

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Vicerrectoría de Investigación y Extensión

Dirección de Proyectos

Informe final de proyectos de investigación y extensión

Determinación de la tasa de regeneración en heridas cutáneas aplicando células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en un andamio de origen biológico

Departamento Académico responsable: Escuela de Biología (EB).

Investigador(a) responsable: Dr. rer. nat. Miguel Rojas Chaves (EB)

Otros investigadores: MSc. Silvia Castro Piedra

Ing. Johan Morales Sánchez (EB),

PhD. Ricardo Starbird Pérez (EQ),

Lic. Edwin León (LEBi),

MSc. Cristina Briones (LEBi)

Dr. Jose Luis Quirós Alpizar (HMP).

Período cubierto: Enero 2018 - Diciembre 2019

Tabla de contenido

1. Código y Título del proyecto.....	3
2. Autores y direcciones	3
3. Resumen.....	3
4. Palabras clave.....	3
5. Introducción	3
7. Metodología	8
8. Resultados	10
9. Discusión y conclusiones	16
10. Recomendaciones.....	20
11. Agradecimientos (opcional)	20
12. Referencias.....	20
13. Apéndices (opcional).....	¡Error! Marcador no definido.

1. Código y Título del proyecto

1510097: Determinación de la tasa de regeneración en heridas cutáneas aplicando células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en un andamio de origen biológico

2. Autores y direcciones

Coordinador: Dr. rer. nat. Miguel Rojas Chaves (EB)

Otros investigadores: MSc. Silvia Castro Piedra (EB)
Ing. Johan Morales Sánchez (EB),
PhD. Ricardo Starbird Pérez (EQ),
Lic. Edwin León (LEBi-UCR),
MSc. Cristina Briones (LEBi-UCR)
Dr. Jose Luis Quirós Alpízar (HMP).

3. Resumen

En los últimos años se ha evidenciado que el uso de células madre mesenquimales de tejido adiposo (ADSC) contribuye a la regeneración de la piel ante diferente tipo de heridas, estimulando a las células que proliferen y a que el tejido lesionado recupere su estructura normal. Debido a las complicaciones que resultan de heridas en la piel causadas por quemaduras o bien úlceras resulta necesaria la implementación de terapias alternativas que mejoren la regeneración. Por ello se buscó comprobar el potencial regenerador de las ADSC. Para esto se emplearon 5 grupos de roedores a los que se les realizó una herida cutánea y se les aplicó los siguientes tratamientos: solución salina como control negativo, ADSC en suspensión, un andamio de agarosa, un andamio de agarosa con ADSC, y finalmente un producto comercial como control positivo. Se calculó la tasa de cierre de la herida y se realizaron análisis histológicos. Aunque no hubo diferencias significativas en el tiempo de cierre de la herida entre los diferentes tratamientos, a nivel histológico si se evidenció que aquellos grupos tratados con ADSC presentaron un mejor proceso regenerativo que el resto de los tratamientos, principalmente observado en una menor inflamación, ausencia de paraqueratosis y mayor retracción de la herida, indicando así el potencial regenerativo de estas células en lesiones de piel.

4. Palabras clave

Células madre de tejido adiposo, regeneración, herida en piel, modelo animal.

5. Introducción

La Medicina Regenerativa (MR) es un campo que se enfoca en la reparación, y regeneración de células, tejidos y órganos dañados. Esta área envuelve varias estrategias como ingeniería de

tejidos, terapia celular y factores de crecimiento, aplicación de biomateriales, entre otros, por lo cual requiere de un equipo interdisciplinario para desarrollar nuevas terapias, desde biólogos, biotecnólogos, médicos, ingenieros en materiales, genetistas, biólogos moleculares, entre otros, lo que facilita la traslación del conocimiento científico a la práctica clínica (Steinhoff, 2011). La terapia celular es una estrategia que se ha venido utilizando en la clínica desde hace ya varias décadas. Entre los tipos de células utilizados, se destacan las células madre mesenquimales, que se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y diferenciación en varios linajes. La ventaja de estas células radica en que, por encontrarse en tejidos adultos y accesibles, poseen implicaciones éticas menores y métodos de obtención seguros, poco invasivos pero eficaces, por lo que han sido ampliamente utilizadas con éxito como parte de la MR (Rohban & Pieber, 2017).

A nivel internacional se ha evidenciado que la aplicación tópica e intradérmica de células madre mesenquimales de tejido adiposo, contribuye a la regeneración de la dermis y epidermis en heridas crónicas y agudas, estimulando a las células que proliferen y a que el tejido lesionado regenere en vez de que se convierta en una cicatriz fibrótica (Lo Furno et al, 2016).

Nuestro país no es una excepción. En el Instituto Tecnológico de Costa Rica, a través del Centro de Investigación en Biotecnología, se estableció en sus instalaciones el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos en el 2004. Desde esa fecha, investigadores de ese centro han venido realizando proyectos de investigación orientados al desarrollo de terapias que proporcionen una mejor regeneración a personas que han sufrido afecciones de la piel, ya que, en muchos casos los tratamientos disponibles no son suficiente. A raíz de esas investigaciones, se han establecido protocolos de aislamiento y cultivo de células de la piel humanas y células madre mesenquimales provenientes de tejido adiposo (ADSC por sus siglas en inglés); y a parte del manejo *in vitro*, también se establecieron ensayos con animales de laboratorio a modo de prueba piloto con resultados exitosos (Morales, 2006; Castro y Morales, 2019).

En Costa Rica, las lesiones en la piel (quemaduras y úlceras) representan un problema de salud pública importante. Sin embargo, actualmente no se cuenta con información estadística actualizada al respecto, por falta de un sistema de registro estadístico estandarizado, diversidad de servicios para la atención médica, el nivel socioeconómico de cada uno de los pacientes, en otros. A pesar de carecer de datos epidemiológicos para evaluar y describir el impacto de la enfermedad, no por ello se debe minimizar esta dolencia (Nettel et al, 2013).

En el caso específico de las úlceras, también va a depender de su etiología, por ejemplo, en miembros inferiores los tratamientos recomendados son la compresión mayor a 40 mm de mercurio y cirugía de venas superficiales, pero estos tratamientos resultan insuficientes en al

menos el 35% de los pacientes. Además, se reporta una cicatrización de la úlcera en 24 semanas con recurrencia del 12% en menos de un año.

Debido a los resultados insatisfactorios descritos, es necesaria la implementación de terapias alternativas que mejoren o promuevan la regeneración de lesiones de esta naturaleza. Una opción podría ser la terapia celular con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. Como bien se sabe, este tipo de terapias está ganando terreno en la medicina a nivel mundial por su gran potencial regenerativo. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue analizar la efectividad de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo expandidas *in vitro*, en la regeneración de heridas agudas en un modelo murino.

6. Marco Teórico

Las células madre mesenquimales (MSC por sus siglas en inglés) poseen una serie de características únicas que las hacen buenas candidatas para terapias celulares en el campo de la MR, entre ellas: técnicas de aislamiento relativamente sencillas, poseen la habilidad de diferenciarse en células de origen mesenquimal y no mesenquimal, tienen la habilidad de expandirse en cultivo sin pérdida de la capacidad de diferenciación, y no tienen implicaciones éticas tan fuertes al ser tomadas de tejido adulto, no inducen a una respuesta inmune porque carecen de expresión de HLA-DR, inducen inmunosupresión en la zona donde son trasplantadas, tienen propiedades antiinflamatorias y tienen la capacidad de migrar hacia los tejidos dañados para inducir y modular la regeneración (Porada et al, 2010).

Aunque muchos trabajos se han enfocado en el uso de MSC derivadas de médula ósea, es importante indicar que también se han logrado aislar de numerosos tejidos incluyendo cerebro, hígado, pulmones, sangre fetal, cordón umbilical, riñones y material de liposucción. La amplia distribución de este tipo de células en el cuerpo, dan indicios de que éstas funcionan normalmente para mantener la homeostasis, probablemente mediando el mantenimiento y reparación de los tejidos respectivos (Zuk et al, 2001; Zuk et al, 2002).

Debido a que el tejido adiposo es más accesible y se encuentra en cantidades importantes, las células madre de este tejido, han sido utilizadas en muchas aplicaciones para la regeneración de piel. Por ejemplo, se han utilizado modelos porcinos, murinos y conejos para probar ADSC, así como la fracción vascular estromal en lesiones de piel con resultados exitosos (Rodríguez et al, 2015).

Como está descrito, la regeneración de una herida se puede dividir en tres fases: inflamatoria, proliferativa y de remodelación (Murphy y Evans, 2012). Se ha determinado que las ADSC actúan en cada una de ellas. En la fase inflamatoria, estas células secretan factores que son

capaces de disminuir la inflamación y aumenta la actividad antibacteriana a través de la modificación del fenotipo de los macrófagos. En la fase proliferativa, se da una mejor inducción en la angiogénesis al reclutar células endoteliales. Además, estimula el reclutamiento de fibroblastos y queratinocitos para ir repoblando la herida e iniciar el cierre de la misma. Finalmente, en la fase de remodelación, regula la deposición de colágeno lo que está directamente relacionado con la disminución en la formación de una cicatriz fibrótica resultado en una piel de mejor apariencia y más similar a la piel sana (Cequeira et al, 2016; Hassan et al, 2014; Shingyochi et al, 2015).

A parte de funcionar como una fuente de los factores de crecimiento que orquestan los mecanismos envueltos en la regeneración, se ha demostrado *in vitro* la diferenciación de las ADSC en: células similares a queratinocitos, fibroblastos dérmicos, adipocitos correspondientes a la hipodermis y músculo. Con estas células se han recreado análogos de piel, sin embargo, estos resultados hay que validarlos *in vivo* en un modelo de regeneración cutánea (Chan et al, 2012).

Una gran interrogante en este tipo de terapias es si las células se desempeñarían mejor si son inoculadas dentro de un biomaterial, esto con el fin de incrementar el proceso de regeneración. Considerando el gran número de trabajos en animales que han utilizado ADSC, ya sea inyectados en la periferia de la herida o bien incorporadas de forma azarosa dentro de una matriz de diversos materiales, hay ciertos aspectos a considerar. Por lo tanto, resulta importante evaluar *in vivo* también el efecto de esta variable (Cequeira et al, 2013; Rustad et al, 2011) y así resolver uno de los principales inconvenientes de la aplicación directa de las células como lo es la limitada implantación de las mismas directamente en la herida. A la fecha, existen diferentes estrategias que permite combinar el uso de biomateriales, en este caso hidrogeles, en conjunto con ADSC.

Actualmente, existe una gran variedad de hidrogeles que se han sido utilizado en investigaciones similares, donde se han reportado sus ventajas y desventajas. Dentro de los geles de origen natural más comunes se menciona: ácido hialurónico, alginato, mezclados con seda, fibrina, mezclas entre gelatina y colágeno entre otras. Por parte de los geles de origen sintéticos más utilizados se encuentran: polietilenglicol, poliacrilamida, poliNIPAAm, entre otros (Gnecchi, 2016). A pesar de las opciones disponibles, se han encontrado ciertas desventajas, el ácido hialurónico, tiene un alto costo, a parte que tiene que ser entrecruzado con otros materiales para poder ser utilizado para este fin (Averbeck et al, 2007), las gelatinas de origen vegetal (algas), aunque son de fácil acceso, no son inmunogénicas y poseen propiedades

físicas y químicas bien definidas, se degradan rápidamente, lo que resulta en la pérdida de estabilidad mecánica que dificulta mantener la estructura biológica (Steinstraesser et al, 2012). La agarosa es un polisacárido (polímero lineal) formado por galactosa α y β que se extrae de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*. Es soluble en agua a temperaturas superiores a los 65°C, por lo que a temperatura ambiente es capaz de mantener su estructura de gel. Este polímero forma una matriz inerte y no tóxica que se emplea como una herramienta indispensable en gran cantidad de técnicas de biología molecular, bioquímica y genética. Su uso más extendido es para construir geles que permitan separar moléculas de ADN mediante electroforesis y se usa para fijar moléculas a su estructura como anticuerpos, antígenos y enzimas. Igualmente, se utiliza para el cultivo celular ya que puede mantener la viabilidad celular, la proliferación y la síntesis proteica por parte de las células *in vitro* (Lewandrowski et al, 2008). Además, se ha venido aplicando a la ingeniería de tejidos como material de relleno por sus características físicas y químicas, así como por su bajo costo (Garzón et al, 2013).

La agarosa, por lo tanto, parece ser un excelente candidato para ser empleado con ADSC, gracias a la versatilidad de sus propiedades mecánicas al variar la concentración de uso, a su baja inmunogenicidad (no es citotóxico) y ausencia de rechazo, fácil manejo y manipulación en el laboratorio, bajo costo, y también a lo fácil que resulta la adhesión, expansión, proliferación de células y además secreción de factores y proteínas que podrían promover una adecuada regeneración. Además, al tener una porosidad variable, permite una adecuada infiltración de nuevos vasos sanguíneos, lo cual resulta indispensable para suplir de nutrientes a las células trasplantadas y a las que migran desde los bordes de la herida (Chen et al, 2007). Dentro de este trabajo se pretende: continuar con la línea de investigación con este tipo de células, mediante el proyecto 1510077 inscrito en la VIE, en donde se caracterizan y analizan las ADSC (Castro y Morales, 2019). Además, se analizó la regeneración de una herida cutánea en roedores al aplicar ADSC de origen autólogo en conjunto con una matriz de agarosa. Dicho tratamiento se comparó contra un tratamiento utilizado comúnmente en este tipo de heridas, que es Nanogen Aktigel®, también se comparó la efectividad de las células aplicadas en solución salina, el gel de agarosa solo y solución salina como control con el fin de determinar y comparar la eficiencia de la terapia propuesta.

Finalmente, es importante mencionar que, esta investigación podría funcionar como evidencia preclínica para el potencial desarrollo de un tratamiento que se escale a Fase Clínica I/II y de esta forma, incentivar la investigación clínica que llegue a culminar es una terapia que esté a disposición para los pacientes que sufran lesiones de esta naturaleza.

7. Metodología

Uso de animales de experimentación: Es importante mencionar que se contó con el permiso del Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Costa Rica, para poder utilizar los animales en este proyecto, bajo el expediente CICUA-047-2016. Se utilizaron ratones macho adultos sanos de la cepa Balb-C de 25-30g de peso, los cuales fueron anestesiados antes de cada procedimiento con ketamina (90 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg); cuando fue necesario realizar eutanasia, se aplicó la misma anestesia y se procedió a realizar dislocación cervical.

Elaboración del andamio de agarosa: Se pesó 1.5 g de agarosa y se mezcló con 100 ml de PBS estéril. De esa solución, se tomó 33 ml y se agregó 10 ml de SFB, 1 ml de L-glutamina, 1 ml de ATB/ATM y 55 ml de DMEM, todo lo anterior a una temperatura de 42°C.

Cultivo celular: Justo después de realizar la eutanasia a los animales, se tomó muestras de tejido adiposo del pliegue inguinal de los roedores y se colocó en medio de transporte compuesto por solución salina tampón de Hank (HBSS) suplementada con 10% de antibióticos y antimicóticos hacia el laboratorio donde se procesó. En la cámara de flujo laminar se lavó con solución tampón de fosfatos (PBS) y 10% de antibióticos. Después, las muestras se cortaron en segmentos pequeños y se agregaron en una solución de colagenasa tipo I al 0.1% donde se incubaron durante 60 min. en agitación a 37°C hasta observar una disgregación del tejido. Después, se inactivó la colagenasa agregando suero fetal bovino (SFB), y se filtró la suspensión celular para luego centrifugar por 10 minutos a 1200 rpm.

Ante la presencia de eritrocitos, se agregó 5 ml de NH₄Cl 0.8% y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Luego se descartó el sobrenadante. Seguidamente se resuspendió el precipitado en medio de cultivo de Dulbecco (DMEM) con 10% de SFB, 1% antibióticos-antimicóticos y 1% de L-glutamina. Se calculó el porcentaje de viabilidad y las células se incubaron a 37°C con 5% CO₂, hasta lograr un estado de confluencia del 70%-80%. El medio de cultivo se cambió cada tres o cuatro días.

Las células pasaje 2 a 80% de confluencia de tripsinizaron y se realizó una suspensión celular de 1x10⁶ cél/ml se mezcló con 2 ml de la solución de agarosa anteriormente indicada y se dejó solidificar a temperatura ambiente (dentro de la cámara de flujo). De la mezcla anterior se chorreó 1ml por pozo en una placa de 12 pozos. Después, se agregó medio de cultivo completo y se dejó incubando en condiciones normales por 24 horas. Transcurrido este periodo, se sembraron 1 x 10⁵ cél por pozo adicionalmente. Se revisó el gel con el microscopio con el fin de observar el crecimiento de las células y esperar que haya una suficiente confluencia para

trasplantar. Parte de las células se mantuvieron en un cultivo en condiciones normales con el fin de mantener una reserva.

Evaluación del andamio: El gel de agarosa preparado en el punto 1.1 se liofilizó y se trató con radiación gamma a tres diferentes dosis (0 kGy, 25 0 kGy y 50 kGy) con el fin de analizar si la irradiación afectaba las propiedades mecánicas. Se analizó una sola muestra del gel. Debido a la naturaleza del gel, las evaluaciones mecánicas del sustrato las realizó la empresa Rheolution Inc. A las muestras liofilizadas, se les agregó 5 mL agua destilada a 40°C a cada uno de los tubos con las muestras irradiadas. La cámara térmica se encendió media hora antes de montar las muestras en el equipo. Una vez pasado este tiempo, se colocó las muestras en el porta muestras e inmediatamente se hizo la lectura de los perfiles de gelificación y propiedades mecánicas en el equipo ElastoSens™ Bio2 (Rheolution Inc).

Inducción de la herida y aplicación de los tratamientos: La herida se realizó en un área aproximada de 1cm² en el área interescapular con el fin de remover únicamente epidermis y dermis, el tejido muscular se dejó intacto. Después de realizar la herida en los animales, se les aplicó de forma tópica cada uno de los siguientes tratamientos

Tratamiento A: 1x10⁶ ADSC por kg/peso en solución salina, 6 animales

Tratamiento B: Gel de agarosa sin células madre, 6 animales

Tratamiento C: Células madre mesenquimales embebidas en gel de agarosa, 6 animales

Tratamiento D: Nanogen Aktigel® (Control positivo) 3 animales

Tratamiento E: Solución salina (Control negativo) 3 animales.

Después, a todos los animales se les cubrió el tratamiento aplicado con Tegaderm®, con el fin de monitorear cada tres días el cierre de la herida. A lo largo de los tratamientos, se monitoreó que los animales no presentaran síntomas de dolor utilizando “*The Mouse Grimace Scale*” y su comportamiento general, y se revisó la herida de manera diaria para detectar inflamación. Para el dolor postoperatorio se utilizó paracetamol 200 mg/Kg durante los cinco días posteriores a la cirugía.

Medición del cierre de la herida y calculo la tasa de regeneración: La herida de los animales se midió utilizando una regla métrica (usada para la calibración y estandarización del área de la lesión) y se tomó una fotografía aproximadamente cada 3 días con cámara digital hasta que la herida cerró por completo o que transcurrieran 18 días. Las fotografías se analizaron para determinar la evolución del área de cicatrización de la lesión, y el porcentaje de regeneración cutánea en la lesión se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Área en el día de trasplante} - \text{área en el día postoperatorio X}) \times 100}{(\text{Área en el día trasplante})}$$

Toma de muestras de piel: Luego del 100% del cierre o el transcurso de 15 días a partir de la operación, cada animal fue sometido a eutanasia utilizando pentobarbital al 20% a una dosis de 50 mg/kg intraperitoneal. Las muestras de piel del dorso de los animales donde se encontrará la lesión se colocaron en formalina tamponada al 10%

Elaboración de láminas histológica: Se realizó una deshidratación del espécimen de piel con alcohol etílico durante un 1 minuto, luego se aclaró con tolueno y la peroxidasa endógena se neutralizó con peróxido de hidrógeno al 3% por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se siguió el proceso estándar mediante uso de un micrótopo para los cortes transversales de piel y la muestra se agregó en parafina fundida a 60 °C y se dejó en un horno, para luego dejarla solidificar a temperatura ambiente. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina para el análisis histológico.

Análisis de las láminas y clasificación según criterios establecidos: La clasificación histológica se realizó según una serie de criterios establecidos, de acuerdo con las etapas de regeneración considerando aspectos como ausencia de epidermis, fibras de colágeno, tejido de granulación, presencia de vasos sanguíneos, grosor de epidermis, paraqueratosis entre otros (Won-Serk et al, 2010). Dichos criterios se emitieron por un patólogo por el sistema de doble ciego.

Análisis estadístico: se analizó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos a los 4, 8 y 14 utilizando ANOVA en cada tiempo. Se calculó la normalidad, homocedasticidad e igualdad de los residuos de forma correspondiente. Se consideró significativo cuando $p < 0,05$.

8. Resultados

En un estudio previo (Castro y Morales, 2019), se utilizó el protocolo aislamiento de células indicado en este informe con la misma cepa de ratón, para identificar los marcadores característicos de ADSC, así como el potencial de diferenciación de las células aisladas. De esta manera se aseguraba trabajar con las células indicadas: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

Con respecto a la evaluación del andamio (Anexo 1), se observó que la dosis de irradiación gamma (para utilizarla como posible método de esterilización), incrementó las propiedades mecánicas de los geles de agarosa y que esta iba incrementando en el tiempo de gelificación (Figura 1.a). Una vez el gel solidificó luego de 50 minutos, es posible ver que las propiedades mecánicas cambiaron a sus valores (Figura 1.b).

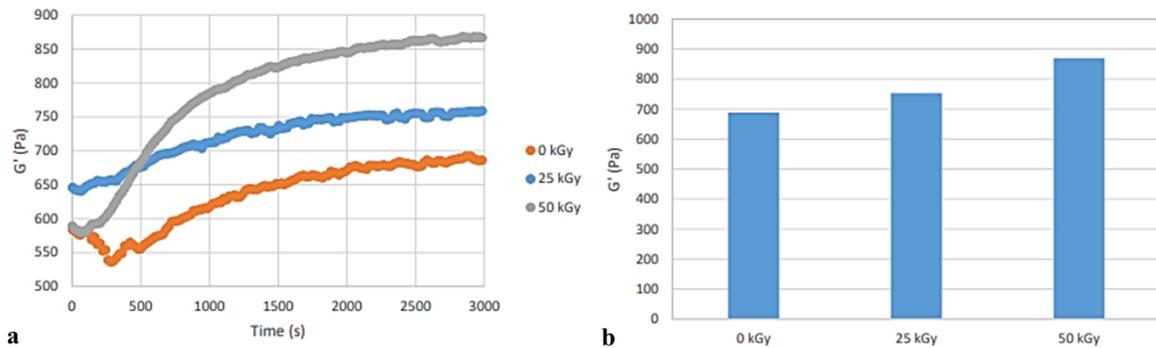


Figura 1. Módulo de Young para un gel de agarosa al 0,5% a) Durante la gelificación b) Después del gel formado (50 minutos) y estabilizado. **Fuente:** Informe preparado y enviado por la empresa Rheolution Inc. Por los costos de exportación solo se probó con una muestra

Para probar la efectividad de las ADSC, se determinó la tasa de cierre cada tres días en cada uno de los animales luego de aplicar los diferentes tratamientos. En este caso se obtuvo que, durante los primeros 4 días, la mayor tasa de cierre se obtuvo con el tratamiento de células madre en solución salina, sin embargo, esta no fue significativa (ANOVA, $p = 0,8941$), mientras que la menor tasa de cierre se obtuvo en el grupo tratado con el control positivo. Del día 4 al día 8, fue el control positivo el que presentó la mayor tasa de cierre, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (ANOVA, $p = 0,561$); el resto de los grupos se comportaron de manera muy similar durante ese mismo lapso. Del día 8 al día 13, hay un comportamiento muy homogéneo entre los tratamientos. Los primeros grupos en cerrar, día 14 posterior a la elaboración de la herida, fueron a los que se le aplicó sólo agarosa, sólo solución salina como control negativo y Nanogen como control positivo, un día después, el grupo tratado con ADSC cerró completamente la herida, finalmente, el último grupo en cerrar al 100% fue el tratado con las ADSC + agarosa (Figura 2). De manera general, no se pudo observar diferencias significativas en la tasa de cierre entre los diferentes tratamientos aplicados ($p > 0,05$).

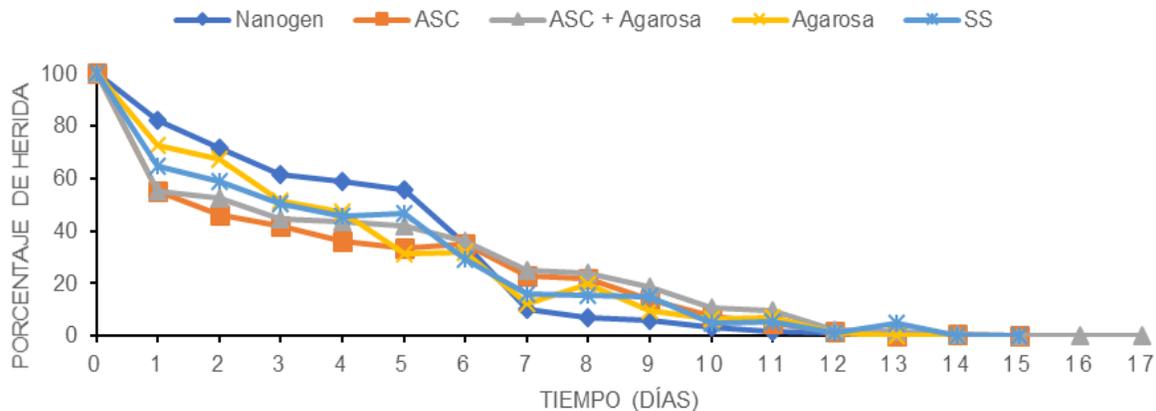


Figura 2. Promedio de la tasa de cierre de la herida de los diferentes grupos de ratones tratados con el producto comercial Nanogen Aktigel® (Nanogen) n=3, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en solución salina (ASC) n=6, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en un andamio de agarosa (ASC + Agarosa) n=6, un andamio de agarosa solo (Agarosa) n=4 y solución salina sin células (SS) n=3.

En general los animales no presentaron problemas mayores a nivel de dolor o comportamiento, a excepción de dos animales (tratamiento con sólo agarosa) a los cuales se tuvo que aplicar eutanasia antes de terminar el tratamiento debido a una infección en la herida.

A nivel macroscópico, se pudo observar que las heridas de todos los tratamientos disminuyeron su diámetro a una velocidad similar (Figura 3), que se aceleraba una vez que se caía el Tegaderm® y se formaba el grano. Es importante destacar que algunos de los animales presentaban una leve molestia en los tratamientos que involucraban agarosa, lo cual se demostraba dado, que se intentaban quitar el recubrimiento antes que los demás animales, posiblemente debido a la sensación del andamio de agarosa sobre la herida.

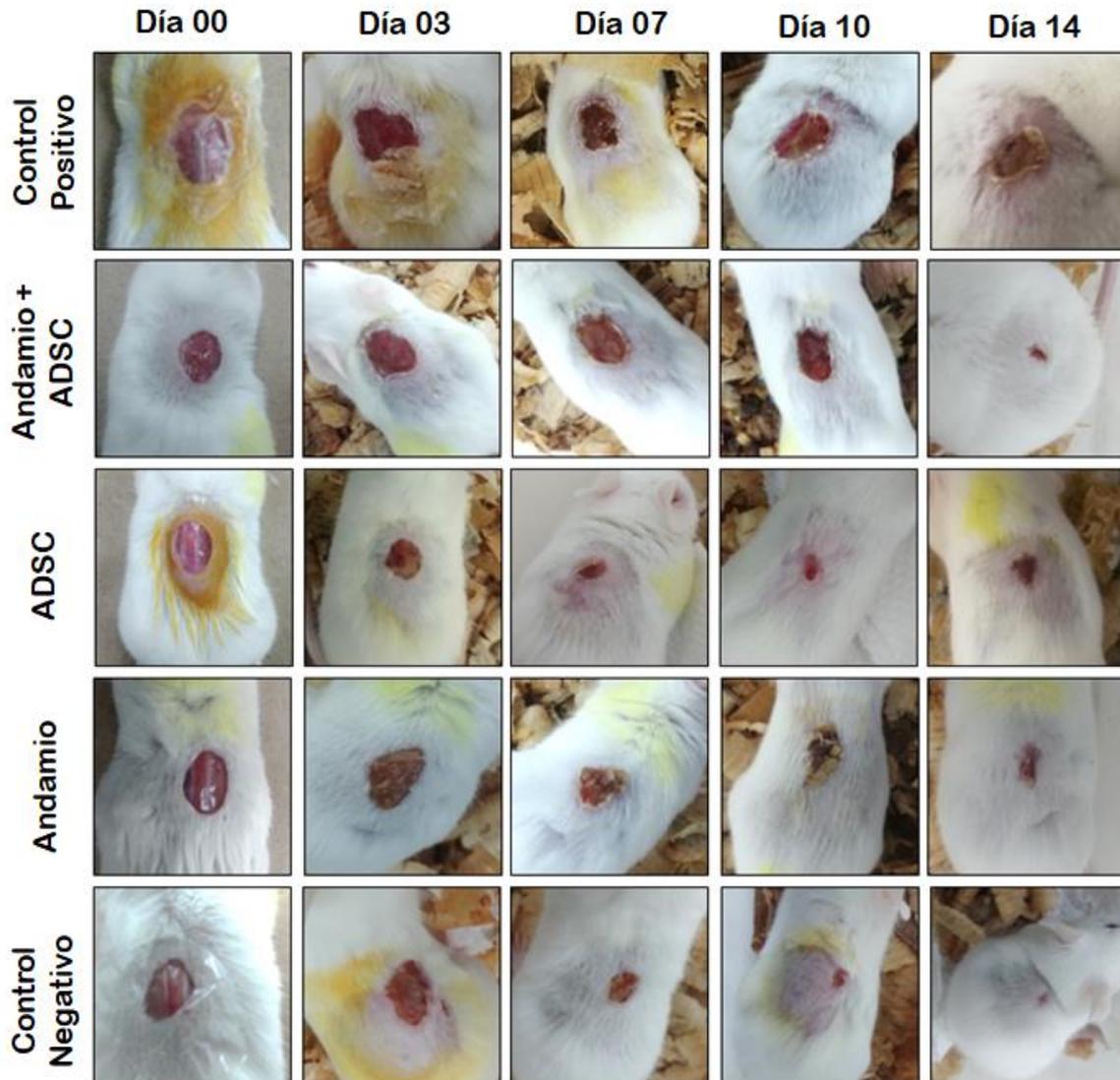


Figura 3. Avance del cierre de herida en el modelo animal según tratamiento: el producto comercial Nanogen Aktigel® (Control positivo) n=3, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en solución salina (ADSC) n=6, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en un andamio de agarosa (Andamio + ADSC) n=6, un andamio de agarosa solo (Andamio) n=4 y solución salina sin células (Control negativo) n=3.

Con respecto al análisis histológico (Cuadro 1 y Figura 4), se puede indicar que claramente hay presencia de diferentes patrones. La paraqueratosis e inflamación son los elementos más importantes que diferencia a los grupos. De forma general se observa que la inflamación es menor en los grupos que fueron tratados con ADSC y el control positivo. Además, la densidad de colágeno fue menor en el tratamiento con agarosa sola, mientras que, en los demás grupos, fue intermedia y abundante. Es importante resaltar que la presencia de paraqueratosis fue muy notable en el control negativo y en el grupo que fue tratado con agarosa sola.

Cuadro 1. Evaluación histológica de muestras de piel de ratones con los diferentes tratamientos: producto comercial Nanogen Aktigel® (Nanogen) n=3, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en solución salina (ASC) n=6, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en un andamio de agarosa (ASC + Agarosa) n=6, un andamio de agarosa solo (Agarosa) n=4 y solución salina sin células (SS) n=3.

Parámetros de evaluación	Tratamientos				
	Nanogen	ADSC + Agarosa	ADSC	Agarosa	SS
Inflamación	+	+	+	+++	++
Densidad de colágeno	+++	+++	++	+	++
Paraqueratosis	-	-	-	+	++
Reepitelización	++	++	++	++	++
Tejido de granulación	++	+	++	++	++
Cicatriz	Abultada (gruesa)	Intermedia	Muy pequeña	Amplia	Amplia (larga)

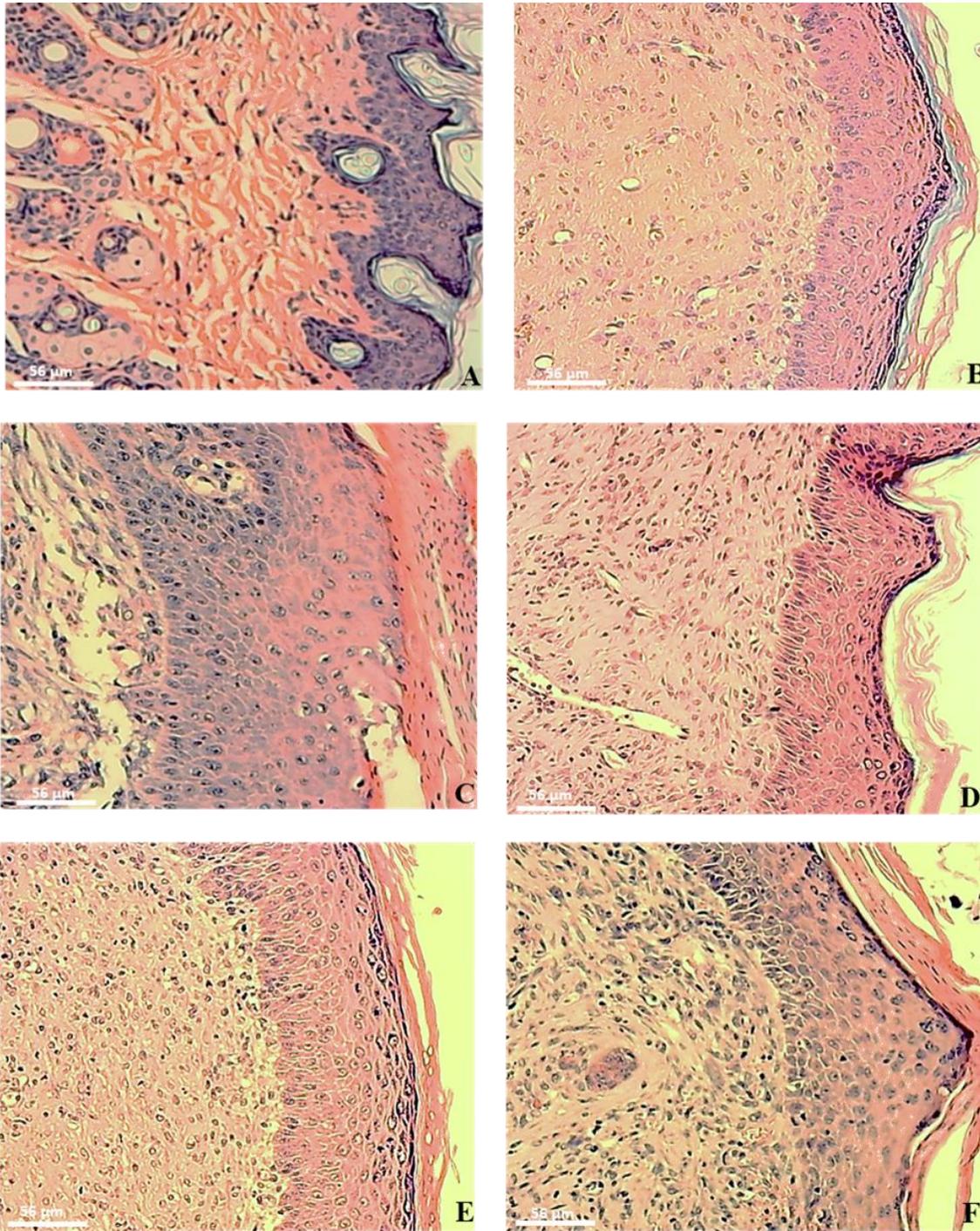


Figura 4. Cortes histológicos de muestras de piel de ratones con los diferentes tratamientos a) Piel sana, b) control positivo (Nanogen Aktigel®), c) control negativo (solución salina), d) células madre mesenquimales (ADSC), e) células madre mesenquimales en un gel de agarosa al 0,5% y f) gel de agarosa al 0.5%. Aumento 20X. Barra de escala 56 µm.

9. Discusión y conclusiones

Se ha visto a través de múltiples estudios que, dentro de la hipodermis o la capa subcutánea, las ASC participan en la homeostasis de la piel de manera autocrina, paracrina e incluso endocrina lo que influye a nivel de expresión genética para orquestar el comportamiento de los fibroblastos, queratinocitos, así como células del sistema inmune para modular la regeneración de piel (Gaur et al, 2017). Es entonces que, a partir de estas evidencias que las células mesenquimales aisladas de tejido adiposo (ASC) han sido ampliamente investigadas para desarrollar una terapia celular enfocada a la regeneración de la piel.

Existen diferentes estrategias que se han utilizado, como vía de administración de las células, por ejemplo, se han aplicado vía sistémica o bien por vía directa/local (Sorrel & Caplan, 2010; Hamou et al, 2009). En el caso de heridas que se generan en la piel, la aplicación local resulta mucho más sencilla y menos invasiva. Se puede hacer utilizando solución salina como vehículo para su inyección intradérmica, o bien para aplicación tópica. Uno de los principales problemas con esta última, es que su destino final muchas veces es incierto (Falanga et al, 2007).

Sorrell y Caplan (2010) reportan diferentes ensayos que utilizan colágeno y fibrina (moléculas propias de la matriz extracelular en este tejido) como andamios para inocular las células directamente en la herida, con resultados positivos. Cuando se utiliza un andamio, es importante considerar aspectos clave como la biocompatibilidad, así como las propiedades físicas y químicas, ya que las propiedades mecánicas de los sustratos para cultivos celulares pueden afectar la respuesta biológica (Barnes et al, 2017; Garzón et al, 2013).

En el presente caso se analizó las propiedades mecánicas del gel de agarosa elaborado, para utilizarlo como potencial andamio en la terapia celular. Tal y como se observó en los resultados, este parece depender de la temperatura y la dosis de irradiación. Los valores obtenidos del gel de agarosa al 0,5% se encuentran dentro del rango reportado por otros autores (Barnes et al, 2017; Grech, 2014; Mori et al, 2013), valores que también coinciden con algunas mediciones de la piel hechas a nivel *in vivo* e *in vitro* (Agache et al, 1980; Kaira et al, 2013), lo cual puede resultar prometedor desde esta perspectiva, sin embargo, es necesario analizar aún más propiedades físicas y mecánicas del gel y compararlas con la piel humana.

Ya que se está usando agarosa como un material que forma parte de la terapia celular para promover la regeneración, es importante tener modelos animales antes de pasar a las pruebas clínicas. Moreno-Jiménez y colaboradores (2018) mencionan que el uso de modelos animales en muchos casos aún es necesario para determinar la eficacia de terapias que usen materiales exógenos, antes de pasar a pruebas clínicas en seres humanos. De esta manera con el biomodelo se puede ayudar a verificar la reacción que el animal tendrá de manera local y sistémica ante el tratamiento, y además se generan

datos suficientes para ayudar a predecir parcialmente la manera en que se comportará el cierre de la herida una vez que se pase a pruebas en humanos.

En esta investigación el cierre completo de la herida se dio alrededor de los 14-16 días para los diferentes tratamientos evaluados, lo cual se mencionó anteriormente y puede ser observado en la figura 3. Estudios presentados por Kucharzewski y colaboradores (2019) en los que se utilizaban ADSC en diferentes modelos animales, presentaron el cierre completo de la herida alrededor de 2 semanas luego de realizada la cirugía; lo cual demuestra que el protocolo utilizado en esta investigación obtiene resultados similares a los reportados por otros autores; al menos en lo relacionado al tiempo de cierre de la herida.

Mehanna y colaboradores (2015), por ejemplo, utilizaron un modelo de herida de piel similar al descrito en este proyecto: aplicaron células madre mesenquimales derivadas de médula ósea de manera tópica, y evaluaron la regeneración de herida de manera funcional y microscópica. Los experimentos que realizaron estos autores mostraron tasas de regeneración sin diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos; pero a nivel histológico, aquellos que involucraban células madre mostraron una mejor calidad de tejido regenerado: con una mayor área cubierta por fibras de colágeno y una barrera epidérmica mejor formada.

Investigadores como James et al (2018), Martinello et al (2018) y Irons et al (2018), realizaron ensayos de regeneración en piel utilizando animales de mayor tamaño: un modelo de oveja Bergamasca utilizando células madre mesenquimales de sangre periférica, un modelo de cerdo diabético utilizando ADSC y un modelo de cerdo Yorkshire al cual se inyectó ADSC, respectivamente. En todos los modelos se encontró una mejora en los parámetros de regeneración al estudiar la expresión de marcadores, comparando a los controles negativos.

En este estudio, fue posible observar diferencias histológicas importantes en aquellos grupos que eran tratados con ADSC. Inicialmente, tal y como se observa en la Figura 4.d y 4.e. se observa menor cantidad de PMN y linfocitos dentro del tejido formado. Está bien documentado que las ADSC son capaces de disminuir la inflamación de manera paracrina (Lobardi et al, 2019). Si bien es cierto, durante la fase inicial de la regeneración es necesario el proceso inflamatorio, si este persiste durante más tiempo, se estimula la formación de tejido fibrótico, lo que se asocia con cicatriz y no con la restauración del tejido normal (Kumar et al, 2018). Es por lo tanto que, en esta etapa, la presencia de células proinflamatorias no representa un buen indicador de regeneración, sino más bien un proceso inflamatorio crónico. Estos mismos hallazgos coinciden con otros estudios realizador en roedores (Su et al, 2017), en cerdos (Irons et al, 2018), con células humana *in vitro* e *in vivo* (Taha et al, 2020) así como la aplicación en otras patologías inflamatorias (Ceccarelli et al, 2020).

Con respecto a la paraqueratosis, también fue otra característica destacada en este estudio. Es claramente visible la ausencia de paraqueratosis en los grupos tratados con ADSC en comparación con los demás tratamientos. En contraste con la piel normal, donde los queratinocitos mitóticamente activos y nucleados residen en las capas basales, los queratinocitos de las heridas crónicas sobrepasan las capas inferiores haciéndose presente en el estrato córneo de la piel resultado de la hiperproliferación de la epidermis y una desregulación de la diferenciación de ellos, presente también en enfermedades como psoriasis o bien dermatitis atípica (Pastar et al, 2014; Usui et al, 2013). De esta manera, la ausencia de paraqueratosis es indicador de un proceso de regeneración adecuado; este proceso de atenuación de la paraqueratosis por efecto de ADSC fue hallado por Kim y colaboradores en el 2018, en un modelo de ratón de dermatitis atípica.

La deposición de colágeno durante la regeneración es un evento que inicia entre el día 3 y 5 posterior a la herida y continua por algunas semanas dependiendo del tamaño de la herida, así como otros factores. Durante la reparación temprana el colágeno que se deposita es el III y posteriormente con forme el tejido se remodela y madura, cambia por colágeno tipo I. Durante estos eventos, hay un balance entre el depósito y la degradación de colágeno con el fin de que la cantidad sea moderada. Un exceso en la densidad de colágeno puede representar una fibrosis, mientras que ausencia puede ser perjudicial para el proceso de remodelación y regeneración de la piel (Kumar et al, 2018). En este caso fue posible observar que la cantidad densidad de colágeno varió entre los grupos: fue poca en el grupo tratado con agarosa, alta en el control positivo y el grupo tratado con células embebidas en agarosa, y moderada en el grupo tratado sólo con ADSC. En otros estudios se ha visto que las ADSC se han asociado con el incremento en la formación de tejido de granulación, así como la formación de matriz extracelular (deposición de colágeno), sin embargo, es importante considerar que para el caso de los roedores en general, estos mecanismos de reparación no son los predominantes, sino más bien la contracción (Bliley et al, 2016) por lo que, en este ensayo, la deposición de colágeno y el tejido de granulación, no se pueden considerar como indicadores sobresalientes o diferenciadores de la reparación tisular murina. Es importante destacar que tanto el depósito de colágeno como de ECM no solo es influenciada por los factores paracrinicos liberados por las ADSC sino que ellas mismas tienen esta capacidad de síntesis (Paganelli et al, 2020) factor importante en la regeneración de la piel en seres humanos.

Otro aspecto sobresaliente fue el hecho de que el tejido formado se ve más retraído y la cicatriz más pequeña en el grupo tratado con ADSC, aunque a nivel macro todas las heridas estaban complementemente cerradas. Esta retracción o contracción de la herida está dada por los miofibroblastos y favorece en diferente medida según la especie al cierre de la lesión durante la etapa final de la regeneración, lo

cual es un efecto deseado posiblemente inducido en parte por las ADSC (Kucharzewski et al, 2019; Li y Guo, 2018). Este efecto también ha sido reportado en la literatura por Dash y colaboradores (2009).

Los estudios mencionados, así como otros similares, enfatizan que, en este tipo de experimentos aparte de realizar un análisis histológico, requieren una evaluación de la expresión de marcadores moleculares asociados a diferenciación en las capas dérmica y epidérmica de la piel, así como otros biomarcadores que respalden la regeneración.

Kasap et al (2017) utilizaron un modelo diabético de ratón para generar heridas similares a úlceras, a las cuales se aplicó queratinocitos diferenciados a partir de células madre embrionarias (ESC) y de ADSC; los estudios que se realizaron fueron principalmente a nivel de marcadores moleculares para comparar la efectividad de ambas terapias celulares; y si bien se obtuvieron los mismos marcadores en ambos tratamientos, la estructura del tejido era más similar a la piel sana en el caso de queratinocitos obtenidos a partir de ESC.

Park y colaboradores (2015) así como Kim y colaboradores (2019) aseveran que el precondicionamiento hipóxico de las MSC, aumenta su potencial terapéutico. En sus estudios, las células se agruparon en clusters antes de ser aplicadas a la herida, lo cual mejoró el grado de neovascularización, reepitelización y regeneración encontrados; los datos recopilados sugieren que fue debido al aumento en la secreción de factores de crecimiento, lo cual se promueve gracias al agrupamiento celular. En los ensayos realizados para esta investigación, al usar agarosa como andamio para su inoculación se promueve el agrupamiento celular en el tratamiento correspondiente, lo cual a su vez conlleva a una mayor acumulación de factores de crecimiento en la zona de la herida, y con ello una mejor estructuración del nuevo tejido formado.

Casos de estudio presentados por Mendoza, Liu y Galiano (2018) muestran que incluso los factores de crecimiento encontrados en el tejido adiposo (sin pasar por la expansión de ADSC *in vitro*), podrían ayudar en la regeneración de diferentes etiologías en la piel y puede ser una alternativa para no utilizar las células directamente.

Por lo evidenciado en el presente estudio, se puede deducir que las ADSC contribuyeron a un mejor proceso de regeneración de la piel en este modelo murino de herida aguda.

10. Recomendaciones

Para obtener aún mayor evidencia, se recomienda realizar análisis de biomarcadores que apoyen las evidencias histológicas encontradas.

Debido a la gran heterogeneidad de estudios, así como de criterios de evaluación en regeneración, se recomienda elaborar una herramienta estandarizada, que sirva para evaluar de manera cualitativa los cambios histológicos de la piel murina.

11. Agradecimientos

Se le agradece a la VIE por su apoyo económico para la realización de este estudio (proyecto N°1510097) que representa un área de estudio de la Escuela de Biología, que podría tener un gran impacto a la sociedad costarricense.

12. Referencias

- Agache, P.; Monneur, C.; Leeque, J y de Rigal, J. (1980). Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo. *Arch Dermatol Res.*; 269:127–33.
- Alfaro, M. (2003). Quemaduras. Unidad Nacional de Quemados. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/quemaduras.pdf>
- Averbeck, M.; Gebhardt, C.; Voigt, S.; Beilharz, S.; Anderegg, U. et al. (2007). Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* 127: 687– 697
- Barnes, J.; Przybyla, L y Waever V. (2017). Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. *Journal of Cell Science* .130, 71-82 p doi:10.1242/jcs.1917
- Bliley, J.; Argenta, A.; Satish, L.; McLaughlin, M.; Dees, A.; Tompkins, C.; Marra, K. y Rubin, P. (2016). Administration of adipose-derived stem cells enhances vascularity, induces collagen deposition, and dermal adipogenesis in burn wounds. *Burns*; 42(6): 1212 - 1222. doi: 10.1016/j.burns.2015.12.007
- Castro-Piedra, S., & Morales-Sánchez, J. (2019). Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo del pliegue inguinal murino: un protocolo para obtener lo mejor de pequeñas muestras. *Revista Tecnología En Marcha*, 32(4), 69-80. doi.org/10.18845/tm.v32i4.4793

- Ceccarelli, S.; Pontecorvi, P.; Anastasiadou, E.; Napoli, C. y Marchese, C. (2020). Immunomodulatory Effect of Adipose-Derived Stem Cells: The Cutting Edge of Clinical Application. *Front Cell Dev Biol.*, 8(236). 1-12. doi.org/10.3389/fcell.2020.00236.
- Cerqueira, M.; Pirraco, R.; Santos, T.; Rodrigues, D.; Frias, A.; Martins, A. et al. (2013). Human adipose stem cells cell sheet constructs impact epidermal morphogenesis in full-thickness excisional wounds. *Biomacromolecules* ;14:3997–4008
- Cerqueira, M.; Pirraco, P. y Marques, A. (2016). *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 1;5 (4) :164-175.
- Chan, R.; Zamora, D.; Wrice, N.; Baer, D.; Renz, E.; M.; Christy, R. y Natesan, S. (2012). Development of a vascularized skin construct using adipose-derived stem cells from debrided burned skin. *Stem Cells Int.* 2012; 2012.
- Chen, S.; Fitzgerald, W. y Zimmerberg, J et al. (2007). Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions regulate embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells*. Mar;25 (3):553-61
- Dash, N.; Dash, S.; Routray, P.; Mohapatra, S. y Mohapatra, P. (2009). Targeting nonhealing ulcers of lower extremity in human through autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Rejuvenation Res.* 12, 359-366.
- Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, Shrayder D, Carson P. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng.* 2007;13:1299–1312.
- Garzón, I.; Miyake, J.; González-Andrades, M.; Carmona, R.; Carda, C.; Sánchez-Quevedo, M.; Campos, A. y Alaminos M. 2013. Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem Cells Trans Med* ; 2 (8):625-32
- Gaur, M; Dobke, M. y Lunyak, V. (2017). Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue in Clinical Applications for Dermatological Indications and Skin Aging. *Int J Mol Scie.*: 18(1). 1-29. doi:10.3390/ijms18010208
- Gnecchi, M. (Ed.) (2016). *Mesenchymal Stem Cells. Methods and Protocols.* Segunda Edición. Nueva York, Estados Unidos. Springer Nature.
- Grench, D. 2014. Development of a Quasi-concertina MEMS sensor for the characterisation of biopolymers. Tesis de doctorado. Universidad de Southampton.
- Hassan, W.; Greiser, U. y Wang, W. (2014). Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen.*; 22 (3):313-25.
- Hamou C, Callaghan MJ, Thangarajah H, Chang E, Chang EI, Grogan RH, Paterno J, Vial IN, Jazayeri L, Gurtner GC. Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization. *Plast Reconstr Surg.* 2009;123:45S–55S.

- Irons, R.F., Cahill, K.W., Rattigan, D.A., Marcotte, J.H., Fromer, M.W., Chang, S., Zhang, P., Behling, E.M., Behling, K.C., Caputo, F.J., 2018. Acceleration of diabetic wound healing with adipose-derived stem cells, endothelial-differentiated stem cells, and topical conditioned medium therapy in a swine model. *J Vasc Surg.* 68:115S–125S. doi: 10.1016/j.jvs.2018.01.065.
- James, I., Bourne, D., Silva, M., Havis, E., Albright, K., Zhang, L., Kostereva, N., Wang, S., DiBernardo, G., Guest, R., Lei, J., Almadori, A., Satish, L., Marra, K., Rubin, J.P., 2018. Adipose stem cells enhance excisional wound healing in a porcine model. *J Surg Res.* 229, 243-253.
- Kaira, J.; Lowe, A y Al Jumaily, A. (2016). An Overview of Factors Affecting the Skin's Young's Modulus. , *J Aging Sci.*; 4 (2). 1-5. doi: 10.4172/2329-8847.1000156.
- Kasap, S., Barutcu, A., Gu, H., Yazgan, S., Kivanc, M. & Vatansever, S. Effects of keratinocytes differentiated from embryonic and adipogenic stem cells on wound healing in a diabetic mouse model. *Wounds Journal* 2017; 29 (11): 333-339.
- Kim, H., Hyun, M. R., & Kim, S. W. (2019). The Effect of Adipose-Derived Stem Cells on Wound Healing: Comparison of Methods of Application. *Stem cells international*, 2019, 2745640. doi.org/10.1155/2019/2745640
- Kim, M.; Lee, S.; Kim, Y.; Kwon, Y, Park, Y.; Lee, H, Suk, H y Jeoung, D. (2018). Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Atopic Dermatitis by Regulating the Expression of MIP-2, miR-122a-SOCS1 Axis, and Th1/Th2 Responses. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1175. Doi.org/10.3389/fphar.2018.01175
- Kucharzewski, M., Rojczyk, E., Wilemska-Kucharzewska, K., Wilk, R., Hudecki, J. & J. Los, M. Novel trends in application of stem cells in skin wound healing. *European Journal of Pharmacology.* 2019, 843: 307-315
- Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C., & Perkins, J. A. (2018). *Robbins basic pathology (Décima Edición)*. Philadelphia: Elsevier.
- Lewandrowski, K.; Wise, D.; Trantolo, D.; Gresser, J.; Yaszemski, M.; y Altobelli, D. (Eds). (2008). *Tissue engineering and biodegradable equivalents. Scientific and clinical applications.* Marcel Dekker, New York, pp 237–266.
- Li, P., Guo, X. A review: therapeutic potential of adipose-derived stem cells in cutaneous wound healing and regeneration. *Stem Cell Res Ther* 9, 302 (2018).
- Lo Furno D, Mannino G, Cardile V, Parenti R, Giuffrida R. (2016). Potential Therapeutic Applications of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.*

- Lombardi, F.; Palumbo, P.; Augello, F.; Cifone, M.; Cinque, B.; & Giuliani, M. (2019). Secretome of Adipose Tissue-Derived Stem Cells (ASCs) as a Novel Trend in Chronic Non-Healing Wounds: An Overview of Experimental In Vitro and In Vivo Studies and Methodological Variables. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3721. doi.org/10.3390/ijms20153721
- Martinello, T., Gomiero, C., Perazzi, A., Iacopetti, I., Gemignani, F., DeBenedictis, G.M., Ferro, S., Zuin, M., Martines, E., Brun, P., Maccatrozzo, L., Chiers, K., Spaas, J.H., Patruno, M., 2018. Allogeneic mesenchymal stem cells improve the wound healing process of sheep skin. *BMC Vet Res.* 14, 202.
- Mehanna, R.A., Nabil, I., Attia, N., Bary, A.A., Razek, K.A., Ahmed, T.A.E. & Elsayed, F. The effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and their conditioned media topically delivered in fibrin glue on chronic wound healing in rats, *BioMed Research International*. 2015: 12pp.
- Mendoza R, Liu J, Galiano R. Adipose-derived allograft injectable filler as an alternative treatment for chronic wounds: case series. Poster presented at: Symposium on Advanced Wound Care Fall; November 2-4, 2018; Las Vegas, NV.
- Mori, Y; Kanazawa, S.; Watanabe, M.; Suenaga, H.; Okubo, K.; Nagata, S.; Fujihara, Y....Hoshi,K. 2013. Usefulness of Agarose Mold as a Storage Container for Three-Dimensional Tissue-Engineered Cartilage. *Materials Sciences and Applications*. 4, 73-78 p. doi: 10.4236/msa.2013.48A010.
- Morales, O. (2006). Fisiología celular de las células madre. Ed. Ucimed. 1 Ed. P 25.
- Moreno-Jiménez, I., Hulsart-Billstrom, G., Lanham, S. et al. The chorioallantoic membrane (CAM) assay for the study of human bone regeneration: a refinement animal model for tissue engineering. *Sci Rep* 6, 32168 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep32168>
- Nettel, F.; Rodríguez, N.; Nigro, J.; Gonzales, M.; Conde, A. et al. (2013). Primer consenso latinoamericano de úlceras venosas. *Rev Mex Angiol* 41(3): 95-126.
- Paganelli, A.; Benassi, L.; Rosi, E y Magnoni, C. (2020). Extracellular matrix deposition by adipose-derived stem cells and fibroblasts: a comparative study. *Archives of Dermatological Research* 312, 295–299. doi.org/10.1007/s00403-019-01997-8
- Park, I. S.. Chung, P.S. & Ahn, J.C. Adipose-derived stromal cell cluster with light therapy enhance Q5 angiogenesis and skin wound healing in mice. *Biochemical and Biophysical research communications*. 2015. 462; 3(3): 171-177.
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N. C., Ramirez, H., Nusbaum, A. G., Sawaya, A., Patel, S. B., Khalid, L., Isseroff, R. R., & Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in Wound Healing: A

- Comprehensive Review. *Advances in wound care*, 3(7), 445–464.
doi.org/10.1089/wound.2013.0473
- Porada, C. y Almeida-Porada G. 2010. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics and Vehicles for Gene and Drug Delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 30; 62(12): 1156–1166.
- Rodriguez, J.; Boucher, F.; Lequeux, C.; Josset-Lamaugarny, A.; Rouyer, O.; Ardisson, O.; Rutschi, H.; Sigaudou-Roussel, D.; Damour, O. y Mojallal, A. (2015). Intradermal injection of human adipose-derived stem cells accelerates skin wound healing in nude mice. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Dec 8;6:241.
- Rohban, R., & Pieber, T. R. (2017). Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells International*. Volume 2017.
- Rustad, K.; Wong, V.; Sorkin, M.; Glotzbach, J.; Major, M.; Rajadas, J. et al. (2011). Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. *Biomaterials*; 33:80–90
- Shingyochi, Y.; Orbay, H. y Mizuno, H. (2015). Adipose-derived stem cells for wound repair and regeneration. *Expert Opin Biol Ther*; 15 (9):1285-92.
- Sorrell, J. M., & Caplan, A. I. (2010). Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem cell research & therapy*, 1(4), 30. <https://doi.org/10.1186/scrt30>
- Steinhoff, G. (2011). “Regenerative Medicine - from Protocol to Patient.”. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine*, 7(1), 57–58.
- Steintraesser, L.; Hirsch, T.; Schulte, M.; Kueckelhaus, M., Jacobsen, F. et al. (2012). Innate defense regulator Peptide 1018 in wound healing and wound infection. *PLoS One* 7: e39373.
- Su, N.; Gao, P.; Wang, K.; Wang, J.; Zhong, Y. y Luo, Y. (2017). Fibrous scaffolds potentiate the paracrine function of mesenchymal stem cells: A new dimension in cell-material interaction. *Biomaterials*.141:74–85. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.06.028.
- Taha, S.; Volkmer, E.; Haas, E.; Alberton, P.; Straub, T.; David, D.; Aszodi, A.; Giunta, R. y Saller, M. Differences in the Inflammatory Response of White Adipose Tissue and Adipose-Derived Stem Cells. *Int J of Mol Sci.*, 21(3), 1086. doi.org/10.3390/ijms21031086
- Usui, M. L., Underwood, R. A., Fleckman, P., & Olerud, J. E. (2013). Parakeratotic corneocytes play a unique role in human skin wound healing. *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), 856–858. doi.org/10.1038/jid.2012.352
- Won-Serk, K.; Byung-Soon, P.; Johg-Hyuk, S.; Jun-Mo, Y.; Seok-Beom, P.; Sahng-June, K.; Jeong-Soo, P. (2007). Wound healing effect of adipose derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*. 48: 15-24

Zuk, P.; Zhu, M.; Mizuno, H. et al. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*; 7(2):211–228.

Zuk, P.; Zhu, M.; Ashjian, P. De Ugarte, D. et al. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 13(12):4279–4295.

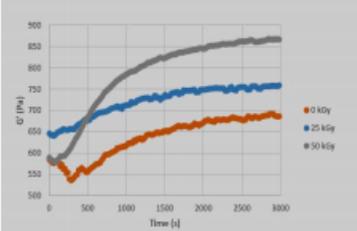
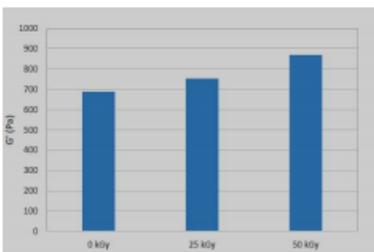
Anexo 1. Informe de actividades correspondientes a la evaluación del andamio de agarosa realizado por el PhD. Ricardo Starbird, memorando enviado a la VIE CIB-235-2020

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN
DIRECCIÓN DE PROYECTOS

INFORME DE ACTIVIDADES DE PROYECTOS INVESTIGACIÓN

Código del Proyecto: 1510097
Nombre del proyecto o actividad: Determinación de la tasa de regeneración en heridas cutáneas aplicando células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en un andamio de origen biológico.
Departamento Académico: Escuela de Biología.
Investigador(a) responsable: Dr. rer. nat. Miguel Rojas Ch.
Otros investigadores: Ing. Silvia Castro Piedra
 Ing. Johan Morales Sánchez
Período: 2018-2019

CUADRO DE OBJETIVOS Y ACTIVIDADES

Objetivo general: Evaluar el potencial regenerador de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, inoculadas en un polímero natural, aplicado sobre una herida aguda de piel, en un modelo animal.					
Objetivo específico	Actividad	Fecha	% avance	Productos	Comentarios
1. Desarrollar un andamio biológico con características físico-químicas idóneas para mantener viables las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.	Evaluación físico-química del andamio	II Sem 2018	100%	 <p>Figura 1. Respuesta de las muestras irradiadas empleando el equipo ElastoSens Bio2.</p>  <p>Figura 2. Módulo final obtenido para cada muestra empleando el equipo ElastoSens Bio2.</p>	<p>Con los resultados enviados por la empresa (<i>anexo 1</i>) se puede apreciar un aumento del módulo en las muestras irradiadas, lo cual es muy para modular la respuesta mecánica del andamio.</p> <p>La metodología empleada por los equipos de Rheolution es muy especializada y debe compararse con equipos estándares en el campo y era de nuestro interés confirmar el comportamiento a nanoescala.</p>