



Rol de TRPV1 frente a la muerte celular inducida por estrés oxidativo en cultivos primarios de células madre adultas.

CANDIDATO AL GRADO DE MAGÍSTER:

Claudio Eduardo Córdova Lepe

*Magíster en ciencias, mención
"Radicales libres en biomedicina".*

DIRECTOR DE TESIS:

Pablo Esteban Olivero Rebolledo

Facultad de medicina

Universidad de Valparaíso.

INDICE

1. RESUMEN..... 2

2. ABSTRACT..... 3

3. INTRODUCCIÓN..... 4

4. HIPÓTESIS..... 10

5. OBJETIVOS..... 10

6. METODOLOGÍA..... 10

7. RESULTADOS..... 17

8. DISCUSIÓN..... 22

9. CONCLUSIONES..... 25

10. ANEXOS..... 26

11. REFERENCIAS..... 29

1. RESUMEN

En el organismo, tanto en el daño agudo como en las enfermedades degenerativas se produce una muerte masiva de células que componen los epitelios de tejidos como la piel, músculo cardíaco, vasos sanguíneos y epitelios sensoriales. En respuesta a este daño el organismo puede reparar mediante la cicatrización, o en el mejor de los casos regenerar en gran parte el tejido volviendo a su estado original. Actualmente se busca favorecer la regeneración de epitelios dañados y recuperación de su funcionalidad mediante la utilización de células madre adultas provenientes principalmente de grasa subcutánea, pulpa dentaria y encía siendo esta última la de mayor utilidad en injertos. Sin embargo la condición de estrés oxidativo generado en el tejido dañado, no permite la supervivencia del porcentaje suficiente de células madre para su adecuada proliferación, diferenciación y producción de factores que modulan la angiogénesis y re-inervación. En este contexto se ha informado que la expresión de canales de membrana de la familia TRP hallados en células sensoriales, tejido conjuntivo y variados tipos celulares incluidas células madre adultas, es fundamental en la regulación de funciones celulares frente a perturbaciones del medio externo. Particularmente TRPV1 cumple un rol principal en la protección celular contra el estrés oxidativo en variadas localizaciones del daño. El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol de TRPV1 frente a la muerte celular inducida por H_2O_2 en células madres adultas, provenientes de encía. Para ello se evaluó la pureza e identidad de cultivos primarios de células madre, se caracterizó la expresión de TRPV1, y mediante técnicas farmacológicas se determinó el rol de su activación frente a la muerte inducida por estrés oxidativo *in vitro*.

Los datos obtenidos mostraron por inmunofluorescencia y RT-PCR que TRPV1 se expresa en células madre provenientes de encías humanas. Además mediante la medición tanto de la función mitocondrial como de la integridad de la membrana celular, se demostró que Capsaicina, agonista exógeno de TRPV1, promueve resistencia a la muerte celular inducida por H_2O_2 , efecto revertido por Capsazepina, un antagonista del canal. Se espera continuar con el desarrollo de este modelo para entender si esta estrategia permitirá mejorar la calidad de injertos con células madre adultas, y potenciar la regeneración endógena de tejidos dañados por el estrés oxidativo provocado en la isquemia-reperfusión.

2. ABSTRACT

In Organism, both acute damage and degenerative diseases massive death of cells that make up the lining of tissues such as skin, heart muscle, blood vessels and sensory epithelia occurs. In response to this damage, the tissue can be repaired through cicatrization, or at best scenery, largely regenerate the tissue back to its original state. Currently it seeks to promote the regeneration of damaged epithelia and retrieval functionality through the use of adult stem cells mainly from subcutaneous fat, dental pulp and gingiva latter being the most useful grafts. However the condition of oxidative stress generated in damaged tissue, does not allow sufficient percentage survival of stem cells suitable for proliferation, differentiation and production of factors that modulate angiogenesis and reinnervation. In this context it has been reported that the expression of TRP membrane channels family, found in sensory cells, connective tissue and many cell types including adult stem cells, is essential in regulating cellular functions against external environmental disturbances. Particularly TRPV1 plays a major role in cellular protection against oxidative stress damage in various locations. The objective of this work was to study the role of TRPV1 in front of the H₂O₂-induced cell death in adult stem cells. For it the purity and identity of primary stem cell cultures was evaluated, the expression of TRPV1 was characterized, and by pharmacological techniques the role of TRPV1 activation front the *in vitro* oxidative stress induced cell death was determined.

The data obtained showed by immunofluorescence and RT-PCR that TRPV1 is expressed in human stem cells from gingiva. Additionally by measuring both mitochondrial function and the integrity of the cell membrane, it was shown that Capsaicin, exogenous TRPV1 agonist, promotes resistance to cell death induced by H₂O₂, an effect reversed by Capsazepine, channel antagonist. We hope to continue the development of this model to understand whether this strategy will improve the quality of adult stem cell grafts, and enhancing the endogenous regeneration of damaged tissue caused by oxidative stress in ischemia-reperfusion.

3. INTRODUCCIÓN

En humanos, la pérdida de las células que componen el tejido epitelial y sensitivo por enfermedades degenerativas, pérdida de la irrigación sanguínea o daño directo es el principal evento que busca revertir la medicina regenerativa actual ¹. Independiente del tipo y magnitud del daño, todo tejido desarrolla procesos fisiológicos que culminan con la recuperación parcial o completa través de dos vías posibles. Por una parte la “regeneración” es la formación de tejido específico en el órgano dañado a través de la diferenciación *de novo* de células troncales, este proceso se lleva a cabo en injurias superficiales, en epitelios mucosos y durante la vida intrauterina ². En cambio la “reparación” es una estrategia inespecífica de recuperación del tejido adulto que consiste en la formación de una cicatriz, con cambios en la distribución del tejido conectivo y sin recuperación de los anexos funcionales como células secretoras y sensitivas. Lo anterior implica entonces, que la herida madura en el adulto se caracteriza por ser acelular, avascular y sin propiedades motoras/sensitivas ³. En el daño por isquemia reperfusión en músculo cardíaco y musculatura lisa intestinal por ejemplo, hay pérdida parcial a total de la motilidad en la cicatriz básicamente por daño irreversible en miocitos y neuronas de las placas motoras ^{4,5}. En la pérdida de la audición, el daño agudo o crónico sobre el epitelio sensitivo coclear implica degeneración invariable de neuronas de ganglio espiral (SGNs) y muerte de células ciliadas (HC) ^{6,7}. También el daño profundo en la piel por quemadura o isquemia violenta implica un extenso proceso de cicatrización que concluye con la modificación del tejido de manera que se pierde la sensibilidad mecánica y térmica, la capacidad de secretar y las propiedades básicas del epitelio córneo como la defensa frente a radiación UV y la producción de vitamina D ².

Utilización de células madre mesenquimales en terapia celular.

Actualmente la terapia celular pretende favorecer la regeneración por sobre la reparación en todos los tipos de daño mencionados, ya que mediante la utilización de

células madre es posible el restablecimiento funcional del epitelio y la reconexión con la maquinaria motora/sensitiva del sistema nervioso periférico, así también de la red de vascularización normal ⁸⁻¹⁰. Una célula madre es una célula troncal que cumple con dos criterios básicos: capacidad de auto renovarse mediante división celular manteniendo su estado indiferenciado, y capacidad de diferenciarse a cualquier linaje de célula madura, tales como células epiteliales y neuronas sensitivas ¹¹. Las células madre se subdividen en varios tipos dependiendo de su potencial de diferenciación y tejido de origen siendo las células madre mesenquimales (MSCs) las más utilizadas en la terapia regenerativa de epitelios como la piel debido a su mayor abundancia y fácil manipulación ¹². En general una MSC es una célula adherente a plástico, morfológicamente similar a un fibroblasto y con un fenotipo de membrana característico que incluye la expresión de CD105, CD44, CD90 y la ausencia de marcadores hematopoyéticos y linfoides como CD45 y CD34 ¹³, sus principales fuentes de aislamiento son médula ósea, grasa subcutánea y encía siendo esta última fuente la que presenta mejores características en cuanto a abundancia de células, proliferación y supervivencia frente a estrés ¹⁴. La inmuno-caracterización más aceptada de células madres mesenquimales se basa, en parte, en la expresión diferencial de marcadores de superficie celular: Por ejemplo, MSC de grasa y tejido gingival (MSC-GT), expresan CD44 y CD105. CD44 es una glicoproteína transmembrana funcional en la adhesión celular con los componentes de la matriz y CD105 o endoglina es una glicoproteína transmembrana expresada en endotelios proliferantes (reparación de heridas y tejido embrionario). Además, no expresan el marcador linfocitario común (CD45) y el antígeno de célula hematopoyética (CD34) ^{13,15}.

En el daño profundo de piel la utilización de trasplantes con MSCs en matrices de colágeno, o en medios celulares enriquecidos contribuye directamente a la re-epitelización y restablecimiento de los fibroblastos del tejido conectivo debido a la gran capacidad de proliferación y diferenciación de estas células y sobre todo su gran capacidad secretora e inmunomoduladora ^{16,17}. Las MSCs secretan una amplia gama de factores que regulan la respuesta inmune frente a la injuria y aceleran los procesos de remodelación de la matriz colagenosa y angiogénesis ^{18,19}. Si bien no se ha estudiado su participación directa en la re-inervación de la piel, algunos trabajos señalan que el

trasplante autólogo de MSCs puede acelerar en ratas la recuperación del nervio ciático frente a la regresión por daño agudo ²⁰. Por otra parte se ha demostrado que el implante de MSCs en suspensión directamente sobre el epitelio coclear de ratas con daño inducido por Gentamicina, promueve la reinervación mediante la diferenciación de progenitores neurales y aumento de las proyecciones de SGNs remanentes ^{6,21}.

Limitantes fisiopatológicas en terapia celular: estrés oxidativo.

Bajo el contexto fisiopatológico del daño epitelial, la terapia celular debe lidiar con varios problemas como los procesos inflamatorios agudos, la hipoxia, isquemia/reperfusión y la subsecuente generación de estrés oxidativo ²². En términos generales el estrés oxidativo consiste en un gran aumento en la producción interna de especies reactivas del oxígeno (ROS), y/o una gran disminución en la capacidad reductora de pares redox como el glutatión o enzimas como catalasa ²³. El estrés oxidativo puede causar muerte celular programada, y una oxidación moderada y permanente causa falla metabólica lo que conlleva a envejecimiento, mientras que si la oxidación es muy intensa se pueden desencadenar varias aberraciones celulares a nivel de biomembranas y ADN, que terminan en muerte celular de tipo autofágica o accidental ²⁴, de esta manera frente a cualquier tipo de injuria las especies reactivas del oxígeno favorecen el predominio de la muerte celular por sobre la regeneración, además disminuyen la capacidad de proliferación, diferenciación, migración y viabilidad de MSCs implantadas en el tejido dañado, y favorece la formación de tumores por daño acumulativo en ADN ¹. Actualmente la muerte masiva de las células madre trasplantadas, crecimiento descontrolado en el tejido hospedero, y disminución drástica de la capacidad migratoria al sitio dañado son las principales problemáticas de la terapia celular, y su causa central se atribuye al ambiente oxidativo del tejido dañado ²⁵.

En este escenario actualmente los investigadores buscan alternativas para mejorar la eficiencia del implante con MSCs frente al daño y favorecer la regeneración por sobre la reparación, para ello la búsqueda de fuentes de obtención con mayor tasa proliferativa y de resistencia al estrés como las MSCs provenientes de tejidos dentales

²⁶, y la utilización de factores proangiogénicos y potenciadores de la respiración celular se han hecho frecuentes ^{8,27}. Más recientemente se ha comenzado a estudiar el rol de canales iónicos de membrana involucrados directamente en control homeostático de la célula. Por otra parte se sabe de la existencia de canales tipo TRP, y que estos canales son capaces de potenciar la actividad de varios tipos de MSCs, por ejemplo la entrada de Ca^{2+} mediada por TRPC1 y TRPC5 promueve la diferenciación de varios tipos de células madre estromales ²⁸, mientras que TRPM7 es crítico para la supervivencia de MSC de médula de ratón ²⁹. En particular, la expresión y activación de TRPV1 y TRPV2 se ha asociado a varios escenarios de protección frente a estrés. En hipocampo y *sustancia nigra* su activación previene la muerte celular por daño oxidativo ³⁰. Junto a TRPV2 en corazón, su actividad controlada por bajas dosis de su agonista Capsaicina, regulan el pulso cardíaco y la presión coronaria disminuyendo el área de infarto en eventos de isquemia-reperfusión, efecto que es revertido por su agonista clásico Capsazepina ³¹. Las MSCs expresan una amplia variedad de canales iónicos funcionales, entre los cuales destacan algunos TRP del tipo C y M. La entrada de Ca^{2+} mediada por TRPC1 y TRPC5 promueve la diferenciación de varios tipos de células madre estromales ²⁸, mientras que TRPM7 es crítico para la supervivencia de MSC de médula de ratón ²⁹. En cuanto a TRPV1 se ha reportado su expresión en MSCs provenientes de grasa, y su posible implicancia en los procesos que favorecen la migración celular ³², y también se ha asociado con la proliferación de MSCs en la porción estromal de la médula ósea ³³. Se ha descrito que este canal abunda hacia la pulpa dentaria y ligamento periodontal, y estaría implicado en la sensación del dolor, así como también en procesos asociados a la diferenciación de odontoblastos ^{34,35}.

TRPV1 y la muerte celular frente al estrés.

Este canal receptor de potencial transitorio, es un canal catiónico no selectivo altamente sensible a los cambios de temperatura en el medio por lo que comúnmente es llamado como canal sensor de temperatura, sin embargo es sensible también a los cambios de pH y cambios en los gradientes electroquímicos ³⁶. Desde el punto de vista farmacológico son los más preponderantes de los TRP y se expresan

principalmente en testículo y neuronas de los ganglios basales asociado a su función en las fibras sensoriales de la piel detectando estímulos térmicos y del dolor, además son ligando principalmente para los capsaicionides y canabionides. Los capsaicinoides son compuestos presentes en los frutos del *Capsicum Annum* (guindilla o ají) siendo el prototipo la Capsaicina ³⁷. El ají se usa culinariamente por su fuerte sabor picante y en la medicina tradicional como estimulante del apetito, para el tratamiento de las úlceras gástricas y el reumatismo y para aliviar el dolor de dientes. El hecho de que la Capsaicina muestra una cierta selectividad hacia determinadas fibras sensoriales llevó al descubrimiento del receptor específico, el TRPV1, que juega un importante papel en la percepción de la temperatura, del dolor y de muchos tipos de prurito, así también se descubrió que Capsazepina es un inhibidor específico de este canal ³⁸. Además TRPV1 está altamente expresado en testículo y su función ha sido descrita en la capacitación espermática ³⁹, regulado no solo por las variaciones de pH ⁴⁰, sino también por la temperatura crítica y la producción de ROS en procesos como la aromatización andrógena para la producción de estrógenos en células de Sertoli ⁴¹. Los sitios activos de TRPV1 modulados por las condiciones Redox están localizados tanto en el extracelular como en el intracelular y tanto su estado oxidado o reducido pueden aumentar la sensibilidad del canal a otros estímulos ^{42,43}. Se ha descrito además que la actividad de TRPV1 puede ser inhibida por bajas concentraciones crónicas de 17 β -estradiol por un mecanismo no clásico de modulación por receptores estrogénicos movilizados a la membrana plasmática neuronal, lo que sugiere que la activación endógena de TRPV1 puede ser vía estrogénica, encaminando muchos de los estudios de la actividad del TRPV1 en el marco biológico de la espermatogénesis y la actividad neuronal del hipocampo ⁴⁴.

La activación de TRPV1 mediante altas dosis de Capsaicina y condiciones ácidas con pH alrededor de 5.5, inducen un aumento considerable del calcio citoplasmático, producción de radicales libres de oxígeno, alteraciones de la producción energética, estrés en retículo endoplásmico y reducción de la viabilidad celular ⁴⁵. La activación descontrolada de TRPV1 desencadena la muerte celular apoptótica en células de la corteza cerebral vía apertura de canales de Ca²⁺, fosforilación de dímeros ERK y producción de ROS ⁴⁶, así también ocurre en pulmón donde se provoca estrés del

retículo endoplásmico ⁴⁷. En espermatoцитos estudiados in vitro, la activación de TRPV1 por altas dosis de Capsaicina (>500nM) también afecta la viabilidad celular induciendo apoptosis ⁴⁸. Sin embargo estudios realizados bajo las condiciones proporcionadas por la esteroidogénesis en testículo de ratón señalan que cuando Capsaicina está presente en bajas concentraciones (<500nM) previene la muerte celular inducida por la torsión testicular (criptorquidia) que a su vez produce un aumento en la temperatura testicular con daño oxidativo que inhabilita los mecanismos antioxidantes aumentando la producción normal de ROS llevando a infertilidad parcial o completa. Los ratones en los que la expresión de TRPV1 ha sido inhibida mediante intervención genómica son normales y fértiles y con capacidades termoreguladoras intactas ^{49,50}, sin embargo el efecto de la hipertermia es mucho más severo comparado con los ratones WT que expresan el canal naturalmente, demostrando que la actividad de este canal es clave en la protección celular frente al estrés térmico y al estrés oxidativo subsecuente ⁴⁸. Bajo el concepto de la protección frente a estrés se ha estudiado el rol de TRPV1 frente al daño por isquemia/reperfusión en músculo cardíaco de rata, demostrando que la activación tópica con Capsaicina regula la presión cardíaca y disminuye el área de daño ^{31,51}. Así también se comprobó el efecto protector de Capsaicina en el mismo modelo de daño en hígado ⁵². Por último, investigaciones más recientes han demostrado una disminución en el daño por isquemia reperfusión en cerebro, gracias a la hipotermia inducida farmacológicamente a través de TRPV1 ^{53,54}.

En base a los antecedentes presentados, se estudiará el rol de TRPV1 frente a la muerte de células madre mesenquimales de encía (MSC-GT) inducida por estrés oxidativo, y de qué manera permite la mantención de funciones básicas de la célula, comúnmente alteradas por ROS como la permeabilidad de la membrana plasmática y la función mitocondrial.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO:

La activación de TRPV1 promueve resistencia a la muerte inducida por H₂O₂ en células madre mesenquimales.

5. OBJETIVOS:

Objetivo general:

Analizar el rol de TRPV1 frente a la muerte inducida por H₂O₂ en células madre mesenquimales provenientes de encía.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la pureza e identidad de cultivos primarios de MSC-GT.
2. Caracterizar la expresión poblacional de TRPV1 en MSC-GT.
3. Evaluar el efecto de agonistas y/o antagonistas de TRPV1 sobre la muerte celular inducida por H₂O₂ en MSC-GT.

6. METODOLOGÍA:

Mantenición de cultivos de MSC-GT.

En el laboratorio de Estructura y Función Celular se cuenta con cultivos primarios de MSC de encía provenientes del Laboratorio de Cultivos Celulares de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso. Las células fueron sub-cultivadas y mantenidas en DMEM High Glucose (Gibco) + 10% SFB (Gibco) hasta su utilización en

el protocolo experimental bajo condiciones de cultivo estándar (37°C y 5% de saturación de CO₂).

Privación y estimulación en cultivo.

Las células subcultivadas en placas de 24 pocillos, en primer lugar fueron sometidas durante 24 horas a un medio de privación, DMEM High + 1% SFB (Gibco), para sincronizar el ciclo celular. Luego las células fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfato, 0.1M pH 7.4 (PBS) y estimuladas en base al protocolo experimental número 1 (Anexo A.1) en un medio de estimulación DMEM High glucose + 1%BSA (Winkler). Posterior a la estimulación las células fueron recuperadas desde las placas de cultivo por tratamiento con Tripsina 0,1%+ EDTA 0,2% (Winkler) previo lavado con solución salina PBS. El detalle de las soluciones de estimulación se desglosa en el protocolo experimental citado.

Caracterización de MSC-GT mediante inmunofenotipificación FACS.

Se generó un protocolo de caracterización de MSC-GT por medio de un panel de anticuerpos primarios más sus respectivos anticuerpos secundarios unidos a fluoróforos (Thermo Scientific, detalle de anticuerpos y diluciones en el anexo A.2), seleccionados de acuerdo a la capacidad de detección del citómetro FACS Calibur (Bekton Dickinson) (Figura 6.1), e incubados en células en suspensión sin fijación. El control negativo consistió en no incluir la incubación con el anticuerpo primario y muestras de expresión conocida de CD105 y CD44 fueron usadas como control positivo según recomendación de fabricantes (células HeLa según Abcam, Jackson Inmuno y Thermo Scientific.). La células en suspensión fueron obtenidas a partir de placas de cultivo de 100mm e inmediatamente centrifugadas a 1500 RMP durante 5 min. a 20°C para remover la tripsina. Se eliminó el sobrenadante y la pella resultante fue re suspendida en PBS + BSA 5% (Winkler) + Tween 20 0,5%(Winkler) para bloquear sitios

de unión inespecífica. Luego las células se centrifugaron bajo el mismo protocolo anterior y la pella fue incubada con el anticuerpo primario diluido en PBS durante 1 hora a 37°C. Posterior a la incubación se repitió una centrifugación y se incubó el anticuerpo secundario durante 30 min. a 37°C. Finalmente se centrifugaron las muestras por última vez y se re suspendieron en 300µL de PBS para su medición en el citómetro de flujo. Como control positivo de la técnica se utilizaron células HeLa según recomendación de las empresas Abcam, Jackson Inmuno y LifeTech.

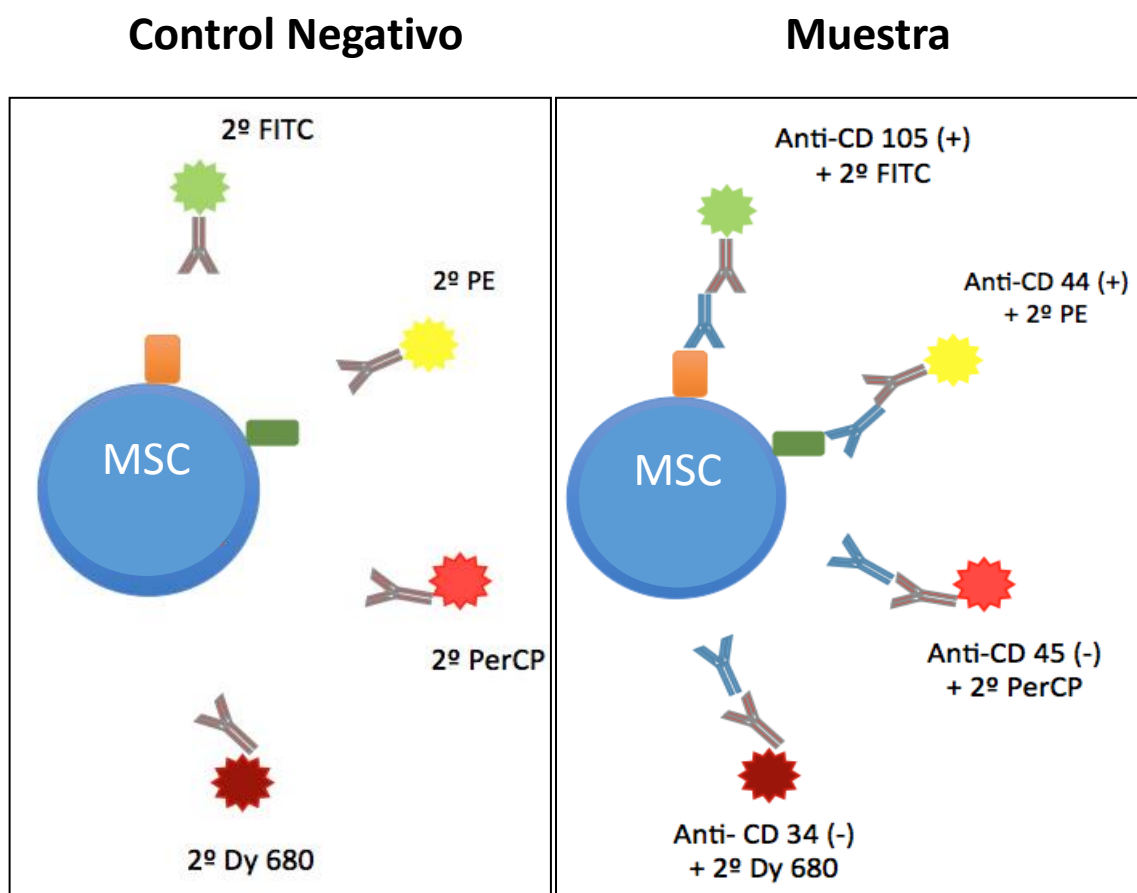


Figura 6.1 Inmunofenotipificación de MSCs: CD 105 y 44 antígenos positivos para MSCs, CD45 (marcador linfocitario común) y CD 34 (marcador de célula madre hematopoyética) negativos. El control de la técnica incluye sólo la incubación de los Ac.2º conjugados a fluoróforo. En la muestra se incuban Ac.1º anti CD junto a los secundarios conjugados específicos al Hospedero del Ac1º.

Caracterización de MSC-GT mediante Microscopía de Fluorescencia.

Utilizando la combinación de anticuerpos para CD105 y CD44 más una marcación nuclear con Hoescht (intercalante de ADN, Em. : 380 nm, Invitrogen), se obtuvieron microfotografías de la doble marca. Las células fueron cultivadas en portaobjetos de 6mm. y fueron fotografiadas cuando presentaron una confluencia del 70%. Se utilizó un microscopio Olympus IX 81 , equipado con una cámara CCD monocromática (F-View) y el software Xcellence Pro V11 (Olympus). Las imágenes obtenidas en Rojo, Verde y azul fueron ajustadas en brillo/contraste y montadas mediante combinación RGB. Finalmente el formato de la imagen fué ajustado a .TIFF sin compresión, en paleta de colores CMYK y resolución de 1200 dpi. para su impresión según recomendación de Nature Publishing Group.

Caracterización de MSCs-GT mediante estudio de diferenciación celular.

Para el estudio de diferenciación se sembraron 40.000 células por pocillo en placas de 4 pocillos con el medio de mantención indicado anteriormente. Una vez que las células se encontraron adheridas (24 horas) se cambió el medio de mantención por un medio de diferenciación adipogénico (Dexametasona 1 μ , Isobutil metil Xantina (IBMX) 100 μ g/ml, Insulina 0,2 U/ml, Indometacina 100 μ M), osteogénico (Dexametasona 0,1 μ M, Ascorbato 2 fosfato 50 μ g/ml, β -glicerol fosfato 10mM) o condrogénico (Dexametasona 0,1 μ M, Insulina 0,5 U/ml, TGF beta3 10ng/ml, Ascorbato 2 fosfato 50 μ g/ml) según correspondía, preparados sobre MEM α (Corning). Dos pocillos fueron estimulados con el medio completo y dos fueron usados como control solo con MEM α . El medio de diferenciación para los tres casos fue cambiado 2 veces por semana y preparado en el momento. A los 10 días se caracterizó la diferenciación adipogénica en la placa respectiva con tinción Oil Red (Abcam). La diferenciación condrogénica fue caracterizada 15 días después de la estimulación con tinción Safranina-O (Abcam). Finalmente las placas de diferenciación osteogénica fueron

caracterizadas con Alizarin Red (Abcam) después de 21 días. Las tinciones cromogénicas fueron aplicadas según protocolo proporcionado por el fabricante.

Detección de TRPV1 mediante inmuno FACS.

MSC-GT colectadas por tripsinización fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en buffer SEx (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.0) por 15 min a 4°C. Luego las células fueron permeabilizadas y se bloquearon sitios de unión inespecíficos mediante una solución 5% BSA en PBS con (Merk) y 0,5% de Tween20 (Merk) por 1 hr a 37°C. Posterior a esto se incubó con el anticuerpo Rabbit anti TRPV1 (Thermo, 1:1000) toda la noche a 4°C. Después de la centrifugación se incubó con el anticuerpo anti-Rabbit biotinilado (Thermo, 1:200) durante 1hr. a 37°C. Las células se centrifugaron nuevamente y se incubaron en oscuridad durante 1hr. a 37°C con streptavidin-Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1:200). La señal de Alexa Fluor fué detectada con el citómetro FACS Calibur usando el láser de Argón de 488nm y el filtro de emisión 530/30 band pass. El debris fue excluido del análisis por tamaño celular y se obtuvo un total de 10.000 eventos. Los datos fueron analizados y presentados con FlowJo V.10 (Tree Star Inc.)

Detección de ARNm-TRPV1 mediante RT-PCR.

El total de ARN fué extraído de MSC-GT y Testículo (control tejido positivo) utilizando Trizol (Invitrogen). El par de partidores de PCR diseñados con Vector NTI (Life) para TRPV1 fueron: Forward 5' TCCCAGGACTGTCTCCAC 3' y Reverse: 5'TCTGGGTCTTTGAACTCGCT 3' y los correspondientes a S16 (control de carga): Forward: 5'aggagcgatttgctggtgtgga 3' y Reverse: 5'gctaccaggcctttgagatgga 3'. Para TRPV1 el producto de PCR es un amplicón de 167 pb y para s16 102 pb. Todas las muestras fueron simultáneamente amplificadas usando la temperatura de

alineamiento para cada par de partidores. La reacción de PCR se realizó con Master Mix GoTaq (Promega), que contenía todos los reactivos para la amplificación, exceptuando el templado de ADNc. Para la amplificación se usó un termociclador BioRad iCycler.

Cuantificación de viabilidad celular mediante FACS.

Las células fueron expuestas a diferentes condiciones experimentales detalladas en el protocolo experimental (Anexo A.1) en un medio de cultivo sin suero (DMEM + 1% BSA). La muerte celular se determinó en base a la literatura ⁵⁵ y se analizó de acuerdo a un modelo de tres estados: Alive-Vulnerable-Dead (Modelo A-V-D). Para cuantificar los tres estados celulares se registró la función mitocondrial y la integridad de la membrana plasmática utilizando Rhodamina 123 (Invitrogen) y Yoduro de Propidio (PI, Sigma). El potencial de membrana mitocondrial se monitorizó utilizando Rho123 en modo de “no Quenching”. Rho123 es un catión permeante fluorescente, que se distribuye de forma pasiva de acuerdo al potencial de membrana. En este modo la despolarización mitocondrial causa la salida de Rho123 de la matriz mitocondrial hacia el citosol lo que resulta en una disminución de la intensidad de fluorescencia ⁵⁵. Para medir la integridad de la membrana se usó Yoduro de Propidio, un intercalante de ADN de gran tamaño que se une sólo en células con aumento drástico de la permeabilidad de membrana. ⁵⁶. Brevemente las células fueron cargadas con Rho123 y Yoduro de Propidio, y la fluorescencia fue detectada por un citómetro FACS Calibur. Se analizaron un mínimo de 10.000 células/muestra para evaluar la función mitocondrial y permeabilidad de membrana utilizando el software Flow Jo VX (Three Star).

Para determinar la probabilidad de células vivas (A), los datos se normalizaron utilizando la siguiente formula:

$$A = \frac{X - C_D}{C_A - C_D}$$

Donde X (Recuento de células) corresponde a las células vivas en cada condición, CD a las células vivas en presencia de etanol 10% para inducir muerte celular y CA a las células vivas sin tratamiento ⁵⁷.

Una curva de respuesta a la concentración de H₂O₂ se ajustó al siguiente modelo:

$$A = \frac{1}{1 + \left[\frac{X}{AC_{50}} \right]^P}$$

Donde AC₅₀ es la concentración de H₂O₂ en la que la mitad de las células no son viables, y la pendiente P define la rapidez con la que cambia la curva.

Análisis de datos.

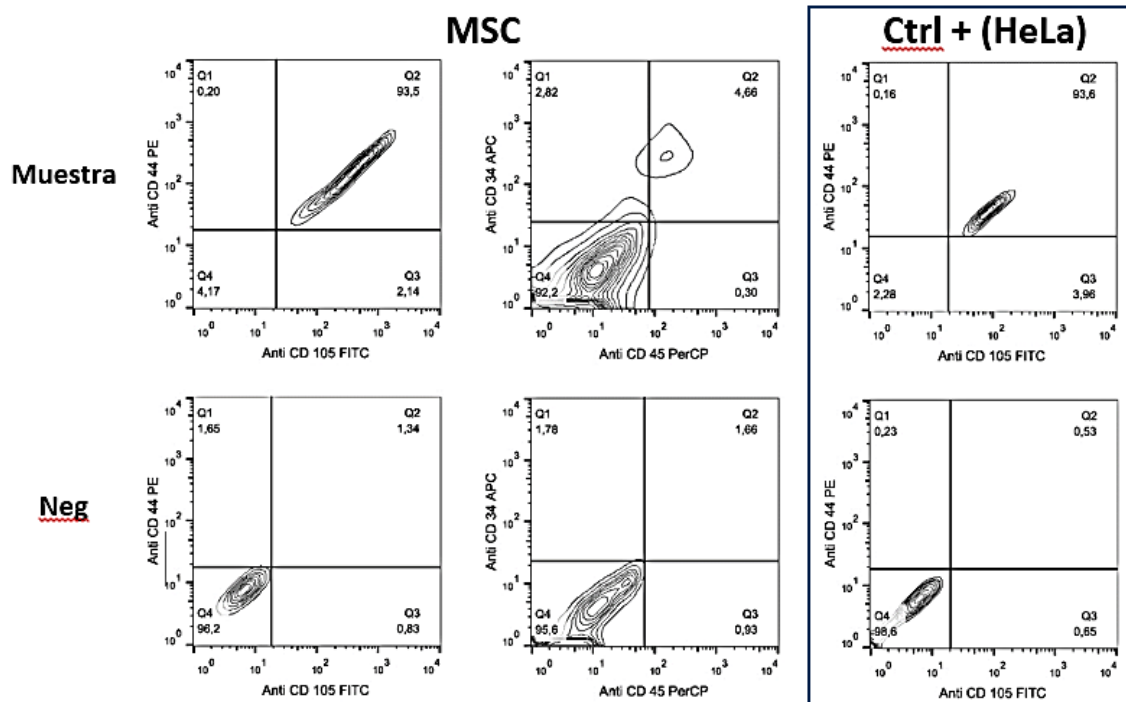
Todos los resultados se presentaron como la Media +/- error estándar a partir de al menos de tres ensayos independientes con células provenientes de diferentes cultivos para cada condición experimental. La prueba de la menor diferencia significativa de Fisher y la prueba ANOVA seguido por un test de Bonferroni se utilizaron para comparar varios grupos usando Statgraphics Centurion VX (Graph Pad). Un valor de p<0,05 fué utilizado para indicar la significación estadística. Todos los gráficos fueron contruidos en formato encapsulado (.eps) con codificación ASCII de 3 niveles mediante Origin Pro 9 SR2 (Origin Lab) y resolución de 600 dpi. según recomendación de Nature Publishing Group.

7. RESULTADOS

Inmunofenotipificación de MSC de encía.

La inmunomarcación fluorescente de los antígenos de superficie para célula madre mesenquimal (CD 105 y CD44) reveló mediante FACS que sobre el 90% de los cultivos primarios de MSC provenientes de encía poseen positividad. La distribución de la marcación observada en microscopía muestra el patrón típico de superficie a lo largo de toda la célula de CD105 y una distribución perinuclear de CD44. En cuanto a los marcadores hematopoyéticos usados como marcadores negativos no más del 5% de las muestras mostró positividad.

A



B

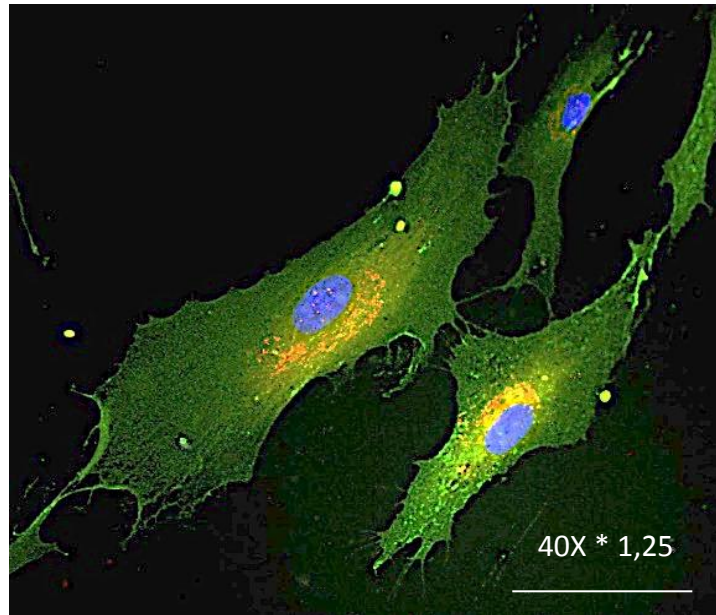


Figura 7.1, Inmunofenotipificación de MSC-GT. (A) El análisis poblacional de las marcas mediante Citometría de flujo indica que más del 90% de las células expresa marcadores de células madre mesenquimales y no expresa marcadores hematopoyéticos. (B) Microfotografía de MSCs en donde se utilizaron marcadores fluorescentes para anti-CD105 (Verde) y anti CD-44 (Rojo), los núcleos se ven en Azul.

Capacidad de diferenciación de MSC-GT *in vitro*.

Mediante inducción de diferenciación con medios especializados sobre cultivos CD 105/ CD 44 +, se obtuvo células con tinción cromogénica positiva para Condrogénesis (Safranina-O después de 10 días), Adipogénesis (Oil red después de 15 días) y Osteogénesis (Alzarin red después de 21 días). Los pocillos que no fueron estimulados no presentaron tinción positiva en los días correspondientes.

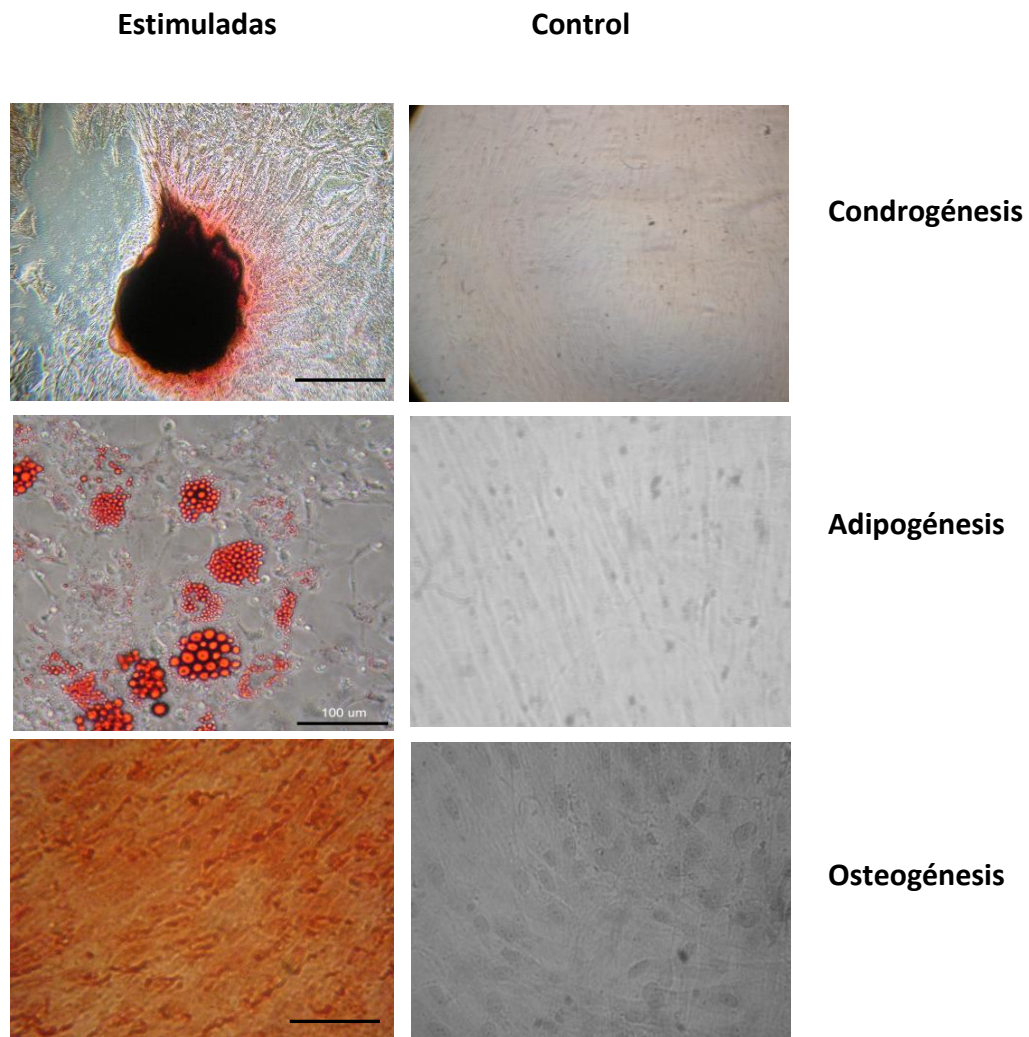


Figura 7.2. Diferenciación de MSC-GT *in vitro*. Capacidad de diferenciación de células madre provenientes de encía a línea condrogénica (Safranina-O, 10 días de estimulación), adipogénica (Oil red, 15 días) y osteogénica (Alzarin red, 21 días). Los controles de la técnica solo se mantuvieron en medio MEM α .

Caracterización de TRPV1 en MSC-GT.

Mediante RT-PCR se comprobó la presencia del ARNm para TRPV1 tanto en MSC de encía como en el tejido de expresión conocida (Testículo), con un producto de PCR 150 pares de bases aproximadamente. La presencia del ARNm se correlaciona con la expresión de la proteína revelada mediante Inmuno FACS, indicando que más del 90% de las MSC-GT expresan TRPV1.

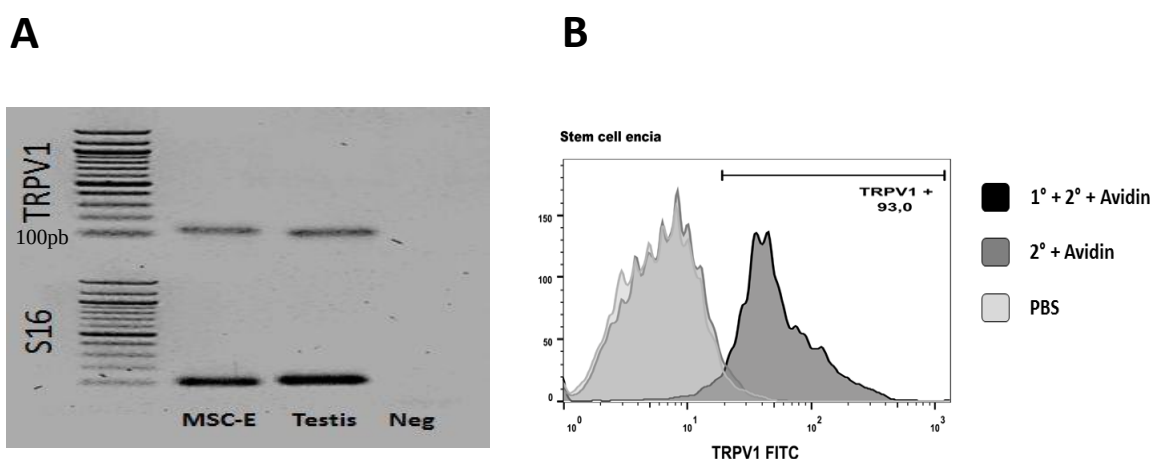


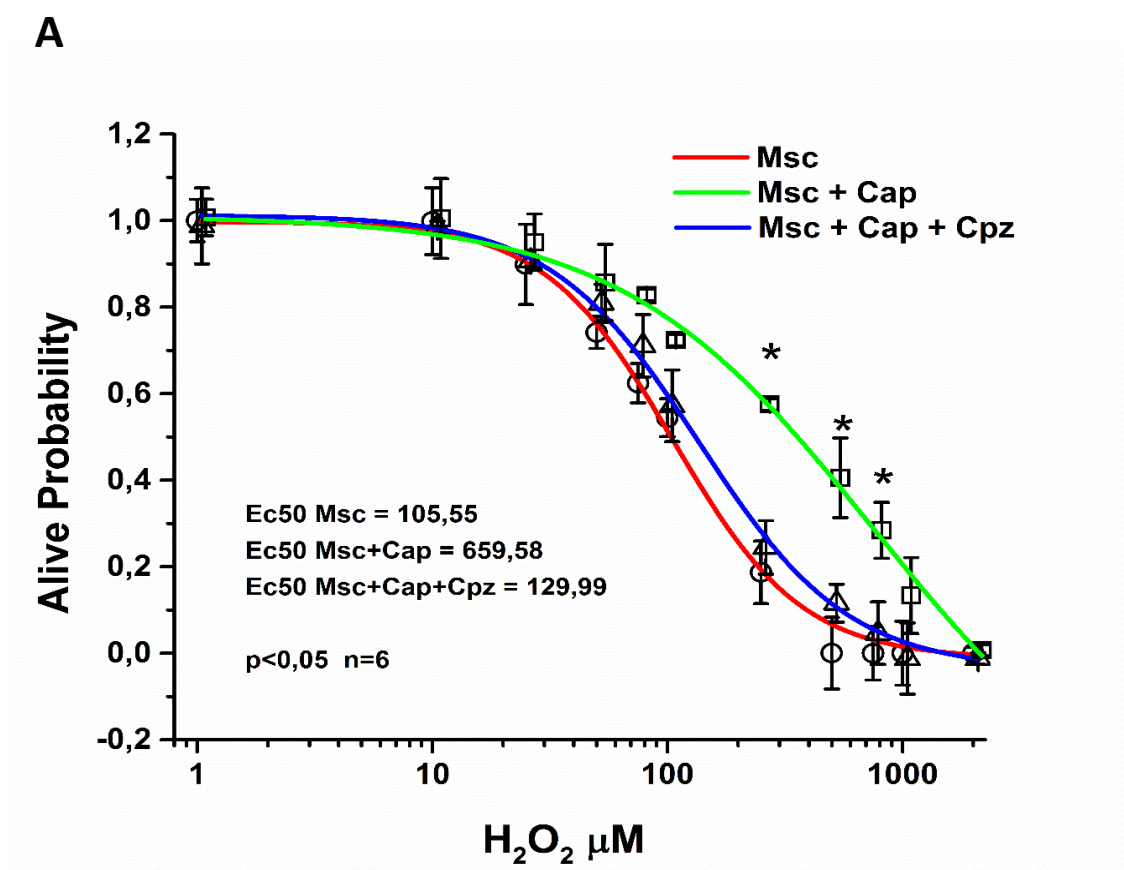
Figura 7.3, Expresión de TRPV1 en células madre de encía. (A) RT-PCR que demuestra la expresión del ARNm de TRPV1 en células madre mesenquimales de encía. Como control positivo se usó testículo. (B) Inmunocaracterización FACS de TRPV1 mediante Citometría de flujo. Más del 90% de las células expresan la proteína.

Protección frente a H₂O₂ mediada por trpv1 en MSC-GT.

Debido a la evidencia de la expresión de TRPV1 en MSC-GT, se continuó estudiando el rol de la actividad de TRPV1 frente a la muerte celular inducida por estrés oxidativo, mediante activación con su agonista exógeno Capsaicina. Cuando MSC-GT son expuestas a distintas concentraciones de H₂O₂ en el medio de cultivo sin suero durante 24 horas, hay una disminución de la viabilidad de manera concentración

dependiente con un EC_{50} de 105,5 μM . Si al medio de cultivo además se agrega Capsaicina, la toxicidad de H_2O_2 disminuye considerablemente, efecto que es revertido si se adiciona el inhibidor clásico de TRPV1 Capsazepina (Fig 7.4 A).

Al analizar la distribución probabilística de las intensidades de fluorescencia para Rho123 y PI registradas mediante FACS, se puede determinar que H_2O_2 altera principalmente la función mitocondrial (Fig 7.4 B, disminución en la intensidad de Rho123 con respecto al control). H_2O_2 a 250 μM es suficiente para generar una población con disminución de la función mitocondrial, denominada como Vulnerables del tipo 1 y otra población que además posee la permeabilidad de la membrana plasmática drásticamente aumentada, denominada como Muertas. Si a la misma concentración de H_2O_2 se agrega Capsaicina a una concentración no letal (250 nM, Anexo A.3) la población no se mueve del cuadrante de Vivas, lo que significa que tanto su función mitocondrial como su permeabilidad de membrana no fueron alteradas. El efecto es revertido por Capsazepina (10 μM , Anexo A.3), inhibidor de TRPV1. (Fig 7.4B)



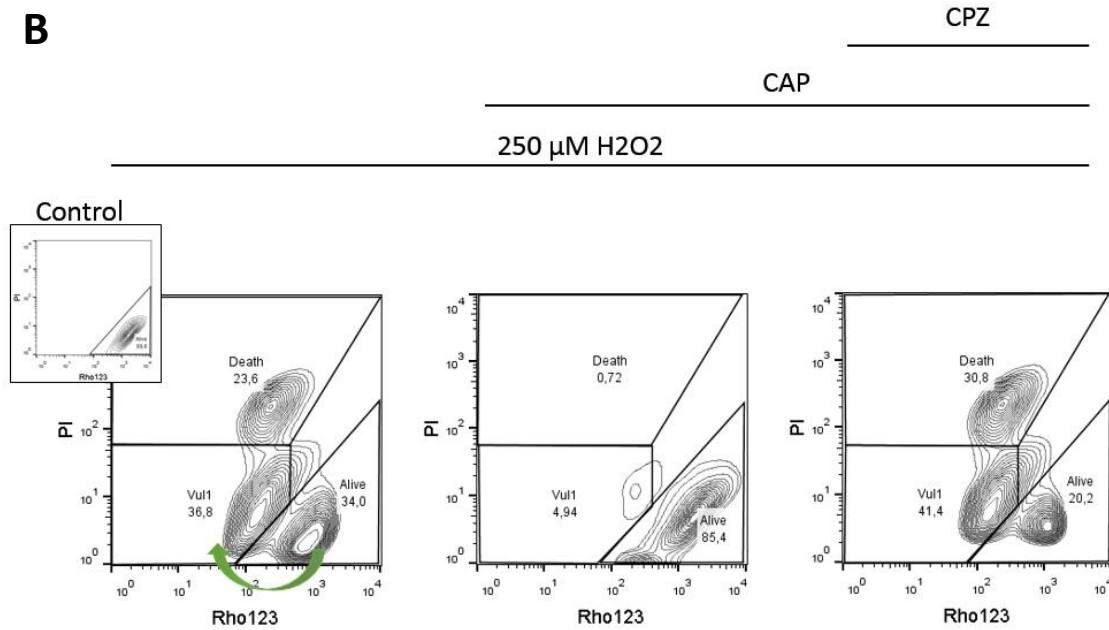
B

Figura 7.4 Protección frente a H_2O_2 mediada por *trpv1* en MSC de encía. (A) Efecto protector de Capsaicina sobre la muerte celular inducida por H_2O_2 de manera concentración dependiente en MSC, determinado por FACS. La protección es inhibida por Capsazepina. (B) Gráficos probabilísticos de la intensidad fluorescente de Rho123 y PI que demuestran que el principal parámetro celular afectado frente al daño por H_2O_2 es la función mitocondrial (flecha verde).

8. DISCUSIÓN

El primer punto crítico en la fase previa a los injertos con células madre es la separación adecuada de células desde sus distintas fuentes para obtener un alto grado de pureza. Es muy frecuente la aparición de importante cantidad de fibroblastos, adipocitos, células hematopoyéticas o células epiteliales en los cultivos primarios de MSCs, que si no son bien caracterizados, aportan gran variabilidad a los ensayos y disminuyen considerablemente la efectividad de los injertos ^{58,59}. La caracterización más aceptada actualmente incluye la inmunofenotipificación, registro de la capacidad

de diferenciación y observación de patrones morfológicos ^{14,60}. En nuestras células madre de encía el inmunofenotipo corresponde a una célula mesenquimal típica, positiva en primera línea para CD105 como marcador de célula troncal, y en segunda línea a marcadores de linaje mesenquimal que pueden ser CD44, CD90 o más recientemente usado CD271 ^{61,62}. En cuanto a la obtención del grado de pureza necesario de este fenotipo de MSC en el cultivo primario, es aceptado comúnmente como método de separación la inmunoseparación magnética, o por columna, a través de CD105 y CD44, posterior a la selección de células adherente a plástico, sin embargo los resultados de este trabajo demuestran que sólo la separación por adhesión a plástico en células provenientes de encías humanas, es suficiente para obtener niveles de pureza mayores al 90% y con correcta capacidad de diferenciación a células de linaje mesodérmico con inducción simple de diferenciación *in vitro*.

Este primer problema que enfrenta la fase previa a los injertos, también aplica para áreas más específicas del trabajo con MSCs, como es el servicio de almacenamiento de células madre mediante crio preservación. No existen actualmente normativas oficiales de almacenamiento que exijan el cumplimiento de niveles mínimos de pureza de células extraídas para su almacenamiento, y que apliquen sobre los bancos de células madre especialmente en nuestro país. Así también, y más importante aún, no se informa cuántas de las células madre que serán almacenadas mediante crio preservación son viables antes y después de la congelación ⁶³. A partir de este último punto es que nace la iniciativa por estudiar parámetros fisiológicos vitales para las células madre, tales como la función mitocondrial, integridad del sistema de membranas, concentración de iones, pH y sobre todo equilibrio interno en la producción de especies reactivas del oxígeno ^{64,65}. Como bien es sabido, las células en el injerto deben soportar distintos tipos de estrés, para lo cual es importante una condición óptima de las células antes de cualquier intervención. En los experimentos de este trabajo, la condición inicial de las células madre, medida en base a la función mitocondrial e integridad de membrana, es óptima asegurando una viabilidad mayor al 90% antes de ser expuesta a H₂O₂, en lo que se denomina como condición “control” para los ensayos de viabilidad, y sólo a partir de 50µM H₂O₂ en el medio externo existe disminución significativa de las funciones celulares (Fig. 7.4).

Es muy probable que sólo baste con obtener cultivos primarios con alta pureza en su fenotipo, y alto porcentaje de viabilidad, para generar mayores tasas de efectividad en los injertos, especialmente en tejidos con daño agudo de moderado a severo. Sin embargo la práctica nos lleva a pensar que es necesario buscar nuevas alternativas para resguardar la homeostasis de las MSCs en el contexto de la ingeniería de tejidos frente a la hipoxia y el subsecuente desequilibrio redox. Por ejemplo el uso de microalgas del tipo *Chlamydomonas reinhardtii* para regular el equilibrio de oxígeno en matrices colagenosas para injertos, es una vía de estudio interesante para poder comprender como utilizar la maquinaria fotosintética para suplir la falta de irrigación sanguínea, tanto en el tejido dañado como en el injerto propiamente tal ⁶⁶. Por el momento el injerto de algas en medicina regenerativa humana parece ser una idea difícil de concretar, y probablemente la utilización de estrategias farmacológicas para promover la supervivencia de MSCs y potenciar su metabolismo frente a la isquemia es un modelo de fácil implementación. La utilización de fármacos agonistas de TRPs como Capsaicina, agonista de TRPV1, es una alternativa prometedora, no solo por su rol protector frente a la muerte inducida por la hipoxia de epitelios funcionales ^{31,53,67} y cultivos primarios de células madre como fue demostrado en este trabajo, sino también por su capacidad de regular la fisiología local de órganos tan sensibles al daño oxidativo como el corazón y el cerebro, previniendo eventos como la isquemia aguda y reperfusión ^{54,68,69}.

Debido a que TRPV1, cuando es activado por Capsaicina o calor, permite el paso de cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} principalmente ^{70,71}, su rol en la homeostasis y la regulación de la muerte celular frente a distintas condiciones de estrés es crucial. Tal como muestran los resultados de este trabajo, la activación de TRPV1 promueve resistencia frente a la muerte inducida por H_2O_2 principalmente por mantención de la función mitocondrial, lo que se ve reflejado en la acumulación de Rhodamina 123 dentro de la matriz mitocondrial, aumentando su intensidad fluorescente debido al potencial altamente negativo dentro de la mitocondria cuando esta no ha sufrido daño alguno (Fig.7.4 B). En base a esto, es sabido que la integridad mitocondrial se ve directamente afectada por el equilibrio de Ca^{2+} , un aumento significativo en la captación de este catión junto al aumento de especies de reactivas de oxígeno en la matriz mitocondrial

se convierte en un factor iniciador de muerte mediante la inducción de la apertura del poro de permeabilidad transitoria (PTP). Si la apertura del PTP persiste, la membrana mitocondrial se despolariza, cesa la fosforilación oxidativa, se libera citocromo c y proteínas apoptóticas y se produce estrés energético ^{72,73}. Sin embargo las señales controladas de Ca^{2+} pueden aumentar la captación del catión en otros organelos, evitando la sobrecarga mitocondrial. Así niveles adecuados de Ca^{2+} facilitan el flujo de Mg^{2+} para tamponar el potencial de membrana mitocondrial ⁷⁴, disminuye la producción de ROS en la matriz ⁷⁵ y previene la sobrecarga citoplasmática de Ca^{2+} frente al estrés energético ⁷⁶, factores que en su conjunto promueven la vitalidad de las células frente a distintos tipos de estrés. Es muy probable que en futuros trabajos, el estudio de las cinéticas de las señales de Ca^{2+} activadas por bajas y altas concentraciones Capsaicina a través de TRPV1, permitan comprender de qué manera la actividad de este canal se acopla a la función mitocondrial para promover o prevenir la muerte celular frente a estrés oxidativo.

Se espera que los resultados de este trabajo permitan continuar con el desarrollo de este modelo para entender si esta estrategia permitirá, además de promover la vitalidad frente a estrés oxidativo, potenciar la motilidad de MSCs y su capacidad secretora, para así mejorar la calidad de injertos con células madre adultas. Junto a esto, también se espera que esta estrategia permita optimizar la regeneración endógena de tejido dañado en la isquemia reperusión de tejidos funcionales como el músculo cardíaco, daño térmico severo en piel y enfermedades degenerativas de epitelios sensoriales, donde la utilización de células madre para su recuperación es el principal tema de estudio.

9. CONCLUSIONES

- Cultivos primarios de MSCs de encía poseen inmunofenotipo de célula madre mesenquimal en más del 90% y capacidad de diferenciación cuando son separadas por adherencia a plástico.

- MSCs de encía expresan ARNm y proteína de TRPV1.
- Agonistas exógenos de TRPV1 como Capsaicina promueven la mantención de la función mitocondrial frente al daño inducido por H₂O₂, efecto que es revertido por Capsazepina.

10. ANEXOS

A.1 Protocolo experimental.

1. Curva concentración respuesta al H₂O₂.

Para evaluar el efecto de la concentración de H₂O₂ durante 24 hrs. sobre la población de células vivas se aplicó el siguiente panel de estimulación por duplicados en placas de 24 pocillos:

CONTROL	CONTROL	CONTROL	Et.OH 10%	Et.OH 10%	Et.OH 10%
10 µM	10 µM	25 µM	25 µM	50 µM	50 µM
75 µM	75 µM	100 µM	100 µM	250 µM	250 µM
500 µM	500 µM	750 µM	750 µM	1000 µM	1000 µM

Cada experimento contiene controles de viabilidad (Control) y muerte máximas (Et.OH 10%) en triplicado.

2. Efecto de TRPV1 sobre la muerte inducida por H₂O₂.

Utilizando el panel anterior, se repitió la curva en las siguientes condiciones:

1. A dosis baja de Capsaicina (agonista exógeno de TRPV1, 250nM, anexo A.3)
2. Capsaicina más el inhibidor de TRPV1 Capsazepina (10 µM, anexo A.3)

A.2 Detalle de anticuerpos para inmunofenotipificación.

Anticuerpos 1°

Provedor	Tipo	Host	Reactividad	Clonalidad	Fluoroforo	Emisión	Dilución
S.cruz	1º CD45	Chicken	Humano	Policlonal			Sc-1123
Abcam	1º CD34	Rabbit	Humano	Monoclonal			Ab8128
Abcam	1º CD105	Mouse	Humano	Monoclonal			Ac11414
Abcam	1º CD 44	Rat	Humano	Monoclonal			ab119863

Anticuerpos 2°

Jackson	2º	Donkey	Chicken	Policlonal	PerCP	630 nm	705-116-147
Jackson	2º	Donkey	Rabbit	Policlonal	Dy680	680 nm	711-136-152
Jackson	2º	Donkey	Mouse	Policlonal	FITC	520 nm	715-126-150
Jackson	2º	Donkey	Rat	Policlonal	R-PE	560 nm	712-096-150

Protocolo.

1. Extraer las células de la placa con Tripsina 1x a 37°C por 5min.
2. Neutralizar la tripsina con PBS triplicando el volumen.
3. Pasar a tubo eppendorf y centrifugar a 1800RMP por 5 min.
4. Resuspender en PBS con Tween20 al 0,1% y BSA 10% e incubar a 37°C por 30 min.
5. Centrifugar.
6. Resuspender en solución de PBS + Acs.Primarios en las diluciones según recomendación del fabricante e incubar por 1hr. a 37°C.
7. Centrifugar.

8. Resuspender en solución de PBS + Acs.Secundarios en las diluciones recomendación del fabricante e incubar por 1hr. a 37°C.
9. Centrifugar
10. Resuspender en PBS y medir en el citómetro.

A.3 Figuras suplementarias.

1. Efecto concentración respuesta de Capsaicina sobre la viabilidad de células HeLa.

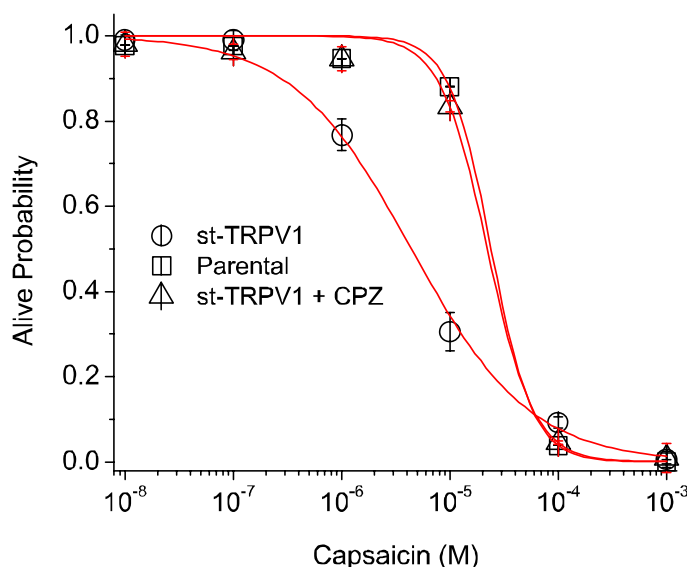
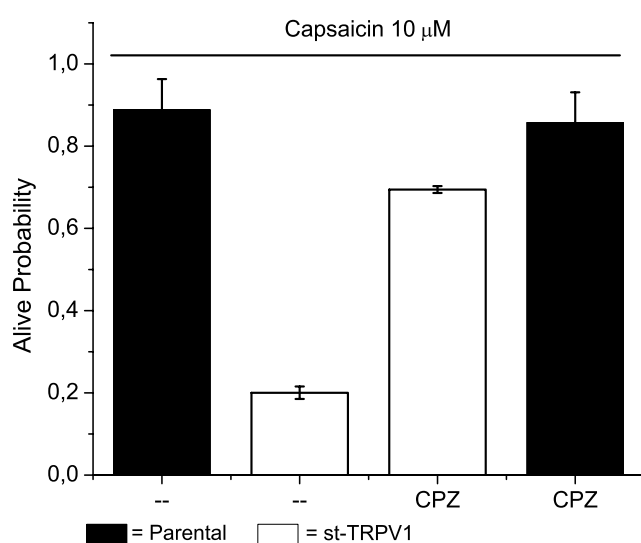


Gráfico de probabilidad de estado vivo ajustado a un modelo logístico farmacológico para evaluar el efecto concentración respuesta a Capsaicina en células HeLa parentales y st-TRPV1 a 24 horas.

2. Efecto inhibitorio de Capsazepina sobre la muerte inducida por Capsaicina.



Efecto de Capsaicina 10µM sobre la probabilidad de estado vivo en HeLa P y st-TRPV1. El efecto sobre las células que expresan TRPV1 es inhibido por Capsazepina 10µM (CPZ).

11. REFERENCIAS.

1. Lennard, A. L. Science, medicine, and the future: Stem cell transplantation. *BMJ* **321**, 433–437 (2000).
2. Reinke, J. M. & Sorg, H. Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.* **49**, 35–43 (2012).
3. Martin, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**, 75–81 (1997).
4. Ambrosio, G. & Tritto, I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am. Heart J.* **138**, S69–75 (1999).
5. Verma, S. Fundamentals of Reperfusion Injury for the Clinical Cardiologist. *Circulation* **105**, 2332–2336 (2002).
6. Choi, M. Y., Yeo, S. W. & Park, K. H. Hearing restoration in a deaf animal model with intravenous transplantation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **427**, 629–36 (2012).
7. Sergeyenko, Y., Lall, K., Liberman, M. C. & Kujawa, S. G. Age-related cochlear synaptopathy: an early-onset contributor to auditory functional decline. *J. Neurosci.* **33**, 13686–94 (2013).
8. Egaña, J. T. *et al.* The use of glandular-derived stem cells to improve vascularization in scaffold-mediated dermal regeneration. *Biomaterials* **30**, 5918–26 (2009).
9. Wang, X. *et al.* [The best site of transplantation of neural stem cells into brain in treatment of hypoxic-ischemic damage: experiment with newborn rats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **87**, 847–50 (2007).
10. Bas, E. *et al.* Adult Human Nasal Mesenchymal-Like Stem Cells Restore Cochlear Spiral Ganglion Neurons After Experimental Lesion. *Stem Cells Dev.* 1–44 (2013). doi:10.1089/scd.2013.0274
11. Avasthi, S., Ms, R. N. S. & Ms, A. S. Stem Cell : Past , Present and Future- A Review Article. **3**, 22–30 (2008).
12. Bieback, K. & Brinkmann, I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J. Stem Cells* **2**, 81–92 (2010).
13. Baksh, D., Song, L. & Tuan, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* **8**, 301–16 (2004).

14. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**, 2739–49 (2007).
15. Barry, F. P., Boynton, R. E., Haynesworth, S., Murphy, J. M. & Zaia, J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 134–9 (1999).
16. Satoh, H. *et al.* Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds. *Cell Transplant.* **13**, 405–12 (2004).
17. Bensidhoum, M. *et al.* [Therapeutic effect of human mesenchymal stem cells in skin after radiation damage]. *J. Soc. Biol.* **199**, 337–41 (2005).
18. Hocking, A. M. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Wounds. *Adv. wound care* **1**, 166–171 (2012).
19. 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).
20. Marchesi, C. *et al.* Skin-derived stem cells transplanted into resorbable guides provide functional nerve regeneration after sciatic nerve resection. *Glia* **55**, 425–38 (2007).
21. Kasagi, H., Kuhara, T., Okada, H., Sueyoshi, N. & Kurihara, H. Mesenchymal stem cell transplantation to the mouse cochlea as a treatment for childhood sensorineural hearing loss. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **77**, 936–42 (2013).
22. Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405–410 (2002).
23. Finkel, T. & Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239–47 (2000).
24. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 107–120 (2012). doi:10.1038/cdd.2011.96
25. Kim, N. & Cho, S.-G. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J. Intern. Med.* **28**, 387–402 (2013).
26. Huang, G. T.-J., Gronthos, S. & Shi, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* **88**, 792–806 (2009).
27. Zhang, Z. *et al.* The role of single cell derived vascular resident endothelial progenitor cells in the enhancement of vascularization in scaffold-based skin regeneration. *Biomaterials* **32**, 4109–17 (2011).

28. Fiorio Pla, A. *et al.* Canonical transient receptor potential 1 plays a role in basic fibroblast growth factor (bFGF)/FGF receptor-1-induced Ca²⁺ entry and embryonic rat neural stem cell proliferation. *J. Neurosci.* **25**, 2687–701 (2005).
29. Cheng, H. *et al.* Transient receptor potential melastatin type 7 channel is critical for the survival of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* **19**, 1393–403 (2010).
30. Park, E. S., Kim, S. R. & Jin, B. K. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 contributes to mesencephalic dopaminergic neuronal survival by inhibiting microglia-originated oxidative stress. *Brain Res. Bull.* **89**, 92–6 (2012).
31. Robbins, N., Koch, S. E. & Rubinstein, J. Targeting TRPV1 and TRPV2 for potential therapeutic interventions in cardiovascular disease. *Transl. Res.* **161**, 469–76 (2013).
32. Schmuhl, E., Ramer, R., Salamon, A., Peters, K. & Hinz, B. Increase of mesenchymal stem cell migration by Cannabidiol via activation of p42/44 MAPK. *Biochem. Pharmacol.* (2013). doi:10.1016/j.bcp.2013.11.016
33. AIKAWA, F. & IWAI, Y. Capsaicin Activates Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 (TRPV1) of Rat Bone Marrow-derived Stromal Cells (BMSCs) in vitro. *J. oral tissue Eng.* **6**, 41–55 (2008).
34. Chung, G. & Oh, S. TRP channels in dental pain. *Open Pain J.* 31–36 (2013).
35. Okumura, R. *et al.* The odontoblast as a sensory receptor cell? The expression of TRPV1 (VR-1) channels. *Arch. Histol. Cytol.* **68**, 251–7 (2005).
36. Kunert-Keil, C., Bisping, F., Krüger, J. & Brinkmeier, H. Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* **7**, 159 (2006).
37. Vriens, J., Nilius, B. & Vennekens, R. Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Curr. Neuropharmacol.* **6**, 79–96 (2008).
38. Clapham, D. E., Runnels, L. W. & Strübing, C. The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 387–96 (2001).
39. Maccarrone, M. *et al.* Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J. Cell Sci.* **118**, 4393–404 (2005).
40. Dhaka, A. *et al.* TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J. Neurosci.* **29**, 153–8 (2009).
41. Auzanneau, C. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in cultured rat Sertoli cells regulate an acid sensing chloride channel. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 476–83 (2008).
42. Chuang, H. & Lin, S. Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20097–102 (2009).

43. Susankova, K., Tousova, K., Vyklicky, L., Teisinger, J. & Vlachova, V. Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current. *Mol. Pharmacol.* **70**, 383–94 (2006).
44. Xu, S., Cheng, Y., Keast, J. R. & Osborne, P. B. 17beta-estradiol activates estrogen receptor beta-signalling and inhibits transient receptor potential vanilloid receptor 1 activation by capsaicin in adult rat nociceptor neurons. *Endocrinology* **149**, 5540–8 (2008).
45. Hu, F., Sun, W. W., Zhao, X. T., Cui, Z. J. & Yang, W. X. TRPV1 mediates cell death in rat synovial fibroblasts through calcium entry-dependent ROS production and mitochondrial depolarization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 989–93 (2008).
46. Shirakawa, H. *et al.* TRPV1 stimulation triggers apoptotic cell death of rat cortical neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 1211–5 (2008).
47. Thomas, K. C. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 1 agonists cause endoplasmic reticulum stress and cell death in human lung cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **321**, 830–8 (2007).
48. Mizrak, S. C. & van Dissel-Emiliani, F. M. F. Transient receptor potential vanilloid receptor-1 confers heat resistance to male germ cells. *Fertil. Steril.* **90**, 1290–3 (2008).
49. Iida, T., Shimizu, I., Nealen, M. L., Campbell, A. & Caterina, M. Attenuated fever response in mice lacking TRPV1. *Neurosci. Lett.* **378**, 28–33 (2005).
50. Lee, H. & Caterina, M. J. TRPV channels as thermosensory receptors in epithelial cells. *Pflügers Arch.* **451**, 160–7 (2005).
51. Buckley, C. L. & Stokes, A. J. Mice lacking functional TRPV1 are protected from pressure overload cardiac hypertrophy. *Channels (Austin)*. **5**, 367–74 (2011).
52. Wang, M., Peng, J., Wang, R., Zhao, L. & Xia, Z. TRPV1 Agonist Capsaicin Attenuates Lung Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbits. *J. Surg. Res.* **8**, 1–8 (2010).
53. Muzzi, M. *et al.* Ischemic neuroprotection by TRPV1 receptor-induced hypothermia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 978–82 (2012).
54. Cao, Z., Balasubramanian, A. & Marrelli, S. P. Pharmacologically induced hypothermia via TRPV1 channel agonism provides neuroprotection following ischemic stroke when initiated 90 min after reperfusion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **306**, R149–56 (2014).
55. Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B. & Gelbard, H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* **50**, 98–115 (2011).
56. Hetz, C., Bono, M. R., Barros, L. F. & Lagos, R. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2696–701 (2002).

57. Chang, S.-W., Chou, S.-F. & Wang, Y.-H. Ethanol treatment induces significant cell death in porcine corneal fibroblasts. *Cornea* **25**, 1072–9 (2006).
58. Balaji, S., Keswani, S. G. & Crombleholme, T. M. The Role of Mesenchymal Stem Cells in the Regenerative Wound Healing Phenotype. *Adv. wound care* **1**, 159–165 (2012).
59. Hui, J. H. P., Ouyang, H. W., Hutmacher, D. W., Goh, J. C. H. & Lee, E. H. Mesenchymal stem cells in musculoskeletal tissue engineering: a review of recent advances in National University of Singapore. *Ann. Acad. Med. Singapore* **34**, 206–12 (2005).
60. Haynesworth, S. E., Baber, M. A. & Caplan, A. I. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* **13**, 69–80 (1992).
61. Martí, M. *et al.* Characterization of pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **8**, 223–53 (2013).
62. Battula, V. L. *et al.* Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica* **94**, 173–84 (2009).
63. Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. *Stem Cell Rev.* **5**, 301–14 (2009).
64. Biteau, B., Hochmuth, C. E. & Jasper, H. Maintaining tissue homeostasis: dynamic control of somatic stem cell activity. *Cell Stem Cell* **9**, 402–11 (2011).
65. Ito, K. & Suda, T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 243–56 (2014).
66. Schenck, T. L. *et al.* Photosynthetic biomaterials: A pathway towards autotrophic tissue engineering. *Acta Biomater.* **15**, 39–47 (2015).
67. Guo, S.-Y. *et al.* Protection of capsaicin against hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **86**, 785–92 (2008).
68. Ghelfi, E., Rhoden, C. R., Wellenius, G. a, Lawrence, J. & Gonzalez-Flecha, B. Cardiac oxidative stress and electrophysiological changes in rats exposed to concentrated ambient particles are mediated by TRP-dependent pulmonary reflexes. *Toxicol. Sci.* **102**, 328–36 (2008).
69. Qin, C., Farber, J. P., Miller, K. E. & Foreman, R. D. Responses of thoracic spinal neurons to activation and desensitization of cardiac TRPV1-containing afferents in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **291**, R1700–7 (2006).
70. Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816–24 (1997).
71. Pingle, S. C., Matta, J. A. & Ahern, G. P. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handb. Exp. Pharmacol.* 155–71 (2007).

72. Bernardi, P. & Rasola, A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell. Biochem.* **45**, 481–506 (2007).
73. Duchen, M. R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J. Physiol.* **529 Pt 1**, 57–68 (2000).
74. Broderick, R. & Somlyo, A. P. Calcium and magnesium transport by in situ mitochondria: electron probe analysis of vascular smooth muscle. *Circ. Res.* **61**, 523–30 (1987).
75. Voccoli, V., Tonazzini, I., Signore, G., Caleo, M. & Cecchini, M. Role of extracellular calcium and mitochondrial oxygen species in psychosine-induced oligodendrocyte cell death. *Cell Death Dis.* **5**, e1529 (2014).
76. Zablocki, K., Makowska, A. & Duszyński, J. pH-dependent effect of mitochondria on calcium influx into Jurkat cells; a novel mechanism of cell protection against calcium entry during energy stress. *Cell Calcium* **33**, 91–9 (2003).