células T *-helper* 17 (Th17), células que secretan IL-17, un marcador de citoquinas inflamatorias en muchos tejidos. Por lo tanto, la IL1RA disminuye la diferenciación de las células Th17 y provoca un aumento del efecto antiinflamatorio de las células⁵⁵. Estos estudios indican que las CMM tienen capacidad antiinflamatoria a través de la modulación de la polarización de los macrófagos y la expresión de citoquinas antiinflamatorias.

En la fase proliferativa, las CMM manipulan los macrófagos para reclutar queratinocitos y fibroblastos. Diversos grupos de investigación demostraron que las CMM liberan factores de señalización solubles que aumentan la migración, la proliferación y la quimiotaxis de fibroblastos y queratinocitos dérmicos. Los macrófagos activados por las CMM liberan EGF y TGF- α para estimular la migración y proliferación de los queratinocitos. Los queratinocitos, a su vez, estimulan a los fibroblastos mediante la expresión de fibronectina, laminina y tenascina. Y los fibroblastos, por su parte, inducen la migración y proliferación de los queratinocitos a través de la secreción de EGF, fibronectina y el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF)^{60,61}.

Otro de los mecanismos relevantes durante la regeneración de heridas es la neovascularización. Se ha demostrado que las CMM pueden favorecer la angiogénesis en el lugar de la herida, induciendo la polarización de los macrófagos, que luego expresarán y secretarán factores que promueven la angiogénesis. Qiu y colaboradores observaron que las CMM, previamente expuestas a exosomas de suero de ratón neonato, mejoran significativamente la cicatrización de heridas al inducir la angiogénesis. El grupo de Rustad, por otra parte, demostró que las CMM dentro de hidrogeles aumentaban los niveles de expresión de VEGF y daban lugar a una cicatrización más rápida de las heridas⁵⁵. Más aún, en estudios *in vitro* con células endoteliales (HUVEC) tratadas con VE derivadas de CMM se observó que las HUVEC captan las VE, aumentando su proliferación, migración y angiogénesis. Estos efectos fueron acompañados por una mayor expresión de genes relacionados con la proliferación (ciclina D1, ciclina D2, ciclina A1 y ciclina A2), la angiogénesis (VEGF-A, PDGF-A, EGF y FGF2) y la migración (integrina beta 1 (ITGB-1) y CXCL-1)⁶².

En resumen, las CMM migran al lugar de la lesión cutánea, inhiben la inflamación y aumentan el potencial de proliferación y diferenciación de fibroblastos, células epidérmicas y células endoteliales. Interesantemente, varios trabajos han demostrado que los MC procedentes de cultivos de CMM tienen una capacidad regenerativa similar, o incluso superior, a la de dichas células, cuando se aplican a heridas. En la práctica patológica cotidiana, las heridas siguen siendo un problema clínico relevante, cuyas complicaciones precoces y tardías constituyen una causa frecuente de morbilidad y mortalidad. El uso de las CMM, principalmente de su secretoma, ofrece un amplio espectro de posibilidades para el desarrollo de distintos enfoques terapéuticos y en el desarrollo continuo de tecnologías para el tratamiento de heridas agudas y a largo plazo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A lo largo de la introducción hicimos hincapié en la relevancia del potencial regenerativo de las CMM como posibles herramientas para el desarrollo de terapias en el campo de la medicina regenerativa. Su capacidad de diferenciación a diferentes tipos celulares, así como de inducción y activación de células madre residentes y sus funciones “anti-apoptóticas”, pro-angiogénicas e inmunorreguladoras son características especialmente atractivas y relevantes en numerosos procesos y mecanismos necesarios para la regeneración tisular. Más aún, el hecho de que estas funciones son ejercidas principalmente mediante su secretoma, compuesto por factores solubles y VE, permite proyectar el desarrollo de tratamientos de aplicación sencilla, económicos y seguros. Sumado a esto, actualmente existen diversos métodos para cultivar CMM de forma más eficiente que la tradicional, que permiten escalar el proceso tanto de amplificación de las células como de aislamiento de su secretoma, así como también, diferentes técnicas de condicionamiento y modificación que podrían utilizarse para aumentar el potencial regenerativo de las CMM. Por otro lado, el proceso de cicatrización de heridas cutáneas es un proceso complejo que requiere migración celular, desarrollo de un entorno inflamatorio, angiogénesis, granulación, formación de tejido, re-epitelización y remodelación de la ME, mecanismos en los que las CMM y su secretoma desempeñan un papel activo y se ha demostrado que la aplicación terapéutica de estas células mejora los resultados de la cicatrización. Interesantemente, la glicoproteína multifuncional SPARC, expresada y secretada por las CMM, se expresa en animales adultos principalmente en tejidos sometidos a reparación o remodelación debido a heridas, procesos patológicos o fisiológicos naturales. Desde el punto de vista celular, SPARC está involucrada en diversos mecanismos como la remodelación y organización de la ME, angiogénesis, migración, proliferación, diferenciación y supervivencia, uniéndose a diferentes componentes de la ME, a factores de crecimiento y otras moléculas para ejercer su acción. Por lo que SPARC, favorecería la generación de un entorno adecuado para la regeneración tisular a través de sus diversas funciones.

En función de estas evidencias previas, en este trabajo hipotetizamos que la sobreexpresión de SPARC en CMM podría tener un efecto directo en la composición de su secretoma, así como también en su potencial para la regeneración de heridas. A su vez, sabiendo que las VE, en particular los exosomas, constituyen una herramienta atractiva para el desarrollo de terapias clínicas y que la cantidad colectada por los medios tradicionales suele ser limitante, proponemos un escalado del sistema de cultivo mediante el uso de *microcarriers* y *spinner flasks* para crecer las células en gran cantidad, condicionar su medio y así poder aislar una mayor cantidad de exosomas de la que se obtendría haciéndolo de la forma tradicional. Por consiguiente, **objetivo general** de este proyecto es aislar el secretoma derivado de CMM modificadas genéticamente y cultivadas en un sistema en suspensión (3D), con el fin de caracterizarlo y evaluar su potencial terapéutico.

En base a la hipótesis y al objetivo general, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Poner a punto y caracterizar el sistema de cultivo de CMM en suspensión y aislamiento de los exosomas derivados de estas células.
2. Modificar la expresión de SPARC en las CMM y hacer un análisis comparativo de las células modificadas respecto de las *wild type*.

3. Aislar el medio condicionado y exosomas de CMM modificadas y *wild type* y caracterizarlos.
4. Analizar el potencial regenerativo del medio condicionado y exosomas derivados de CMM *wild type* y modificadas en ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular de CMM-WJ en dos dimensiones (2D)

Las CMM-WJ se cultivaron en medio α -MEM (Gibco) con un suplemento de 10% v/v de suero fetal bovino (SFB, Natocor) y GlutaMAX (Gibco), en estufa a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Dependiendo del uso que se les quisiera dar, se usaron placas de plástico (JetBiofill) de diferentes tamaños. Generalmente se usaron placas de 60, 100 y 150 mm de diámetro (20, 60 y 145 cm² de superficie respectivamente).

Cuando las células alcanzaban a un 80% de confluencia se realizaba el pasaje o repique de éstas con el fin de amplificarlas o plaquearlas en una determinada concentración para un determinado experimento. Los pasajes se realizaron de la siguiente manera, se descartó el medio de cultivo, se lavó con PBS y se incubaron las células a 37°C con Tripsina (Gibco) hasta corroborar visualmente que las células se comenzaron a despegar de la placa (3-4 min de incubación). La enzima se inactivó con igual volumen de α -MEM (Gibco) suplementado con 10% SFB (Natocor) y las células se terminan de disgregar de forma mecánica con la pipeta. Después se transfirieron a un tubo cónico el cual se centrifugó durante 5 minutos a 300 g. Por último, se retiró el sobrenadante y resuspendió el pellet en medio de propagación. Para los cultivos en mantenimiento se sembró una tercera o cuarta parte de las células levantadas en una nueva placa. El medio de cultivo fue renovado cada 48 horas.

Cultivo de CMM-WJ en suspensión (3D)

Para el cultivo en suspensión se utilizaron frascos de 125 mL de capacidad los cuales cuentan con una paleta de agitación con barra magnética incorporada (Corning). Como las CMM crecen en adherencia, se utilizaron *microcarriers beads* Cytodex 3 (Sigma), los cuales son micropartículas esféricas (175 μ m de diámetro) de plástico, recubiertas por una capa de colágeno que sirven de superficie de adherencia para las células. Los *microcarriers* fueron hidratados por 3 horas en PBS con agitación esporádica. Transcurrido este tiempo, se esperó a que las *beads* decanten, se descartó cuidadosamente el PBS con pipeta, y se agregó PBS nuevo. Se esterilizaron mediante autoclave y luego de este proceso se descartó nuevamente el PBS para reemplazarlo por PBS fresco. Mediante la información del tamaño de los *microcarriers* y la cantidad de partículas por gramo, calculamos la superficie por gramo de *microcarriers*, siendo 1 g equivalente a 2700 cm². Este dato lo usamos para preparar gramos de *beads* en un volumen final determinado y así luego pipetear el volumen correspondiente a la superficie que necesitáramos para cada experimento.

La siembra de CMM-WJ en los *microcarriers* se realizó de la siguiente manera: se tomó el volumen correspondiente a 0,3 g de *beads* o 800 cm² (que equivalen a aproximadamente 5 ½ placas de 150 mm) y se trasvararon a los frascos de cultivo. Cuidadosamente se descartó el máximo volumen de PBS posible, y se agregaron 30 mL de α -MEM (Gibco) suplementado con 10% v/v SFB (Natocor) y GlutaMAX (Gibco). El frasco con las *beads* y medio se puso sobre la placa magnética agitadora (bioMIXdrive 4, 2MAG), y se mantuvieron en agitación suave (30 rpm) por al menos 40 minutos previo al plaqueo de las células. Las células se levantaron como se describió previamente, se contaron en cámara de Neubauer y se sembraron con una densidad de 6000 células/cm². El volumen correspondiente a la cantidad de células necesaria se agregó a los frascos con las *beads*, durante 1 hora se agitaron a 30 rpm en ciclos de 2 min prendido y 15 min apagado y por último se dejaron en reposo hasta el día siguiente.

Al día siguiente, para corroborar que las células estuviesen adheridas se tomaron alícuotas y se trasvasaron a placas de 24 o 12 pocillos (JetBiofill) para observarlas al microscopio. Por último, se agregaron 40 mL de medio de propagación y se dejaron en agitación suave constante (30 rpm). Los cambios de medio se hicieron cada 48 hs, descartando dos tercios del volumen y reponiéndolos por medio fresco. El agitador y los frascos se mantuvieron en estufa a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.

El procedimiento para repicar las células es similar al descrito: se descartó el medio con cuidado de no levantar los *microcarriers*, se hicieron dos lavados con PBS para eliminar los residuos de SFB y se agregaron 30 mL de Tripsina (Gibco). Los frascos se pusieron en agitación a 30 rpm por 4 minutos y transcurrido este tiempo se procedió a disgregar mecánicamente con suavidad utilizando micropipeta con *tip* de 1000 µL por 1 minuto. Se agregaron 30 mL de medio con SFB para cortar la acción de la Tripsina y se esperó a que las beads decanten. Se tomó el máximo volumen posible sin *beads* y se trasvasó a tubos cónicos de 50mL para centrifugar las células a 300 g por 5 minutos. El *pellet* de células fue resuspendido en medio de propagación y las células se sembraron en beads nuevas para continuar con la amplificación del cultivo o fueron utilizadas para otros experimentos.

Medición de la concentración de glucosa en cultivos 3D

Como una medida estimativa del crecimiento de las células en el cultivo en suspensión, se hicieron mediciones de la concentración de glucosa en el medio. Para esto, utilizamos el kit de Glicemia enzimática (Wiener lab), que permite determinar la concentración de glucosa en muestras líquidas, mediante una reacción colorimétrica.

Se colectaron muestras de medio a día 1 post siembra luego de llevar el cultivo al volumen final de medio y homogenizarlo, a día 3 (se tomó una muestra antes y una luego del cambio de medio) y día 5. Todas las muestras fueron analizadas en el momento que fueron colectadas siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se tomaron alícuotas de 500 µL del medio de cultivo en microtubos de 1,5 mL. Los medios fueron centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos para eliminar *debris* celular u otros componentes que pudieran interferir con la medición y se trasvasaron los sobrenadantes a tubos limpios. Se prepararon 3 tubos, el primero (B) con el blanco de reacción que consistía en 1 mL de reactivo A, provisto por el kit. El segundo tubo (E) se preparó con 10 µL de una solución estándar de glucosa 1 mg/mL + 1 mL del reactivo A. El tercer tubo (I) con 1 mL de reactivo A + 10 µL de la muestra incógnita. Se homogenizaron las muestras y se incubaron 5 minutos en baño térmico a 37°C, luego de la incubación se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 505 nm.

El cálculo de la concentración de glucosa en las muestras incógnitas se hizo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Glucosa [mg/mL]} = I \times f$$

$$f = (1 \text{ mg/mL})/E$$

Cultivo celular de las líneas celulares HaCat y CCD-32Sk

Las líneas de queratinocitos y fibroblastos de piel normal de humano (HaCat y CCD-32Sk, respectivamente) fueron compradas por el laboratorio del profesor Randy Schekman a la *Cell Culture Facility* de la Universidad de California, Berkeley (336 Barker Hall) y donadas a nuestro laboratorio. Los fibroblastos se

cultivaron y repicaron de manera similar a las CMM-WJ, pero el medio de propagación utilizado fue D-MEM (#11995065, Gibco) suplementado con 10% v/v SFB (Natocor) y GlutaMAX (Gibco).

Los queratinocitos se mantuvieron en medio D-MEM (#11995065, Gibco) suplementado con 10% v/v SFB (Natocor), GlutaMAX (Gibco), aminoácidos no esenciales (MEM NEAA, Gibco) y piruvato de sodio 1mM (Gibco). Al llegar al 60% de confluencia se repicaron de la siguiente manera: se descartó el medio y se hizo un lavado con PBS, se agregaron entre 1-2 mL de TryPLE 10X (Gibco) y se incubó la placa a 37 °C por 5 minutos. Se disgregaron mecánicamente suavemente para ayudar a despegar las células de la placa y luego se cortó la reacción de la enzima con 2-4 mL de medio con SFB. Las células se transfirieron a un tubo de centrífuga y centrifugaron a 300 g por 5 minutos. El pellet de células se resuspendió y sembró para continuar amplificando o se plaqueó para experimentos determinados.

Cuantificación del número de células

Para todas las cuantificaciones del número de células se levantaron las células como se explicó previamente para cada cultivo. Luego de la centrifugación, se procedió a resuspender suavemente para lograr individualizar las células, se tomó una alícuota la cual se mezcló con una solución azul de Tripán-PBS (1:1) y se realizó el conteo en cámara de Neubauer, empleando un microscopio de contraste de fases. El azul de Tripán (solución 0,4%, Sigma) es un colorante utilizado para el recuento de células íntegras por exclusión de dicho colorante. Este método está basado en que las células vivas (viables) no incorporan el azul de Tripán mientras que las células muertas (no viables) si lo hacen. Por lo tanto, se contaron únicamente las células refringentes.

Criopreservación y descongelamiento de las líneas celulares utilizadas

Para mantener los stocks de células a largo plazo las mismas fueron congeladas en nitrógeno líquido usando criotubos (Corning) resistentes a las bajas temperaturas. El protocolo utilizado fue el mismo para todas las líneas celulares. Se levantaron las células como se describió previamente para cada línea y luego fueron resuspendidas en el medio de propagación correspondiente suplementado con 20% v/v de SFB y 10% v/v de Dimetil Sulfoxido (DMSO, Sigma). Los criotubos se colocaron en un recipiente lleno de isopropanol (*Frost-it*) que se llevó al freezer a -80°C para que el congelamiento fuera lento y evitar la formación de cristales que puedan dañar las células. 24 horas después los tubos eran guardados en el tanque de nitrógeno líquido.

Para descongelar las células, los criotubos fueron incubados en un baño térmico de 37°C durante unos minutos hasta que se termina de descongelar la totalidad del líquido. El contenido se transfirió a tubos cónicos que contenían 4 ml del medio de cultivo correspondiente y se centrifugaron durante 5 minutos a 300 g. Por último, se descartaron los sobrenadantes, los *pellets* fueron resuspendidos en medio de cultivo y trasvasados a las placas de cultivo.

Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico, a partir de aproximadamente 2×10^5 células disociadas se realizó un lavado con PBS y se las resuspendió en 100 μ l de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.001% gelatina, 0.5% NP-40, 0.5% Tween-20) y se agregó 1 μ l de proteinasa K (10 μ g/ml, Thermo Fisher). Luego de incubar la muestra a 65°C durante 1 hora en agitación se precipitó en frío con 600 μ l de isopropanol 100% durante 30 min a -20°C. Se centrifugó la muestra a 12.000 x g durante 15 min a 4°C, se lavó el pellet de ADN con etanol 70% y se lo resuspendió en 30 μ l de agua Milli-Q. Se favoreció la solubilización del ADN genómico mediante la incubación de las muestras a 65°C durante 1 h. Conservamos las muestras de ADN genómico a -20°C.

Detección de contaminación con *Mycoplasma sp.*

En el laboratorio controlamos periódicamente los cultivos de células para la detección de contaminación con bacterias del género *Mycoplasma sp.* y, de ser positiva, proceder a descartarlos. Para ello, extrajimos ADN genómico de las distintas líneas celulares a analizar y realizamos reacciones de PCR con *primers* (Tabla 1) que amplifican una secuencia de ADN de 500 pb conservada en este género de bacterias. Dado que ante la ausencia de contaminación no se obtiene producto de amplificación, utilizamos como control positivo muestras de ADN genómico de *Mycoplasma sp.* Los productos de amplificación fueron corridos en un gel de agarosa 1,5% m/v y revelados utilizando un transiluminador (*Foto Analyst Investigator FX, Fotodyne*).

	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
Mycoplasma	ACACCATGGGAGYTGGAAT	CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT

Tabla 3. Secuencias de los *primers* utilizados para la detección de contaminación por Micoplasma.

Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se llevó a cabo utilizando el reactivo Trizol (Thermo Fisher) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Brevemente, se le retiró el medio de cultivo a las células, se lavó con PBS y las mismas fueron colectadas en un volumen óptimo de Trizol según el número de células de las cuales se partió. Luego se realizó una extracción orgánica con cloroformo (Merck), se precipitó el ARN con isopropanol (Merck), se lavó con etanol 75% y se resuspendió en agua deionizada libre de ribonucleasas. En el caso de tener una muestra con poco número de células, se agregó previo a la precipitación con isopropanol en cada tubo 0,5 μ l de glucógeno (15 mg/mL) (Glyco Blue, Thermo Fisher), el cual funciona como coprecipitante del ARN. Al final se colocó la solución de ARN en un termobloque a 55°C durante 10 min para favorecer la resuspensión y rehidratación. La concentración del ARN aislado (ng de ARN/ μ l de solución) se determinó utilizando un espectrofotómetro automático NanoDrop 1000 (Thermo Fisher) controlado por el software ND-1000. Se verificó también que la relación OD260/OD280 fuese de entre 1,7 y 2 para asegurar una elevada pureza del ARN total obtenido. Este ARN fue conservado a -80°C hasta el momento de uso.

Tratamiento con DNAsa y Retrotranscripción

Todas las muestras de ARN fueron tratadas con la enzima DNAsal (1 U/ μ L, Thermo Fisher) para eliminar posibles restos de ADN en la muestra. Se utilizaron de 0,5-1 μ g de ARN total que fueron incubados en una mezcla con la enzima DNAsal (1 U (unidad)), la solución buffer de la enzima y agua Milli-Q libre de DNAsas y RNAsas hasta un volumen final de 10 μ L, a 37°C en termobloque por 30 minutos. Luego se cortó la reacción de la enzima agregando 1 μ L de una solución de EDTA 50mM en incubando a 65°C por 10 min. Por último, se incubaron las muestras por 5 minutos en hielo previo a realizar la reacción de retrotranscripción.

La síntesis del ADN copia (ADNc) se realizó a partir de la retrotranscripción de los ARNm. Se utilizaron 0,5-1 μ g de ARN total (previamente tratado con DNAsal), 200 ng/ μ L de oligonucleótidos al azar (*random primers*, Invitrogen) ó 0,5 μ g/ μ L de oligonucleótidos poli-T (OligodT, Invitrogen), dNTPs 10 mM (Invitrogen) y 200 U de la enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega). Se realizó una mezcla con los *random primers* (u OligodT), dNTPs, el buffer de reacción de la enzima (MMLV Buffer 5X, Promega), la transcriptasa reversa y agua Milli-Q hasta un volumen final de 9 μ L por muestra. Se agregó esta mezcla a las distintas muestras de ARN y se llevó a cabo la reacción utilizando el siguiente programa en termocicladora: 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 37°C para que ocurra la retrotranscripción y 15 minutos a 70°C con el fin de inactivar a la enzima. Finalmente, las muestras de ADNc se diluyeron al menos 5 veces en agua Milli-Q y fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización en PCR en tiempo real.

Diseño de *primers* para analizar los ARNm

Los pares de oligonucleótidos específicos (*primers*) utilizados en este trabajo para analizar la expresión de los genes estudiados fueron diseñados en el portal BLAST de NCBI con la aplicación primer-BLAST. Para evitar la amplificación espuria de posible ADN geonómico contaminante en las muestras, los *primers* fueron diseñados de manera tal que cada miembro del par sentido y anti-sentido hibride en un exón diferente del gen en estudio, en los casos en los que esto fue posible. Los *primers* fueron sintetizados por el servicio de la empresa Invitrogen o Macrogen. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se indican en la Tabla 4.

Nombre del gen	Primer Forward	Primer Reverse
<i>RPL7</i>	AATGGCGAGGATGGCAAG	TGACGAAGGCGAAGAAGC
<i>GAPDH</i>	ACAGCCTCAAGATCATCAG	GAGTCCTCCACGATACC
<i>Fibronectina</i>	AAGACCAGCAGAGGCATAAGG	CACTCATCTCCAACGGCATAATG
<i>LAMB 1</i>	GGGGTCGTGTCAGCCTTG	AGTGCTCTTGACGGTGCC
<i>LAMC 1</i>	GGCCCAGGATGTCAAAGATG	TGTTCTCTACATGGGCACG
<i>LAMA 5</i>	AGCGGCTGAACACGACAGG	AGTGAGCGGTGCCACGTTT
<i>LAMA 1</i>	CGGGCTTTTCCAGAACAGTG	AGTAAATCAGGCCGCTGGAG

<i>LAMC 2</i>	TGATACCAGAGCCAAGAACGC	CCAGCCCCTCTTCATCTACA
<i>LAMB 2</i>	GAACCCCAAAGCAAGGAGGA	GCCAGCACGCTTAGCAGTAG
<i>LAMB 3</i>	CAGAGGAGCTGTTTGGGGAG	CCCATTGATGTGGTCACGGA
<i>LAMA4</i>	CCTTTTGATGCCGTA CTCTGC	CGCTGACATCCAGTAGTGCT
<i>LAMA 2</i>	TGAGTATGAAAGCAAAGGCCAGA	TCAATTGGCACAGGGGAGAG
<i>FN1</i>	AAGACCAGCAGAGGCATAAGG	CACTCATCTCCAACGGCATAATG
<i>COL1A1</i>	GGACTACCTGGAACAAAAGGG	GCCAAGTATCTCACCTGGATCA

Tabla 4. Secuencia de los *primers* utilizados en la PCR cuantitativa en sentido 5'-3'.

PCR a punto final

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l. Se colocaron los siguientes componentes por tubo de PCR: 2,5 μ l de Buffer de PCR (Tris-HCl 200mM[pH 8.4], KCl 500mM), 1 μ l de MgCl₂ 50 mM, 0,5 μ l de una mezcla de los 4 deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Thermo Fisher), 2,5 μ l de oligonucleótido sentido (*primer forward*) 5 μ M, 2,5 μ l de oligonucleótido antisentido (*primer reverse*) 5 μ M, 0,2 μ l de la ADN polimerasa DreamTaq DNA Polimerasa 5 U/ μ l (Thermo Fisher) y 2 μ l de ADNc, y completando el volumen a 25 μ l con agua libre de DNasas.

PCR en tiempo real

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 15 μ l. Se colocaron los siguientes reactivos por tubo de PCR: 7,5 μ l de SYBR-Green master mix (contiene dNTPs con dUTP y ROX) (Roche); 1,5 μ l de primer sentido (5 μ M); 1,5 μ l de primer anti-sentido (5 μ M); 3 μ l de agua Milli-Q y 1,5 μ l de una dilución 1/5 del ADNc de ARNm o de microARNs maduro. Se utilizó el termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems). Cada muestra fue determinada por duplicado. En todos los casos el programa utilizado fue el siguiente:

1. Activación de la enzima UDG (uracil-DNA glycosylase) para degradación de posibles amplicones contaminantes (que contienen uracilo): 2 minutos a 50°C
2. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 10 minutos a 95°C
3. Desnaturalización: 15 segundos a 94°C
4. Apareamiento y extensión: un minuto a 60°C

Se realizaron 40 ciclos de los pasos 3-4. La lectura de la fluorescencia fue realizada al finalizar el paso 4 de cada ciclo.

Para cada uno de los ADNc analizados se realizaron curvas de temperatura de apareamiento para verificar la presencia de un único producto de amplificación.

Cada condición fue analizada por duplicado y cada experimento se realizó al menos con tres réplicas biológicas. Los datos crudos fueron analizados usando el programa *LinRegPCR*. El mismo permite el cálculo de una cantidad inicial de ADNc teórico, N_0 , a partir del cálculo de la eficiencia de amplificación para cada

par de *primers* utilizado. En cada experimento se evaluó la expresión de dos genes normalizadores o *housekeeping*, GADPH y RPL13A. Se utilizó la media geométrica de su N_0 para normalizar la expresión de los genes en estudio.

Clonado para la generación de los plásmidos pLJM1-CMV-SPARC-Puro y pLKO.1-shSPARC-Puro

Clonado del plásmido pLJM1-CMV-SPARC-Puro para la sobreexpresión de SPARC

Para generar este plásmido, partimos del plásmido AAV2/2-CMV-SPARC (Fig. 17) que fue generado previamente por nuestro laboratorio con el objetivo de lograr la sobreexpresión de SPARC utilizando como vector partículas de adenovirus asociado.



Figura 17. Mapa del plásmido AAV2/2-CMV-SPARC (creado con SnapGene Viewer).

Brevemente, se extrajo ARN de CMM-WJ *wild type*, se retrotranscribió utilizando OligodTs para generar el ADNc y por último se amplificó el mensajero de SPARC mediante PCR de punto final utilizando los siguientes *primers*, que fueron diseñados para amplificar cualquiera de las 3 isoformas de ARNm de SPARC reportadas:

Sparc Clon Forward: 5'-AAACCGGTCAGGAGGGTTCCCAGCAC-3'

Sparc Clon Reverse: 5'-TTCTCGAGGGCAAAGCTACAAATGGCAAGA-3'

El producto amplificado y el plásmido AAV2/2-CMV-eGFP (#49055, Addgene) fueron digeridos y posteriormente ligados para generar el plásmido AAV2/2-CMV-SPARC. Por último, se corroboró mediante secuenciación que el fragmento clonado no tenía ninguna mutación. Para obtener el plásmido pLJM1-CMV-SPARC-Puro, utilizamos como plásmido base el pLJM1-CMV-GFP (#19319, Addgene) (Fig. 18), que cuenta con las secuencias necesarias para ser empaquetado en partículas lentivirales.

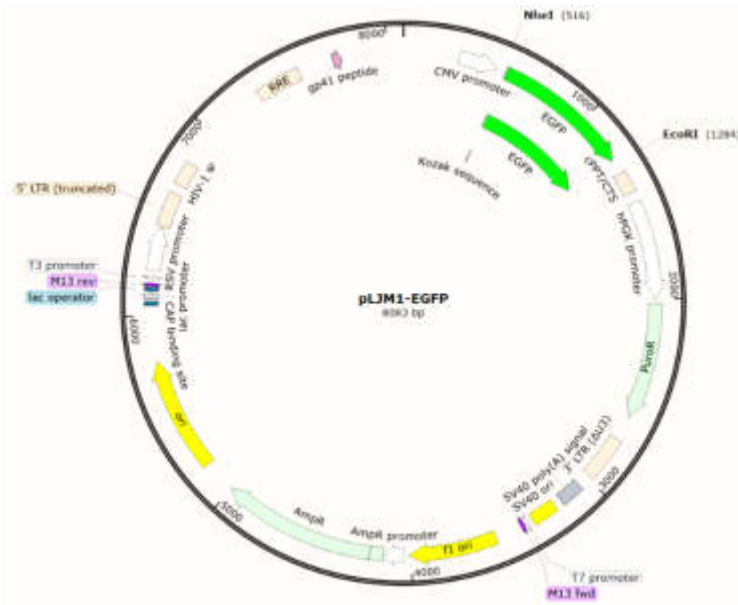


Figura 18. Mapa del plásmido pLJM1-CMV-GFP (SnapGene Viewer)

En primer lugar, se digirió con las enzimas NheI-HF (NEB) y EcoRI-HF (NEB) para generar los extremos cohesivos en el sitio de clonado, se corrieron los productos de digestión en un gel y la banda correspondiente al plásmido digerido se purificó desde el gel utilizando un kit comercial (GeneJet Gel Extraction Kit, Thermo Fisher). Por otro lado, el fragmento de interés que sería amplificado usando como molde el plásmido AAV2/2-CMV-SPARC posee un sitio de reconocimiento para la enzima EcoRI en el medio del fragmento (Fig. 17), con lo cual recurrimos al método de clonado molecular Gibson, el cual permite ligar hasta 6 fragmentos de ADN distintos que previamente son amplificados con *primers* diseñados para que los extremos se ligen en el orden deseado. Siguiendo las indicaciones del kit Gibson Assembly (NEB), se diseñaron los siguientes *primers* para la amplificación del fragmento:

Sparc assembly Forward: 5'-TGAACCGTCAGATCCGCTAGCCACTGAGGGTCCCAGCAC-3'

Sparc assembly Reverse: 5'-TGCCATTTGTCTCGAGGTCGAGAATTCGGCAAAGCTACAAATGGCAAGAG-3'

Se amplificó el fragmento por PCR utilizando como molde el AAV2/2-CMV-SPARC, luego se corrió en un gel para corroborar su tamaño y se purificó. La reacción de ensamblado entre el plásmido pLJM1-CMV- (digerido) y el fragmento se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit. Se mezclaron plásmido y fragmento en una relación 1:5 y luego se agregó el *Gibson mix buffer 2X*. El volumen total de reacción fue 12 µL y se incubó en termocicladora por 30 minutos a 50°C. Una vez finalizado el ensamble, se utilizó el total del volumen para transformar bacterias competentes.

Clonado del plásmido pLKO1-shSPARC-Puro para el *knockdown* de SPARC

En primer lugar, diseñamos la secuencia de *shRNA* (un tipo de ARN de interferencia) específica para que se una al ARN mensajero de SPARC y lo envíe a degradación. Para esto utilizamos la plataforma *online* GPP Web Portal, que se especializa en el diseño de secuencias específicas para edición génica y perturbación de la expresión de genes. La plataforma arroja secuencias, las cuales tienen un *score* asociado que indica cuán específicas son para interferir al mensajero blanco y además se diseñan para clonar en los diferentes plásmidos disponibles comercialmente.

Se seleccionó un *shRNA* específico para SPARC, el cual tiene un *score* de 15 (*score* > 7 es ideal) y compatible para ser clonado en el plásmido pLKO.1-Puro (#8453, Addgene) (Fig. 19). Las secuencias diseñadas por la plataforma se muestran a continuación:

shSPARC Forward: 5'-CCGGAATACATTAACGGTGCTAAACTCGAGTTTAGCACCGTTAATGTATTCTTTTGG-3'

shSPARC Reverse: 5'-AATCAAAAAGAATACATTAACGGTGCTAAACTCGAGTTTAGCACCGTTAATGTATTC-3'

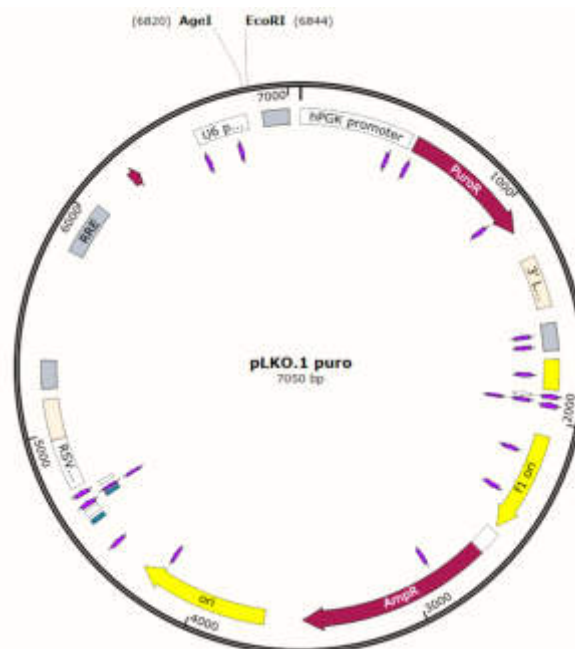


Figura 19. Mapa del plásmido pLKO.1-Puro (SnapGene Viewer)

Para hibridar las secuencias se mezclaron 1 μ L de cada oligonucleótido (100 μ M) con 5 μ L de un buffer de reacción (*NEBuffer2*, NEB) y se llevó a un volumen final de 35 μ L con agua Milli-Q. La mezcla se incubó en termocicladora 3 minutos a 95°C y luego se disminuyó su temperatura a 0,1°C/segundo hasta llegar a los 16°C.

Por otro lado, se digirió el plásmido pLKO.1-Puro durante 1 hora a 37°C con las enzimas *Agel*-HF (NEB) y *EcoRI*-HF (NEB) y se corrió el producto de digestión en un gel para luego purificar el plásmido digerido.

Por último, se realizó la reacción de ligación mezclando 20 ng del plásmido digerido + 2 μ L de los oligos hibridados + 10 μ L del buffer de ligación (*Quick Ligase Reaction Buffer (2X)*, NEB) + 1 μ L de enzima ligasa (*Quick Ligase*, NEB) en un volumen final de 20 μ L, a 16°C por 4 horas en termocicladora.

Se usaron 5 μ L del producto de ligación para transformar 50 μ L de bacterias competentes *Stlb3*.

Transformación de bacterias

Para transformar bacterias con los plásmidos que utilizamos luego para generar las partículas virales, se alicuotaron 50 μL de bacterias competentes de la cepa *Stlb3 (QB3 Macrolab* - University of California, Berkeley) por cada plásmido utilizado para transformar. Se incluyeron además un control positivo (plásmido con misma resistencia al antibiótico que los plásmidos de interés) y un control negativo (bacterias sin transformar).

Se agregaron 1-3 μL de plásmido en el tubo con bacterias (el volumen del plásmido no puede superar al 10% del volumen de bacterias), se agitaron suavemente los tubos e incubaron 30 min en hielo.

Se hizo un shock térmico poniendo las bacterias en un baño a 42°C por 90 segundos y luego de esto se llevaron a hielo por 5 minutos. Agregamos 1 mL de medio LB a cada tubo y se incubaron las bacterias en baño térmico a 37°C durante 30-60 min (este paso puede no hacerse, es un paso de recuperación).

Para finalizar, se centrifugaron las bacterias 5 min a 1300rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron suavemente los pellets con el medio sobrante en el fondo de cada tubo. Se sembraron las bacterias resuspendidas en placas de LB – 10% Ágar preparadas con el antibiótico correspondiente.

Las placas sembradas se dejaron incubando a 37°C overnight. Al día siguiente se observaron las colonias transformantes.

Purificación y chequeo de plásmidos clonados

Las colonias positivas transformantes fueron chequeadas de la siguiente manera. Se tomaron muestras de las colonias elegidas usando una punta de *tip* de micropipeta. La muestra se depositó en tubos con 3 mL de medio LB + antibiótico (en general ampicilina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se dejó en agitación a 180 rpm y 37°C por 16-18hs. Transcurrido este tiempo, se tomaron por un lado 800 μL de cultivo a los cuales se les agregó 200 μL de una solución de Glicerol 20% v/v para guardar un stock de estas bacterias transformadas a -80°C. Por otro lado, se tomaron 2 mL de los cultivos, se peletearon las bacterias mediante centrifugación a 2000 rpm y se procedió a purificar los plásmidos utilizando el GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher). Los plásmidos purificados fueron chequeados mediante secuenciación (*UC Berkeley DNA Sequencing Facility*, University of California, Berkeley) y posterior alineamiento utilizando el software *Geneious*.

Una vez chequeados los plásmidos, se utilizaron los stocks de glicerol de estos para amplificar las bacterias en cultivos de 50 mL de LB + antibiótico y purificar una mayor cantidad de plásmido. Las purificaciones se hicieron utilizando un kit de midipreps (*ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit*, Zymo Research).

Producción de partículas lentivirales

Para generar partículas lentivirales se utilizan lo que se denominan células empaquetadoras, las cuales fueron modificadas genéticamente para que expresen genes específicos que permiten la replicación viral. Para este procedimiento utilizamos la línea celular HEK 293T. Se sembraron 3×10^5 células HEK 293T/*well* en placas *multiwell* de 6 pocillos, en 1,5 mL de DMEM 10% v/v SFB (día 0 del protocolo). A las 24 horas se

observaron las células al microscopio para corroborar una confluencia del 60% aproximadamente y se procedió a cambiarles el medio por medio DMEM sin suero para luego ser transfectadas.

Para preparar el medio de transfección se colocaron 100 μ l de OptiMEM (Gibco) en un microtubo de 1,5 mL. Se utilizó la lipofectamina X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (#06365787001, Roche). La relación lipofectamina:ADN usada fue de 3:1, es decir, 3 μ l de lipofectamina por microgramo de ADN. La lipofectamina se mezcló muy bien con vórtex y luego se agregaron 9 μ l en el tubo con OPTIMEM, la mezcla se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron otros 100 μ l de OPTIMEM a otro tubo, al cual se le agregaron 3 μ g de ADN total según las siguientes cantidades de cada plásmido necesario para la generación de los virus:

1.5 μ g del plásmido con gen de interés (1500 ng, pLJM1-CMV-SPARC-puro ó pLKO.1-shSPARC-puro)

1.34 μ g de psPAX2 (134 ng) (#12260, Addgene)

0.16 μ g de pMD2.G (160 ng) (#12259, Addgene)

Se mezcló suavemente y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se unió el contenido de ambos tubos, se mezcló suavemente y se incubó la mezcla entre 15-20 minutos a temperatura ambiente (15-25°C). Por último, se tomó el contenido del tubo y se agregó gota a gota a la placa de HEK293T. La placa se llevó con cuidado a la incubadora a 37°C.

Al día siguiente, se agregó un 10% de SFB al medio de las células transfectadas (día 2 del protocolo). En el día 3 del protocolo, se agregó con mucho cuidado de no levantar las células, 1 mL de DMEM con 10% SFB. Al cuarto día de protocolo, se cosecharon los virus, para esto se tomaron los medios o sobrenadantes de los wells con las células y se filtraron utilizando filtros de jeringa de 0,45 μ m de tamaño de poro. Los filtrados, que contienen las partículas virales, se guardaron a -80°C hasta su uso.

Transducción de células con lentivirus

Se sembraron 10.000-12.000 células mesenquimales/cm² por cada condición, considerando los controles de células sin transducir para probar los antibióticos. A las 24 horas de la siembra (día 1) se cambió el medio de las células por medio α -MEM sin SFB.

Se agregaron 100 μ l de la solución con las partículas virales gota a gota sobre las células y se dejaron incubando en estufa a 37°C.

A las 24 horas de la transducción (día 2), se cambió el medio de cultivo por medio nuevo α -MEM suplementado con 10% v/v de SFB y GlutaMAX, y se le agregó Puromicina 2 μ g/mL (Thermo Fisher) para seleccionar las células transducidas. Continuamos con la selección con antibiótico, renovando el medio de cultivo cada 48hs, hasta que observamos que en el control de células sin transducir ya no había células vivas (esto ocurría a las 48-72hs).

Luego de la selección con antibiótico (día 4-5), se continuó amplificando las células en su medio hasta llegar al día 7 de manera de asegurarnos de que no quedaran partículas virales remanentes, y a partir de ahí las células fueron o criopreservadas o se utilizaron para los distintos ensayos.

Condicionamiento de medio de CMM-WJ

Se sembraron 10.000 células/cm², de CMM-WJ *wild type*, +SPARC y KD-SPARC en placas de 60 mm. Al día siguiente se les cambió el medio por 4 mL de medio fresco α -MEM + 10% SFB + GlutaMAX para condicionar. 48 horas después, se colectó el medio en tubos cónicos y se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y los medios fueron guardados a -20°C hasta su uso.

Aislamiento de exosomas mediante Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC)

Los exosomas se aislaron a partir de medio condicionado de CMM-WJ *wild type*, +SPARC y KD-SPARC y utilizando columnas que se basan en el método de cromatografía de separación de moléculas por tamaño.

Se sembraron 6000 células/cm² en 750 cm² de *beads* tal como se explicó anteriormente. Al día siguiente se agregó medio y se dejaron crecer las células por 24 horas más. Luego se procedió a descartar el medio y se lavaron las *beads* con PBS dos veces para eliminar restos de suero, ya que éste contiene vesículas extracelulares entre sus componentes. Luego de los lavados se descartó lo máximo posible de PBS y se agregaron 70 mL de α -MEM + ITS (Insulina-Transferrina-Selenio, #41400045, Thermo Fisher) + GlutaMAX + MEM NEAA para condicionar las células durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo, el medio fue colectado en tubos cónicos de 50 ml y sometido a centrifugaciones diferenciales. La primera a 2000 g durante 15 minutos y luego a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C para eliminar células, *debris* y contaminantes que pudieran interferir en el posterior aislamiento. El siguiente paso fue concentrar el medio utilizando los tubos concentradores con membranas de celulosa Amicon *Ultra-15 100 KDa* (Merck) capaces de retener partículas de hasta 100 kDa y reducir el volumen de muestra hasta 30 veces el volumen original. El medio se centrifugó en estos tubos por 30 minutos a 4000 rpm y 4°C. Finalmente se obtuvieron entre 1-2 mL de medio concentrado.

Siguiendo el protocolo del fabricante, el medio concentrado fue colocado dentro de las columnas qEV2 (Izon Science) y se fue eluyendo su contenido con PBS. Se colectaron fracciones de 1,5 mL de las cuales cinco de las fracciones eluídas eran positivas para exosomas (esto fue previamente puesto a punto por nuestro laboratorio). Las fracciones positivas fueron concentradas usando los tubos concentradores Amicon y finalmente obtuvimos los exosomas concentrados en 100 μ L de PBS. Se utilizaron 10 μ L del concentrado para corroborar por citometría de flujo la positividad de las muestras y luego fueron guardadas a -80°C hasta su uso.

Análisis y detección de exosomas por citometría de flujo

Para corroborar la presencia de exosomas en las fracciones eluídas por SEC se realizó una citometría de flujo usando *beads* magnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD63 (*Human AntiCD63 Isolation-Detection Beads*, Thermo Fisher) junto con una marcación con anticuerpos específicos para CD9 y CD81, marcadores de superficie de exosomas.

En primer lugar, se incubaron 5 μ L de *beads* con 10 μ L de la fracción de exosomas a testear en un volumen final de 100 μ L con PBS, durante toda la noche a 4°C en rotación constante. Luego se hicieron dos lavados con PBS-BSA 0,1% y se resuspendieron en 50 μ L de PBS-BSA 0,1% + 1 μ L de los anticuerpos específicos conjugados CD9 y CD81. Se incubaron 40 min a temperatura ambiente, se hizo un lavado y se agregaron 200 μ L de PBS-BSA 0,1% para luego ser analizarlos con el citómetro (BD-Accuri C6, BD Biosciences). Como

control de autofluorescencia y para marcar la población de *beads*, se incubaron 5 μ l de éstas con los mismos anticuerpos, pero sin exosomas.

Los anticuerpos utilizados se detallan en la siguiente tabla:

Anticuerpo conjugado	Fluoróforo conjugado	Marca	N° Catálogo	Dilución
α -CD9	APC	Molecular Probes	A15698	1/50
α -CD81	PE	Molecular Probes	A15781	1/50

Tabla 5. Anticuerpos conjugados utilizados.

Aislamiento de exosomas mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad

Para aislar exosomas con esta técnica, se partió de 6 placas de 150 mm con CMM-WJ de cada una de las condiciones, las cuales fueron condicionadas por 48 horas en medio DMEM + ITS + GlutaMAX. El medio condicionado fue recuperado (150 mL por condición) y centrifugado a 1000 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos limpios y se centrifugó a 10.000 g por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue trasvasado a tubos de ultracentrífuga, aproximadamente 33 mL de medio por tubo (Ultra Clear™-35 mL, Beckman) y se añadieron suavemente con jeringa introduciendo la aguja hasta el fondo del tubo, 2 mL de una solución 60% sacarosa (en buffer HEPES 10 mM). Luego se centrifugaron a 29.500 rpm por 1:30 horas a 4°C (rotor SW32Ti, Optima XPN Ultracentrifuge, Beckman). Luego de la centrifugación quedaron 3 fases, el medio por encima, la del medio donde se encuentran las vesículas extracelulares y la fase de abajo a la que se llama “almohadón” de sacarosa. Se descartó el medio suavemente y se recuperó la fase media incluyendo 1 mL de la interfase recuperando una pequeña cantidad del almohadón de sacarosa, luego se añadieron 8 mL de buffer HEPES 10 mM a la muestra recuperada, se homogenizó bien y se corroboró que la concentración de sacarosa de la muestra sea menor al 20%. Se agregaron 2 mL de la solución de sacarosa 60% al fondo de los tubos (Ultra Clear™-13 mL, Beckman) y se centrifugaron a 31,500 rpm (rotor SW41Ti) y 4 °C por al menos 16 horas. Luego de esta centrifugación, se puede observar una banda de color blanco muy sutil. Se procedió a recuperar esta banda (1 mL de medio por encima y por debajo de la banda fueron recuperados también, el volumen recuperado total fue 3 mL) y se mezcló con 3 mL de sacarosa 60%. Suavemente y con jeringa se agregaron 1 mL de una solución 40% de sacarosa (en HEPES 10 mM) por encima, seguido de 1 mL de una solución 10% sacarosa (en HEPES 10mM), quedando 3 fases bien definidas. Las muestras se centrifugaron al menos 20 horas a 36.500 rpm a 4 °C (rotor SW41Ti). Esta centrifugación permite separar la población de exosomas de otras vesículas extracelulares de mayor tamaño. Se recuperó una banda blanca muy fina en la interfase entre las soluciones de sacarosa 10% y 40%, aproximadamente 800 μ L que se trasvasaron a un nuevo tubo de ultracentrífuga (Ultra Clear™-13 mL, Beckman) y se añadieron 10 mL de PBS 1X (filtrado con filtro de 0,02 μ m) para precipitar los exosomas a 36.500 rpm, 4 °C, durante 2 horas. Por último, se descartó el PBS con punta de *tip* de 10 μ L acoplado a vacío muy suave, y se resuspendió el *pellet* de exosomas en 30 μ L de PBS filtrado. Las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su uso.

Visualización de exosomas por microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Las muestras de exosomas aislados mediante SEC y luego fueron procesadas por los técnicos del servicio de microscopía electrónica del Instituto de Biología Celular y Neurociencias de la Universidad de Buenos Aires (IBCN-CONICET). El microscopio con el que se observaron y sacaron fotos de las vesículas es el modelo Zeiss-EM109T. Las imágenes se procesaron con el software ImageJ.

Ensayo *in vitro* de cerrado de herida o *Wound Healing Assay*

Se sembraron 180.000 células HaCat en pocillos de 24 (16-18 hs previo al ensayo). Al día siguiente, se realizó la herida sobre la monocapa de células pasando un *tip* de micropipeta de 10 μ L a lo largo del pocillo. Los pocillos fueron lavados dos veces con PBS, y luego se les agregó 1 mL de medio condicionado (MC) derivado de CMM-WJ *wild type* (MC-WT), CMM-WJ +SPARC (MC-+SPARC) ó CMM-WJ KD-SPARC (MC-KD-SPARC), se utilizó como control el medio de cultivo en el que condicionamos las CMM-WJ (DMEM + 10% SFB + GlutaMAX). Las placas fueron incubadas en condiciones normales (37°, 5% de CO₂) en la incubadora del microscopio automático BioTek Lionheart FX (Agilent). Las condiciones experimentales fueron seteadas en el software utilizado con el microscopio, Gen5 (versión 3.11), el cual podía configurarse para que el microscopio tomara fotos secuenciales de cada pocillo. Se utilizó el objetivo 4X con campo claro y con contraste de fase. Se tomaron fotos de las heridas en 3 campos distintos de cada pocillo, cada 30 min durante 14 horas. El programa, a su vez, permitía determinar diferentes parámetros a partir de las imágenes capturadas. Utilizando los datos del área de la monocapa celular a cada lado de la herida, se determinaron las curvas de porcentaje del área de la herida en función del tiempo y se analizaron las diferencias entre las condiciones estudiadas.

Ensayo *in vivo* de cerrado de herida

El siguiente ensayo se realizó en colaboración con la Dra. Marcela García de la cátedra de Citología, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de La Plata (UNLP) y cuenta con la aprobación del comité de ética de la UNLP (Protocolo: P01-03-2018).

Para el ensayo se utilizaron ratones inmunocompetentes de la cepa C3HS, al menos 3 individuos (de los cuales debía haber tanto hembras como machos) por cada condición y se realizaron tres experimentos independientes. Los animales fueron anestesiados y se les efectuó una primera herida dérmica sobre el lomo utilizando un *punch* dermatológico de 4 mm de diámetro. Una semana después de la primera herida, se les realizó una segunda lesión por intención y se les aplicó la primera dosis de medio condicionado derivado de CMM-WJ *wild type*, +SPARC o KD-SPARC. Las dosis de medio condicionado se aplicaron diariamente durante 10 días de manera intradérmica, un volumen de 200 μ L equivalente a 100 μ g de proteína. Se tomaron fotografías de los animales el día de la segunda lesión y 7, 10 y 21 días después ésta también se tomaron fotografías y se sacrificaron animales de cada condición para tomar muestras de la zona de la herida y realizar preparados y tinciones histológicas.

Se empleó el software ImageJ (FIJI) para analizar el área de las heridas en las fotografías capturadas y calcular la tasa de cerrado de herida. Por último, se realizaron tinciones con hematoxilina/eosina y tricrómico en los cortes histológicos con el fin de analizar la estructura y composición de los tejidos a medida que avanzaba la cicatrización y regeneración. Esto último fue llevado a cabo por técnicas especialistas en análisis histológicos pertenecientes al grupo colaborador a cargo de la Dra. García.

Ensayo de incorporación o *up-take* de exosomas por células receptoras

Tinción de exosomas

Se tomaron 100 μ L de las fracciones concentradas de los exosomas aislados por SEC y se llevaron a un volumen de 500 μ L con la solución vehículo del kit PKH67 Green Fluorescent Cell Membrane Labeling Kit (Sigma). Se añadieron 3 μ L del marcador fluorescente PKH67 y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Como control se realizó lo mismo, pero agregando la solución de marcación a 100 μ L de PBS. Se cortó la reacción de tinción con 3,5 mL de una solución de PBS + 10% ASB y se procedió a hacer lavados utilizando las columnas concentradoras Amicon *Ultra-15 100 KDa* (Merck). Luego de 4 lavados agregando 10 mL de PBS 1X (filtrado con filtro de 0,02 μ m), centrifugando 30 minutos a 4000 rpm y 4°C, se recuperó el concentrado y se guardó a 4°C hasta su uso.

Ensayo de *up-take* con células HaCat

Se sembraron 15.000 células HaCat en placas μ -Slide 8 Well (Ibidi®), una vez adheridas las células, se descartó el medio, se hicieron dos lavados con PBS y se añadieron 200 μ L de DMEM + ITS + GlutaMAX + MEM NEAA + Piruvato de sodio y 50 μ L de la muestra de exosomas marcados. Los controles consistieron en 1 well con exosomas sin marcar y otro well en el que se añadió la solución con el marcador fluorescente, pero sin vesículas. Las células se incubaron durante 15 horas en estufa 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Al día siguiente, se descartó el medio, se hicieron dos lavados con PBS 1X, se agregó a cada well 200 μ L de medio fresco + 1 μ L de WGA-594 (1 μ g/mL, Wheat germ agglutinin, Thermo Fisher) + 2 μ L de Hoescht (Invitrogen) para marcar las membranas y núcleos de las células receptoras. Se incubaron en estufa a 37°C por 20 minutos, se lavaron 2 veces con PBS 1X y se les agregó medio fresco para luego ser observadas con el microscopio de fluorescencia (EVOS XL Core). Se capturaron imágenes con el objetivos 40x, las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ.

Análisis de marcadores proteicos de membrana por citometría de flujo

Las CMM-WJ fueron levantadas y disgregadas en células individuales al tratarlas con TryPLE 1X (Gibco), diluidas en medio y centrifugadas a 300 x g por 5 min. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS/Albumina 0,1 %, se resuspendieron en 50 μ L de PBS/Albumina 0,1 % con anticuerpos primarios conjugados (Tabla 4) a temperatura ambiente por 30 min. A continuación, las células lavadas dos veces y resuspendidas en 250 μ L de PBS/Albumina 0,1% para ser analizadas en un citómetro de flujo BD Accuri C6. Se utilizaron células sin marcar como controles para seleccionar la población correspondiente a las células y poder determinar las poblaciones positivas para cada marcador.

Los datos fueron analizados con el software *FlowJo*.

Anticuerpo primario	Fluoróforo conjugado	Especie-Tipo	Marca	N° Catálogo	Dilución
CD90	FITC	Ratón	BD Pharmigen	555595	1/50
CD73	PE	Ratón	BD Pharmigen	550257	1/50

CD105	APC	Ratón	BD Pharmigen	562408	1/50
CD49a	PE	Ratón	BD Pharmigen	559596	1/50
CD49c	PE	Ratón	BD Pharmigen	556025	1/50
CD49d	PE	Ratón	BD Pharmigen	560972	1/50
CD49e	PE	Ratón	BD Pharmigen	555617	1/50
CD49f	PE	Rata	BD Pharmigen	561894	1/50
CD14	FITC	Ratón	BD Pharmigen	555397	1/50
CD34	FITC	Ratón	BD Pharmigen	555821	1/50
CD45	FITC	Ratón	BD Pharmigen	555482	1/50
HLA-DR	FITC	Ratón	BD Pharmigen	555560	1/50
CD29	PE	Ratón	BD Pharmigen	561795	1/50
CD51-61	PE	Ratón	BD Pharmigen	550037	1/50

Tabla 6. Anticuerpos primarios conjugados con fluoróforos utilizados.

Inmunomarcación y microscopía de fluorescencia

Inmunomarcación de células crecidas en 2D

Para la inmunomarcación, las CMM-WJ fueron cultivadas en placas de cultivo de 24 pocillos (JetBiofill). Luego de la remoción del medio de cultivo, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con una solución 4% m/v de paraformaldehído (PFA) (Sigma) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados durante 5 minutos cada uno, con albúmina sérica bovina (ASB) 0,1% v/v (Gibco) en PBS. La permeabilización y el bloqueo se realizó con una solución compuesta por 0,1% v/v Triton X-100 (Sigma); 0,1% v/v ASB; 10% v/v Suero de Cabra Normal (SCN) (Gibco) en PBS, durante 45 minutos a temperatura ambiente. Luego de remover la solución de permeabilización y bloqueo se realizó la marcación incubando las células con una dilución 1:100 del anticuerpo primario específico Anti-SPARC (#33-5500, *mouse monoclonal*, Thermo Fisher) en una solución de dilución de anticuerpos compuesta por: 0,1% v/v ASB, 10% v/v SCN en PBS durante una noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS, 0,1% v/v ASB. Posteriormente se realizó una incubación de 45 minutos de los preparados con el anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo, Alexa Fluor 594 (#A11032, goat anti-mouse, Invitrogen), en una dilución 1:400 (misma solución de dilución empleada para el anticuerpo primario). Para la tinción de los núcleos se utilizó el 4-6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) (Sigma) en una concentración final de 200 ng/ml, el cual fue agregado simultáneamente con el anticuerpo secundario. Se realizaron nuevamente 3 lavados durante 5 minutos cada uno, con 0,1% v/v ASB en PBS y finalmente se

agregó un volumen apropiado de PBS. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio de fluorescencia EVOS XL Core y procesadas con ImageJ.

Inmunomarcación de células crecidas en 3D

Para la inmunomarcación de las células cultivadas en 3D, se tomó una alícuota de cada condición de los spinners flasks y se colocó en microtubos de 1,5 mL. El procedimiento se realizó de la misma forma que para 2D, con la diferencia de que en cada paso de lavado, fijación, permeabilización e incubación con marcadores fluorescentes se debió esperar a que las beads con las células adheridas precipiten para poder descartar el sobrenadante con mucho cuidado. Para este ensayo, luego de permeabilizar se incubaron las células con Faloidina (Thermo Fisher) por 30 minutos y por último con DAPI (Sigma) por 10 minutos. Luego de los lavados pertinentes, las beads se transfirieron a pocillos de una placa *multiwell*, para poder ser observados con el microscopio de fluorescencia (EVOS XL Core). Las imágenes fueron procesadas con ImageJ.

Análisis de proteínas por Western Blot

Extractos de proteínas de lisados celulares

Los extractos de proteínas totales fueron obtenidos de las células usando el buffer de extracción RIPA (Sigma) suplementado con inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail set I, Calbiochem). Las muestras se incubaron 10 minutos en hielo y luego se centrifugaron 5 minutos a 10.000 rpm, se recuperaron los sobrenadantes. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método del ácido bicinónico (BCA, del inglés Bicinchoninic Acid Protein Assay) (Pierce) empleando ASB como patrón. Las muestras se prepararon con 30 µg de proteínas a las cuales se les agregó solución de siembra y se las calentó 5 minutos a 100°C para completar el proceso de desnaturalización. Posteriormente las proteínas se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE en un gel de 10% de acrilamida durante 2:30 horas a 100 Volts. Las muestras se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (General Electric) durante 45min a 10 Volts. Finalizada la electrotransferencia se bloqueó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en solución PBS-Tween que contiene 5% m/v de leche. La membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos, preparados en PBS-Tween más el agregado de 3% de leche. Luego se realizaron 2 lavados de 5 minutos y 1 lavado de 20 minutos en PBS-Tween. Seguidamente se incubaron las membranas durante 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes (acoplado a la enzima peroxidasa) (Tabla 5), diluidos 1/5000. Por último, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween. El revelado de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo comercial Super Signal West Femto (Thermo Scientific), reacción que fue captada por un detector de quimioluminiscencia (ImageQuant LAS 4000mini).

Las soluciones utilizadas en la electroforesis fueron: Solución de siembra: Tris 40 mM pH = 6,8, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,006%, SDS 1% y β-Mercaptoetanol 0,1%; Solución de Corrida: Tris 25 mM pH = 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%; Solución de Transferencia: Tris 25 mM pH = 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%, Metanol 20%, PBS-Tween: Tween20 (Sigma-Aldrich) 0,1% V/V en PBS. Los geles utilizados fueron de poliacrilamida al 10% (gel de resolución): -Para gel 10%: 2 ml de acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8% (BIO-RAD), 1,5 ml de TrisHCl 1,5 M pH = 8,8, 60 µl SDS 10%; 60 µl de persulfato de amonio 10%, 2,4 ml de H₂O

destilada y 6 µl de tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich). -Gel de poliacrilamida concentrador: 0,4 ml de acrilamida 30%-bisacrilamida, 0,8%, 0,375 ml de Tris-Cl 1 M pH = 6,8, 30 µl SDS 10%, 30 µl APS 10%, 2,16 ml de H₂O destilada y 4 µl de TEMED.

Extracto de proteínas de muestras de exosomas

Las muestras de exosomas usadas para analizar por *western blot* se obtuvieron mediante ultracentrifugación con gradiente de densidad. Previo a aislar las vesículas, se contaron las células de cada condición para tener una medida de a partir de cuántas células derivan los exosomas aislados y también se tomó una muestra de extracto proteico a partir de los lisados celulares.

Las muestras de exosomas se mezclaron con una solución 10% de SDS (en PBS) para lograr una concentración final de SDS de un 2% y se hirvieron por 5 minutos. Los siguientes pasos se realizaron tal como se describieron previamente.

Anticuerpo primario	Especie-Tipo	Marca	N° Catálogo	Dilución
α-SPARC	Monoclonal-Mouse	Invitrogen	33-5500	1/1000
α-GAPDH	Monoclonal-Mouse	Santa Cruz	Sc-32233	1/1000
α-CD63	Polyclonal-Rabbit	Santa Cruz	Sc-15363	1/500
α-CD81	Monoclonal-Mouse	Santa Cruz	Sc-166029	1/1000
α-VICULINA	Monoclonal-Rabbit	Abcam	129002	1/1000

Tabla 7. Anticuerpos primarios utilizados.

Ensayo de ciclo celular con ioduro de propidio (IP)

Para el análisis del perfil del ciclo celular, se analizó el contenido de ADN mediante el ensayo de ioduro de propidio. Las células fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia del 70%. Luego, se disgregaron de manera enzimática utilizando la enzima Tripsina (o TryPLE 10X en el caso de las células HaCat) tal como se explicó anteriormente. El pellet celular fue resuspendido en 1,5 mL de PBS 1X y las células fueron fijadas con 3,5 mL de etanol 100% (quedando una concentración final de etanol 70%). Este paso de fijación se realizó de manera lenta, incorporando el etanol gota a gota y con las células en constante agitación con vórtex suave, para evitar así la formación de dobletes y tripletes de células. Luego se dejaron las muestras en la solución de fijación durante 40 min a 4°C (también es posible dejar las células en esta solución a -20°C, durante varias semanas). Una vez transcurrido el tiempo de fijación, se centrifugaron las células y los pellets se resuspendieron en 1 mL de *Staining* buffer (PBS 1X + 3% SFB). Este paso se repitió 3 veces. En el último lavado, se resuspendió las muestras en 500 µl de *Staining* buffer, se agregaron 20 µl de la enzima ARNasa A 20mg/ml (Thermo Fisher) y se incubaron 30 min a 37°C, para degradar el ARN. Por último, se agregaron 10 µl de ioduro de propidio (IP) (1 mg/ml) (Sigma), se incubó 5 min y se analizó el

contenido de ADN mediante citometría de flujo en un equipo BD AccuriC6 (Becton Dickinson). El análisis posterior para determinar los % de células en las distintas fases del ciclo celular se realizó en el programa FlowJo, mediante el ajuste al modelo de Watson.

Análisis estadístico

Las significancias de las diferencias observadas fueron analizadas mediante análisis estadístico (prueba t de Student con corrección de Welch), utilizando el programa GraphPad PRISM versión 8. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando los valores de p fueron menores a 0,05 entre los tratamientos indicados ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Capítulo 1

1.3 Puesta a punto del cultivo 3D de CMM

Como mencionamos previamente en la introducción, las funciones pro-regenerativas de las CMM constituyen una herramienta con gran potencial de desarrollo en el campo de la medicina regenerativa. Sin embargo, su aplicación en la clínica requiere de la estandarización de protocolos que permitan obtener un gran número de células a la vez que estas conserven sus cualidades terapéuticas. Los sistemas de cultivo en suspensión (3D) basados en *microcarriers* son considerados actualmente como la plataforma más eficiente en términos de escalabilidad y automatización para cultivar y expandir CMM. Por lo tanto, como primer objetivo de este trabajo nos propusimos poner a punto el cultivo 3D de CMM con *microcarriers* como superficie de anclaje y *spinner flasks*.

En la práctica, una de las características que define a las CMM, es su adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar. Dado que estas células necesitan de una superficie de anclaje para proliferar, expandirlas para obtener grandes cantidades mediante el sistema tradicional de cultivo 2D implica tener que manipular a la vez numerosas placas, lo que aumenta el riesgo de contaminaciones, ocupa mucho espacio en las incubadoras y consume mucho tiempo de trabajo en cultivo. Los *microcarriers* o *beads*, son micropartículas esféricas de diversos materiales que funcionan como matriz de soporte donde las células se adhieren y crecen manteniéndose en suspensión en recipientes como *spinner flasks* y biorreactores. Este sistema brinda una relación superficie/volumen elevada, que permite mantener una mayor cantidad de células en un único recipiente de cultivo con un volumen menor de medio. En base a los resultados de trabajos previos, en los cuales se evaluó la expansión de CMM en términos de eficiencia, escalabilidad y mantenimiento de las propiedades intrínsecas de las células utilizando diferentes *microcarriers* como soporte, decidimos utilizar las *beads* Cytodex 3 (micropartículas de Dextrano con recubrimiento de colágeno). Goh y colaboradores observaron mayor expansión a la vez que menor tasa de agregación entre beads en el cultivo de CMM en *spinner flasks* utilizando los *microcarriers* Cytodex 3 en comparación con otros *microcarriers* analizados⁶³.

Como se explicó anteriormente, las CMM pueden aislarse de diversas fuentes, en este trabajo utilizamos CMM derivadas de la gelatina de Wharton de cordón umbilical (CMM-WJ). Tradicionalmente, el cultivo de las CMM-WJ en nuestro laboratorio, se realizaba de manera convencional sembrando las células en placas de Petri para amplificarlas. Una vez que las células alcanzaban un 80% de confluencia, se repicaban y continuaban expandiéndose hasta llegar a cantidad de células deseada. Para trasladarlo al cultivo en suspensión usando los *microcarriers* y *spinner flasks*, en primer lugar, determinamos las mejores condiciones para sembrar las células. Normalmente para el cultivo en 2D se siembran alrededor de 5000 células por cm², al alcanzar un 80%-90% de confluencia se dividen y continua la expansión. En base a esto, para el cultivo en 3D decidimos sembrar un 20% más de células por cm² teniendo en cuenta que la

superficie de los *microcarriers* no es plana y podría dificultar la adhesión de las células, así como también provocar más muerte celular de lo normal. Una vez sembradas las células, se agitaron intermitentemente por 5 segundos cada 15-20 minutos, durante las primeras 2 horas post siembra, para que se adhieran lo más homogéneamente posible y luego se dejaron en reposo. Al día siguiente se observó que las células se adherieron a los *microcarriers* de manera bastante homogénea, pudiendo ver al menos 2 o 3 células por *bead* (Fig. 17).

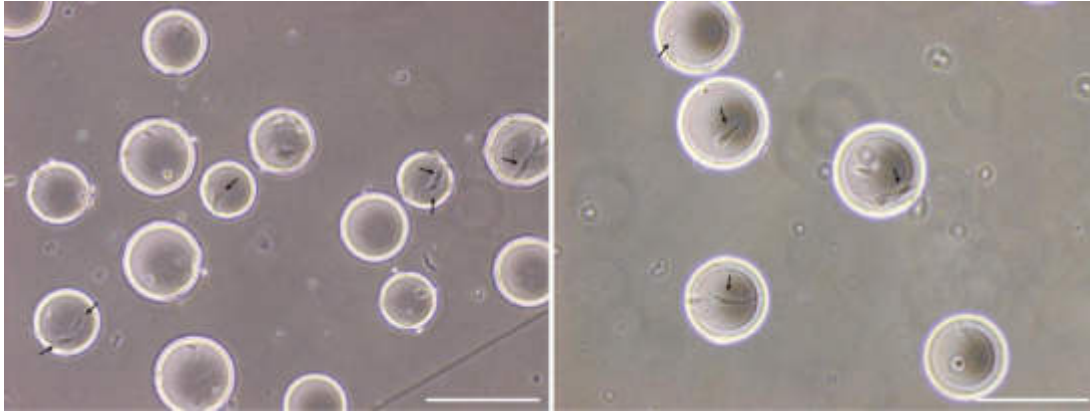


Figura 17. CMM-WJ adheridas a los *microcarriers*. Imágenes representativas tomadas con microscopio óptico de CMM-WJ 24 horas post-siembra en los *spinner flasks*. Las flechas negras indican algunas células adheridas a las *beads*. Se observa que la mayoría de las *beads* tienen adheridas al menos una célula. Barra de escala: 200 μm .

Las células se mantuvieron en los *spinner flasks* con agitación suave y continua para observar su evolución. En la figura 18 se muestran imágenes de las CMM-WJ a días 1, 3 y 5 post-siembra cultivadas en suspensión. A simple vista, se puede observar que las células proliferan a medida que van ocupando la superficie de las *beads*, además, no se observó un porcentaje de muerte muy distinto al habitual en cultivos 2D y por último, no observamos formación de aglomerados entre *beads*. A día 5, se puede ver que las células se encuentran muy confluentes (~90%). En este punto las células fueron tripsinizadas para continuar su expansión, similar a lo que realizamos de rutina en el cultivo 2D.

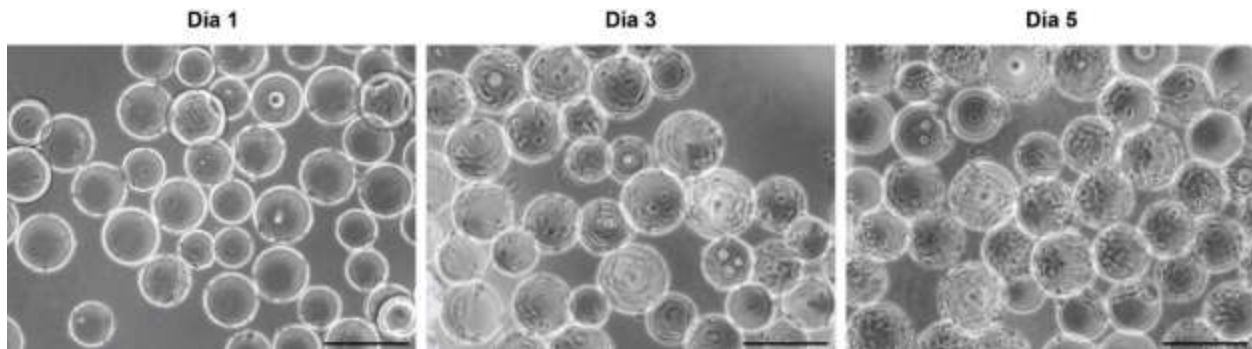


Figura 18. Crecimiento de CMM-WJ en cultivo 3D. Imágenes representativas tomadas con microscopio óptico a días 1, 3 y 5 post-siembra. Se observa cómo las células van proliferando ya al día 5 ocupan casi por completo la superficie de las *beads*. Barra de escala: 200 μm .

Paralelamente, medimos la concentración de glucosa en el medio de cultivo a distintos tiempos. La concentración de glucosa y lactato son parámetros normalmente utilizados en este tipo de sistemas, ya que disminuyen y aumentan, respectivamente, con el crecimiento celular, permitiendo estimar indirectamente el crecimiento de las células. En línea con lo observado en la figura 18, se puede ver como la concentración de glucosa va disminuyendo a medida que transcurren los días hasta llegar casi a 0 a día 5, indicando el crecimiento de la población de CMM-WJ (Fig.19).

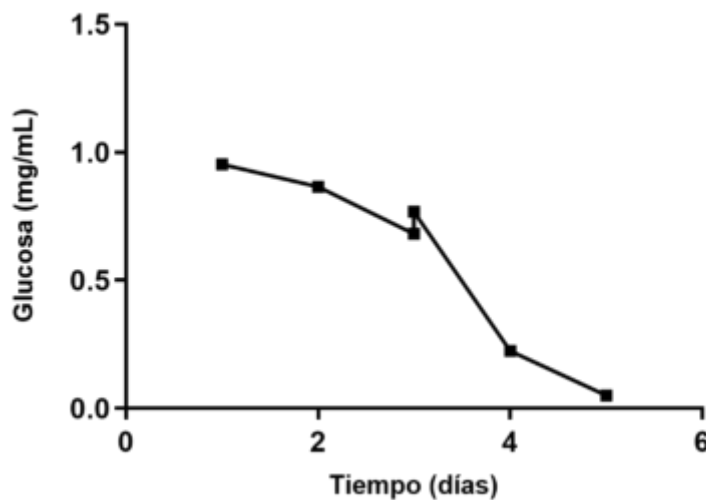


Figura 19. Crecimiento celular medido por consumo de glucosa. El gráfico muestra la concentración de glucosa en el medio de cultivo de las CMM-WJ en suspensión desde el día posterior a la siembra hasta el día 5. A día 3, se midieron las concentraciones de glucosa previo y posterior al cambio de medio.

Con estos resultados, podemos concluir que las condiciones utilizadas para el cultivo de las CMM-WJ en suspensión nos permitieron mantener y amplificar las células varios días sin inconvenientes, con lo cual decidimos continuar con esta configuración para los siguientes análisis.

1.4 Caracterización del cultivo 3D de CMM-WJ

Como se explicó anteriormente, el cultivo 3D es considerado una plataforma eficiente para escalar y automatizar la expansión de las CMM, sin embargo, es sumamente importante lograr condiciones de cultivo controladas y óptimas de manera de no sólo obtener altos rendimientos en cantidad de células,

sino que también las CMM conserven su identidad y características terapéuticas. Por lo tanto, una vez estipuladas las condiciones para cultivar las CMM-WJ en los *microcarriers* y *spinner flasks*, nos propusimos evaluar distintos parámetros para corroborar su identidad, en comparación con las células cultivadas en 2D.

En primer lugar, para corroborar que el protocolo en 3D fuera efectivamente más eficiente que el 2D, quisimos comparar partiendo de una misma cantidad inicial de células en ambas condiciones, la cantidad final de células obtenida luego de 5 días de cultivo (momento en el cuál, como se observa en la figura 18, las células llegan a confluencia en el *spinner* y hay que repicarlas). Para esto, sembramos $4,8 \times 10^6$ de CMM-WJ en un *spinner flask* con la cantidad de *beads* necesarias para poder sembrar 6000 células/cm², y en paralelo sembramos la misma cantidad en un total de 5 placas de 150 mm y 1 placa de 100 mm para la condición de cultivo en 2D, que sería la superficie equivalente. Las células se cultivaron como de costumbre, con los cambios de medio cada 48 horas y abriéndolas de ser necesario. Al quinto día las células se tripsinizaron y contaron en cámara de Neubauer. En la figura 20 se puede observar que hay una diferencia en la cantidad de CMM-WJ cuantificadas a partir de los cultivos 2D y 3D. El número total de células fue 1,56 veces mayor en la condición 3D con un promedio total de células de $3,97 \times 10^7$ contra $2,54 \times 10^7$ células en la condición 2D, siendo significativamente mayor la cantidad de células obtenidas a partir del cultivo en suspensión. Es importante mencionar que tuvimos que tripsinizar y abrir una vez las células cultivadas en 2D porque llegaron a la confluencia límite, con lo cual, el día que fueron cuantificadas teníamos un total de 15 placas de 150 mm contra un único *spinner* en la condición 3D. Con este resultado, podemos decir que el cultivo en suspensión es más eficiente que el cultivo 2D en términos de cantidad de células obtenidas, espacio ocupado y tiempo de manipulación.

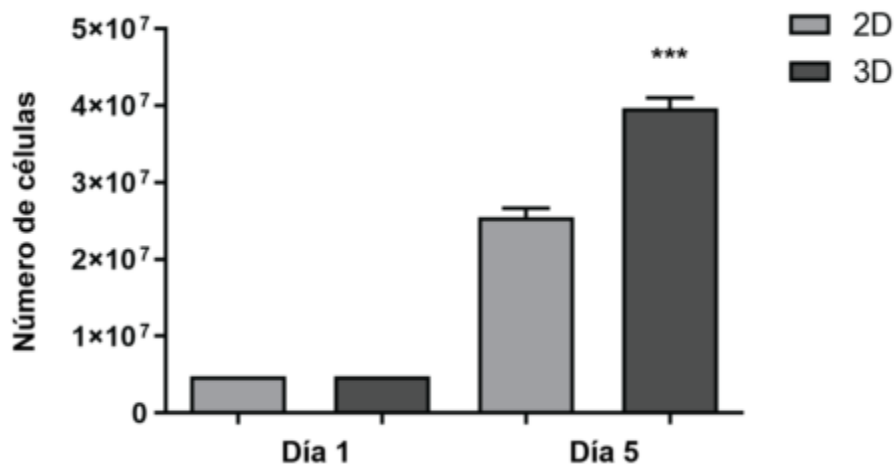


Figura 20. Cuantificación de CMM-WJ luego de 5 días de crecimiento en cultivos 2D y 3D. Se muestran los resultados de 3 réplicas biológicas independientes. El promedio de células cuantificadas el día 5 para la condición 2D fue $2,54 \times 10^7$ células y para la condición 3D fue $3,97 \times 10^7$ células. Se realizó una prueba estadística t de Student de dos colas con corrección de Welch para comparar la cantidad de células a día 5 en 2D y 3D, el resultado dio significativo ($p < 0,001$).

Continuando con la caracterización, evaluamos la expresión de determinados marcadores establecidos por el comité de Células Madre Mesenquimales y de tejido Mesenquimal de la Sociedad Internacional de Terapia Celular, como parte del criterio mínimo que debe cumplir una célula para ser considerada CMM. Según este criterio, más del 95% de la población debe ser positiva para la expresión de CD90, CD73 y CD105, medido por citometría de flujo; por otro lado, deben carecer de expresión de proteínas como CD45, CD34, CD14 o CD11b y HLA clase II (menos del 2% de la población). Para realizar esto, cultivamos las células en 2D y 3D, las tripsinizamos e incubamos con una serie de anticuerpos conjugados con fluoróforos para luego analizarlos por citometría de flujo. Como puede observarse en la figura 21, las células cultivadas en 3D presentan porcentajes de positividad similares a los de las células cultivadas de manera tradicional para los marcadores típicos de CMM, CD90, CD73 y CD105 (> 95% positivas).

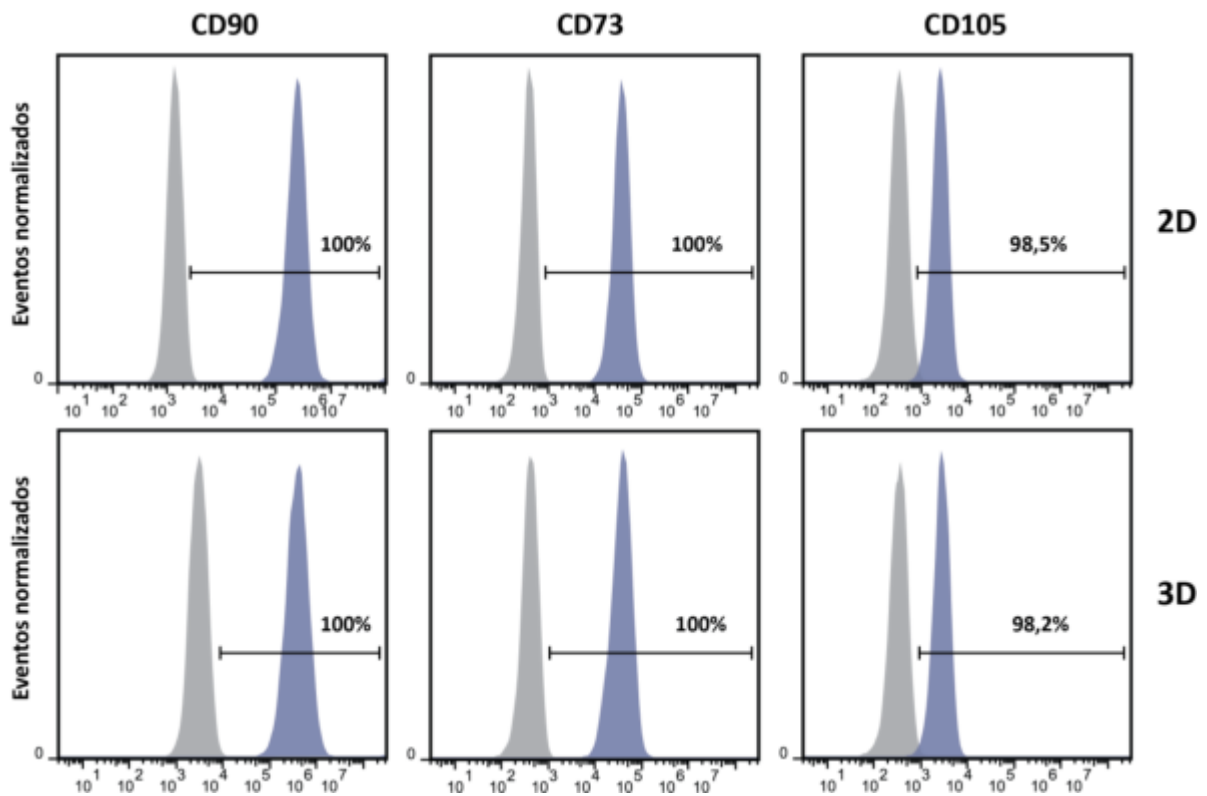


Figura 21. Marcadores positivos de CMM. Expresión de los marcadores de membrana CD90, CD73 y CD105 analizados por citometría de flujo en CMM-WJ cultivadas en 2D (paneles superiores), y 3D (paneles inferiores). Curvas grises: CMM-WJ sin marcar; curvas azules: CMM-WJ marcadas con los anticuerpos específicos. Los porcentajes de células positivas para cada marcador fueron analizados con el software FlowJo v10.0. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes para cada condición, no se encontraron diferencias significativas entre estas.

A su vez, observamos que carecen de la expresión de las proteínas de membrana CD45, CD34, HLA-DR y CD14, tal como está descrito en la bibliografía (Fig. 22). Este análisis nos permitió corroborar

que las CMM-WJ cultivadas en suspensión conservan la expresión de los principales marcadores característicos de células mesenquimales sin diferencias con las células cultivadas tradicionalmente.

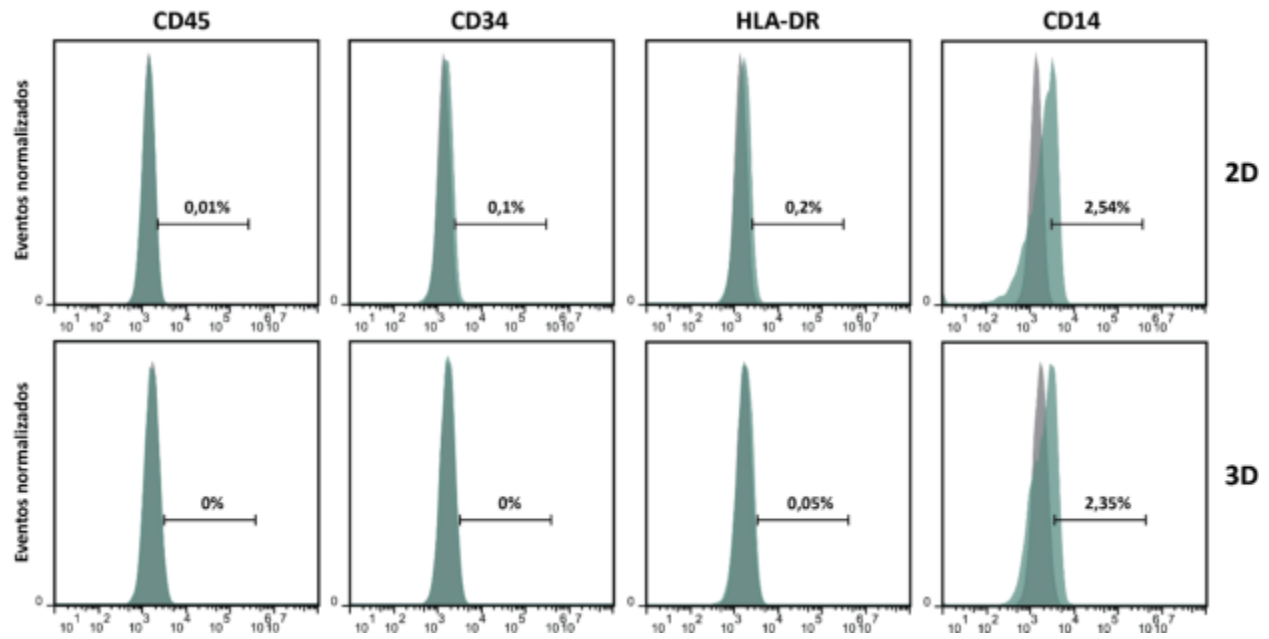


Figura 22. Marcadores negativos de CMM. Expresión de los marcadores de membrana CD45, CD34, HLA-DR y CD14 analizados por citometría de flujo en CMM-WJ cultivadas en 2D (paneles superiores) y 3D (paneles inferiores). Curvas grises: CMM-WJ sin marcar; curvas verdes: CMM-WJ marcadas con los anticuerpos específicos. Los porcentajes de células positivas para cada marcador fueron analizados con el software FlowJo v10.0. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes para cada condición, no se encontraron diferencias significativas entre estas.

Dadas las diferencias observadas en el crecimiento de las células en el sistema 3D con respecto al 2D y teniendo en cuenta que la superficie de anclaje es un factor importante que influye en la proliferación, migración y supervivencia de las CMM, evaluamos la expresión de algunos genes que codifican para proteínas que intervienen en la regulación de estos mecanismos. Mediante RTq-PCR (PCR en tiempo real), analizamos los niveles de ARNm de fibronectina, colágeno 1 α , lamininas α 1, 2, 4 y 5, lamininas β 1-3, y lamininas γ 1 y 2. Todas estas proteínas forman parte de la ME, o de la membrana basal de las células que interactúa con la ME regulando procesos de suma importancia como la adhesión, el crecimiento y proliferación, la migración y la diferenciación celular. Se obtuvieron valores relativos a la expresión de los genes en la condición de cultivo 2D. Los resultados revelaron un aumento en los niveles de expresión de ARNm de colágeno 1 α , así como de las lamininas α 5, β 1, β 3 y γ 1 en las células cultivadas en 3D (Fig. 23). Esto sugiere que el entorno de cultivo tridimensional tiene un impacto significativo en la

expresión de estos genes y podría estar relacionado a las diferencias en la tasa de crecimiento que observamos en ambos cultivos.

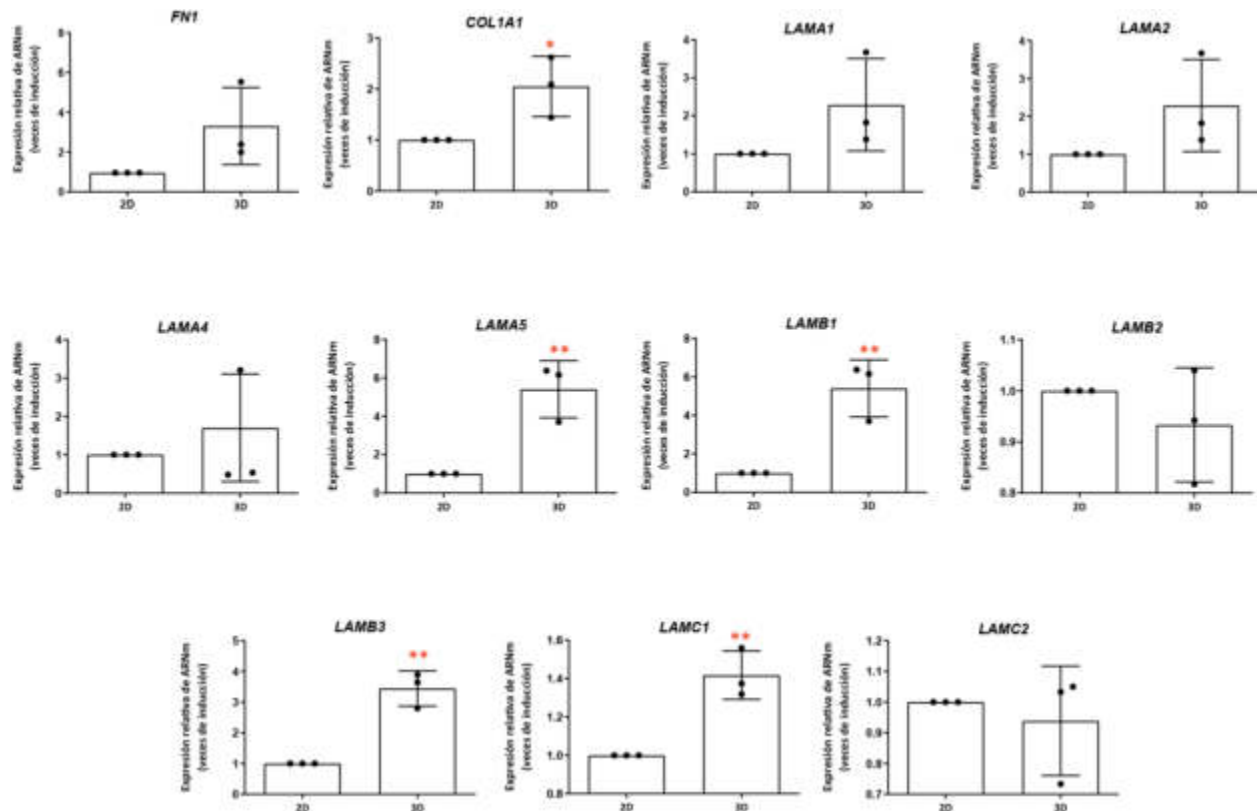


Figura 23. Análisis de integrinas de membrana y proteínas de la ME. Cuantificación de la expresión de los ARNm de fibronectina (*FN1*), colágeno 1 α (*COL1A1*), lamininas α 1 (*LAMA1*), α 2 (*LAMA2*), α 4 (*LAMA4*), α 5 (*LAMA5*), β 1 (*LAMB1*), β 2 (*LAMB2*), β 3 (*LAMB3*), γ 1 (*LAMC1*) y γ 2 (*LAMC2*) por RTq-PCR. La expresión de los genes fue normalizada con los genes *GAPDH* y *RPL7* como *housekeepings*. Se muestran los niveles de expresión de cada gen relativos a la expresión de los mismos en la condición 2D. Se muestran el promedio y error estándar para 3 réplicas biológicas independientes, (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

Finalmente, examinamos la expresión de ciertas integrinas de membrana presentes en las células mesenquimales, las cuales desempeñan funciones como proteínas de adhesión en la superficie celular. Estas integrinas interactúan con diversas proteínas de la ME, incluyendo lamininas, y están implicadas en las vías de señalización que regulan procesos fundamentales como la proliferación y migración celular. Mediante el análisis por citometría de flujo determinamos la expresión de CD49a, CD49c, CD49d, CD49e, CD51/61 y CD29 en las CMM-WJ cultivadas en 2D y 3D. No observamos cambios en el porcentaje de células positivas para las diferentes integrinas comparando 2D contra 3D, excepto para la integrina CD49a, para la cual vimos una disminución significativa de su expresión en las células cultivadas en suspensión (Fig. 24).

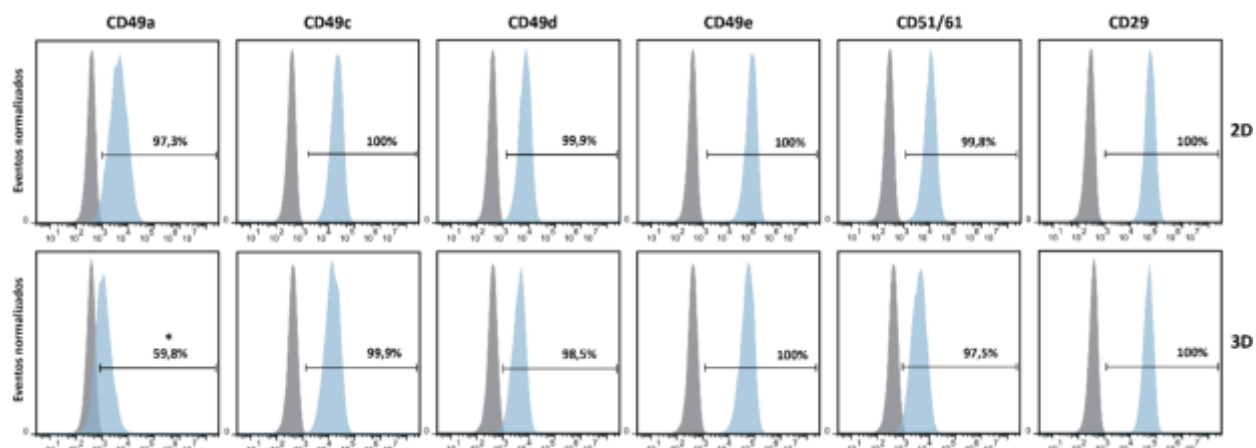


Figura 24. Expresión de integrinas de membrana. Expresión de las integrinas de membrana CD49a, CD49c, CD49d, CD49e, CD51/61 y CD29 analizadas por citometría de flujo en CMM-WJ cultivadas en 2D (paneles superiores) y 3D (paneles inferiores). Curvas grises: CMM-WJ sin marcar; curvas celestes: CMM-WJ marcadas con los anticuerpos específicos. Los porcentajes de células positivas para cada marcador fueron analizados con el software FlowJo v10.0. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes para cada condición, $p < 0,05$ (*).

Resumiendo, logramos establecer un protocolo de cultivo en suspensión de CMM en nuestro laboratorio, el cual resultó ser más eficiente ahorrando tiempo y espacio de trabajo y permitiéndonos amplificar y obtener una cantidad de células significativamente mayor que con el cultivo tradicional previamente utilizado.

Capítulo 2

2.1 Modificación de la expresión de SPARC en CMM-WJ

Como ya mencionamos, SPARC es una glicoproteína multifuncional que se expresa en vertebrados principalmente en tejidos que se encuentran en remodelación ya sea por condiciones fisiológicas o patológicas. Esta proteína es capaz de interactuar con numerosos factores de crecimiento y componentes de la ME, debido a esto, se le atribuyen diversas funciones biológicas relacionadas a la proliferación y migración celular, la regulación de proteínas remodeladoras de la matriz, la adhesión celular y la angiogénesis. Por otro lado, en la introducción también explicamos que la regeneración de heridas

cutáneas es un proceso sumamente complejo que involucra diferentes etapas en las cuales intervienen los mecanismos antes mencionados. Se ha demostrado que las CMM cumplen un rol activo durante este proceso, principalmente mediante los factores solubles y las VE que secretan. SPARC es una de las tantas proteínas que forman parte del secretoma de las CMM, por lo que nos propusimos analizar si un cambio en la expresión de esta proteína podría influir en la composición del secretoma de las CMM, modificando su potencial regenerativo.

Para modificar la expresión de SPARC en las CMM-WJ decidimos utilizar la técnica de transducción lentiviral, ya que presenta numerosas ventajas frente a otras técnicas de modificación genética. En primer lugar, los lentivirus transducen de manera muy eficiente a las CMM, conservando un alto porcentaje de viabilidad celular. Por otro lado, el genoma lentiviral se integra al genoma celular, lo que permite seleccionar el pool de células transducido mediante la incorporación de un gen de resistencia a antibiótico. Por último, si bien se deben tener precauciones y trabajar en condiciones estrictas de bioseguridad, tanto la producción de partículas lentivirales como la transducción de las células blanco, son procedimientos simples de realizar lo que facilita la modificación de gran cantidad de células a la vez. Esto representa una ventaja para nuestro proyecto dado que las CMM se vuelven senescentes luego de cierta cantidad de pasajes en cultivo, por lo que es crucial poder obtener una gran cantidad de células modificadas que puedan amplificarse rápidamente mientras puedan aprovecharse las propiedades terapéuticas de las mismas.

Para lograr la sobreexpresión de SPARC en las CMM-WJ, se llevó a cabo el clonado de la secuencia de ARNm de SPARC en el vector lentiviral pLJM1-CMV-Puro. Por otro lado, para realizar el knockdown de SPARC, se clonó la secuencia de un ARN de interferencia específico (shRNA, del inglés: short hairpin RNA) en el vector pLKO.1-Puro. Una vez completado el clonado de los plásmidos y la producción de las partículas virales utilizando células empaquetadoras, se procedió a la transducción de las CMM-WJ. La viabilidad celular post-transducción fue alta, ya que no se observó gran cantidad de células muertas con respecto al control sin transducir. Además, no observamos cambios morfológicos evidentes que indicaran que las células estuviesen experimentando estrés (Fig. 25).

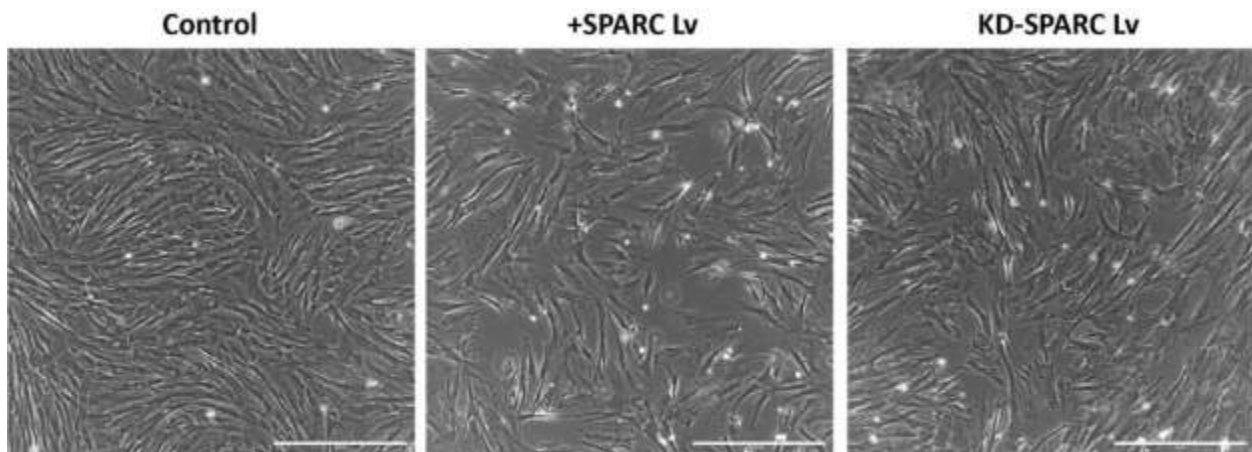


Figura 25. Transducción de CMM-WJ. Imágenes tomadas con microscopio óptico de CMM-WJ sin transducir (Control), transducidas con partículas lentivirales para sobreexpresar SPARC (+SPARC Lv) y transducidas con partículas lentivirales para disminuir la expresión de SPARC (KD-SPARC Lv). Imágenes capturadas 24 horas post transducción. Barra de escala: 200 μ m.

Las células transducidas se mantuvieron en un medio de cultivo con puromicina, con el fin de seleccionar aquellas células que incorporaron e integraron el transgén en su genoma. Tal como se esperaba, luego del proceso de selección con antibiótico, se observó un porcentaje de muerte celular correspondiente a las células que no lograron incorporar la resistencia al antibiótico. A pesar de esto, observamos un porcentaje alto de células resistentes. Las células seleccionadas mostraron algunos signos de estrés, observados como leves cambios morfológicos (células más elongadas y con algunas prolongaciones) y disminución de la proliferación (Fig. 26A). Sin embargo, se mantuvieron en cultivo y al cabo de unos días observamos algunas células, de menor tamaño, que empezaron a proliferar y a colonizar las placas (Fig. 26B, señaladas con flechas rojas).

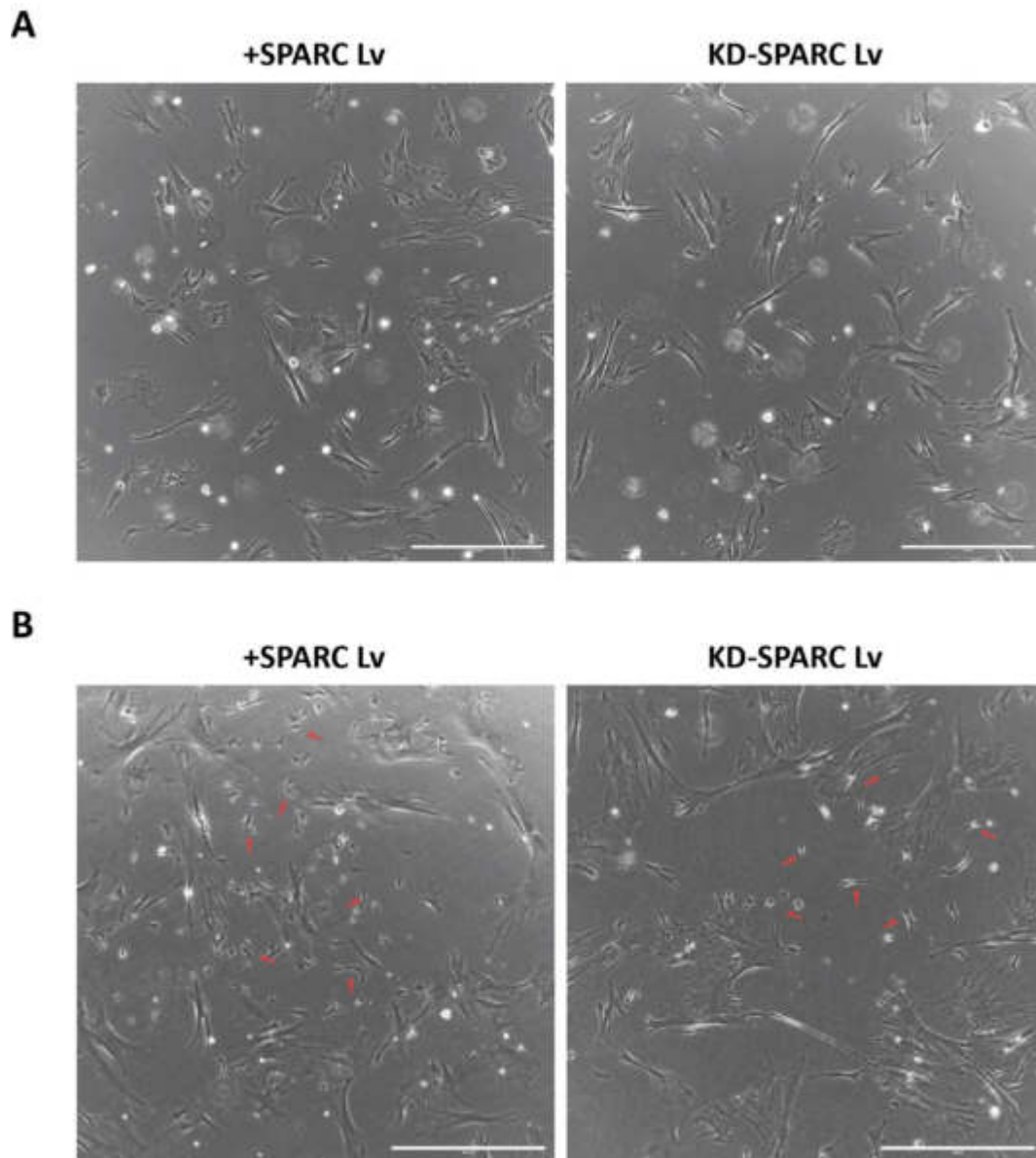


Figura 26. Selección del pool de CMM-WJ transducidas. **A:** CMM-WJ luego de ser tratadas con puromicina por 48 horas (tiempo al cual todas las células del control de selección murieron). Barra de escala: 50 μm . **B:** Imágenes de las CMM-WJ seleccionadas en **A**, mantenidas en cultivo 5 días post-selección. Las flechas rojas señalan las células pequeñas que empezaron a proliferar luego de unos días. Barra de escala: 200 μm .

Las células se mantuvieron y amplificaron durante al menos 10 días posteriores a su selección, antes de empezar a usarlas para experimentos, de forma tal de asegurarnos que no quedaran partículas virales remanentes en el medio. Al cabo de este período, las células transducción mostraron una morfología y proliferación comparables a las CMM-WJ *wild type* (CMM-WJ WT) (Fig. 27).

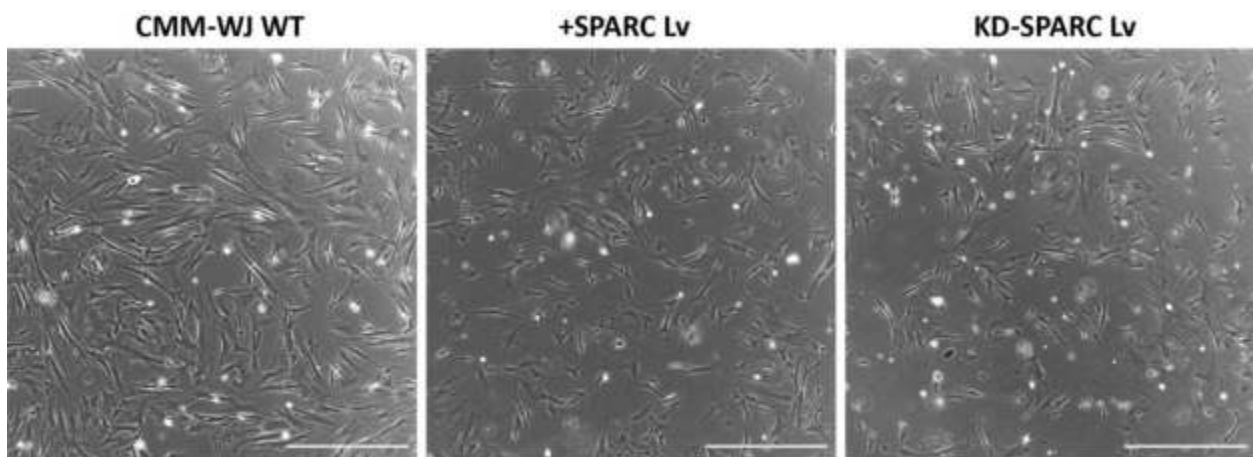


Figura 27. CMM-WJ transducidas y seleccionadas. Imágenes capturadas 8 días después de la selección de las CMM-WJ transducidas con +SPARC Lv y KD-SPARC Lv. Las CMM-WJ WT son un control (sin transducir) del mismo *batch* de células que se usó para transducir. Barra de escala: 200 μm .

Una vez que amplificamos las células transducidas, el siguiente paso consistió en verificar si logramos modificar la expresión de SPARC. Para ello, se obtuvieron muestras de lisado total de las CMM-WJ WT y transducidas. Estas muestras se procesaron, se separaron en un gel de poliacrilamida, se transfirieron a una membrana y, finalmente, se incubaron con un anticuerpo específico anti-SPARC. Al revelar la membrana, se observó la banda correspondiente a SPARC la cual fue más intensa en la muestra derivada de las células transducidas con el vector +SPARC Lv, menos intensa en la muestra derivada de las células transducidas con el vector KD-SPARC Lv, en comparación con la muestra de CMM-WJ WT. Las diferencias observadas fueron cuantificadas mediante el análisis densitométrico de las bandas, dando como resultado diferencias significativas en la expresión de SPARC en las células transducidas en comparación con las células WT (Fig. 28).

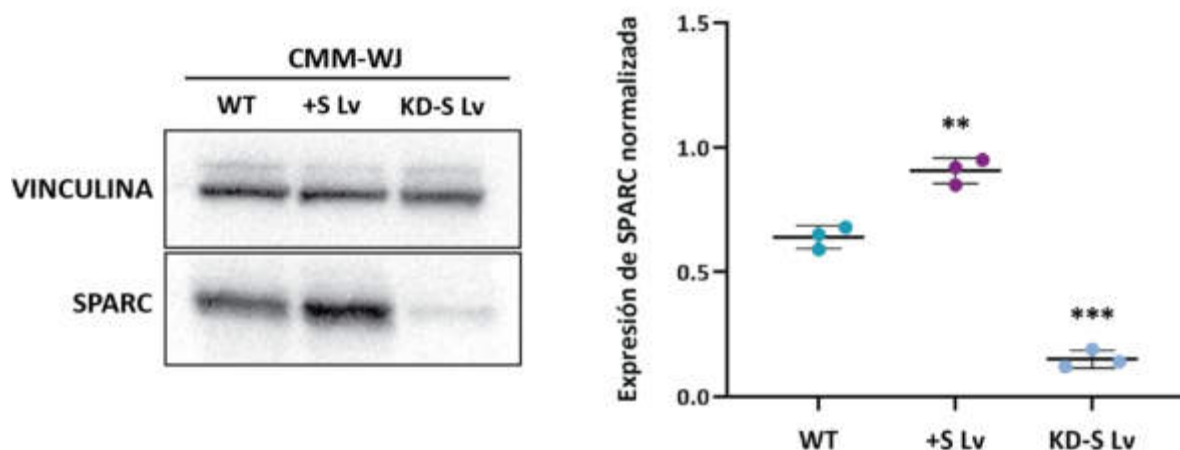


Figura 28. Expresión de SPARC en CMM-WJ WT y transducidas. A: Análisis del nivel de expresión de SPARC en lisados totales de CMM-WJ *wild type* (WT) y transducidas con el vector para sobreexpresar SPARC (+S Lv) y para disminuir la expresión de SPARC (KD-S Lv), cuantificado por Western Blot. A la derecha se muestra el gráfico de la cuantificación realizada mediante un análisis densitométrico de las bandas. Se usó el nivel de expresión de Vinculina como control de carga proteica para normalizar. Se realizó una prueba estadística t de Student de dos colas con corrección de Welch comparando cada condición contra la condición WT, para 3 réplicas biológicas independientes [(**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$].

Por otro lado, dado que SPARC es una proteína de secreción también analizamos la cantidad de proteína presente en los medios condicionados de estas células. En línea con lo observado en los lisados celulares, la banda correspondiente a SPARC fue más intensa en la muestra de medio derivada de las células transducidas con el vector +SPARC Lv, mientras que fue de menor intensidad en la muestra de medio derivada de las células transducidas con el vector KD-SPARC Lv, en comparación con la muestra de células *wild type*, esto también fue confirmado mediante el análisis densitométrico (Fig. 29).

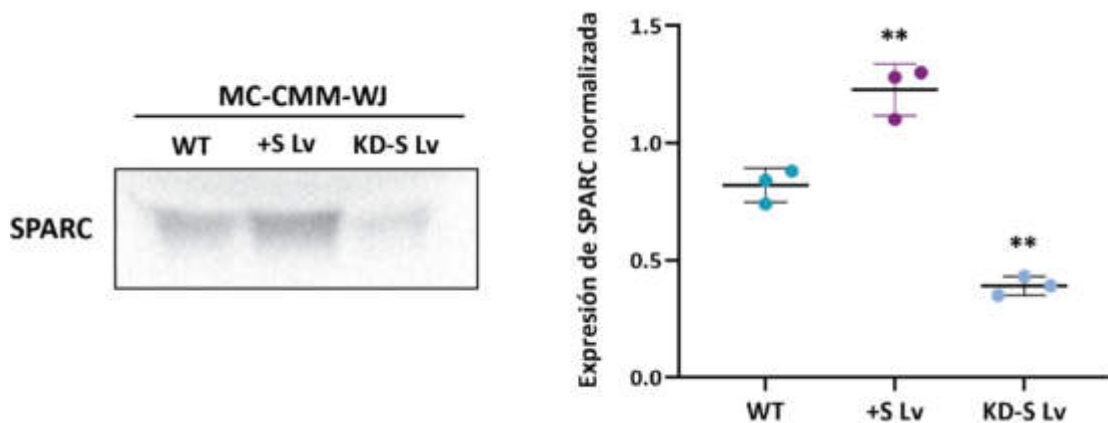


Figura 29. Cuantificación de SPARC en el medio condicionado de CMM-WJ WT y transducidas. Cuantificación por *Western Blot* de los niveles proteicos de SPARC en los medios condicionados derivados de CMM-WJ *wild type* (WT) y transducidas con el vector para sobreexpresar SPARC (+S Lv) y para disminuir la expresión de SPARC (KD-S Lv). A la derecha se muestra el gráfico de la cuantificación realizada mediante un análisis densitométrico de las bandas. Se usó el nivel de expresión de Vinculina de los lisados celulares de donde provienen los MC como control de carga para normalizar. Se realizó una prueba estadística t de Student de dos colas con corrección de Welch comparando cada condición contra la condición WT, para 3 réplicas biológicas independientes [(**) $p < 0.01$].

Basándonos en estos resultados podemos concluir que se modificó la expresión de SPARC en las CMM-WJ, generando grupos celulares estables que sobreexpresan SPARC (+SPARC) y otros en los que la expresión de SPARC se encuentra disminuida (KD-SPARC).

2.2 Caracterización de las CMM-WJ +SPARC y KD-SPARC

Una vez cumplido el objetivo de modificar la expresión de SPARC en las CMM-WJ, el siguiente paso consistió en caracterizar las células modificadas comparándolas con las células WT.

Para empezar, analizamos la localización celular de SPARC en las CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC. Mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía observamos que SPARC se localiza en el citoplasma de las células y esta localización no varía en las condiciones +SPARC y KD-SPARC donde la expresión de la proteína está alterada. Adicionalmente, la intensidad de fluorescencia asociada a la marca específica de SPARC, se observa más intensa en las células +SPARC y de menor intensidad en las KD-SPARC, en contraste con las células WT. Esto refuerza los resultados anteriores, en donde constatamos las diferencias de expresión SPARC entre condiciones (Fig. 30).

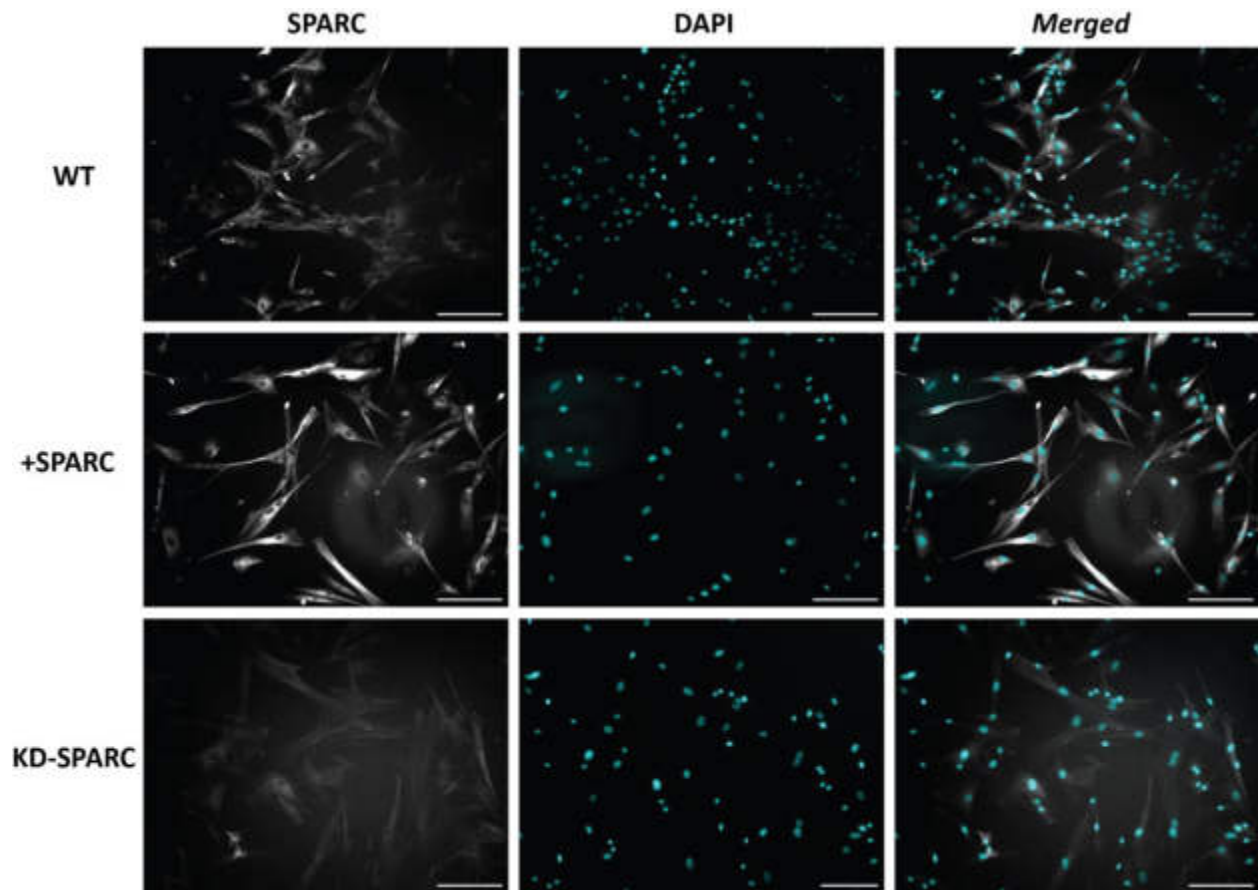


Figura 30. Localización de SPARC en CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC. Detección por inmunofluorescencia indirecta de la presencia de SPARC en CMM-WJ *wild type* (WT), que sobreexpresan SPARC (+SPARC) y *knockdown* para la expresión de la proteína (KD-SPARC). Barra de escala: 200 μ m.

Siguiendo los criterios mínimos de caracterización, evaluamos los marcadores de superficie comúnmente utilizados para identificar a las CMM. Se cultivaron las células de las 3 condiciones (WT, +SPARC y KD-SPARC), tripsinizaron e incubaron con los anticuerpos conjugados correspondientes para ser analizados por citometría de flujo. Los resultados mostraron que más del 95% de las poblaciones celulares son positivas para los marcadores típicos de células mesenquimales, sin diferencias entre WT, +SPARC o KD-SPARC (Fig. 31).

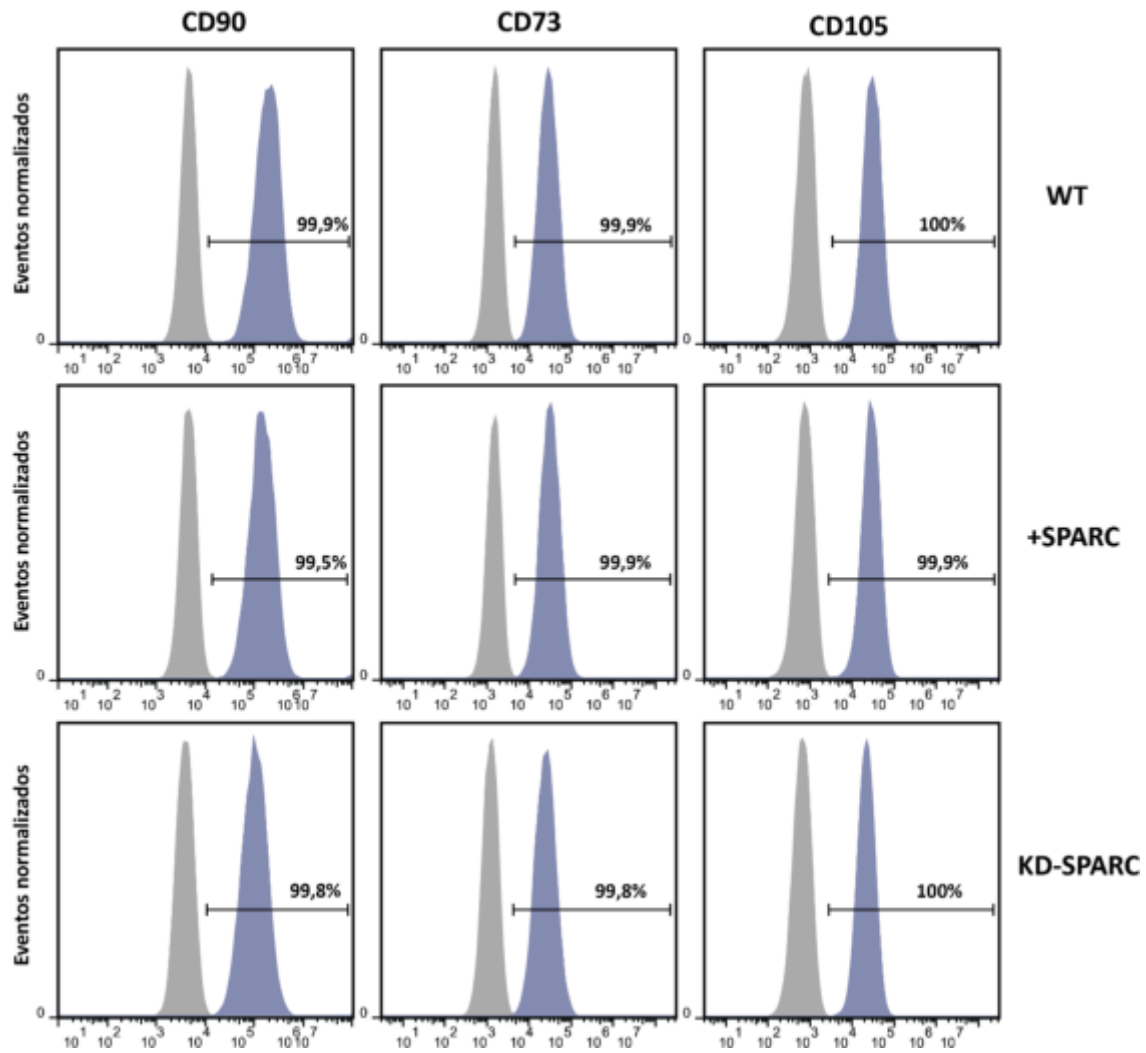


Figura 31. Marcadores positivos de CMM. Expresión de los marcadores de membrana CD90, CD73 y CD105 analizados por citometría de flujo en CMM-WJ *wild type* (WT), que sobreexpresan SPARC (+SPARC) y *knockdown* para SPARC (KD-SPARC). Curvas grises: CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC sin marcar; curvas azules: CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC marcadas con los anticuerpos específicos. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes para cada condición. Los porcentajes de células positivas para cada marcador fueron analizados con el software FlowJo v10.0.

Por otro lado, también observamos que ni las células *wild type* ni las modificadas expresan CD45, CD34, HLA-DR y CD14 (Fig.32). Con estos resultados podemos decir que los cambios en la expresión de SPARC no estarían modificando la identidad de las CMM-WJ.

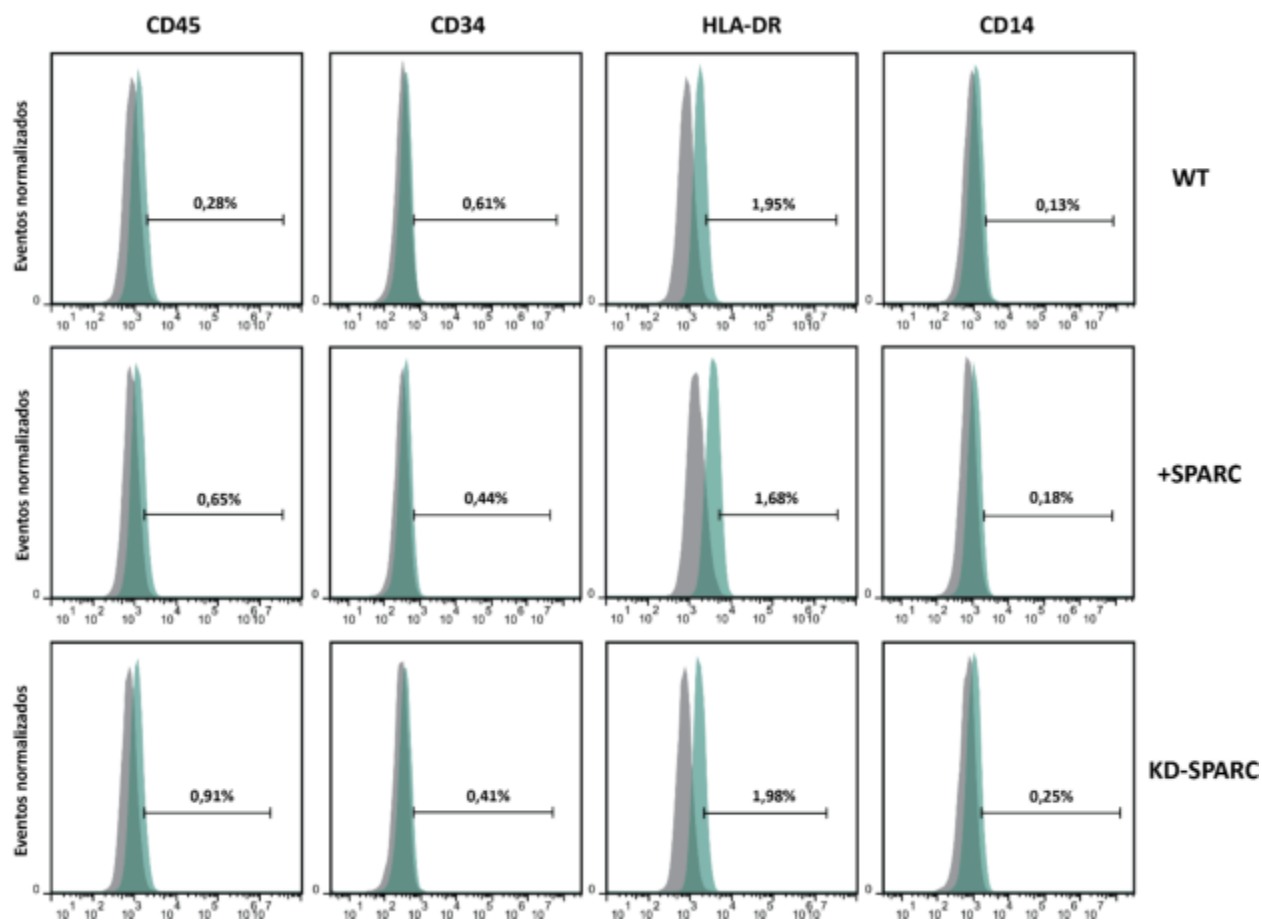


Figura 32. Marcadores negativos de CMM. Expresión de los marcadores de membrana CD45, CD34, HLA-DR y CD14 analizados por citometría de flujo en CMM-WJ *wild type* (WT), que sobreexpresan SPARC (+SPARC) y *knockdown* para SPARC (KD-SPARC). Curvas grises: CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC sin marcar; curvas verdes: CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC marcadas con los anticuerpos específicos. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes para cada condición. Los porcentajes de células positivas para cada marcador fueron analizados con el software FlowJo v10.0.

Como vimos en la introducción de este trabajo, SPARC está relacionada con la proliferación celular. Dependiendo del tipo celular o del contexto, está reportado que esta proteína puede inhibir o estimular la proliferación. Con el objetivo de profundizar la caracterización de las CMM-WJ +SPARC y KD-SPARC, analizamos el ciclo celular de las mismas cuantificando del contenido de ADN mediante la marcación con yoduro de propidio (IP) y análisis por citometría de flujo. Los resultados de este análisis mostraron para las 3 condiciones el perfil de ciclo celular típico en células mesenquimales, con un mayor porcentaje de células en la fase G1, y un menor porcentaje en las fases S y G2 (Fig. 33, panel superior). Al cuantificar los porcentajes de células en cada fase, observamos que las CMM-WJ KD-SPARC tienen una mayor proporción de células en la fase G1 del ciclo, comparado con las células WT, lo que podría indicar menor proliferación de las células *knockdown*. Por otro lado, no observamos diferencias significativas en el ciclo celular de las células que sobreexpresan SPARC con respecto a las *wild type* (Fig. 33, panel inferior).

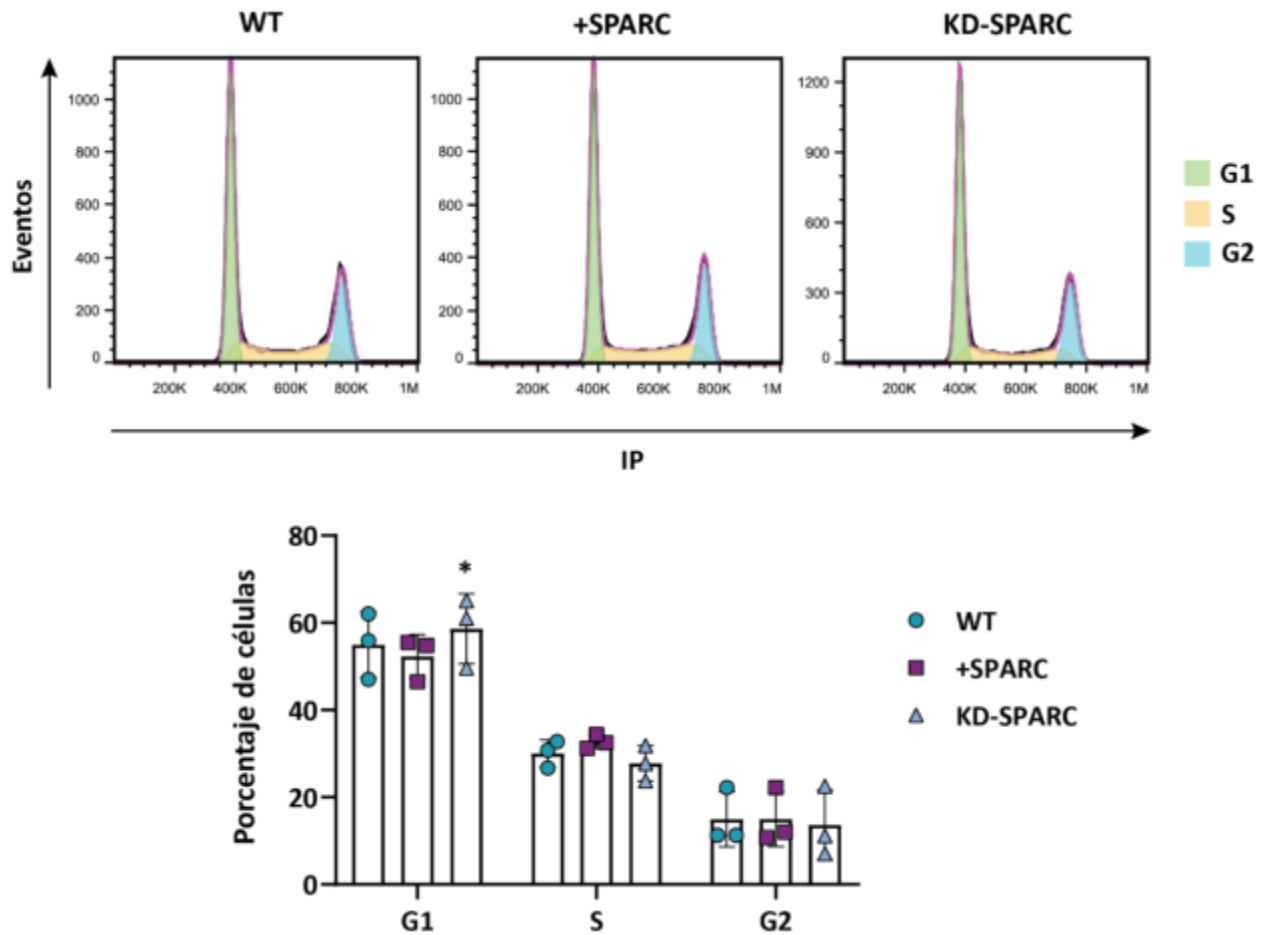


Figura 33. Ciclo celular de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC. CMM-WJ *wild type* (WT), que sobreexpresan SPARC (+SPARC) y knockdown para SPARC (KD-SPARC) cultivadas hasta llegar a un 70% de confluencia. El perfil del ciclo celular fue analizado luego de fijar las células con etanol al 70% en frío. El contenido de ADN fue medido por la incorporación de yoduro de propidio (IP) y su fluorescencia se cuantificó por citometría de flujo. En el panel superior se muestran los gráficos representativos del perfil de ciclo celular para cada condición. En el panel inferior se muestra el gráfico correspondiente a la cuantificación del porcentaje de células de cada condición en las fases G1, S y G2. Los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular se calcularon con la plataforma Un-variada del programa FlowJo v10.0. N=3, p<0,05 (*).

Por último, evaluamos el nivel de expresión de algunas integrinas de membrana presentes en las CMM, ya que como describimos previamente, SPARC es capaz de interactuar con distintas integrinas y regular tanto su expresión como su actividad. Analizamos mediante citometría de flujo el porcentaje de células positivas para la expresión de las integrinas CD49a, CD49c, CD49d, CD49e, CD51/61 y CD29, en células WT, +SPARC y KD-SPARC y no observamos diferencias significativas en la expresión de las mismas entre condiciones, lo que sugiere que ni la sobreexpresión ni el *knockdown* de SPARC en las CMM-WJ influyen en la expresión de las integrinas de membrana estudiadas (Fig. 34).

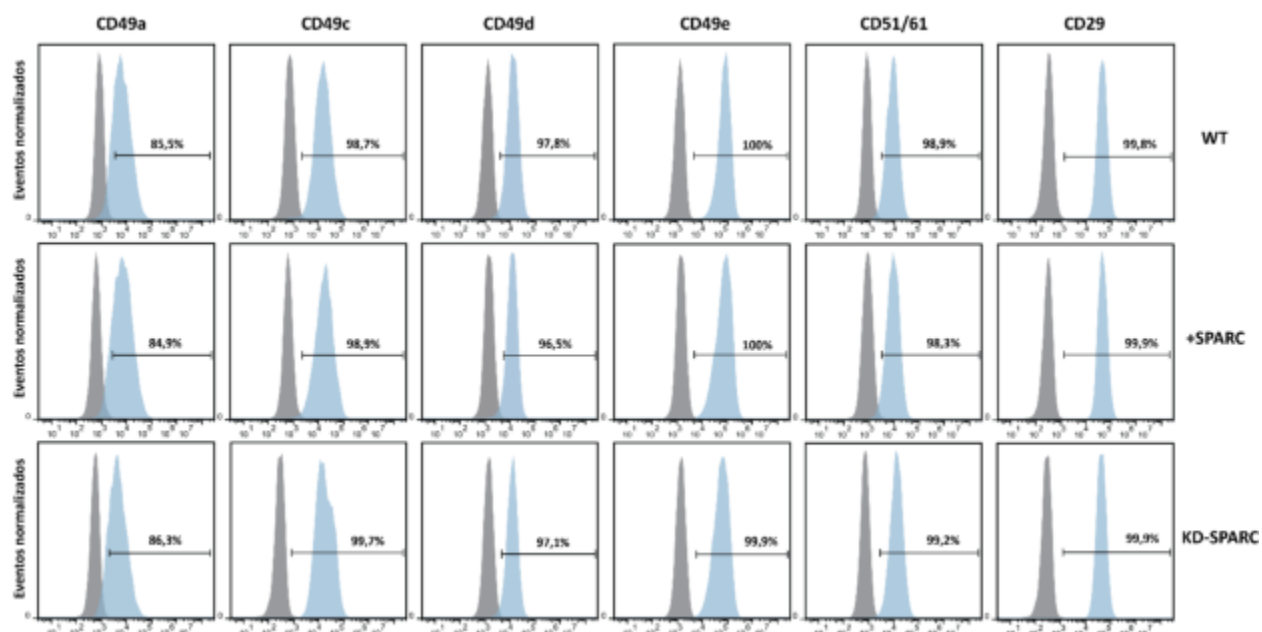


Figura 34. Expresión de integrinas de membrana en CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC. Expresión de las integrinas de membrana CD49a, CD49c, CD49d, CD49e, CD51/61 y CD29 analizadas por citometría de flujo en CMM-WJ *wild type* (WT), que sobreexpresan SPARC (+SPARC) y *knockdown* para la expresión de SPARC (KD-SPARC). Curvas grises: células sin marcar; curvas celestes: células marcadas con los anticuerpos específicos. Los porcentajes de células positivas para cada proteína fueron analizados con el software FlowJo v10.0, N=3.

2.3 Aislamiento de exosomas derivados de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC

Uno de los objetivos de este trabajo fue aislar exosomas a partir de las células modificadas. Por consiguiente, nos propusimos aislar las vesículas derivadas de las CMM-WJ WT, +SPARC Y KD-SPARC. Para empezar, cultivamos las células de manera tradicional en 2D y al llegar a la cantidad deseada, cambiamos su medio por un medio libre de suero, ya que éste también contiene vesículas extracelulares. Luego de 48 horas de condicionamiento, recuperamos el medio y procedimos a aislar los exosomas mediante la técnica de ultracentrifugación y flotación con gradiente de densidades. Esta metodología se basa en una serie de centrifugaciones diferenciales, seguida de ultracentrifugaciones en un medio con diferentes concentraciones de sacarosa, lo cual permite recuperar una fracción muy pura correspondiente a la población de exosomas.

Una vez obtenida la muestra de exosomas, evaluamos la presencia de marcadores típicos de este tipo de microvesículas. Analizamos por *Western Blot* la expresión de CD63 y CD81, dos tetraspaninas presentes en las membranas exosomales. Los resultados mostraron expresión de ambas tanto en las

fracciones celulares, como en las fracciones de los exosomas, estando CD81 enriquecido en las últimas. El análisis densitométrico de las bandas reveladas, mostró una tendencia a una menor expresión tanto de CD81 como de CD63 en los exosomas derivados de las células modificadas en contraste con las WT, llamativamente, la expresión de CD63 en las muestras de lisados celulares es mayor en las células +SPARC y KD-SPARC. Por último, dado que SPARC es una proteína de secreción, también evaluamos su expresión, de manera de comprobar la pureza de la población de microvesículas aisladas. Como era de esperar, no vimos la banda correspondiente a SPARC en las muestras de lisados exosomales (Fig. 35).

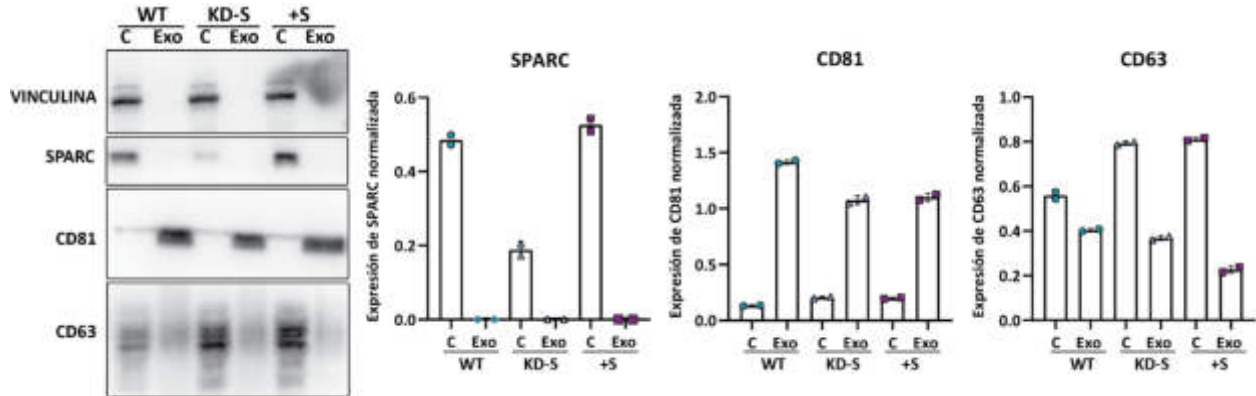


Figura 35. Marcadores característicos de exosomas. Análisis de la expresión de CD63 y CD81 (marcadores de exosomas) y SPARC en muestras de lisado total (C) de CMM-WJ WT (WT), +SPARC (+S) y KD-SPARC (KD-S), y muestras de los exosomas derivados de estas (Exo). A la izquierda se muestran las bandas proteicas reveladas, donde se utilizó Vinculina como control de carga de la fracción celular; y a la derecha se muestran las cuantificaciones de dichas bandas por análisis densitométrico (N = 2).

2.4 Aislamiento de exosomas derivados de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC cultivadas en 3D

Parte del desarrollo de este trabajo consistió en poner a punto una metodología tanto del cultivo de las CMM como del aislamiento de su medio condicionado y exosomas que fuera compatible en un futuro con un proceso fácilmente escalable y trasladable a la clínica. Siguiendo esta premisa, a continuación, cultivamos las células genéticamente modificadas utilizando el sistema de cultivo 3D puesto a punto. El protocolo se realizó siguiendo los mismos pasos previamente descritos para sembrar CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC en *microcarriers* y *spinner flasks* (Fig. 36). Las células se cultivaron en agitación constante hasta que llegaron a una confluencia de un 50%, en ese momento se les cambió el medio por un medio libre de suero y se condicionaron por 48 horas. Al finalizar este tiempo, se recuperaron los medios y se procedió a aislar los exosomas mediante una serie de centrifugaciones diferenciales, concentración y, por último, cromatografía por exclusión de tamaño.

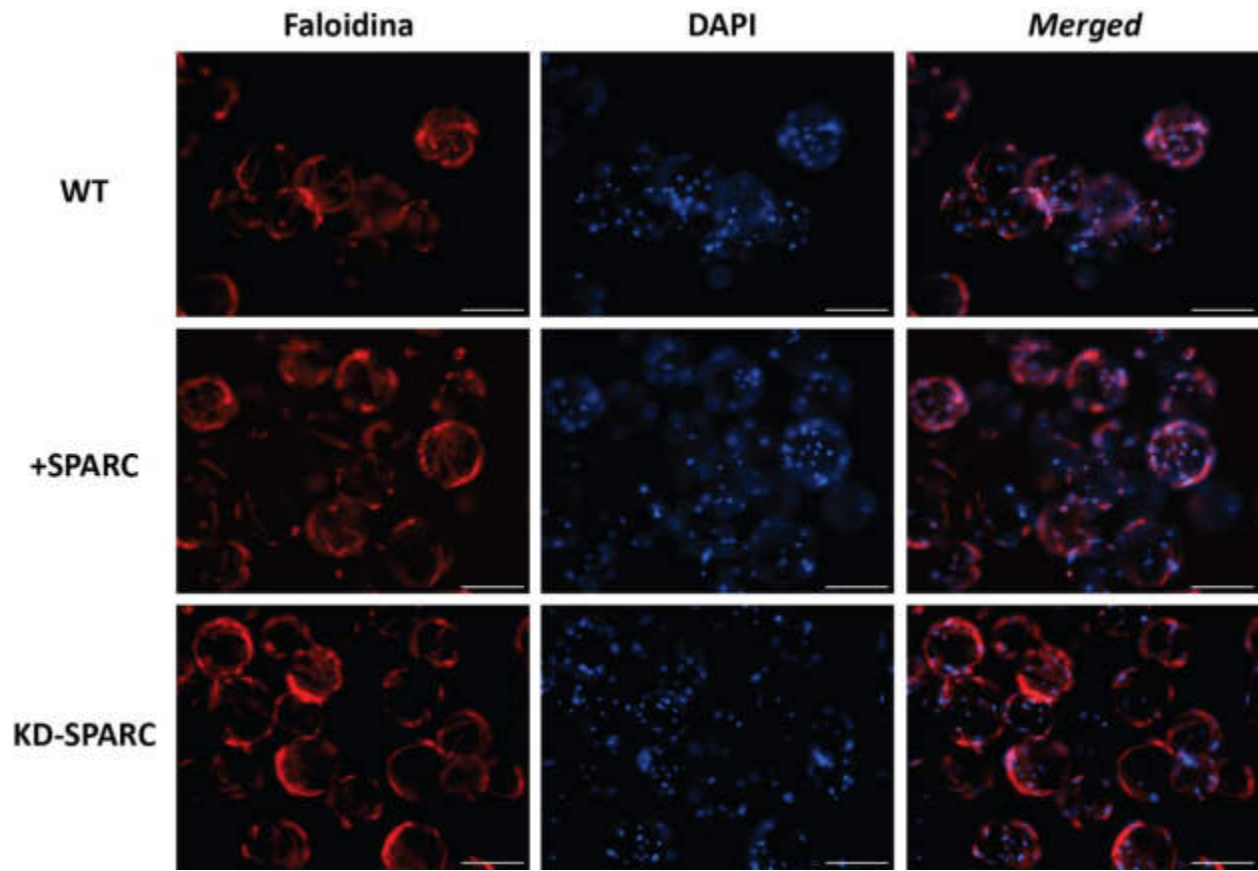


Figura 36. Cultivo 3D de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC. Imágenes de células de las tres condiciones adheridas a las *beads*. Se tomaron alícuotas de los cultivos en suspensión, se fijaron, permeabilizaron y marcaron con faloidina (marca fibras de actina) y DAPI (núcleo), de manera de facilitar la visualización de las células en la configuración 3D. Barra de escala: 200 μ m.

Una vez aisladas las fracciones correspondientes a los exosomas, realizamos un chequeo para corroborar la presencia de las vesículas mediante la incubación con *beads* magnéticas acopladas a un anticuerpo anti CD63 y post-incubación con anticuerpos anti CD81 y CD9 acoplados a fluoróforos. El análisis por citometría de flujo reveló la presencia CD81 y CD9 en las muestras pre incubadas con CD63, por lo que podemos decir que las fracciones aisladas contienen exosomas (Fig. 37 A). Sumado a este resultado, observamos las fracciones aisladas mediante microscopía electrónica de transmisión, y en todas las condiciones pudimos distinguir vesículas dentro del rango de tamaño descrito para los exosomas, entre 30 y 120 nm (Fig. 37 B).

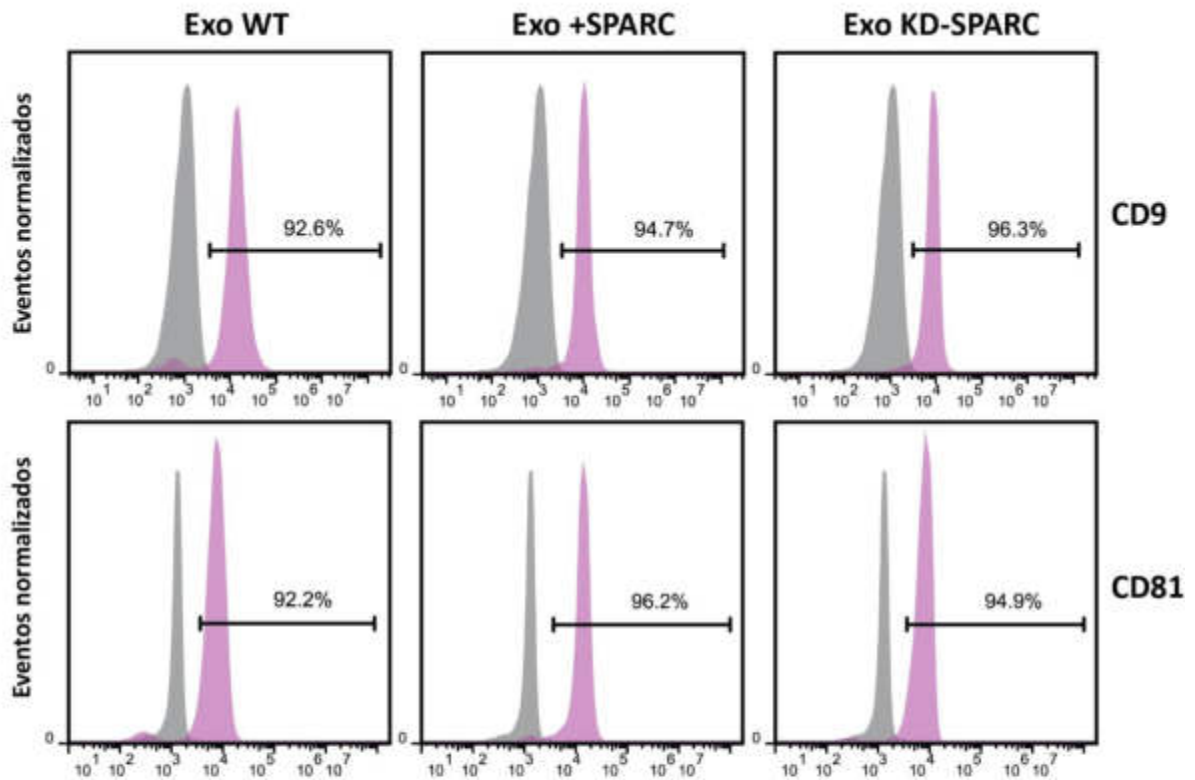
A**B**

Figura 37. Exosomas aislados de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC cultivadas en 3D. A: Marcadores exosomales CD9 y CD81 analizados por citometría de flujo en las fracciones aisladas unidas a beads anti-CD63. Las fracciones se aislaron a partir de células WT, +SPARC y KD-SPARC cultivadas y condicionadas en 3D. **B:** Imágenes tomadas con microscopio electrónico de transmisión de las microvesículas aisladas. Las vesículas (algunas indicadas con flechas negras) tienen un tamaño de entre 30 y 90 nm de diámetro (barra de escala: 100 nm). Se realizaron 3 réplicas independientes.

Por último, evaluamos la funcionalidad de las vesículas aisladas mediante un ensayo de incorporación de las mismas en células receptoras o blanco. Sembramos queratinocitos de la línea HaCat,

e incorporamos al medio exosomas que previamente fueron marcados con una molécula fluorescente que se incorpora a la membrana fosfolipídica de las vesículas. Incubamos los queratinocitos por 14 horas con los exosomas marcados, realizamos varios lavados, luego fijamos las células, permeabilizamos e hicimos una co-marcaación con WGA (*Wheat Germ Agglutinin*), de manera de distinguir los límites celulares, y con DAPI. Al observar las células al microscopio de fluorescencia, notamos la marca positiva correspondiente a las microvesículas dentro de los queratinocitos. La misma se puede observar como micropuntos en general concentrados en alguna parte de la célula. Dado el tamaño de la marca y por lo descrito en bibliografía, lo que se observa muy probablemente son los endosomas que se forman por la invaginación de la membrana de las células al incorporar a los exosomas hacia el interior del citoplasma (Fig. 38).

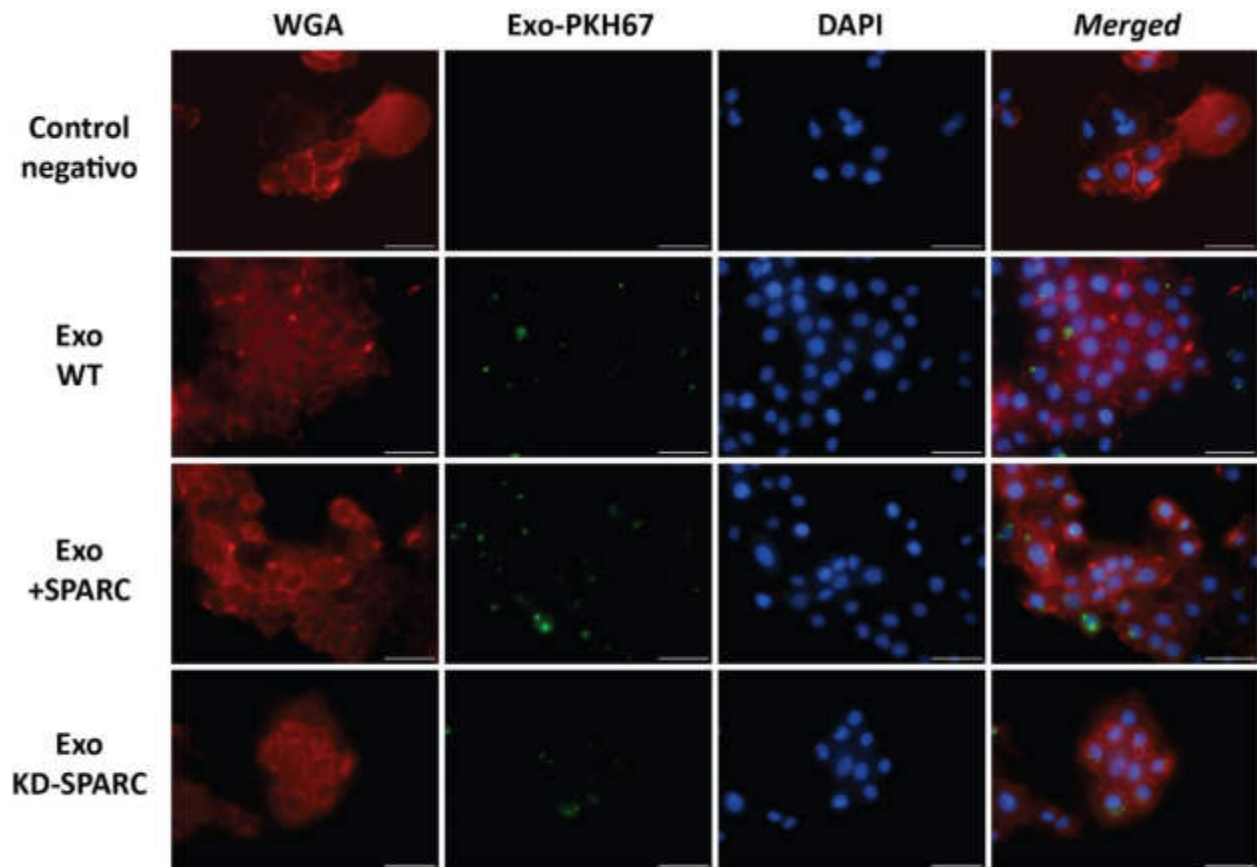


Figura 38. Incorporación de exosomas a células HaCat. Exosomas de células WT, +SPARC y KD-SPARC, aislados y marcados con PKH67, incubados durante 14 horas con queratinocitos. Barra de escala: 50 μm , N = 2.

En resumen, podemos decir que fue posible cultivar y aislar los exosomas a partir del cultivo en suspensión. Es importante recalcar que, si bien debemos continuar analizando la funcionalidad de las vesículas aisladas a partir de este protocolo, la incorporación de las mismas por los queratinocitos receptores es un buen indicio de que son funcionales.

Capítulo 3

3.1. Ensayos funcionales *in vitro* con medio condicionado de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC

En el capítulo previo demostramos que modificamos la expresión de la proteína SPARC en las CMM-WJ. Llevamos a cabo diversos análisis para caracterizar las células modificadas y vimos, a grandes rasgos, que no presentan diferencias importantes en comparación con las células *wild type*, manteniendo sus características morfológicas, tasa de proliferación e identidad de células mesenquimales. Además, cultivamos y amplificamos estas células en 3D y pusimos a punto el condicionamiento de medio por parte de las mismas y aislamiento de sus exosomas, obteniendo vesículas del tamaño y expresión de marcadores esperados y que además pueden ser incorporadas por células receptoras. Por lo tanto, el objetivo siguiente de este trabajo fue evaluar el potencial de regeneración de estas células, en particular, la capacidad regenerativa del secretoma derivado de las mismas. Como ya describimos en la introducción, el secretoma de las CMM está compuesto tanto por factores solubles como por VE que son secretados al medio extracelular y son los principales efectores de las funciones mediadas por las CMM. Previo a cultivar y aislar vesículas a gran escala, decidimos empezar aislando el medio condicionado (MC) de las CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC para evaluar sus posibles efectos biológicos en ensayos funcionales.

En primer lugar, estudiamos el efecto del MC derivado de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC en un modelo de cicatrización de heridas *in vitro*. Durante el proceso de cicatrización, las células proliferan y migran hacia el área herida. La fase de migración es el evento limitante en este proceso. Por lo tanto, los ensayos que estudian la cicatrización de heridas se basan en ensayos de migración, en los que se realiza una lesión en una capa celular confluyente bajo condiciones definidas y se analiza la migración de las células hacia el área "lesionada". Los modelos más simples y utilizados se realizan con fibroblastos y queratinocitos sembrados en cultivos 2D. En el presente trabajo, utilizamos una línea de queratinocitos inmortalizados de piel humana (HaCat).

Para condicionar el medio, sembramos la misma cantidad de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC en placas de cultivo tradicional (2D) con su medio de cultivo habitual, al día siguiente cambiamos el medio por medio fresco y cultivamos las células por 48 horas. El MC de las células fue recuperado, centrifugado para eliminar *debris* y restos de células muertas y se guardó a -20°C hasta ser utilizado. Por otra parte, se sembraron los queratinocitos con una densidad de 90.000 células/cm² y al día siguiente se realizó la herida sobre la monocapa de células confluentes, se lavaron los restos celulares con PBS y se agregó el MC. Además de analizar el efecto de los MC de las CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC, también evaluamos el cerrado de la herida utilizando el medio base en el cual condicionamos a las células, DMEM + 10% SFB. Las células HaCat se cultivaron en condiciones estándar en la incubadora del microscopio automático BioTek Lionheart FX (37°C, 5% CO₂) durante 14 horas, el cual fue configurado para tomar fotos de la herida cada 30 minutos y medir el área de la monocapa celular en cada punto de tiempo.

Al finalizar el ensayo, observamos que las células migraron cerrando la herida en todas las condiciones (Fig. 39A). Para cuantificar la magnitud del cierre utilizamos los parámetros medidos por el

software del microscopio y calculamos el porcentaje del área de la herida cubierta por los queratinocitos en función del tiempo (Fig. 39B). Analizando más en detalle las curvas de velocidad de migración de los queratinocitos en cada condición, se puede observar que hay una leve disminución en las pendientes de las curvas de DMEM + 10% SFB y MC KD-SPARC, es decir, un retraso o disminución en la migración a la vez que el porcentaje de cicatrización a tiempo final parece ser menor. Esto no sucede en las condiciones con MC WT y MC +SPARC, donde se observa un desplazamiento más lineal y constante a lo largo del tiempo evaluado (Fig. 39B).

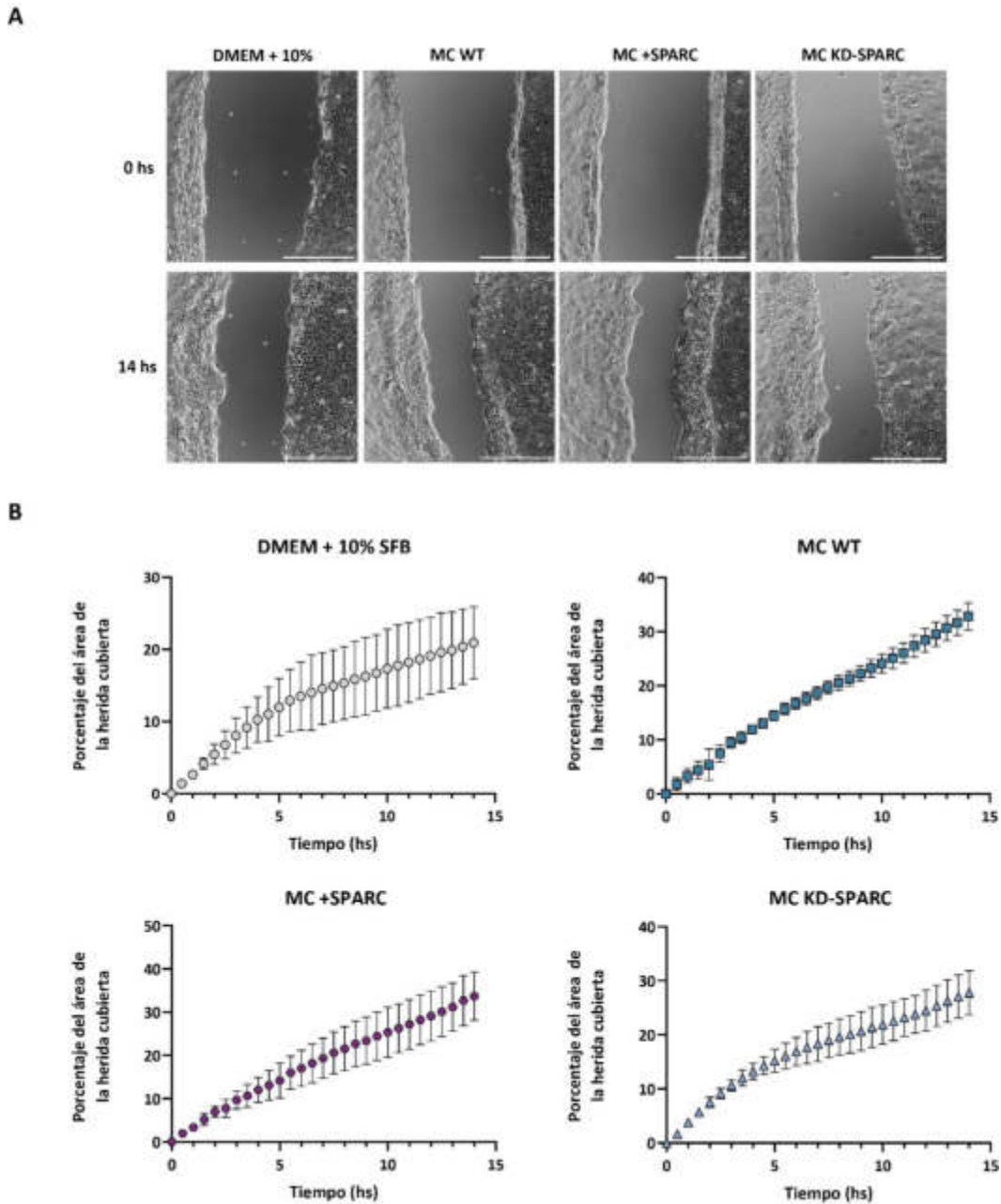


Figura 39. Porcentaje del área de la herida cubierto en función del tiempo. Se calculó el porcentaje del área de la cicatriz cubierto por los queratinocitos (HaCat) en función del tiempo transcurrido (horas). Se

midieron y promediaron 3 zonas distintas de la herida para cada condición, de 4 réplicas biológicas independientes. Se muestran los valores promedio de las 4 réplicas con sus errores estándar.

Viendo las curvas de velocidad promedio de todas las condiciones a la vez, podemos notar diferencias en el porcentaje final del área de la herida cubierta (Fig. 40A). Los resultados de la cuantificación del área total promedio cubierta para cada condición a tiempo final, muestran que los queratinocitos migran cubriendo un porcentaje significativamente mayor de la herida cuando son cultivados con los medios derivados de las CMM-WJ, independientemente de la expresión de SPARC, en contraste con el medio no condicionado. Al comparar entre los medios derivados de las mesenquimales, no encontramos diferencias significativas en la condición con medio de CMM-WJ +SPARC (MC +SPARC) comparadas con las otras, aunque sí una tendencia a que el cerrado sea mayor. Sin embargo, observamos diferencias en el porcentaje total del área de la herida cubierta entre las condiciones con medio condicionado de células *wild type* (MC WT) y *knockdown* (MC KD-SPARC), siendo significativamente menor el último (Fig. 40B).

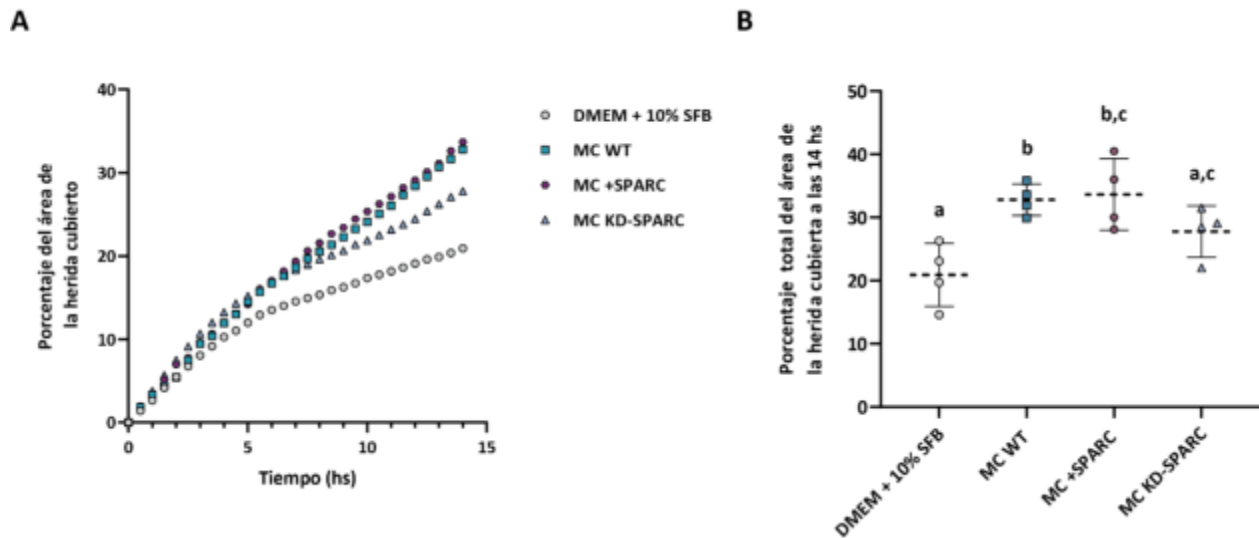


Figura40. Ensayo de cicatrización de herida de células HaCat. A: Imágenes de las heridas a tiempo 0 y 14 horas después, capturadas en campo claro con el microscopio BioTek Lionheart FX. Barra de escala: 500 μm . **B:** Curvas de velocidad de cerrado de la herida de HaCat cultivadas en DMEM + 10% SFB, MC WT, MC +SPARC o MC KD-SPARC. Se muestran los valores promedio de 4 réplicas biológicas independientes, expresados en porcentaje del área de la herida cubierta en función del tiempo. **C:** Porcentaje total del área de la herida cubierta a tiempo final (14 hs). Se muestra para cada condición, el valor del porcentaje en cada réplica, la media y el error estándar. Los resultados de las múltiples comparaciones usando las pruebas “t” estadísticas se expresan con letras (a,b,c); letras iguales: no hay diferencias significativas, letras distintas: diferencias significativas ($p < 0,05$).

Utilizando las curvas de porcentaje del área cubierta promedio en función del tiempo de cada condición, calculamos la pendiente de cada curva, es decir la velocidad promedio de migración, mediante un análisis de regresión lineal. En línea con los resultados anteriores, encontramos diferencias significativas en la velocidad de migración de los queratinocitos en DMEM en comparación con sus velocidades de migración en presencia de los medios derivados de las mesenquimales. No encontramos diferencias significativas entre la condición con MC WT donde la velocidad de migración de las células HaCat fue de 2,24% cada 30 minutos y la de las células con MC +SPARC fue de 2,30% del área de la herida cada 30 minutos. Por el contrario, en la condición MC KD-SPARC la velocidad de cerrado fue significativamente menor comparada con la condición MC WT, con un área de la herida cubierta de 1,78 % cada 30 minutos (Fig. 41).

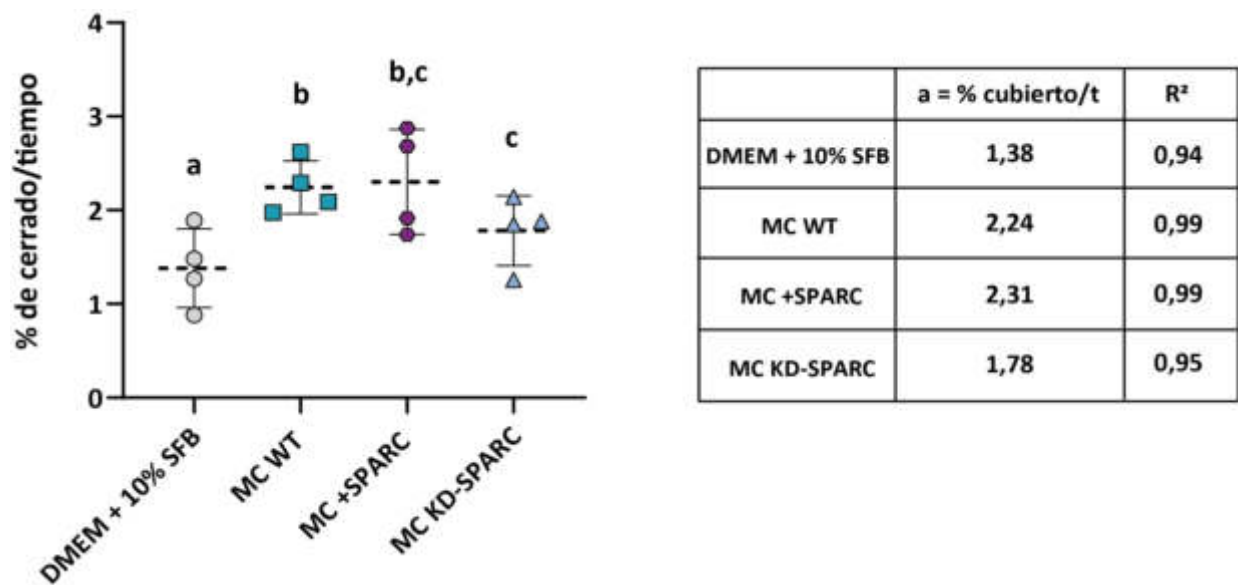


Figura 41. Velocidad de migración de las células HaCat. Se calcularon las pendientes de cada curva de velocidad mediante el análisis de regresión lineal de las mismas. En el gráfico de la izquierda se muestran el valor de la pendiente de la curva de cada réplica, el promedio y el error estándar, para cada condición. A la derecha se muestran las pendientes promediadas (% cubierto/tiempo) y el coeficiente de regresión (R²) de cada ajuste. Los resultados de las múltiples comparaciones usando las pruebas “t” estadísticas se expresan con letras (a,b,c); letras iguales: no hay diferencias significativas, letras distintas: diferencias significativas (p<0,05).

En base a los resultados presentados, podemos decir que hay un efecto “pro migratorio” sobre los queratinocitos cuando están en presencia de los medios que fueron condicionados con las células mesenquimales, este efecto, a su vez, varía con la expresión de SPARC. Sin embargo, el proceso de cicatrización de heridas no solo requiere que las células en este contexto se desplacen hacia la zona de la lesión, sino que también proliferen. Por este motivo, analizamos el efecto de los MC en el ciclo celular de los queratinocitos. Sembramos las células HaCat en la densidad óptima en la cual proliferan normalmente y las cultivamos con su medio estándar, DMEM + 10% SFB, o con los MC de mesenquimales WT, +SPARC y KD-SPARC. Cuantificamos su contenido de ADN por marcación de yoduro de propidio y análisis de la

fluorescencia con citómetro de flujo. Los perfiles del ciclo resultantes son muy similares en todas las condiciones estudiadas. Al analizar y comparar el porcentaje de células HaCat en cada fase del ciclo, observamos una tendencia a que haya un mayor porcentaje de células en la fase G1 cuando son cultivadas con los MC, en contraste con el DMEM. Esta diferencia, resultó ser significativamente menor en la condición con MC KD-SPARC. También encontramos diferencias entre los porcentajes de células en S y G2 comparando DMEM +10% SFB y MC KD-SPARC (Fig. 42).

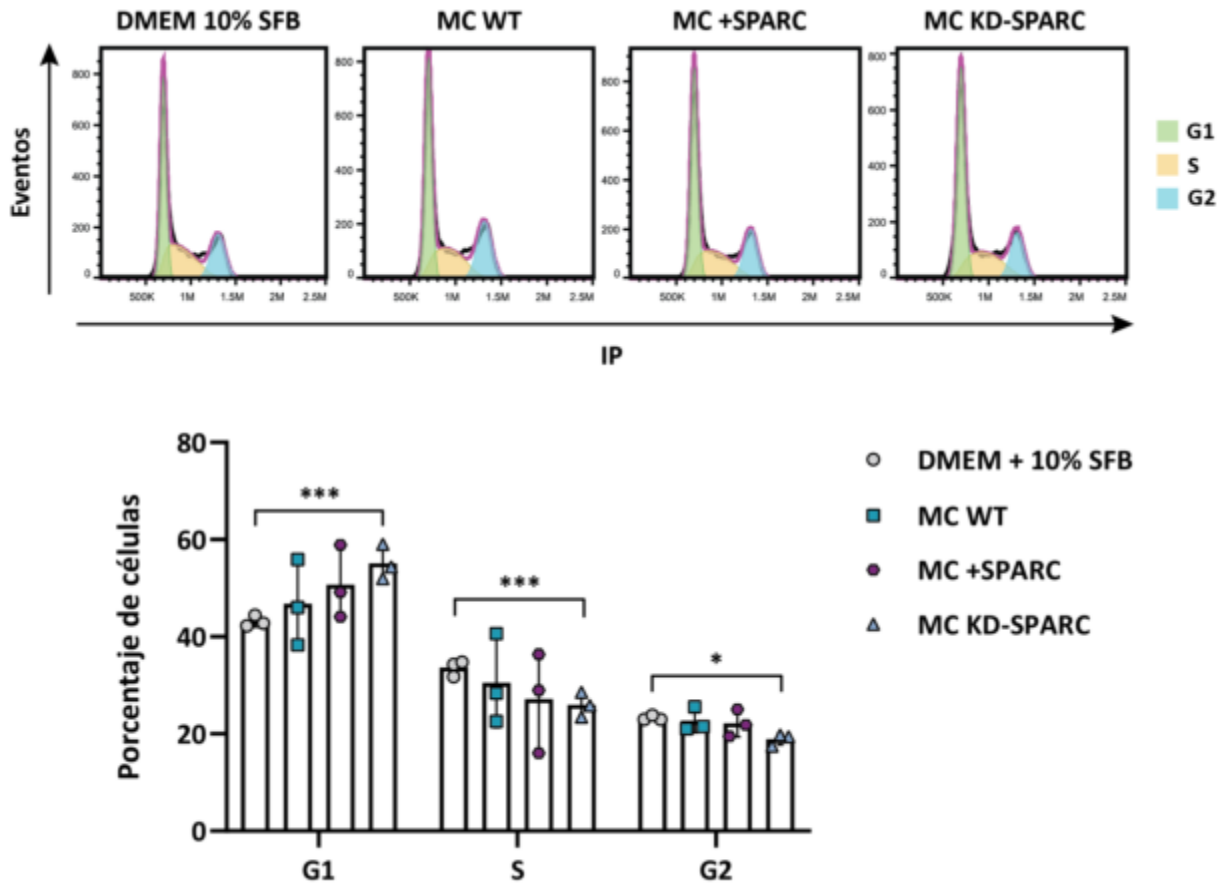


Figura 42. Ciclo celular de HaCat tratadas con MC. Perfiles del ciclo celular de queratinocitos HaCat cultivados con DMEM + 10% SFB, MC WT, MC +SPARC y MC KD-SPARC. El contenido de ADN fue medido por la incorporación de ioduro de propidio (IP) y su fluorescencia se cuantificó por citometría de flujo. En el panel superior se muestran los gráficos representativos del perfil de ciclo celular para cada condición. En el panel inferior se muestra el gráfico correspondiente a la cuantificación del porcentaje de células de cada condición en las fases G1, S y G2. Los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular se calcularon con la plataforma Un-variada del programa FlowJo v10.0. Se realizaron múltiples comparaciones usando pruebas “t” estadísticas para 3 réplicas biológicas, $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***)).

Los fibroblastos, al igual que los queratinocitos, desempeñan un papel fundamental en la regeneración de heridas. Es necesario que estas células migren a la zona afectada, proliferen y produzcan

grandes cantidades de componentes de la ME formando un tejido conjuntivo temporal y más tarde el tejido conectivo que formará parte de la dermis. Por lo tanto, también evaluamos el ciclo celular de fibroblastos dérmicos humanos (CCD-32Sk) tratados con los MC de células WT, +SPARC y KD-SPARC. Como se describió previamente, sembramos los fibroblastos a una densidad en la cual continúan proliferando con normalidad y los cultivamos en DMEM con suero o con MC WT, MC +SPARC y MC KD-SPARC. Cuantificamos el ADN marcado con IP y comparamos los porcentajes de células en cada fase del ciclo. A simple vista, pudimos observar diferencias en los perfiles del ciclo celular entre los distintos tratamientos. La cuantificación de los porcentajes refleja las diferencias observadas. En la fase G1 se ve una clara tendencia a un menor porcentaje de células en los tratamientos con MC en comparación con los fibroblastos cultivados en DMEM, siendo significativamente menor con los medios MC +SPARC y MC KD-SPARC. Esta misma diferencia resulta del contraste entre MC WT y MC KD-SPARC. En la fase S del ciclo, se vio un porcentaje mayor de células tratadas con MC KD-SPARC en comparación con las células cultivadas en DMEM y MC WT. Por último, en la fase G2, la proporción de fibroblastos tiende a ser mayor cuando son cultivados con MC KD-SPARC (Fig. 43).

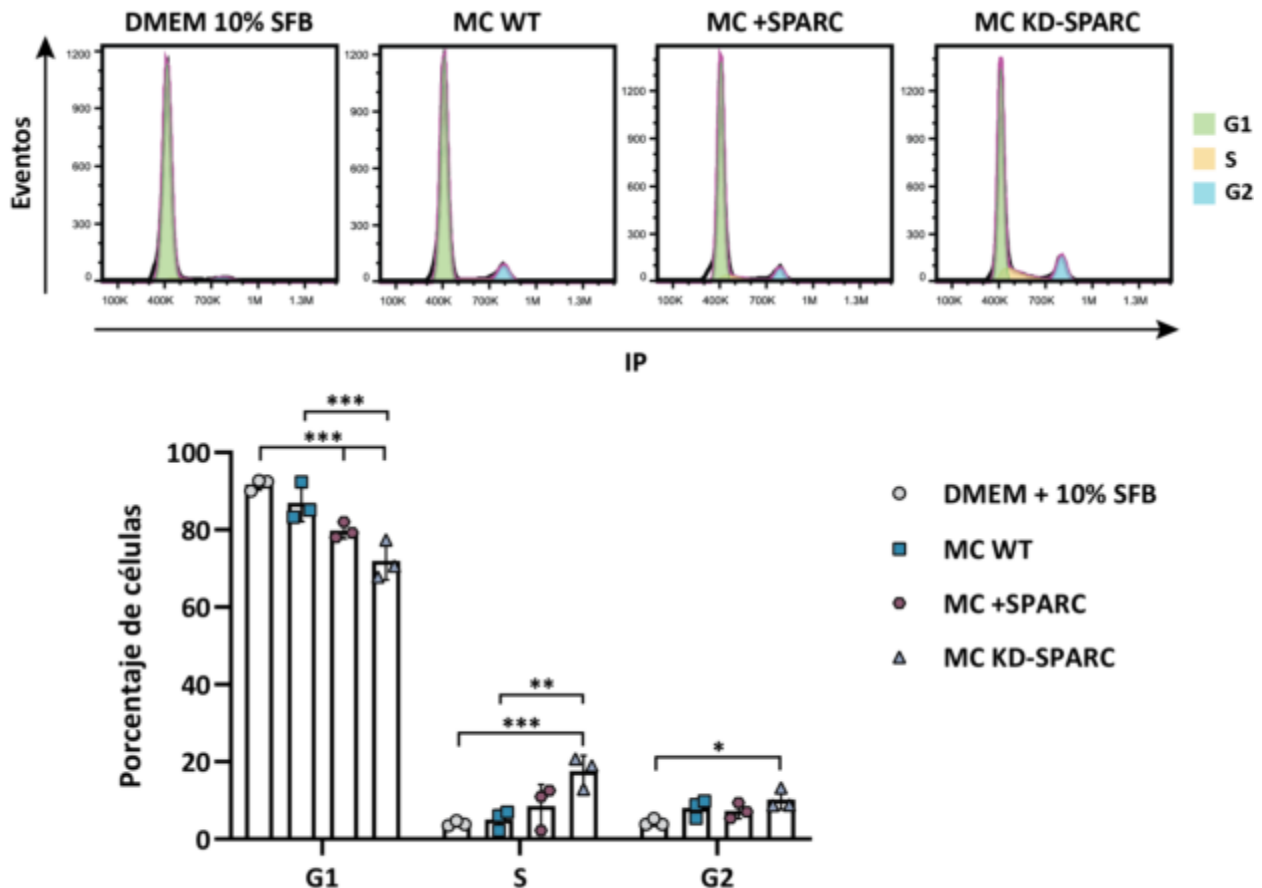


Figura 43. Ciclo celular de CCD-32Sk tratadas con MC. Perfiles del ciclo celular de fibroblastos CCD-32Sk cultivados con DMEM + 10% SFB, MC WT, MC +SPARC y MC KD-SPARC. El contenido de ADN fue medido por la incorporación de yoduro de propidio (IP) y su fluorescencia se cuantificó por citometría de flujo. En el panel superior se muestran los gráficos representativos del perfil de ciclo celular para cada condición.

En el panel inferior se muestra el gráfico correspondiente a la cuantificación del porcentaje de células de cada condición en las fases G1, S y G2. Los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular se calcularon con la plataforma Un-variada del programa FlowJo v10.0. Se realizaron múltiples comparaciones usando pruebas “t” estadísticas para 3 réplicas biológicas, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

En conjunto, estos resultados indican que el medio derivado de las CMM-WJ también estaría teniendo un efecto sobre la tasa de proliferación en queratinocitos y fibroblastos, el cual parece ser más evidente cuando el medio proviene de las mesenquimales *knockdown* para SPARC. Llamativamente, la condición con MC +SPARC dio valores entre las condiciones MC WT y MC KD-SPARC, contrario a lo que esperaríamos. Por otro lado, cabe destacar que el efecto visto sobre los queratinocitos y fibroblastos es inverso, lo que sugiere que el efecto del secretoma de las CMM-WJ es tipo celular específico.

3.2. Ensayo de cicatrización de herida *in vivo* con medio condicionado de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC

Con el propósito de examinar más a fondo el impacto de la expresión de SPARC en la capacidad regenerativa de las células mesenquimales, nos planteamos evaluar el efecto del secretoma de las células mesenquimales WT, +SPARC y KD-SPARC en experimentos de cicatrización de heridas por segunda intención en un modelo *in vivo*. Utilizamos ratones inmunocompetentes de la cepa C3HS, a los cuales se les generó una herida dérmica mediante un punzón dermatológico. Después de 7 días, se les realizó una segunda herida en la misma zona, conocida como lesión por segunda intención, y de forma inmediata se comenzó a administrar inyecciones de medio condicionado derivado de las células WT, +SPARC y KD-SPARC. Se registró y analizó el proceso de cicatrización de las heridas en los ratones hasta el día 21 posterior a la primera inyección.

En la figura 44 se muestran imágenes representativas de los animales tratados con los diferentes MC en los días 7 y 10, donde se observaron las mayores diferencias macroscópicas entre los grupos, así como en el día 21, momento en el que se finalizó el ensayo. A los siete días después de la primera dosis de medio, los ratones tratados con MC +SPARC presentaban en general lesiones de menor tamaño, con una epitelización más avanzada. Incluso se observó la formación de costras sobre la herida y un mayor crecimiento de pelo en la zona circundante a la lesión, en contraste con las otras condiciones. Tanto el grupo tratado con MC WT como el grupo tratado con MC KD-SPARC mostraron una cicatrización más lenta, con heridas más grandes y algunos individuos con poco crecimiento de pelo. En el día 10, en la mayoría de los ratones tratados con MC +SPARC, la zona de la lesión fue casi indistinguible a simple vista, y en muchos casos estaba completamente cicatrizada. Por el contrario, en el grupo tratado con MC KD-SPARC, aunque las heridas mostraban un progreso en la cicatrización, aún eran visibles a simple vista. En el grupo tratado con MC WT se observó una cicatrización más avanzada que en el grupo tratado con MC KD-SPARC, pero al mismo tiempo más lenta en comparación con el grupo MC +SPARC, ya que las heridas no estaban completamente cerradas. Por último, en el día 21, se observó que la mayoría de los ratones presentaron las heridas completamente cerradas (Fig. 44).

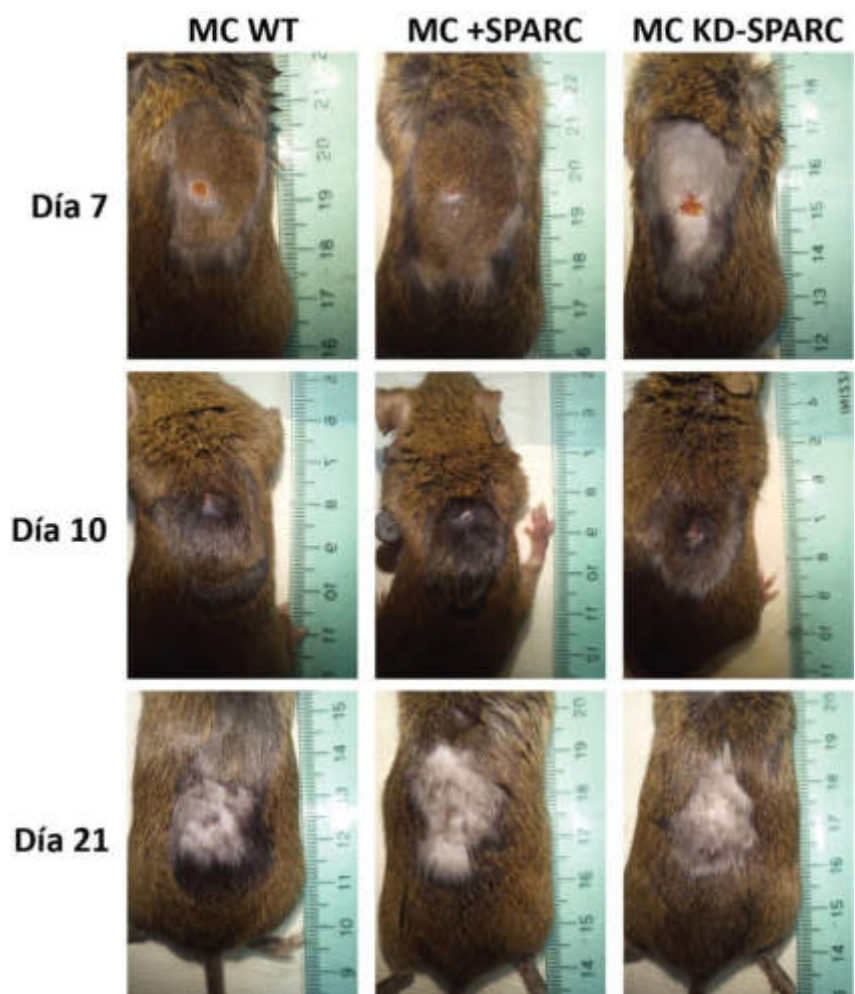


Figura 44. Ensayo de cicatrización de herida dérmica en ratones. Imágenes representativas de ratones con lesiones dérmicas, tratados con inyecciones de MC derivado de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC. Día 7: individuos sin corte de pelo. Día 10 y 21: recorte de pelo para visualizar las lesiones. Se realizaron 3 experimentos independientes con al menos 3 individuos por condición.

Siguiendo con el análisis, procedimos a calcular la tasa de cicatrización para cada condición, midiendo el área de las heridas en los días 7, 10, 14 y 21. La cuantificación de los porcentajes de cierre de las heridas confirmó las diferencias macroscópicas observadas. En el día 7, se observó que la tasa de cicatrización en los ratones tratados con MC +SPARC era significativamente mayor en comparación con las condiciones de MC WT y MC KD-SPARC. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre MC WT y MC KD-SPARC, se observó una tendencia hacia una menor tasa de cicatrización en este último grupo. A día 10, se ve que la tasa de cicatrización para la condición MC +SPARC ronda el 100% y sigue siendo significativamente mayor que la de los ratones tratados con el medio derivado de células KD-SPARC. A partir de este punto, hay un rápido progreso de la cicatrización para las condiciones MC WT y MC KD-

SPARC y a día 14 se puede observar como la cicatrización es casi completa para la mayoría de los individuos sin diferencias entre tratamientos, al igual que a día 21 (Fig. 45).

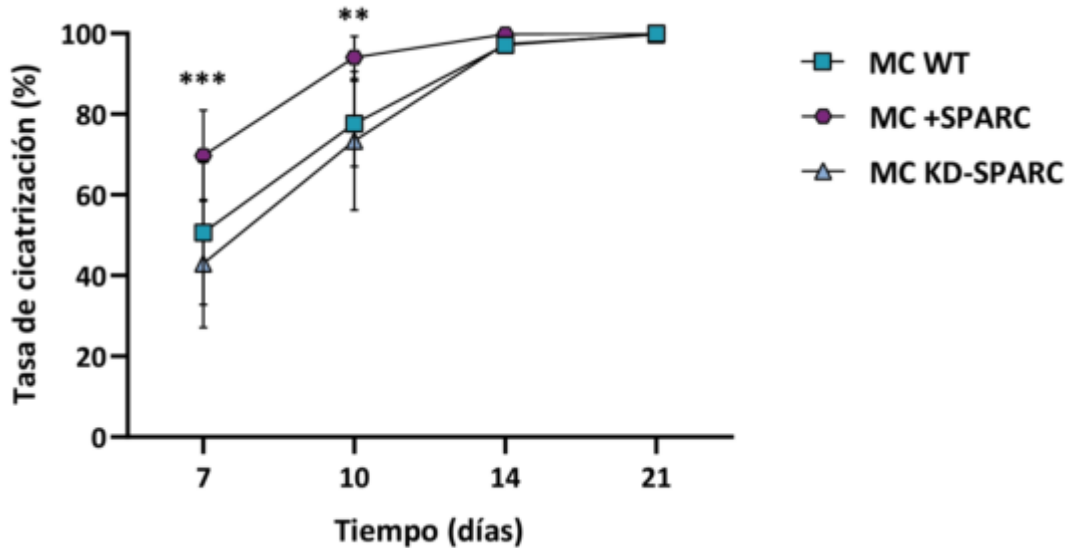


Figura 45. Tasa de cicatrización. Análisis de la tasa de cicatrización de heridas de ratones tratados con MC WT, MC +SPARC y MC KD-SPARC. Se realizó el cálculo de la diferencia entre el área inicial de la herida y el área de la herida en cada punto de tiempo. Se muestran los valores promedio de los individuos analizados expresados en porcentajes y el error estándar. Se realizaron 3 réplicas biológicas con al menos 3 ratones por condición. Se hicieron múltiples comparaciones con pruebas de t student entre condiciones. Se encontraron diferencias significativas a día 7 entre los tratamientos MC WT y MC +SPARC con un $p < 0,01$ (**); y entre MC +SPARC y MC KD-SPARC con $p < 0,001$ (***). A día 10 encontramos diferencias significativas entre MC +SPARC Y MC KD-SPARC, $p < 0,01$ (**). En el gráfico se muestran los asteriscos que indican las mayores diferencias encontradas en ese punto de tiempo.

En vista de las diferencias macroscópicas observadas, nos propusimos analizar las características histológicas del proceso de cicatrización de las heridas en las condiciones mencionadas previamente. Para ello, se tomaron muestras de piel de la zona que contiene la lesión a los 7 y 21 días, se colocaron en formol al 10% para ser procesadas mediante la técnica histológica de rutina y teñidas con Hematoxilina-Eosina. Cabe destacar que tanto la toma, preparación y el análisis histológico de las muestras fue realizado por profesionales especialistas de la cátedra de Citología, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de La Plata (UNLP).

Los cortes histológicos obtenidos de las heridas tratadas con inyecciones intradérmicas de MC WT durante 7 días, muestran el proceso de cicatrización normal. Podemos observar la regeneración del tejido epitelial, con un número de capas celulares mayor al observado en las zonas de piel normal, y la presencia de queratina en la región apical. Por debajo encontramos la dermis con un tejido conectivo (TC) muy celular, donde podemos distinguir a los fibroblastos con sus núcleos ahusados característicos entre otras células allí presentes, capilares sanguíneos y abundantes fibras colágenas (Fig. 46 A, a). A los 21 días post-

lesión, si bien la zona de la herida ha disminuido considerablemente, se observa una pequeña región donde el epitelio sigue siendo grueso, pero ha disminuido el número de capas, y el TC por debajo es abundante, con fibras colágenas que se han reorganizado, formando haces de fibras más gruesas y dispuestas en todas las direcciones, lo cual se corresponde con el TC denso irregular que posee la dermis. Aún no encontramos regeneración de folículos pilosos (Fig. 47 A, a).

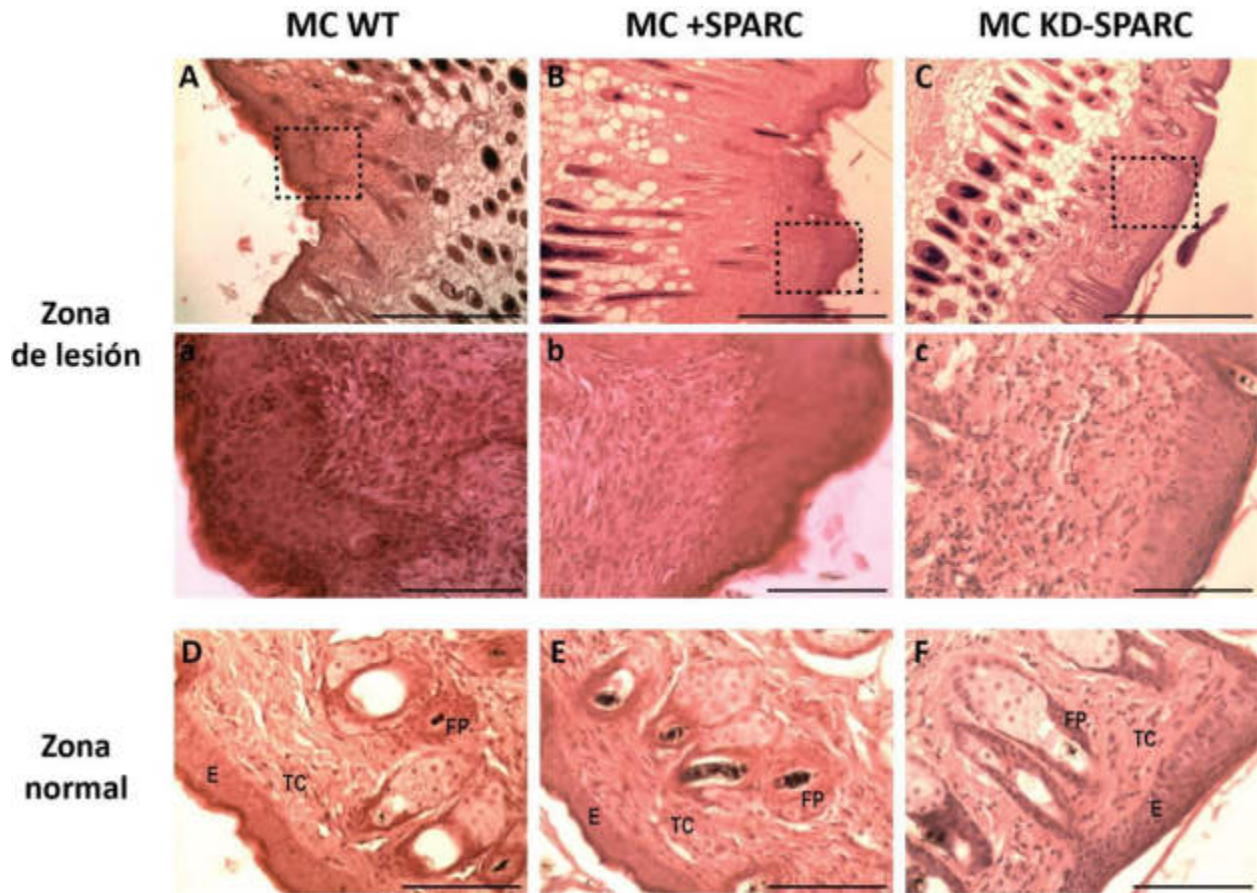


Figura 46. Imágenes de hematoxilina y eosina a día 7 de cicatrización. Imágenes representativas de preparados histológicos de muestras de ratones inyectados con MC WT, MC +SPARC o MC KD-SPARC tomadas a día 7 luego de la primera inyección. Paneles A, B y C: muestras de la zona de la herida teñidas con hematoxilina y eosina, barra de escala: 500 μ m. Paneles a, b y c: aumentos de las zonas indicadas con cuadrantes en los paneles A, B y C, respectivamente, barra de escala: 100 μ m. Paneles D, E y F: imágenes de zonas de piel normal teñidas con hematoxilina y eosina donde se indican algunos componentes, E: epitelio (epidermis), TC: tejido conectivo, FP: folículo piloso (barra de escala: 100 μ m).

Luego analizamos el grupo de ratones que fueron tratados con MC +SPARC. Las muestras tomadas a los 7 días post-lesión no presentan grandes diferencias con respecto al grupo MC WT, solamente parece

observarse una mayor celularidad en la dermis más superficial, bien cercanas al epitelio, y en algunos casos el tejido epitelial parece tener menor número de capas celulares (Fig. 46 B, b). A los 21 días, en general se observa una regeneración completa de la piel, incluso con la formación de folículos pilosos. Solamente en un caso se pudo ver la zona de la lesión, donde el tejido epitelial se ve normal, aunque por debajo aún se observa TC cicatrizal (Fig. 47 B, b), pero la mayoría de los preparados se ven sin rastros de lesión, como tejido normal (Fig. 47 E, e).

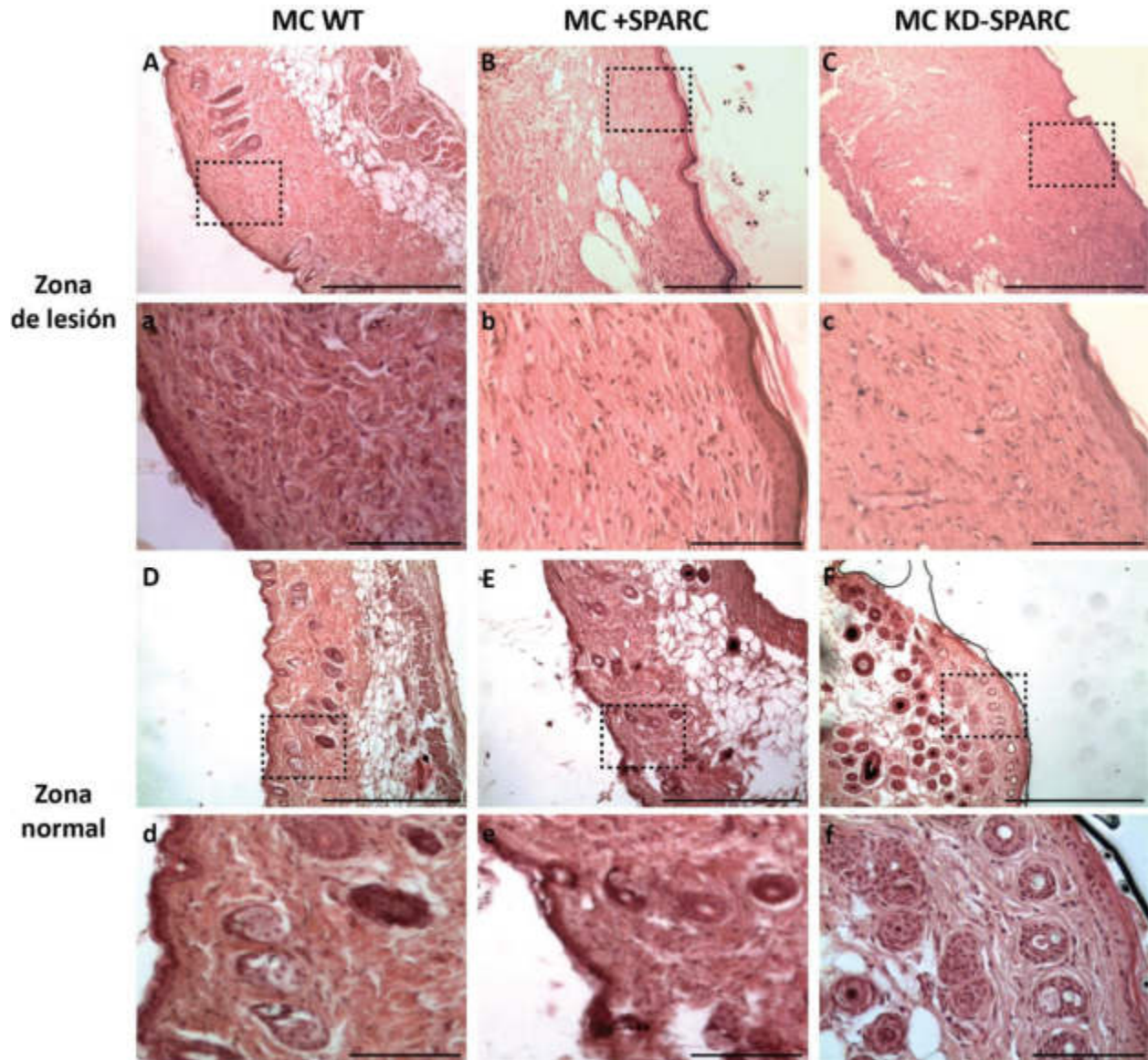


Figura 47. Imágenes de hematoxilina y eosina a día 21 de cicatrización. Imágenes representativas de tinciones con hematoxilina y eosina de muestras histológicas de ratones inyectados con MC WT, MC +SPARC o MC KD-SPARC tomadas a día 21 luego de la primera inyección. Paneles A, B y C: muestras de la zona donde se encontraba la lesión, barra de escala: 500 μ m. Paneles a, b y c: aumentos de las zonas indicadas con cuadrantes en los paneles A, B y C, respectivamente, barra de escala: 100 μ m. Paneles D, E

y F: imágenes de zonas de piel normal (barra de escala: 500 μm) con sus respectivos aumentos, paneles d, e y f (barra de escala: 100 μm).

Por último, aquellos ratones que fueron tratados con MC KD-SPARC presentaron diferencias histológicas significativas con respecto a los dos grupos anteriores. A los 7 días post-lesión, resulta llamativo observar una marcada infiltración celular en todos los casos, con abundante cantidad de linfocitos que pueden distinguirse por su núcleo redondeado, bien pequeño y picnótico. También encontramos gran cantidad de capilares sanguíneos y vasos de pequeño calibre (Fig. 46 C, c). Un solo individuo mostró un retraso mayor en el proceso de cicatrización de la herida ya que solo se observa tejido cicatrizal en contacto con el exterior sin el tejido epitelial que lo reviste, y un proceso inflamatorio exacerbado (Fig. 48). A los 21 días, ha desaparecido el proceso inflamatorio, ya no se ven las células infiltrantes, el tejido epitelial se asemeja a la zona de piel normal, y la capa de TC por debajo parece ser de mayor espesor que en el resto de los grupos (Fig. 47 C, c).

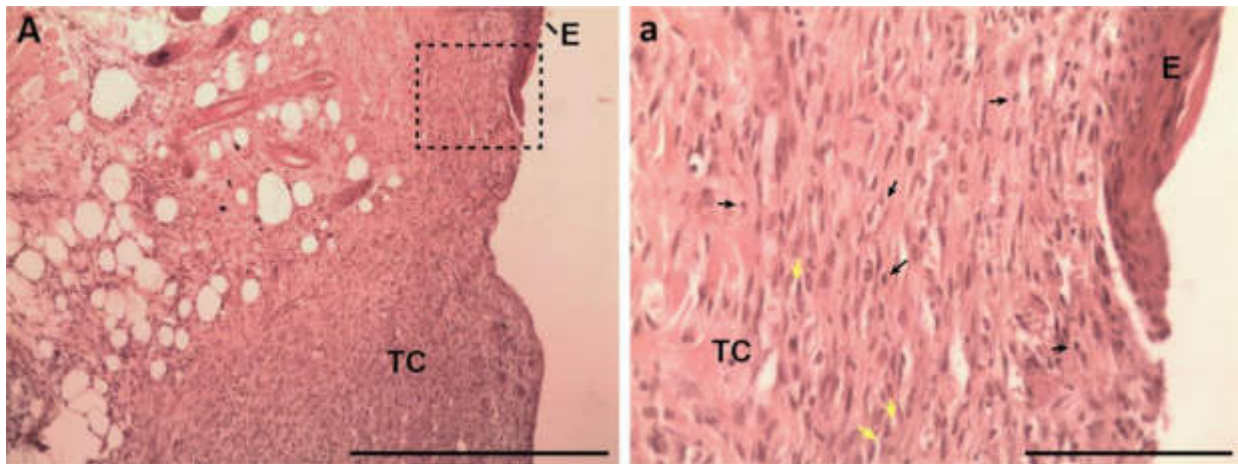


Figura 48. Proceso de cicatrización retrasado en individuo tratado con MC KD-SPARC. A: Imagen de la zona lesionada en uno de los individuos tratados con MC KD-SPARC donde la cicatrización se observaba más retrasada que el resto. La mayor parte de la dermis con el tejido conectivo (TC) no está recubierta de un epitelio (E) y se observa abundante infiltración de células inmunes (barra de escala: 500 μm). a: imagen de mayor aumento (delimitada en la imagen A), se pueden ver los núcleos picnóticos correspondientes a linfocitos infiltrados (se indican algunos con flechas negras) y varios capilares (se indican algunos con flechas amarillas). Barra de escala: 100 μm .

Un tejido propiamente regenerado está conformado por TC formado principalmente por fibras colágenas densas dispuestas de manera irregular, lo que le confiere resistencia mecánica a la piel. Por el contrario, una cicatriz fibrótica está compuesta por abundante fibras de colágeno que son finas, están poco empaquetadas y se disponen de forma paralela a la epidermis. Si bien el análisis histológico permite ver diferencias entre las condiciones a nivel microscópico, nos propusimos ahondar en las características del TC en formación, ya que el tipo de fibras colágenas que se forman, su disposición y su nivel de

empaquetado aportan información acerca del grado de avance y la calidad del proceso de cierre de la herida. Para ello, decidimos realizar otra técnica histológica, el tricrómico de Masson, donde las fibras colágenas se tiñen diferencialmente con el colorante verde luz. En la figura 49 podemos observar las tres condiciones (MC WT, MC +SPARC y MC KD-SPARC) a los 7 días post-lesión. En las condiciones donde se utilizó el MC WT o el MC +SPARC, se observan fibras intermedias, algo delgadas, con una disposición medianamente irregular entre medio de las células del TC, dando como resultado un TC levemente laxo. Por el contrario, las heridas que fueron tratadas con el MC KD-SPARC poseen abundante tejido fibrótico, con fibras que se disponen algo alineadas entre sí, paralelas a la membrana basal del tejido epitelial, y forman haces más delgados de fibras en comparación con el TC de la dermis normal donde las fibras forman gruesos paquetes. Con ello, podríamos concluir que tenemos heridas que fueron reparadas con una mayor cantidad de tejido fibrótico o que están más retrasadas en el proceso de cicatrización (MC KD-SPARC) y heridas que poseen menor cantidad de tejido fibrótico o que han evolucionado más en el cierre de la herida (MC +SPARC).

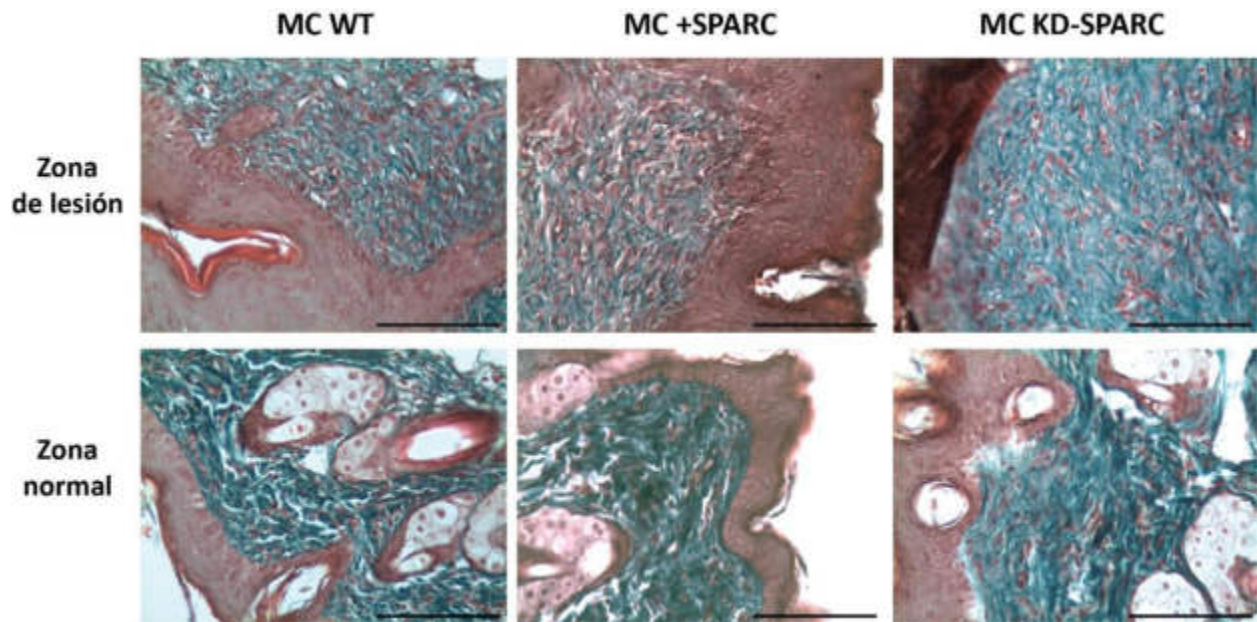


Figura 49. Imágenes histológicas de tejido conectivo a día 7 de cicatrización. Imágenes representativas de tinciones con tricrómico de Masson de muestras histológicas de ratones inyectados con MC WT, MC +SPARC o MC KD-SPARC tomadas a día 7 luego post-lesión. Se muestran zonas correspondientes a la herida y zonas de piel normal. Barra de escala: 100 μ m.

Por último, cabe destacar que al analizar el tricrómico del individuo del grupo MC KD-SPARC que mostró un marcado retraso en la cicatrización, posee un TC muy laxo, con abundante celularidad que indica un importante proceso inflamatorio asociado. Solo se observa una pequeña zona central en donde se está comenzando a formar el tejido fibrótico para cerrar la herida (Fig. 50).

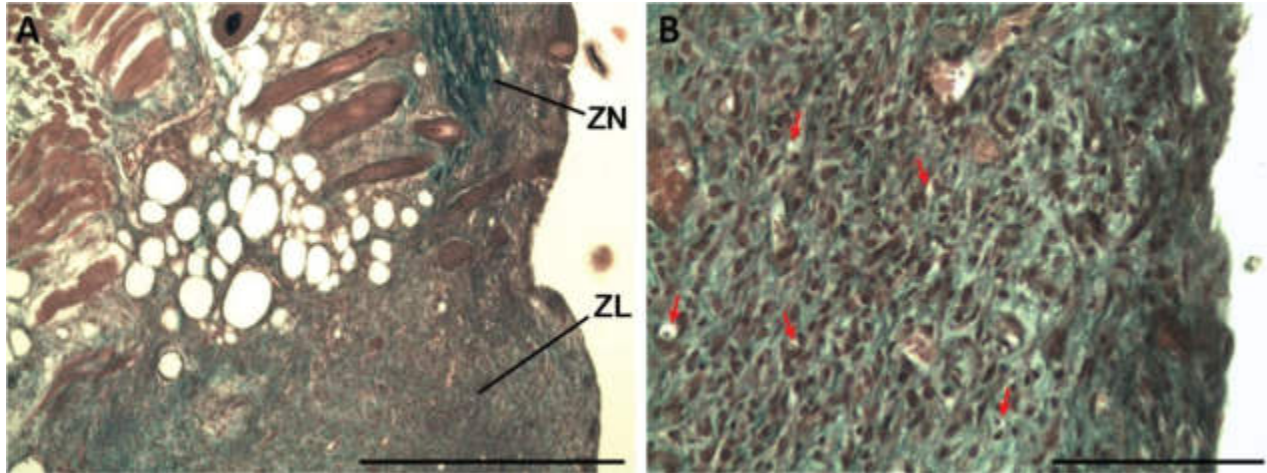


Figura 50. Tejido conectivo de individuo con cicatrización retrasada. A: Imagen a menos aumento de la zona lesionada (ZL) en uno de los individuos tratados con MC KD-SPARC donde la cicatrización se estaba más retrasada. Se observa abundante tejido fibrótico con fibras. Se muestra una zona normal (ZN) de piel que limita con la herida (barra de escala: 500 μm). **B:** zona de lesión en mayor aumento, se pueden ver los núcleos picnóticos, redondeados correspondientes a linfocitos infiltrados, gran cantidad de fibras colágenas laxas (marca verde azulada) y numerosos capilares, algunos indicados con flechas rojas (barra de escala: 100 μm).

En resumen, los resultados sugieren que los medios condicionados de CMM-WJ aceleran el proceso de cierre de herida, ya que la cicatrización normal para este modelo de lesión suele rondar lo +/- 21 días⁶³. Tanto en la condición MC WT como en la de MC +SPARC, se vió a nivel microscópico un proceso de cicatrización normal, observando un cierre macroscópico de la herida a días +/- 12 para la condición MC WT y alrededor del día 10 post-lesión para los ratones tratados con MC +SPARC. Pero lo más importante aún, es que la disminución de SPARC en las células mesenquimales y en consecuencia, en su MC, genera un retraso en la cicatrización de los animales con un cierre de la herida alrededor del día 14 (post-lesión) y evidenciado por un tejido conectivo más inmaduro y una respuesta inflamatoria local que podría estar retrasando el proceso de cicatrización.

En conclusión, podemos afirmar que el secretoma de las CMM-WJ desempeña un papel crucial en la regeneración de heridas cutáneas, y este efecto está directamente relacionado con la presencia de SPARC. Nuestros resultados obtenidos *in vitro* sugieren que el medio condicionado de las células madre mesenquimales contiene factores que regulan la migración y proliferación de queratinocitos y fibroblastos, células clave en el proceso de cicatrización. Estos hallazgos adquieren mayor relevancia al confirmar que estas diferencias también se observan en un modelo *in vivo* de regeneración, donde vimos que los niveles de SPARC en el medio secretado por las CMM se correlacionan con un avance más rápido o un retraso en la cicatrización.

Discusión

En las últimas décadas el interés en las terapias regenerativas basadas en CMM ha crecido exponencialmente. La capacidad de autorrenovación, diferenciación a distintos linajes celulares y las propiedades inmunomodulatorias de estas células, las convierten en candidatas con un gran potencial para ser utilizadas como herramientas en diversas áreas en el campo de la medicina regenerativa. Cada vez son más los grupos dedicados a investigar las características y propiedades pro-regenerativas de las CMM. En la actualidad, hay más de 1400 ensayos clínicos registrados en diferentes fases de evaluación, en donde las CMM son utilizadas solas o en combinación con otros fármacos en numerosas enfermedades y condiciones que, hasta la fecha, no disponen de tratamientos que resulten adecuados.

Recientemente, ha cobrado importancia la noción de que las CMM ejercen sus efectos principalmente mediante la acción de mecanismos paracrinos. El secretoma derivado de estas células está compuesto por un amplio repertorio de factores solubles y componentes contenidos dentro de las VE que, se ha demostrado, están implicados en procesos celulares como la proliferación, diferenciación, migración, angiogénesis, inmunomodulación y supervivencia. Estudios realizados en diferentes modelos de enfermedades han mostrado que el uso del MC y VE derivado de mesenquimales es tan efectivo como el trasplante de las propias células. Esto representa una notable ventaja, ya que abre la posibilidad al desarrollo de terapias libres de células utilizando el secretoma derivado de las CMM como una alternativa viable.

Aunque las CMM ofrecen numerosas ventajas, también presentan limitaciones relacionadas al mantenimiento de su actividad biológica y su potencial terapéutico, los cuales tienden a disminuir con los pasajes celulares. A raíz de esto, muchos grupos de investigación buscan diferentes maneras de modificar estas células con el fin de acentuar sus características beneficiosas y aumentar su vida útil. Además, es fundamental poder obtener una cantidad y calidad adecuada de células o de su medio derivado, que cumpla con los requisitos para su aplicación clínica. Por lo tanto, el principal desafío en el uso de las CMM radica en el desarrollo e implementación de protocolos estandarizados que permitan potenciar de manera óptima las propiedades regenerativas de estas células, así como amplificarlas de forma rápida y eficiente.

En función de lo mencionado previamente, en el presente trabajo nos propusimos poner a punto el cultivo en suspensión de las CMM en nuestro laboratorio, de manera tal de poder amplificarlas de manera más eficiente, modificarlas genéticamente con el objetivo de aumentar sus propiedades terapéuticas y por último, aislar el medio derivado de las CMM genéticamente modificadas y estudiar sus efectos regenerativos.

Para empezar, siguiendo protocolos previamente descritos en la bibliografía pasamos de cultivar las CMM de manera tradicional (2D), como se realizaba de rutina en nuestro laboratorio, a cultivarlas en suspensión (3D) utilizando *microcarriers* como superficie de anclaje para las células y *spinner flasks* como recipientes contenedores. Entre las diversas opciones para el cultivo a gran escala de CMM, los sistemas basados en *microcarriers* presentan numerosas ventajas en términos de escalabilidad, seguimiento del proceso y simplicidad operativa^{64,65}. En línea con esto, podemos decir que la implementación de esta técnica para el cultivo de CMM-WJ resultó sencilla y sin complicaciones en su manipulación. Las células adheridas a los *microcarriers* proliferan hasta llegar a confluencia, lo que coincide con un decrecimiento

en la concentración de glucosa del medio de cultivo, por lo que podemos decir que la medición de este parámetro permite estimar indirectamente el crecimiento de las células facilitando el seguimiento del proceso. En cuanto a la escalabilidad, con el sistema 3D obtuvimos 1,56 veces más células que en 2D, en un único *spinner flask*, contra 15 placas de 150 mm. Si se evalúa en cuanto al espacio ocupado en las incubadoras, teniendo en cuenta que sólo usamos la mitad de la capacidad del *spinner*, podríamos llegar a tener más del doble de células en un mismo recipiente mientras que para 2D necesitaríamos más de 30 placas de 150 mm que ocuparían la mitad de una incubadora. Sumado a que un *spinner* utiliza 120 mL de medio de cultivo en su capacidad máxima y 30 placas consumen 600 mL de medio. Con lo cual, concluimos que el sistema 3D empleado es más eficiente en términos de costo/tiempo ya que, no solo se obtiene una cantidad de células considerablemente mayor que en el cultivo tradicional, sino que también se reduce el tiempo de trabajo en el flujo laminar, el espacio ocupado en las incubadoras y los insumos requeridos.

Si bien está reportado que el cultivo en suspensión no modifica la identidad ni las principales características de las CMM⁶⁶⁻⁶⁸, corroboramos de todas formas la identidad de las CMM-WJ cultivadas en 3D, analizando la presencia y ausencia de los principales marcadores utilizados como criterio de clasificación. Los resultados de este análisis confirmaron la presencia de los marcadores CD90, CD73 y CD105 y la ausencia de CD45, CD34, CD14 y HLA-DR, en línea con lo reportado para este tipo celular⁶⁹, sin diferencias de expresión comparado con las células cultivadas tradicionalmente, tal como se esperaba.

Profundizando más en el análisis, evaluamos la expresión de algunos genes que codifican para proteínas que se encuentran en la lámina basal de las células y cumplen un rol clave en su adhesión. Dadas las diferencias observadas en el crecimiento de las células y que el cultivo en suspensión es muy distinto al cultivo tradicional en cuanto a la superficie de adherencia, sumado a las condiciones físicas a las que están sometidas al estar en agitación constante, nos resultó interesante estudiar si esto se traduce en un cambio en la expresión de los genes mencionados. El análisis de expresión en general mostró una tendencia a un aumento en la expresión de estos genes en las células cultivadas en 3D en relación con las células crecidas en placas. Siendo esta diferencia significativa para la expresión de colágeno $\alpha 1$ y las lamininas $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 3$ y $\gamma 1$. Tanto las lamininas como el colágeno son de los principales componentes de la ME, que proporcionan soporte estructural a células y tejidos. Intervienen en la adhesión celular al interactuar con los receptores de integrina de la superficie celular⁷⁰⁻⁷². La unión de las lamininas a las integrinas promueve la adhesión y la migración celular, que son procesos importantes para las CMM durante, por ejemplo, la regeneración tisular. De hecho, se ha demostrado que las lamininas mejoran la adhesión y proliferación de las CMM *in vitro*⁷³. Por lo que el aumento de expresión registrado podría estar relacionado a las condiciones en las cuales estamos amplificando las células.

Continuando con el análisis, medimos la expresión de algunas integrinas de membrana. Que también desempeñan un papel crucial en las CMM al mediar en la adhesión, migración y señalización celular. Son receptores transmembrana que interactúan con la ME y transmiten señales desde la matriz al interior celular⁷⁴. De las proteínas analizadas, sólo encontramos diferencias de expresión para CD49A, también conocida como integrina $\alpha 1$. Los resultados revelaron una disminución en expresión de esta integrina en las CMM-WJ cultivadas en suspensión. La integrina $\alpha 1$ forma un heterodímero con la subunidad $\beta 1$ para constituir uno de los principales receptores de lamininas y colágeno⁷⁵. Por lo que la disminución de la expresión de la integrina $\alpha 1$ observada podría estar relacionada con las diferencias de expresión de las lamininas y el colágeno $\alpha 1$ mencionadas previamente. Trabajos previos han demostrado que en los sistemas de cultivo 3D, las integrinas responden a las propiedades mecánicas de la ME regulando diferentes procesos, entre ellos la proliferación y migración celular, y el comportamiento de las

células en general^{76,77}. En consonancia con lo reportado por otros grupos, estos resultados indican que el cultivo 3D tiene un efecto en la expresión de moléculas estudiadas y que estos cambios podrían estar influyendo en las diferencias que observamos en cuanto al crecimiento acelerado de las CMM-WJ cultivadas en suspensión.

En resumen, logramos establecer un protocolo de cultivo más eficiente que el tradicional en términos de costos y tiempo. Este protocolo puede ser utilizado de manera rutinaria en el laboratorio para amplificar las CMM a una escala adecuada para futuras aplicaciones clínicas.

Entre las numerosas enfermedades y afecciones que, hasta el momento, no cuentan con tratamientos efectivos para las personas que las padecen, se encuentran las lesiones o heridas dérmicas de gravedad. Este tipo de lesiones pueden producirse por procesos fisiopatológicos como, por ejemplo, en personas con diabetes, cáncer, infecciones y de edad avanzada; o por traumas (accidentes, quemaduras, etc) y procedimientos quirúrgicos. Desde el punto de vista demográfico, el número de pacientes que sufren heridas crónicas y trastornos de la cicatrización está alcanzando proporciones epidémicas, tanto en términos de salud humana como económicos^{78,79}. Por lo tanto, desarrollar tratamientos que aceleren la cicatrización de heridas es de suma importancia. Distintos trabajos han demostrado que las propiedades regenerativas e inmunomoduladoras de las CMM, podrían ser aprovechadas para el desarrollo de tales tratamientos. En este sentido, las CMM constituyen una herramienta de enorme potencial, ya participan en la regulación de diversos mecanismos que forman parte de todas de las fases del proceso de regeneración tisular.

Siguiendo con el objetivo del trabajo, nos propusimos modificar a las CMM-WJ con el fin de aumentar sus propiedades pro-regenerativas, en particular, en el contexto de cicatrización de heridas dérmicas. Para ello, el primer paso consistió en elegir un gen candidato. Como ya explicamos en la introducción, SPARC es una glicoproteína asociada a la ME altamente conservada que exhibe diversas funciones biológicas, incluyendo su implicación en la adhesión, migración y proliferación celular, el ensamblaje de la ME, la señalización de factores de crecimiento como bFGF, VEGF, PDGF y TGF- β , la modulación de proteasas, diferenciación y supervivencia celular⁸⁰⁻⁸¹. Su naturaleza multifuncional pone en relieve su importancia en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Por otro lado, muchos de los mecanismos mencionados son de suma importancia para que el proceso de regeneración de heridas progrese de manera normal. Sumado a esto, SPARC es una proteína de secreción y forma parte del secretoma de las CMM, que es el principal mediador de los efectos de estas células sobre las células receptoras. Por este motivo, nos pareció interesante estudiar cómo la modificación de la expresión de SPARC en las CMM-WJ influye en los mecanismos regulados por las mismas a través de su secretoma, en el contexto de cicatrización.

Las CMM pueden ser modificadas genéticamente mediante diferentes estrategias. Las más comunes incluyen la transfección con vesículas lipídicas, la microinyección, electroporación y por último la transducción con distintos vectores virales⁸². Teniendo en cuenta que las propiedades terapéuticas de las CMM disminuyen notablemente con los pasajes *in vitro*, para este proyecto, optamos por utilizar la técnica que nos permitiera modificarlas genéticamente de manera más eficiente, conservando una alta viabilidad celular para poder continuar amplificándolas rápidamente y utilizarlas y, que la vez, fuese compatible con la escalabilidad del cultivo. Por estas razones, elegimos la técnica de transducción viral. En particular, transducción mediante vectores lentivirales, ya que éstos, a diferencia de otros tipos de vectores virales, integran el transgén al genoma de la célula blanco, generando una población estable, que además puede ser seleccionada si se acopla al gen de interés una gen de resistencia a antibiótico.

La estrategia elegida, consistió en generar dos condiciones diferentes, una en la que las CMM-WJ sobreexpresaran SPARC (CMM-WJ +SPARC), y otra en la que la expresión estuviese disminuída (CMM-WJ KD-SPARC), con respecto a las CMM-WJ *wild type*. Luego de la transducción y post-selección de las células, analizamos la presencia de SPARC en las muestras de los lisados celulares confirmando que efectivamente logramos nuestro objetivo, obteniendo las poblaciones CMM-WJ +SPARC y CMM-WJ KD-SPARC. Estos resultados fueron confirmados por la observación de SPARC mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía, donde además vimos que su localización no varía entre condiciones. Por otro lado, partiendo de la base de nuestra elección de usar las CMM como herramientas regenerativas por sus características intrínsecas, es sumamente importante que las células modificadas conserven la identidad de CMM. Por lo tanto, caracterizamos las poblaciones celulares generadas midiendo la expresión de los marcadores típicos de membrana usados como criterio de clasificación. Nuestros resultados confirman que las células modificadas no tienen su identidad de célula mesenquimal comprometida.

Puesto que SPARC está involucrada en la regulación de la proliferación celular, evaluamos el ciclo celular de las CMM-WJ modificadas, un regulador clave para el proceso de proliferación. Los resultados mostraron un leve aumento de la proporción de células KD-SPARC en la fase G1 del ciclo. Si bien el mecanismo exacto por el cual SPARC regula la proliferación celular aún no se conoce, se sabe que regula la expresión y la actividad de diversas integrinas. Entre ellas, las integrinas $\alpha\beta 5$ y $\alpha 6$, que median los mecanismos de adhesión de las células a la ME, y determinan, junto con otros mecanismos, el progreso de las células de la fase G2 a la fase mitótica⁸³. Otros trabajos, sustentan esto demostrando que el agregado de SPARC exógeno a distintos tipos celulares, induce el redondeamiento de las células necesario para que ocurra la mitosis⁸¹. Estos hallazgos van en línea con lo observado en el ciclo celular de las células KD-SPARC. Contrario a lo que esperamos, no vimos diferencias en el ciclo celular de las células +SPARC. Cabe destacar que macroscópicamente, no notamos grandes diferencias en el crecimiento de estas células al manipularlas en cultivo.

Extendiendo un poco más el análisis, evaluamos la expresión de varias integrinas de membrana, algunas de las cuales está reportado que están reguladas por SPARC, y tampoco encontramos diferencias en su expresión. Con estos resultados podemos decir que SPARC podría estar influyendo en el ciclo celular de las CMM-WJ, dado que su disminución se ve reflejada en un aumento de células en la fase G1, pero se necesitan hacer más estudios para poder asegurar que esto sea así.

En resumen, generamos CMM-WJ genéticamente modificadas para la expresión de la proteína SPARC, que no difieren en cuanto a identidad, características morfológicas ni de proliferación con las células *wild type*. Es importante mencionar también, que el protocolo de transducción viral usado para modificar las CMM-WJ, cumplió con las expectativas y resultó eficiente en cuanto al porcentaje de células modificadas que luego pudieron amplificarse rápidamente para posteriores ensayos y generación de stocks. Más aún, realizamos el ensayo en repetidas ocasiones con diferentes *batch* de células obteniendo los mismos resultados con respecto a la expresión de SPARC y las características de las células modificadas, es decir que es un protocolo fácilmente reproducible (datos no mostrados).

Parte del objetivo de este trabajo fue analizar la capacidad regenerativa de las CMM modificadas mediada por su secretoma. El secretoma de las CMM, compuesto tanto por factores solubles como por factores contenidos dentro de las VE, como los exosomas, es el principal efector de las propiedades regenerativas que tienen estas células. Pensando en el futuro desarrollo de terapias de aplicación clínica, el uso del secretoma como herramienta terapéutica presenta muchas ventajas. Para empezar, resuelve varias consideraciones de seguridad asociadas a las terapias con células vivas. Puede evaluarse en cuanto a seguridad, dosificación y potencia de forma análoga a los agentes farmacéuticos, al igual que también puede ser almacenado de manera simple y por largos períodos de tiempo. Reduce los costos de

mantención de células en cultivo, ya que rápidamente se puede obtener medio derivado de estas sin necesidad de amplificarlas por largos períodos de tiempo. El contenido biológico del secretoma obtenido podría modificarse para obtener los efectos celulares deseados. Y, por último, su aplicación clínica sería más simple de implementar⁸⁶⁻⁸⁸. Es por esto, que nos propusimos aislar el secretoma de las CMM-WJ modificadas para estudiar sus características y potencial de regeneración de heridas.

Estudiamos el efecto del MC derivado de las células WT, +SPARC y KD-SPARC en un modelo *in vitro* de cicatrización de heridas. La fase de migración es el evento limitante en este proceso. Por lo que, la mayoría de los ensayos que estudian la cicatrización de heridas se basan en ensayos de migración, en los que se evalúa el desplazamiento de las células hacia el área herida. Basándonos en lo descrito en bibliografía, optamos por uno de los modelos más simples utilizados, y evaluamos la migración de queratinocitos de piel humana frente a la exposición a los MC derivados de las CMM-WJ WT, y modificadas. En línea con lo reportado en estudios previos donde se demostró que el MC de las CMM acelera el cierre de herida en cultivos con fibroblastos y queratinocitos^{89,90}. Nuestros resultados muestran un claro efecto pro-migratorio sobre los queratinocitos, mediado por el secretoma de las CMM-WJ. Esto se evidencia con un mayor desplazamiento y cobertura del área de la herida en comparación con los queratinocitos que fueron cultivados con un medio no condicionado. Interesantemente, la capacidad migratoria de los queratinocitos varía según al MC al que son expuestos, lo que sugiere que el secretoma de las CMM-WJ tiene composiciones distintas según provenga de las células WT, +SPARC o KD-SPARC. En contraste con el MC de las células WT, notamos una tendencia a que los queratinocitos migren más cuando el medio utilizado deriva de las células que sobreexpresan SPARC. Por el contrario, el MC derivado de las células KD-SPARC induce una disminución de la velocidad de migración de los queratinocitos, retrasando el cierre de la herida.

Sumado a la migración de fibroblastos y queratinocitos (entre otros tipos celulares) que ocurre durante la cicatrización de heridas, es necesario que los mismos también proliferen. Dicho esto, estudiamos el efecto de los MC en el ciclo celular de queratinocitos y fibroblastos de piel humana. En ambos tipos celulares vimos un efecto de los MC sobre su ciclo celular e interesantemente este efecto es inverso en un tipo celular que en el otro. En cuanto a los queratinocitos, hay una tendencia a que la tasa de proliferación disminuya por efecto del medio derivado de mesenquimales, en contraste con el medio no condicionado, ya que hay un aumento en la proporción de células en la fase G1 acompañado de una disminución en las fases S y G2. Este efecto es aún mayor cuando las células son tratadas con MC KD-SPARC. Fuller *et al.* demostró que el MC de CMM tiene un muy leve efecto sobre la tasa de proliferación de queratinocitos, mientras que el principal efecto ejercido del mismo es sobre la migración, tal como observamos en nuestros resultados⁸⁹. Por otro lado, el efecto sobre el ciclo celular de los fibroblastos es inverso al de los queratinocitos. Se observa que cuando las células son tratadas con los MC (en comparación con las células cultivadas en DMEM) hay un aumento de la tasa proliferativa evidenciado por una proporción creciente de células en las fases S y G2 al mismo tiempo que disminuye la proporción de células en la fase G1, cuando las células son tratadas con los MC en comparación con las células cultivadas en DMEM. Al igual que para los queratinocitos, la mayor diferencia se observa cuando el medio usado es el derivado de las células KD-SPARC. Estos resultados refuerzan datos previamente publicados donde se describe un efecto pro-proliferativo del MC de CMM sobre fibroblastos dérmicos⁸⁹⁻⁹¹. Llamativamente, observamos que, para ambos tipos celulares el MC +SPARC tiene un efecto “intermedio” entre los efectos observados con MC WT y MC KD-SPARC. Como se mencionó con anterioridad, SPARC interactúa con diversas integrinas y componentes de la ME, los cuales son claves en la regulación de la adhesión celular y la progresión del ciclo celular^{82,92}. Especulamos que el efecto observado podría deberse a que hay un fino equilibrio entre las interacciones de integrinas y otras proteínas, entre ellas SPARC, que determinan la progresión de las células de una fase a otra del ciclo, el cual se ve perturbado cuando los niveles de SPARC en el medio no son los normales. Sin embargo, habría que examinar con mayor

profundidad cuales otro factores podrían estar influyendo en este proceso. Y, por último, es importante volver a resaltar que el efecto de los MC, principalmente de los derivados de las CMM-WJ modificadas tienen efectos que son célula receptora dependiente. Esto se sustenta con numerosos trabajos en los cuales se ha demostrado que los efectos y funciones ejercidas por SPARC son célula y contexto dependiente⁸⁴.

Asimismo, aislamos los exosomas derivados de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC. Estas microvesículas son un componente importante del secretoma de las células y diversas investigaciones demostraron que transfieren su carga en las células receptoras ejerciendo diferentes efectos, en particular, los exosomas derivados de CMM tienen efectos pro regenerativos que fueron estudiados en muchos modelos patológicos^{93,94}. Luego de aislar estas vesículas, realizamos un ensayo de funcionalidad evaluando la incorporación de los exosomas marcados incubándolos con células receptoras y confirmamos que las vesículas aisladas de las tres condiciones son funcionales y pueden ser incorporadas por las células blanco. Esta información nos permite agregar que el efecto observado en los ensayos *in vitro* realizados también podría estar relacionado al contenido de los exosomas presentes en los MC que son incorporados por los fibroblastos y los queratinocitos. Por cuestiones de tiempo, no llegamos a probar si los efectos biológicos observados se deben a los factores solubles del MC de las CMM, a los factores contenidos dentro de los exosomas o a una sinergia entre ambos componentes. En un futuro, pretendemos continuar con el estudio del potencial regenerativo de los exosomas.

En base a estos resultados, donde observamos un efecto del secretoma de las CMM SPARC-dependiente sobre mecanismos claves para la regeneración de heridas, como lo son la migración y proliferación celular, nos propusimos avanzar un paso más en el estudio de su potencial regenerativo mediante un ensayo de cicatrización de heridas utilizando un modelo *in vivo*. En investigaciones previas, se ha reportado que las células mesenquimales tienen un rol significativo en la cicatrización de heridas y regeneración de tejidos y que este rol está mediado principalmente por su secretoma⁹⁵. En función de esto, evaluamos el efecto del tratamiento de heridas de ratones con inyecciones intradérmicas de MC derivado de CMM-WJ WT, +SPARC y KD-SPARC. Durante el transcurso del experimento, observamos diferencias macroscópicas notables en el tamaño de la herida y la velocidad de cierre entre los distintos grupos. Las principales diferencias se observaron a los 7 días de iniciar el tratamiento, donde la tasa de cicatrización fue significativamente mayor en los ratones tratados con MC +SPARC y se veía claramente retrasada en los ratones tratados con MC KD-SPARC. Esto fue en consonancia con lo registrado a días posteriores, donde observamos a simple vista un cierre total de la herida de los individuos tratados con MC +SPARC a día 10 de iniciado el ensayo, seguido de los grupos MC WT y MC KD-SPARC, cuyas heridas cerraron alrededor de los 14 días. En estudios previos, Amitabha *et al.*, demostró que ratones knockout (KO) para SPARC presentaban un retraso en la cicatrización de heridas, sumado a esto, realizó ensayos de cierre de herida *in vitro* con fibroblastos derivados de estos ratones KO donde observó un retraso en la migración con respecto a fibroblastos de ratones *wild type*. Interesantemente, al agregar SPARC purificado, el retraso en la migración fue revertido⁹⁶. En cierta forma, esto apoya nuestros resultados, si bien en nuestro sistema los ratones tratados expresan SPARC, es evidente que los medios provenientes de las CMM donde la expresión de SPARC está modificada interfiere directamente sobre mecanismos involucrados en la cicatrización.

El análisis microscópico de las muestras histológicas de los ratones tratados con los MC, mostró ciertas características que refuerzan los resultados vistos hasta ahora. Tanto en el grupo tratado con MC WT como con MC +SPARC, se observaron procesos de cicatrización normales, aunque pudimos notar un grado de avance levemente mayor en el grupo MC +SPARC. En línea con lo reportado, esto podría explicarse en principio por la diferencia en el nivel SPARC presente en ambos medios. Como ya vimos, SPARC regula la migración y proliferación celular, así como también interactúa con diversos componentes

de la ME y regula la actividad de metaloproteasas, de esta manera podría estar favoreciendo y acelerando la re-epitelización⁹⁷.

Con respecto al grupo MC KD-SPARC, el retraso en la cicatrización observado a nivel macroscópico también fue confirmado microscópicamente. Las lesiones de estos individuos en general muestran un tejido conectivo muy laxo e inmaduro con numerosos capilares sanguíneos y una infiltración llamativa de células inmunes, lo que evidencia un proceso inflamatorio que también estaría contribuyendo al retraso en la cicatrización. En línea con esta observación, está reportado en varios trabajos que SPARC regula la inflamación en diferentes contextos. Said y colaboradores demostraron que en cáncer de ovario por ejemplo, la sobreexpresión de SPARC regula negativamente la respuesta inflamatoria; por otro lado, Riley y Bradshaw describieron que los ratones KO para SPARC padecen procesos inflamatorios exacerbados⁹⁸.

El tejido conectivo está formado principalmente por fibras colágenas, las cuales son sintetizadas por los fibroblastos⁷⁸. Para ello, estas células deben proliferar y migrar a la zona lesionada donde producirán el tejido fibrótico para cerrar la herida. Como vimos antes, la ausencia de SPARC en el MC de las mesenquimales, induce un aumento en la proliferación de fibroblastos de piel humana. Esto podría explicar por qué en los ratones tratados con el medio KD-SPARC se ven numerosos fibroblastos y tienen una gran cantidad de tejido conectivo.

Al finalizar el ensayo a día 21, la regeneración del tejido fue completa para el grupo tratado con MC +SPARC. El grupo tratado con MC WT, mostró un alto grado de regeneración, aunque todavía se podían distinguir zonas del tejido con epitelio más grueso que el epitelio normal de los ratones. Y, por último, en los ratones tratados con MC KD-SPARC se vio un epitelio normal, pero con una extensa capa de tejido conectivo por debajo, lo que podría indicar una cicatrización fibrótica.

Los resultados presentados en este trabajo confirman la hipótesis planteada en un principio. Demostramos que el MC de CMM que sobreexpresan SPARC tiene un efecto pro regenerativo en heridas dérmicas. Asimismo, la disminución de SPARC en el MC de las CMM, induce un retraso en la cicatrización. Resta estudiar si el efecto mediado por el secretoma se debe solamente a las diferencias del nivel de SPARC presente en el medio de las mesenquimales, o a una sumatoria de factores diferencialmente expresados y secretados por las células a raíz de la modificación de SPARC en las mismas. Son muchos los mecanismos en los cuales está reportado que SPARC tiene un rol regulatorio, muchos de estos están directamente relacionados con el proceso de cicatrización de heridas. Se ha reportado que, dependiendo del contexto, SPARC puede estimular o inhibir diferentes procesos como la adhesión, migración, proliferación, diferenciación, angiogénesis, inflamación y supervivencia de las células^{20,37,38}. Muchos estudios en modelos de regeneración, incluido el presente trabajo, demostraron que SPARC tiene un rol clave como factor regenerativo. Si bien los mecanismos por los cuales ejerce sus funciones no están descritos en su mayoría, existe mucha evidencia de su participación en diversos procesos asociados a la regeneración de heridas. Sumado a esto, logramos poner a punto un sistema de cultivo y aislamiento del secretoma de las CMM que es eficiente y fácilmente escalable.

En conclusión, consideramos que nuestros hallazgos son de suma importancia y establecen a SPARC como un nuevo blanco terapéutico de estudio que tiene un enorme potencial para ser explotado en el campo de la medicina regenerativa. Además, pusimos a punto un protocolo compatible con un futuro desarrollo biotecnológico a gran escala de posibles tratamientos basados en el secretoma de las CMM que mejoren la cicatrización de heridas.

Conclusiones

- El cultivo de CMM en 3D es más eficiente que el cultivo tradicional.
- El sistema de cultivo 3D permite aislar MC y exosomas derivados de un gran número de células.
- Los exosomas aislados de las CMM cultivadas en 3D son funcionales.
- EL MC de CMM tiene un efecto pro-migratorio en queratinocitos de piel humana SPARC-dependiente.
- El MC de CMM tiene un efecto pro-proliferativo en fibroblastos de piel humana SPARC-dependiente.
- El análisis sobre la cicatrización de heridas en ratones mostró que el MC de CMM KD-SPARC induce un retraso de la misma.
- El tratamiento de las heridas de ratones con MC +SPARC produjo una aceleración en el proceso de cicatrización.
- El MC derivado de CMM que sobreexpresan SPARC tiene un efecto pro-regenerativo.

Referencias Bibliográficas

1. Poliwoda, S. *et al.* Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. *Orthop. Rev. (Pavia)*. **14**, (2022).
2. De Los Angeles, A. *et al.* Hallmarks of pluripotency. *Nature* **525**, 469–478 (2015).
3. Wojciech Zakrzewski^{1*}, Maciej Dobrzyński², M. S. and Z. R. Stem Cells: Past, Present and Future. *Stem Cell Res. Ther.* (2019). doi:<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
4. Maqsood, M. *et al.* Adult mesenchymal stem cells and their exosomes: Sources, characteristics, and application in regenerative medicine. *Life Sci.* **256**, 118002 (2020).
5. Marino, L. *et al.* Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int. J. Stem Cells* **12**, 218–226 (2019).
6. Abdelrazik, H. *et al.* Substantial overview on mesenchymal stem cell biological and physical properties as an opportunity in translational medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–29 (2019).
7. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
8. Samsonraj, R. M. *et al.* Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 2173–2185 (2017).
9. Pittenger, M. F. *et al.* Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *npj Regen. Med.* **4**, (2019).
10. Suh, N., Subramanyam, D. & Lee, M. Y. Molecular signatures of secretomes from mesenchymal stem cells: therapeutic benefits. *Mol. Cell. Toxicol.* **13**, 133–141 (2017).
11. Saeedi, P., Halabian, R. & Fooladi, A. A. I. A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies. *Stem Cell Investig.* **6**, (2019).
12. Lee, D. K. & Song, S. U. Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Cell. Immunol.* **326**, 68–76 (2018).
13. Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J. & Perez-Fernandez, R. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
14. Kalaszczynska, I. & Ferdyn, K. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: Future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
15. Ding, D. C., Chang, Y. H., Shyu, W. C. & Lin, S. Z. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: A new era for stem cell therapy. *Cell Transplant.* **24**, 339–347 (2015).
16. Petrenko, Y. *et al.* A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. *Sci. Rep.* **10**, 1–15 (2020).
17. Yaghoubi, Y. *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived-exosomes in diseases treatment. *Life Sci.* **233**, (2019).
18. Rafiq, Q. A., Coopman, K. & Hewitt, C. J. Scale-up of human mesenchymal stem cell culture: Current

- technologies and future challenges. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2**, 8–16 (2013).
19. Tsai, A. C. & Pacak, C. A. Bioprocessing of human mesenchymal stem cells: From planar culture to microcarrier-based bioreactors. *Bioengineering* **8**, 1–22 (2021).
 20. Abraham, E., Gupta, S., Jung, S. & McAfee, E. *Bioreactor for Scale-Up: Process Control. Mesenchymal Stromal Cells: Translational Pathways to Clinical Adoption* (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-12-802826-1.00006-4
 21. Koh, B. *et al.* Three dimensional microcarrier system in mesenchymal stem cell culture: A systematic review. *Cell Biosci.* **10**, 1–16 (2020).
 22. Naji, A. *et al.* Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 3323–3348 (2019).
 23. Margiana, R. *et al.* Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Res. Ther.* **13**, 1–22 (2022).
 24. Galipeau, J. & Sensébé, L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell* **22**, 824–833 (2018).
 25. Caplan, A. I. *Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. Principles of Regenerative Medicine* (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/B978-0-12-809880-6.00015-1
 26. Rodríguez-Fuentes, D. E. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Arch. Med. Res.* **52**, 93–101 (2021).
 27. Elahi, F. M., Farwell, D. G., Nolta, J. A. & Anderson, J. D. Preclinical translation of exosomes derived from mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells* **38**, 15–21 (2020).
 28. Keshtkar, S., Azarpira, N. & Ghahremani, M. H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res. Ther.* 1–9 (2018).
 29. Qiu, G. *et al.* Functional proteins of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 1–11 (2019).
 30. Tieu, A. *et al.* An Analysis of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles for Preclinical Use. *ACS Nano* **14**, 9728–9743 (2020).
 31. Van Niel, G., D’Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 213–228 (2018).
 32. Gebara, N. *et al.* Extracellular Vesicles, Apoptotic Bodies and Mitochondria: Stem Cell Bioproducts for Organ Regeneration. *Curr. Transplant. Reports* **7**, 105–113 (2020).
 33. Bjørge, I. M., Kim, S. Y., Mano, J. F., Kalionis, B. & Chrzanowski, W. Extracellular vesicles, exosomes and shedding vesicles in regenerative medicine-a new paradigm for tissue repair. *Biomater. Sci.* **6**, 60–78 (2018).
 34. Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H. & Tang, W. H. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* **9**, 1–18 (2019).
 35. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).

36. Panda, B., Sharma, Y., Gupta, S. & Mohanty, S. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as an emerging paradigm for regenerative therapy and nano-medicine: A comprehensive review. *Life* **11**, (2021).
37. Gonzalez-King, H. *et al.* Hypoxia Inducible Factor-1 α Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Stem Cells* **35**, 1747–1759 (2017).
38. Ho, Y. K., Woo, J. Y., Tu, G. X. E., Deng, L. W. & Too, H. P. A highly efficient non-viral process for programming mesenchymal stem cells for gene directed enzyme prodrug cancer therapy. *Sci. Rep.* **10**, 1–15 (2020).
39. Miceli, V. *et al.* Therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells: The need of cell priming for cell-free therapies in regenerative medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–20 (2021).
40. Choudhery, M. S. Strategies to improve regenerative potential of mesenchymal stem cells. *World J. Stem Cells* **13**, 1845–1862 (2021).
41. Hamann, A., Nguyen, A. & Pannier, A. K. Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells: A review of nonviral methods and applications. *J. Biol. Eng.* **13**, 1–16 (2019).
42. Chen, J. E. & Glover, G. H. SPARC/Osteonectin in Mineralized Tissue. *HHS Public Access* **25**, 289–313 (2016).
43. Jiang, L. *et al.* SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell–matrix communication. *Stem Cells* **13**, 1–16 (2018).
44. Bradshaw, A. D. & Sage, E. H. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J. Clin. Invest.* **107**, 1049–1054 (2001).
45. Torres Núñez, E. Sparc (Osteonectin): new insight into the function and regulation = Sparc (Osteonectin): nuevos conocimientos sobre sus funciones y regulación. (2014).
46. Ghanemi, A., Yoshioka, M. & St-Amand, J. Secreted protein acidic and rich in cysteine as a regeneration factor: Beyond the tissue repair. *Life* **11**, 1–7 (2021).
47. Brekken, R. A. & Sage, E. H. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell–matrix communication. *Matrix Biol.* **19**, 815–827 (2002).
48. Motamed, K. SPARC (osteonectin/BM-40). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 1363–1366 (1999).
49. Bradshaw, A. D. The role of SPARC in extracellular matrix assembly. *J. Cell Commun. Signal.* **3**, 239–246 (2009).
50. Bradshaw, A. D. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 480–488 (2012).
51. Atorrasagasti, C. *et al.* Lack of the Matricellular Protein SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine) Attenuates Liver Fibrogenesis in Mice. *PLoS One* **8**, (2013).
52. Lee B. Rivera, Amy D. Bradshaw, R. A. B. The regulatory function of SPARC in vascular biology. *Cell Mol Life Sci.* (2011). doi:10.1007/s00018-011-0781-8.The
53. Velnar, T., Bailey, T. & Smrkolj, V. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.* **37**, 1528–1542 (2009).

54. Eming, S. A., Martin, P. & Tomic-canic, M. STATE OF THE ART REVIEW Wound repair and regeneration : Mechanisms , signaling , and translation. **6**, (2014).
55. Jo, H. *et al.* Applications of mesenchymal stem cells in skin regeneration and rejuvenation. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–18 (2021).
56. Benson, H. A. E. *Transdermal and Topical Drug Delivery. Part 1. Skin Structure, Function, and Permeation. Collective Dynamics of Nonlinear and Disordered Systems* (2012). doi:10.1007/3-540-26869-3_2
57. Karppinen, S. M., Heljasvaara, R., Gullberg, D., Tasanen, K. & Pihlajaniemi, T. Toward understanding scarless skin wound healing and pathological scarring [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* **8**, 1–11 (2019).
58. Koivisto, L., Heino, J., Häkkinen, L. & Larjava, H. Integrins in Wound Healing. *Adv. Wound Care* **3**, 762–783 (2014).
59. Chiossone, L. *et al.* Mesenchymal Stromal Cells Induce Peculiar Alternatively Activated Macrophages Capable of Dampening Both Innate and Adaptive Immune Responses. *Stem Cells* **34**, 1909–1921 (2016).
60. Walter, M. N. M., Wright, K. T., Fuller, H. R., MacNeil, S. & Johnson, W. E. B. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp. Cell Res.* **316**, 1271–1281 (2010).
61. Smith, A. N. *et al.* Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury. *Exp. Cell Res.* **316**, 48–54 (2010).
62. Casado-Díaz, A., Quesada-Gómez, J. M. & Dorado, G. Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Regenerative Medicine: Applications in Skin Wound Healing. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 1–19 (2020).
63. Palma, M. B. *et al.* Wound Healing by Allogeneic Transplantation of Specific Subpopulation From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant.* **30**, 1–11 (2021).
64. Rafiq, Q. A., Coopman, K. & Hewitt, C. J. Scale-up of human mesenchymal stem cell culture: Current technologies and future challenges. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2**, 8–16 (2013).
65. Jossen, V., van den Bos, C., Eibl, R. & Eibl, D. Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 3981–3994 (2018).
66. Nekanti, U. *et al.* Optimization and scale-up of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Res.* **5**, 244–254 (2010).
67. Koh, B. *et al.* Three dimensional microcarrier system in mesenchymal stem cell culture: A systematic review. *Cell Biosci.* **10**, 1–16 (2020).
68. Sun, L. Y. *et al.* Cell proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable microcarriers enhances in vitro differentiation potential. *Cell Prolif.* **43**, 445–456 (2010).
69. Schachtele, S. *et al.* Markers and Methods to Verify Mesenchymal Stem Cell Identity , Potency , and Quality.

70. Domogatskaya, A., Rodin, S. & Tryggvason, K. Functional diversity of laminins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 523–553 (2012).
71. Maruyama, C. L. M. *et al.* Stem cell-soluble signals enhance multilumen formation in SMG cell clusters. *J. Dent. Res.* **94**, 1610–1617 (2015).
72. Citeroni, M. R. *et al.* Review in vitro innovation of tendon tissue engineering strategies. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–78 (2020).
73. Kiyozumi, D., Nakano, I., Sato-Nishiuchi, R., Tanaka, S. & Sekiguchi, K. Laminin is the ECM niche for trophoblast stem cells. *Life Sci. Alliance* **3**, 1–9 (2020).
74. Bello, A. B., Kim, D., Kim, D., Park, H. & Lee, S. H. Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: From cell culture to medical applications. *Tissue Eng. - Part B Rev.* **26**, 164–180 (2020).
75. Dzobo, K. & Dandara, C. The Extracellular Matrix : Its Composition , Function , Remodeling , and Role in Tumorigenesis. 1–39 (2023).
76. Shamir, E. R. & Ewald, A. J. Three-dimensional organotypic culture: Experimental models of mammalian biology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 647–664 (2014).
77. Li, T. S. *et al.* Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. *Stem Cells* **28**, 2088–2098 (2010).
78. Velnar, T., Bailey, T. & Smrkolj, V. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.* **37**, 1528–1542 (2009).
79. Eming, S. A., Martin, P. & Tomic-canic, M. STATE OF THE ART REVIEW Wound repair and regeneration : Mechanisms , signaling , and translation. **6**, (2014).
80. Lee B. Rivera, Amy D. Bradshaw, R. A. B. The regulatory function of SPARC in vascular biology. *Cell Mol Life Sci.* (2011). doi:10.1007/s00018-011-0781-8.The
81. Bradshaw, A. D. The role of SPARC in extracellular matrix assembly. *J. Cell Commun. Signal.* **3**, 239–246 (2009).
82. Jiang, L. *et al.* SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell–matrix communication. *Stem Cells* **13**, 1–16 (2018).
83. Motamed, K. SPARC (osteonectin/BM-40). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 1363–1366 (1999).
84. Bradshaw, A. D. & Sage, E. H. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J. Clin. Invest.* **107**, 1049–1054 (2001).
85. Hamann, A., Nguyen, A. & Pannier, A. K. Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells: A review of nonviral methods and applications. *J. Biol. Eng.* **13**, 1–16 (2019).
86. Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J. & Perez-Fernandez, R. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
87. Suh, N., Subramanyam, D. & Lee, M. Y. Molecular signatures of secretomes from mesenchymal stem cells: therapeutic benefits. *Mol. Cell. Toxicol.* **13**, 133–141 (2017).

89. Elahi, F. M., Farwell, D. G., Nolta, J. A. & Anderson, J. D. Preclinical translation of exosomes derived from mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells* **38**, 15–21 (2020).
90. Walter, M. N. M., Wright, K. T., Fuller, H. R., MacNeil, S. & Johnson, W. E. B. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp. Cell Res.* **316**, 1271–1281 (2010).
91. Smith, A. N. *et al.* Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury. *Exp. Cell Res.* **316**, 48–54 (2010).
92. Kim, J. W., Lee, J. H., Lyoo, Y. S., Jung, D. I. & Park, H. M. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Vet. Dermatol.* **24**, (2013).
93. Jones, M. C., Zha, J. & Humphries, M. J. Connections between the cell cycle, cell adhesion and the cytoskeleton. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **374**, 1–10 (2019).
94. Yaghoubi, Y. *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived-exosomes in diseases treatment. *Life Sci.* **233**, (2019).
95. Panda, B., Sharma, Y., Gupta, S. & Mohanty, S. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as an emerging paradigm for regenerative therapy and nano-medicine: A comprehensive review. *Life* **11**, (2021).
96. Jo, H. *et al.* Applications of mesenchymal stem cells in skin regeneration and rejuvenation. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–18 (2021).
97. Amitabha Basu, Lorraine H Kligman, S. J. S. and C. C. H. Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40). (2001).
98. Ghanemi, A., Yoshioka, M. & St-Amand, J. Secreted protein acidic and rich in cysteine as a regeneration factor: Beyond the tissue repair. *Life* **11**, 1–7 (2021).
99. Ghanemi, A., Yoshioka, M. & St-Amand, J. Secreted protein acidic and rich in cysteine and inflammation: Another homeostatic property? *Cytokine* **133**, 155179 (2020).
100. Mukherjee, S., Choi, M. J., Kim, S. W. & Yun, J. W. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) regulates thermogenesis in white and brown adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **506**, 110757 (2020).
101. Nakamura, T. & Bornstein, P. Matricellular Proteins. *Encycl. Respir. Med. Second Ed.* **1**, 137–151 (2001).