



FACULTAD DE FARMACIA
LABORATORIO DE CULTIVOS CELULARES

**EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE FACTOR DE CRECIMIENTO
TRANSFORMANTE β_3 EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMÁTICAS CD105
POSITIVAS**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

MAURICIO ALEXIS REYNA JELDES

Directora de Tesis: Caroline Weinstein Oppenheimer, PhD.

Co-director de Tesis: Rodrigo Somoza Palacios, PhD.

2012

*A Euterpe,
en diáfana oración,
en humilde ofrenda
por la senda que me enseña,
por los suspiros que concede,
por la gracia de darme la vida
con el brillo de su obra.*

AGRADECIMIENTOS

Sin lugar a dudas, la vida es un viaje extraño, lleno de diversas contradicciones o instancias de profundas y bellas disonancias que te llevan a romper los esquemas y traducir todo desde una perspectiva distinta. La vida es curiosa, y ante todo misteriosa, al punto de que hasta el menos observador puede sorprenderse de que siempre las cosas difieren, al menos un poco, con las ideas preconcebidas en la mente respecto a un suceso o una persona. En mi propio caso, el desarrollo de esta tesis fue un episodio en que este suceso ocurrió una y otra vez; fue un proceso continuo de cataclismos gestálticos: la forma se volvía fondo, y el fondo una materia intermedia, un plasma del cual se proyectaban luces que muchas veces parecían amenazas y muchas otras un completo deleite para los sentidos, una suerte de aurora boreal para el apetito científico de una persona naciente en estos entornos, como es mi caso.

Pienso en el sinnúmero de ocasiones en que la frustración me dejó en el cuestionamiento de mis capacidades, en que la penuria por un resultado contradictorio me llegaba hasta las bases de lo que entendía y podía manejar con mi concepto anterior de éxito y fracaso. Fue allí, precisamente allí, en plenos diálogos con el experimento mal hecho, con los vapores de un café para desplazar los nubarrones de mi mente, que entendí cuál es el sentido de todo esto, cuál es el propósito de hacer una tesis, además del que se establece en términos académicos y profesionales. Comprendí el sentido de fallar y el rol importante que este juega en el aprendizaje de destrezas técnicas y en el desarrollo personal. Siempre he sido una persona que aprecia los desafíos y que sueña con quimeras salidas de libros románticistas, con ideales beethovenianos y *triacas magnas*, pero esta tesis fue el momento de aprender cómo labrar estos anhelos y sacarlos de su dimensión platónica para transformarlos en patente realidad, con el costo en esfuerzo y fracasos que esto conlleva.

Durante este proceso de conocer y conocerse fue cuando aprecié la vital compañía y enseñanzas de muchas personas, verdaderos héroes de sombría silueta, taciturnos y pacientes en la espera de brindar su grano de arena a una etapa que, dentro de mi propia perspectiva, me ha hecho sentir que he vivido más que en toda una década. Agradecer a todos es ellos es cuanto me propongo, pero como mi mente es olvidadiza y mi condición humana al error más frecuente que la de muchos otros que he conocido, anticipo mis

disculpas a quien no haya dado su merecido reconocimiento en estas páginas. Espero que este intento por dejar una huella de todos los grandes partícipes, no sólo de mi tesis, sino de todo mi pasar como estudiante de Química y Farmacia no sea tan mustio como suelen ser mis intentos para expresarme con la voz, donde siempre me quedo con la sensación de que el mensaje entregado no es símil propicio a lo pensado o sentido por mi ser.

Iniciaré esta serie de gratitudes reconociendo el rol de todos aquellos laboratorios por los que alguna vez pasé durante el desarrollo de mi tesis, y que junto con la entrega de conocimientos o reactivos, dejaron conmigo también la enseñanza fundamental de lo que es la cooperación y armonía entre diversos grupos humanos. Por esta razón, es de mi particular agrado reconocer el rol de Claudia Santibáñez, Claudia Hernández y el profesor Rodrigo Díaz: el equipo de QUIFAC; y su enorme disposición a ofrecer ayuda ante cualquier problemática que surgiese. Su trato gentil y afectuoso desde el momento en que realicé mi práctica profesional con ellos es algo que no olvidaré, así como los buenos momentos vividos en conjunto. Gracias por los buenos consejos y por las risas, por los instrumentos y reactivos facilitados durante el desarrollo de toda mi tesis.

Es casi un deber también agradecer a don Fernando Albornoz del Centro de Biotecnología Dr. Daniel Alkalay Lowitt por instruirme en la fabricación de polímeros y en la adquisición de muchas destrezas de laboratorio que, bajo su particular modo de enseñar -proceso durante el cual no derramé una sola lágrima-, se tornaron más adecuadas a lo que exige el trabajo con células madre. Sus consejos, comentarios y curiosidad científica me ayudaron a marcar un ejemplo en cuanto a lo que investigación refiere. Agradezco también su enorme generosidad al orientarme en el uso de un liofilizador y en el procesamiento de todas las muestras que requirieron dicho tratamiento.

Viajan también mis sentidas gracias al profesor Daniel Moraga y la profesora Patricia Carreño, por su colaboración con mi trabajo de tesis al proporcionarme reactivos, como es el caso de la polivinilpirrolidona, y orientarme en el uso de cloruro de benzalconio como tensioactivo catiónico en reemplazo al sugerido en la literatura para extracción de ARN. También es apreciable su voluntariosa ayuda al momento en que se hizo necesario realizar ajustes de pH.

De esta larga lista tampoco queda atrás la labor de los amigos, personas muy importantes al momento de efectuar cualquier proyecto en la vida, pues de ellos proviene otra clase de ayuda, esa mano gentil que colabora en los otros aspectos de la vida, esos tópicos que se suscitan una vez fuera de las puertas del laboratorio. Iniciaré con Javier Salazar y Begoña Serrano, mis grandes amigos. Gracias por darme aquellos momentos de risa, relajación y compañerismo tan hermosos que sólo ustedes me pueden otorgar. Fueron, y siguen siendo, mi principal reducto de alegría y paz cuando las presiones y los desafíos de la vida parecen más grandes de lo que aparentan.

Insospechadamente quiero también reconocer a Armando Riquelme y María Carolina López, mis maestros en la interpretación del violín. Les doy infinitos agradecimientos por creer en mí, por darme las alas para seguir creyendo posible un anhelo de la infancia a una edad que muchos podrían tomar por tardía. Mientras siga mi trabajo en las ciencias, ustedes me recordarán siempre que la frecuencia de mi alma está, realmente, en graciosa simpatía con la Música. Dentro de esta misma rama deseo agradecer a Mónica Bordones, cuya gentil y desinteresada ayuda ha sido, durante el último tiempo, un fuerte soporte para llevar los distintos desafíos de la vida de una forma más feliz y diligente; tu gran amor por la Música es la intensa baliza que alumbra mi camino instrumental cada vez que la desmotivación me hace perder el rumbo.

También envío abrazos y gratitudes a Felipe Silva, el principal compañero de trabajos y estudios durante gran parte de mi carrera. Su perseverancia, disciplina y decisión me enseñaron que un hombre sí es capaz de hacer varias cosas a la vez de forma exitosa. Es en base a esta enseñanza que tomé el riesgo de iniciar mis clases de violín. Gracias Felipe, el ejemplo de tu esfuerzo en la vida ayuda a muchos de los que te observamos en formas que ni te imaginas.

Como hermosa reminiscencia surge, en conjunto a Felipe, mi más cariñoso afecto a Katherine Álvarez y Claudia Cofré, mi primer grupo de trabajo: el que nunca olvido y al que siempre vuelvo por mucho que las distancias se interpongan. Muchas gracias por su sincera amistad y por preservar dicho sentimiento hacia alguien que, usualmente, suele estar envuelto en el barullo de sus pensamientos y tareas.

Casi por susurro surges tú, Francisca Cepeda, mi querida confidente y consejera del mundo emocional y sentimental. Gracias por tus breves, pero preciados momentos en que el peso de siglos de humanidad y desarrollo se reducen a una sola palabra: *Amor*.

Es imposible no recordar y agradecer la labor de Iván Donoso, gran amigo y compañero que, a pesar de las pocas instancias en que nuestras vidas se encontraban y de la manera tardía en que nuestras buenas conversaciones fueron a nacer, ha sabido crear la instancia para darme más de mil sonrisas mezcladas con mensajes que fueron el viento que llevó a este hombre por páramos más agradables.

Doy sinceros agradecimientos a David Vega, aquel especial amigo al que muy pocas veces puedo encontrar, pero que sin dudas ha marcado un alegre hito en mi pasar por Química y Farmacia. Gracias por los divertidos y sinceros momentos que compartiste conmigo, eres, por lejos, el hombre de mayor virtud y de intenciones más diáfanos que he conocido. Estoy más que seguro que, con tu forma tan alegre y dispuesta para ver la vida, la cosecha de tu larga y costosa siembra será de lo más fructífera. Con estas líneas no puedo hacer más que reflejar una parte del aprecio y de lo tanto que enseñas a este tu amigo, aquel que aborrecías antes de conocerlo.

Terminaré de agradecer a mis amigos reconociendo a Patricia Fuenzalida, que si bien no estuviste en la parte más dulce de este viaje -por razones que mi terquedad demoró en entender-, agradeceré siempre tu compañía y fortaleza en mis tres primeros años de carrera. Estuviste conmigo en la pendiente más extrema y en el llanto más frecuente, sin obtener una recompensa digna por el esfuerzo que supone compartir la carga de otra persona. Quiero que sientas este trabajo como el de una flor que creció sola, pero que sin tu ayuda, no hubiera sido más que una semilla.

Si bien todos a quienes he nombrado hasta ahora son parte de un círculo muy importante de mi vida, quiero ahora, y como último apartado, agradecer a quienes fueron protagonistas en el desarrollo de mi tesis, aquellos que de no tener su apoyo, este trabajo no sería siquiera fruto de mi imaginación. Agradeceré, en primer lugar, a la profesora Leticia Luna por todo el conocimiento entregado durante sus clases y por toda la virtud que emanó de nuestras conversaciones fuera del aula. Son escasos los profesores que se dan el tiempo de conocer las personalidades que existen detrás de los individuos a

quienes enseñan. Gracias por exhortarme, con su sana humildad, a pensar sobre los cursos de mi vida. Muchas de las preguntas que me hizo en esas oportunidades de plática permanecen sin responder, pero espero pacientemente el momento en que llegue la hora de contestar al menos una de aquellas interrogantes: si dejar el estuche o colgar la bata blanca.

Aprecio con profusión la labor de mi co-director, Rodrigo Somoza, por la sempiterna disposición de acudir a mi auxilio, incluso en los momentos más complejos para sí mismo. Agradezco por todas las preguntas contestadas de manera precisa y atenta, siempre con una sincera preocupación por mis avances o retrocesos. Sin duda es otro de mis referentes en la labor científica, pues sus habilidades y competencias no eclipsan la buena atmósfera de su calma y afabilidad, valor tan apreciado -y a veces tan escaso- en cualquier grupo de trabajo. Te deseo el mejor de los éxitos en la siguiente fase que te dispones a emprender en tu vida. Fue una honra preeminente el haberlos conocido y haber estado bajo vuestra tutela todo este tiempo.

Hace mucho tiempo que he pensado en el monumento literario que debería erigir para Miguel Fuentes y Ricardo Ceriani, un reconocimiento a su cordialidad y desinteresada ayuda, pero creo que no me queda más que darles las gracias de la forma más humilde que puedo. Gracias por ser mis principales instructores en las bases del cultivo celular y en el manejo de diversas técnicas de biología molecular; por las entretenidas tardes en que además del aprendizaje formal, me enseñaron lo principal de la labor científica: forjar la paciencia, perder el miedo al fracaso y manejar apropiadamente la frustración ante un experimento errado. Es en ustedes en quienes baso mi experiencia en el laboratorio y a quienes pretendo seguir con el mismo entusiasmo que profesan por el camino de la ciencia.

Nunca podría cerrar esta sección sin agradecer a la profesora Caroline Weinstein, mi mentora en la ciencia. Su pasión por revelar los misterios de la Naturaleza me cautivó desde el primer año de carrera, cuando hizo una charla sobre las áreas de investigación que existían en nuestra facultad. Este aprecio no hizo más que aumentar a la hora de cursar sus asignaturas. Biología Molecular e Inmunología dejaron una huella indeleble en mi formación; a pesar de no figurar entre las mejores que he aprobado, me decidieron finalmente a tomar mi curso hacia la investigación. Desde ese momento surgió un

entramado que llegaría hasta este punto, pasando antes por serias conversaciones donde usted ponía a prueba mi deseo de quedarme en esta área donde, en palabras de Ricardo, se avanza un paso para retroceder tres. Agradezco su atención y afectuoso sentido de unidad, siempre dispuesta a brindar directrices a pesar de las múltiples obligaciones que posee en su vida. Vea esta tesis como un primer pilar, primera fase de una estructura que nació por el soplo y guía de su amoroso mecenazgo.

Al final de este viaje, por sobre todo lo anterior, va el agradecimiento más importante, la gratitud hacia mi familia, por ser la vida, el origen de todas las cosas. Sin ustedes todo esto hubiera llegado a su fin, pero no de la misma manera. En este tiempo he aprendido que yo no soy nada más que ustedes con una carga de defectos adicionales. Por ello agradezco a mi madre, que es la fuerza, el aliento para seguir adelante sin que el miedo y las heridas te paralicen; de mi padre es la curiosidad, el interés por comprender el mundo, por saber un poquito más y por entender a quienes te rodean; de mi hermano Ernesto es la alegría, esa que poco a poco entiendo y que tantos años me costó comprender cómo influye, no en los logros, sino en el GOZO que estos nos producen; de mi hermano Daniel es la calma, esa que me condujo apacible en los momentos en que todo parecía fallar y venirse encima; y de mis hermanas Mariola y Nadia son el amor y mi eterna discrepancia con las líneas establecidas.

Gracias a todos ustedes por esta hermosa experiencia. Son los gestores silenciosos de todo cuanto pudo, puede y podrá salir de estas páginas.

ÍNDICE

Sección	Página
Introducción	12
Hipótesis	19
Objetivos	20
Materiales y Métodos	21
Resultados	34
Discusión	38
Conclusiones	50
Bibliografía	51
Anexo 1	56

RESUMEN

En el continuo desarrollo de nuevas tecnologías para la curación de problemas de salud como las quemaduras y otras lesiones de la piel, la medicina regenerativa ha incorporado entre los métodos para su tratamiento la terapia celular. Esta última se ha vinculado en la actualidad al uso de implantes de células madre adultas para mejorar el proceso de curación de lesiones cutáneas. A estas innovaciones tecnológicas se suman los avances realizados en el esclarecimiento de las rutas bioquímicas que permiten la reparación de las heridas y las biomoléculas involucradas en cada fase del proceso. Todo esto abre un nuevo desafío: establecer los mecanismos por los que estos sistemas de implante que contienen células madre consiguen una reparación rápida y efectiva de las heridas de la piel, conocimiento que resultará ser crucial para optimizar los dispositivos médicos para medicina regenerativa.

De acuerdo a estos planteamientos, la presente investigación se enfocó en la medición de los niveles de factor de crecimiento transformante β_3 (TGF- β_3) que se producen en células madre mesenquimáticas positivas para endogлина (CD105+) cultivadas en monocapa o inmovilizadas en un sistema de implante de soporte polimérico integrado con un gel de fibrina. La determinación de TGF- β_3 en el medio de cultivo se efectuó por ELISA y la expresión génica del mismo gen mediante PCR en tiempo real.

Se observó una tendencia a una mayor secreción de TGF- β_3 en células integradas en el sistema de implante durante su primer y tercer día de cultivo celular. Los niveles de ARNm para TGF- β_3 de células cultivadas en el sistema de implante resultaron indetectables. Estos resultados, aunque requieren más estudios, sugieren una regulación postranscripcional de la expresión de TGF- β_3 .

ABSTRACT

In the incessant development of new technologies for the solution of health problems like burns and other skin injuries, regenerative medicine has included cell therapy as one of its methods for the treatment of these complications. Today, the latter has been related with the use of adult stem cells implants to improve the process of cutaneous wound healing. In addition to these technological innovations, the recent insights in the understanding of the biochemical paths that allow wound healing and the knowledge of biomolecules involved in each phase of the process opens a new challenge: to establish the mechanisms by which stem cells implant systems mediate fast and effective healing of skin injuries. This knowledge would be essential for optimization of medical devices in regenerative medicine.

In agreement with the above establishments, this research was aimed to measure the levels of transforming growth factor β_3 (TGF- β_3) that are produced by endoglin-positive (CD105+) mesenchymal stem cells cultured in monolayer or immobilized in a polymeric implant system integrated with a fibrin gel. The TGF- β_3 levels in the culture medium were determined by ELISA and gene expression by real time PCR.

A trend to a higher level of TGF- β_3 secretion was observed in the cells integrated in the implant system, during the first and third day of cell culture. The TGF- β_3 mRNA levels for cell cultures in the implant system were undetectable. These results, even though more experiments are required, suggest a post-transcriptional regulation of TGF- β_3 expression.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el desarrollo de sustitutos de piel ha constituido un avance fundamental en el tratamiento de varias complicaciones a la salud como las úlceras crónicas, amputaciones y quemaduras de diverso grado, ofreciendo una nueva herramienta para la cirugía reconstructiva, la que busca entregar al paciente condiciones de vida iguales o similares a las que poseía en su vida previa al accidente o proceso de enfermedad¹. Con este fin, la ingeniería de tejidos ha desarrollado diversos sistemas de implante conformados a partir de células -mayoritariamente queratinocitos y fibroblastos- del propio paciente incorporadas en polímeros tridimensionales confeccionados a partir de distintos materiales naturales como colágeno tipo I, alginato, glucosaminoglucanos (GAG), fibronectina, fibrina, ácido hialurónico, quitosano y gelatina, o materiales sintéticos como ácido poliláctico (PLA), politetrafluoroetileno (PTFE), polietilentereftalato (PET), entre otros^{2,3}. Algunos de estos materiales pueden combinarse en diversas proporciones para generar sistemas compuestos cuyas propiedades permitan que el implante se fije efectivamente a la zona afectada, mejore los patrones de sanación y signifique, en la medida de lo posible, la menor toxicidad y rechazo inmunológico para el paciente^{3,4}. Un ejemplo de esta clase de polímeros compuestos es el que constituye el sistema de implante integrado (SII), conformado a partir de una matriz de gelatina, quitosano y ácido hialurónico en proporción 7:2:1, a la que se incorporan las células a implantar a través de un gel de fibrina formado *in situ*. Este sistema fue desarrollado por investigadores del Centro de Biotecnología de la Universidad Técnica Federico Santa María, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia y del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso a través del financiamiento de los proyectos FONDEF D02i1009 y D07i1075^{4,5}.

Con el uso de estos implantes se ha observado, en algunos casos particulares, una regeneración completa de las heridas con una leve cicatrización, de buena calidad funcional y cosmética. Sin embargo, una de las principales problemáticas que ha supuesto el uso de implantes poliméricos es el mayor tiempo que necesitan para regenerar los tejidos lacerados en comparación con el autoinjerto, donde se emplaza un trozo de piel de otro sector en el sitio de la herida. Esta mayor demora en comparación al implante autólogo es lo que ha supuesto uno de los grandes desafíos a superar por la ingeniería de tejidos, ya que si bien el uso de autoinjertos cubre la necesidad médica del paciente en un tiempo menor al uso de matrices poliméricas, es más frecuente que su uso se asocie a la presencia de cicatrices invalidantes o cosméticamente inaceptables, ya sea en el interior o en la periferia del tejido trasplantado, suponiendo esto último una desventaja que es motivo de grandes gastos económicos en salud a nivel internacional, debido a que la formación de tejido fibrótico es más veloz que la regeneración del tejido mismo¹.

Por la misma razón expuesta anteriormente, a las técnicas para el desarrollo de implantes se ha sumado la incorporación de células madre adultas, esto debido a su rápida proliferación *in vitro* y su gran capacidad de diferenciación que permite la restitución más acelerada de diversos tejidos incluso en forma independiente de la capa germinal a la que pertenezcan dichas células⁶. Un ejemplo de lo anterior son las células madre mesenquimáticas (siglas en inglés MSC) que están presentes a nivel del tejido adiposo, médula ósea, hueso, encías, piel, membrana sinovial, entre otras fuentes. Estas células presentan propiedades tales como la adherencia a superficies de cultivo celular, expresión de marcadores de membrana plasmática como CD73, CD44, CD90 o endoglina (CD105), entre otros. Además, se caracterizan por su potencial para diferenciarse hacia

linajes mesenquimáticos, es decir, osteoblastos, condrocitos y adipocitos⁷⁻⁹. De acuerdo a diversas señales microambientales como factores solubles, señales químicas, presión de oxígeno y co-cultivo con otras células, pueden también diferenciarse a varios linajes celulares, incluyendo células de la piel. Dicha capacidad podría ser de gran utilidad al llevarse a implantes confeccionados a partir de MSC en coexistencia con queratinocitos o fibroblastos, principalmente estos últimos, pues son los principales orquestadores del proceso de sanación de heridas. Además, es relevante señalar que estas células tienen como una de sus funciones participar en los procesos de reparación tisular en función a las señales del microambiente^{8, 10}.

El mecanismo de curación de heridas, en forma fisiológica, se compone de una serie de tres etapas que se suceden en el siguiente orden: fase inflamatoria, donde la respuesta inmunitaria que busca frenar la progresión de la hemorragia o el daño; fase de proliferación, marcada por el aumento de fibroblastos y síntesis de colágeno y fase de remodelación tisular, donde la reepitelización y neovascularización se hacen primordiales para la viabilidad de los tejidos reconstituidos. En cada uno de los períodos de este proceso se articula una compleja red de señalización intracelular que desemboca en la síntesis de importantes citoquinas que llevan a cabo la función curativa de las zonas laceradas¹¹. Un ejemplo de esta clase de mediadores es el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), citoquina de características ubicuas, que es mediadora fundamental de una serie de procesos celulares como el crecimiento, diferenciación y la apoptosis. Su acción también puede extenderse hasta la respuesta inmunitaria, la regulación de la motilidad celular epidérmica¹², la regeneración de cartílago y fibroblastos^{12,13} -por medio de un proceso muy coordinado entre sus distintas isoformas-, la neovascularización, la síntesis de matriz extracelular¹⁴ y una serie de procesos

patológicos que incluyen dentro de sí a la osteoartritis¹⁵, el Síndrome de Marfan y Loeys-Dietz, el labio leporino y otra serie de complicaciones asociadas a la carencia o exceso de alguna de las isoformas; en que se clasifica este factor -TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 - cuya expresión es diferente de acuerdo al tipo de tejido¹⁶. La acción de estas proteínas es dependiente en gran medida de una función coordinada con el citoesqueleto y su asociación con receptores asociados a enzimas serina/treonina quinasas que gatillan el inicio de una vía de transducción de señales asociadas a complejos proteicos Smad2/3 o Smad1/5/8 que se fosforilan entre sí -reacción que puede ser inhibida por Smad7- y forman un complejo con Smad4 que pasa al núcleo celular, llevando finalmente a la expresión de genes que codifican para proteínas fundamentales en los procesos antes mencionados^{17, 18}.

Las diversas isoformas de TGF- β exhiben distintos patrones de concentración en el organismo según la etapa vital que se encuentre cursando. Evidencia de esto es que se ha descrito que la presencia de TGF- β_3 es superior a TGF- β_1 y TGF- β_2 en tejidos embrionarios, mientras que en el adulto esta relación se invierte. El patrón de curación de heridas en un individuo se encuentra asociado a la forma de TGF- β imperante, observándose que la mayor presencia de TGF- β_3 en el embrión y feto le permiten sanar sus heridas cutáneas mediante un proceso de regeneración completa del tejido sin formar cicatrices una vez concluido, a diferencia de lo que se observa en un fenómeno de reparación celular adulto^{11, 19}.

Por esta misma razón, es adecuado inferir que la acción regeneradora de la piel con cicatrices de mejor calidad que se presenta con el uso de ciertos injertos poliméricos en la piel se podría deber, al menos parcialmente, al efecto de TGF- β_3 sobre los fibroblastos subyacentes en la herida. Además se ha observado que su aplicación en

heridas, tanto en animales como humanos, mejora considerablemente la evolución del proceso de cicatrización¹⁹. El problema que nace a partir de este razonamiento es que asume que esta citoquina es secretada directamente por las células en su forma biológicamente activa desde sus reservorios citoplasmáticos, lo que, al ponerlo en contraste con lo descrito por la literatura, ilustra una verdad completamente diferente. TGF- β es secretado inicialmente en una forma química latente que debe pasar por un proceso de activación previo a ejercer los efectos antes expuestos para esta citoquina. Esta secuencia de eventos ha sido estudiada ampliamente tras largos años, determinándose finalmente que TGF- β es un factor de crecimiento cuya forma latente responde a una asociación de moléculas biológicas que Annes y *cols.* el año 2003 explicaron mediante la comparación con un sensor de humo²¹. Este modelo, utilizado con fines comparativos por los autores, consigue establecer en forma clara los fines estructurales y funcionales de cada componente de este complejo de latencia. El proceso de formación de este sistema se inicia con la secreción de TGF- β en unión covalente con una molécula denominada proteína asociada a latencia (LAP), complejo que a su vez queda anclado a la matriz extracelular por medio de una proteína de unión a TGF- β Latente (LTBP), constituyendo finalmente el “sensor de humo” o complejo mayor de latencia (siglas en inglés LLC, *Large Latency Complex*) donde todos sus constituyentes tienen una función específica y determinada por este modelo²¹.

TGF- β , al ser la molécula principal de este complejo y la única dotada de actividad biológica, es la que ha sido denominada como el “efector” del LLC. LTBP corresponde a lo que denominan el “localizador” del sistema, pues sin su presencia, TGF- β no podría unirse a la matriz extracelular y desencadenar sus efectos al verse impedido el paso final del ciclo de síntesis del LLC. Además de lo anterior, LTBP es el factor que limita la acción

de TGF- β a un tejido determinado, por lo que el estudio aislado de esta proteína y sus diversas formas ha permitido caracterizar los subtipos de LTBP presentes en cada tejido y las isoformas de TGF- β que pueden unirse a su estructura²¹. En última instancia, LAP es el “detector” del complejo, estructura que presenta diversas isoformas que corresponden al tipo de TGF- β al que se encuentra unido. Su función es fundamental al gestar el paso de TGF- β desde su forma latente a su estructura activa en respuesta a enzimas o condiciones determinadas del entorno extracelular que ejercen acción proteolítica sobre esta asociación de latencia para liberar finalmente TGF- β activo, cuya cantidad depende del número de complejos que se encuentren anexados a la matriz extracelular, a diferencia de lo descrito anteriormente por otros autores²², quienes teorizaban la existencia de “reservorios” de TGF- β que explicaban el límite de liberación máxima de la citoquina activa que se observaba al adicionar moléculas promotoras de la activación o sometiendo al medio bajo estudio a condiciones adversas para el normal desarrollo de la vida, totalmente fuera de lo fisiológicamente observado. Algunos ejemplos de estos factores de activación son: condiciones extremas de pH, especies reactivas de oxígeno (ERO), proteasas como plasmina, trombospondina-1 y algunas integrinas como $\alpha\beta_3$, $\alpha\beta_5$, $\alpha\beta_6$ y $\alpha\beta_8$ ²².

La acción de estos agentes activadores, particularmente en el caso de las integrinas, puede ser específica para una isoforma particular de TGF- β . Así es como se ha logrado caracterizar la acción activadora de integrina $\alpha\beta_6$ sobre TGF- β_1 y TGF- β_3 mediante ensayos de actividad luciferasa en líneas celulares HT-1080 de fibrosarcoma humano y SW-480 de adenoma de colon²³. De esta experiencia logró inferirse que tanto LAP1 como LAP3 -las proteínas de latencia que constituyen el sistema “sensor” de TGF- β_1 y TGF- β_3 - son estructuras con dominios Arginina-Glicina-Aspartato (RGD) que son

reconocidos específicamente por este tipo de integrinas²³. Sobre la base de este hallazgo, estudios posteriores realizados en rata, cerdo y humano, pudieron determinar que la ausencia de moléculas activadoras puede desencadenar severos problemas a nivel del desarrollo embrionario -labio leporino, infiltración inflamatoria pulmonar, reducción de la secreción de surfactante pulmonar, desarrollo aberrante de la vasculatura cerebral, entre otros- y la sanación de heridas²⁴, encontrándose en este último caso que según el balance de concentraciones en que se encuentren las isoformas 1 y 3 de TGF- β es el patrón de cicatrización que se observará en la herida²⁴. Lesiones cuyo proceso de sanación ha sido promovido mayormente por TGF- β_3 exhibirán una restitución total del tejido sin presencia de cicatriz, caso que es observado naturalmente en la sanación de heridas gingivales y embrionarias^{24, 25}. En lo referido a las heridas a nivel del tejido dental, en la actualidad se ha observado que a pesar de tratarse de un tejido en fase adulta, su mecanismo de sanación es similar al observado a nivel fetal, revelando en cultivos asociados a sistemas de implantes poliméricos de MSC derivadas de la matriz periapical de la raíz dental un nivel de TGF- β_3 superior al apreciado en células adultas cultivadas en monocapa²⁶.

En base a los antecedentes anteriormente expuestos, surge el interés en dilucidar si las células madre mesenquimáticas CD105+ incluidas en SII, matriz donde las células son cultivadas en un coágulo de fibrina que mimetiza la etapa inicial del ciclo de curación de heridas, podrían inducir un aumento en la expresión o secreción de un factor estimulante de la regeneración sin cicatriz como es el TGF- β_3 .

HIPÓTESIS

Se postula que las células madre CD105+ cutáneas, por su capacidad de captar el microambiente en que se encuentran, al ser incorporadas en una matriz porosa bioactiva (Sistema de Implante Integrado) expresarán y secretarán TGF- β_3 en mayor cantidad frente a un cultivo convencional en monocapa.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión y secreción de TGF- β_3 en células madre mesenquimáticas CD105+ de origen cutáneo que han sido cultivadas en monocapa o incorporadas en Sistema de Implante Integrado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar los niveles de TGF- β_3 secretados al medio extracelular por MSC CD105+ cultivadas en monocapa o incluidas en el SII por medio de ELISA.
- Evaluar la influencia del cultivo en SII sobre la expresión de ARNm para TGF- β_3 por células madre mesenquimáticas CD105+ de origen cutáneo mediante PCR en tiempo real.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo celular

Se utilizaron células madre mesenquimáticas CD105+ humanas derivadas de un cultivo primario de células derivadas de una biopsia de piel, el que fue sometido a separación inmunomagnética para obtener aquella población celular que posee el marcador de superficie antes mencionado. Estas células fueron sembradas en dos condiciones: monocapa (metodología de cultivo convencional) e incorporadas a SII. En ambas situaciones, la densidad de células utilizada correspondió a la necesaria para alcanzar la preconfluencia en una placa de cultivo de 10 cm de diámetro (alrededor de 10.000 células/cm²) con Medio Eagle Modificado por Dubelcco F12 (DMEM F12; Invitrogen®, Carlsbad, EEUU; 2011) -medio que, a pesar de contener rojo fenol como indicador, no altera las mediciones de TGF- β_3 al no poseer el gen para esta citoquina elementos de respuesta estrogénica-, con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF; Biological Industries, Israel; 2010) y los antibióticos penicilina 0,1 UI/mL y estreptomycin 0,1 mg/mL (Gibco®, Grand Island, NY, EEUU; 2011).

2. Preparación de matriz porosa

La matriz polimérica porosa es preparada en el Centro de Biotecnología Dr. Daniel Alkalay Lowitt de la Universidad Federico Santa María. Se constituye inicialmente a partir de una solución de gelatina 1%, quitosano 2% en ácido acético 1% y ácido hialurónico 0,01% en proporción 7:2:1 distribuida en placas Petri estériles de 10 cm de diámetro, siendo posteriormente sometida a un enfriamiento secuencial desde los 4°C a los -192°C previo a la eliminación de su contenido acuoso por medio de un liofilizador (Liobras®). El resultado de este proceso es un polímero base que al tomar contacto con cualquier solvente polar puede disolverse y perder su constitución inicial; por esta razón, se induce la formación de grupos amida a partir de sus residuos amina y sus residuos carboxílicos por la adición de una solución hidroalcohólica entrecruzante compuesta de N-hidroxisuccinimida (NHS) 8 mM y 1-etil-3-(3-dietilaminopropil)carbodiimida (EDC) 30 mM, usando ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 50 mM como agente estabilizador de pH. Los polímeros entrecruzados son lavados con etanol absoluto y vuelven a un ciclo de enfriamiento y liofilización hasta obtener la forma final que es utilizada en el laboratorio como base para la conformación del SII (Figura 1).

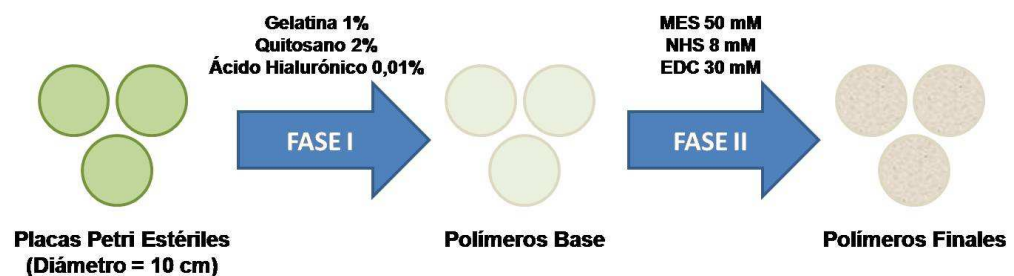


Figura 1. Diagrama de elaboración de polímeros. Fase I. Se inicia el proceso con las soluciones en placas Petri estériles que son liofilizadas para conformar una matriz base. Fase II. Se entrecruza y somete a liofilización el polímero base.

3. Ensamblaje de SII

Los polímeros entrecruzados fueron esterilizados mediante inmersión en etanol al 70% por una hora. La matriz polimérica esterilizada se secó mediante un papel absorbente estéril para ser acondicionada posteriormente con medio de cultivo durante las 24 horas previas al experimento. Al finalizar este proceso, se ubicó en cada placa Petri una circunferencia de 8 cm de diámetro, equivalente a un área aproximada de $50,0 \text{ cm}^2$ ⁵.

Para la constitución del SII, un volumen de suspensión celular de 1 mL -que contenía alrededor de 800.000 células-, se disolvió en 4 mL de una solución salina de cloruro de calcio 30 mM y cloruro de sodio 100 mM con trombina 3 mg/mL (Sigma®, Saint Louis, EEUU; 2011) . Esta mezcla se depositó sobre la matriz porosa en forma espiral, tratando de abarcar toda la cara superior del polímero y esperando alrededor de 30 segundos para permitir su inclusión en la matriz. Una vez absorbida la solución, se agregaron 5 mL fibrinógeno 20 mg/mL (Sigma®, Saint Louis, EEUU; 2011)⁵. Esto generó la coagulación *in situ* de fibrina que contiene las células madre mesenquimáticas, las que quedan incluidas así en el SII ⁵ (Figura 2).



Figura 2. Conformación del SII. Previa esterilización y acondicionamiento de los polímeros entrecruzados, se aplica una solución de trombina 2 mg/mL que contiene las células. Finalmente, se aplica una solución de fibrinógeno 20 mg/mL para generar la coagulación *in situ*.

4. Evaluación de la secreción y expresión de TGF- β_3

4.1. Determinación de TGF- β_3 por inmunoensayo en medio condicionado

Las células en cultivo fueron incubadas en una progresión a los 0, 3 y 5 días para evaluar las variaciones de concentración de TGF- β_3 a lo largo del tiempo. Los intervalos fueron establecidos en función del número de células a sembrar en cada placa de cultivo, dado que en un intervalo superior a los 5 días, las células alcanzan la confluencia, proceso en el cual se produce inhibición por contacto y muerte celular. El medio de cultivo no fue reemplazado durante todo el tiempo en que se desarrolló la curva de tiempo. Cada muestra se recolectó en tubos de micro centrífuga que fueron congelados a -80 °C hasta el momento de su análisis.

Para efectuar el inmunoensayo, las muestras congeladas fueron sometidas a un proceso de liofilización, resuspendiendo el sólido final en 500 μ L de solvente provisto por el proveedor del inmunoensayo para iniciar de esta forma el protocolo de medición mediante el kit de ensayo ELISA para TGF- β_3 humano (R&D Systems®, Minneapolis, EEUU; 2008). Este kit permitió la cuantificación específica de TGF- β_3 activo en placas de 96 pocillos. Estas fueron recubiertas con un anticuerpo monoclonal contra TGF- β_3 (anticuerpo de captura). Una vez fue fijado el anticuerpo a la placa, se removió el exceso por medio de una solución de lavado formulada en base a Tween® 20 0,05% usando buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2 - 7,4 como solvente. Con las placas lavadas, se procedió a incorporar las muestras en cada uno de los pocillos tratados con el anticuerpo de captura. Tras lavar por segunda vez, se retiraron los excesos de material no reactivo y se procedió, posteriormente, a incorporar un segundo anticuerpo marcado con biotina, que al contacto con la enzima estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP)

y una solución sustrato de peróxido de hidrógeno y tetrametilbenzidina, generaron un producto coloreado, que absorbe a una longitud de onda de 450 nm previa detención de reacción por uso de H_2SO_4 2N. La medición de absorbancia se realizó en un lector de placas (SensIdentScan, Merck®) que tras determinar la densidad óptica a 450 nm, se realizó una segunda medición a 540 nm para restar el efecto interferente de la placa de 96 pocillos en la medición, según lo sugerido por el proveedor del kit del inmunoensayo. Luego de este procedimiento, se construyó una curva de calibración para calcular la concentración de $\text{TGF-}\beta_3$ presente en el medio de cultivo (Figura 3).

De acuerdo a las indicaciones del proveedor, la adición previa de ácido clorhídrico 1 N promueve la activación del $\text{TGF-}\beta_3$ presente en la muestra. Basándose en este procedimiento, se establecieron dos situaciones para cada muestra -en presencia y ausencia de ácido clorhídrico-, lo que permitió dilucidar la proporción existente entre el $\text{TGF-}\beta_3$ activo e inactivo de cada muestra analizada.

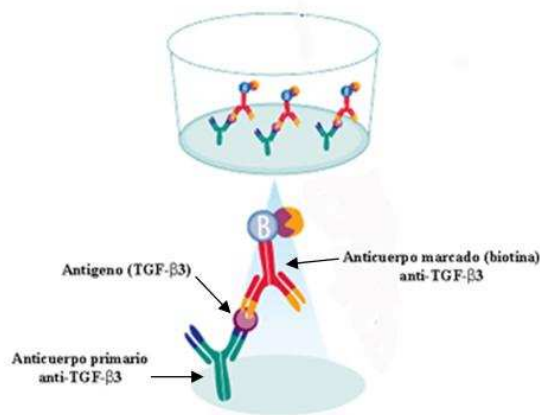


Figura 3. ELISA tipo sándwich para $\text{TGF-}\beta_3$. Su estructura consiste en un anticuerpo primario (captura) contra $\text{TGF-}\beta_3$, el antígeno a cuantificar y un anticuerpo secundario (detección) anti- $\text{TGF-}\beta_3$ ligado a biotina. Esta estructura se complementa con estreptavidina-HRP y una solución sustrato para generar un producto coloreado cuya absorbancia a 450 nm es medida para la cuantificación de la citoquina (adaptado de Somoza, 2012²⁶).

4.2. Expresión de ARNm para TGF- β_3 por retrotranscripción ligada a PCR en tiempo real:

Para determinar los niveles de ARNm para TGF- β_3 , se utilizó la técnica de extracción de ARN sugerida por Wang y Stegemann para células asociadas a sistemas poliméricos²⁷. Las matrices poliméricas, dado su alto contenido de polisacáridos, interfieren con la extracción efectiva de ARNm y proteínas, al impedir que estas precipiten al momento de centrifugar las muestras^{27, 28}. Esto ocasiona que con las técnicas tradicionales de extracción de ARN -TRIzol®, Qiagen® y otros kits de extracción comerciales- se obtengan bajos rangos de pureza espectroscópica (relación de absorbancia 260 nm/absorbancia 280 nm y absorbancia 260 nm/ absorbancia 230 nm) que hacen impracticable la cuantificación posterior de ARNm por PCR en tiempo real. Por la misma razón, los autores anteriormente citados proponen un buffer de extracción formulado a partir de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), EDTA, Tris-HCl (pH 8,0), polivinilpirrolidona (PVP) y β -mercaptoetanol, cuyo efecto está centralizado en la acción del surfactante catiónico (CTAB), compuesto que ocasiona la ruptura de las membranas de las células y permite separar en forma efectiva a los ácidos nucleicos de cualquier polisacárido u otro compuesto interferente que pueda alterar el rendimiento de extracción²⁷.

A partir de la fórmula y el protocolo de elaboración sugerido por los investigadores previamente señalados, se preparó un buffer de extracción modificado, cuyo tensioactivo catiónico correspondió a cloruro de benzalconio al 2%. La formulación se explicita en la Tabla 1.

Tabla 1. Fórmula de elaboración de buffer de extracción de ARN (modificada a partir del trabajo realizado por Wang y Stegemann, 2010 ²⁷)		
Componente	Masa (g) / Volumen (mL)	Funcionalidad
Cloruro de Benzalconio 50% p/v (Winkler®, Santiago, Chile; 2010)	4,00 mL	Tensioactivo catiónico. Separa los ácidos nucleicos de polisacáridos u otros compuestos interferentes
Polivinilpirrolidona (PVP) (Kollidon K-30®, Basf®, Ludwigschafen, Alemania; 2008)	2,00 g	Previene la oxidación de polifenoles presentes en el medio intracelular o extracelular, evitando la formación de sustancias que obstaculicen la extracción
EDTA (Promega®, Madison, EEUU; 2009)	0,75 g	Agente quelante de metales. Impide que estos se unan al material genético a extraer
Cloruro de Sodio (Merck®, Darmstadt, Alemania; 1972)	8,00 g	Facilita la disolución de polisacáridos y separa complejos ARN/tensioactivo catiónico, facilitando su extracción al momento de centrifugar
Tris-HCl (Amersham Biosciences®, Uppsala, Suecia; 2001)	1,20 g	Amortiguador de pH. Debe ajustarse a pH = 8,0 por medio de HCl 1 N
β-Mercaptoetanol (Amersham Biosciences®, Uppsala, Suecia; 2001)	1,0 mL	Agente reductor. Denatura enzimas ARNasas en forma irreversible. Debe adicionarse al momento de utilizar por primera vez el reactivo de extracción
Agua libre de nucleasas (Integrated DNA Technologies, Iowa, EEUU; 2011)	≈ 95,00 mL	Solvente. Evita la degradación del ARN extraído al no contener ARNasas

Para conseguir ARNm según esta técnica, se calentó el buffer de extracción a 65°C y se añadió 1 mL de β -mercaptoetanol para inactivar nucleasas que puedan degradar el material génico obtenido. Al momento de adicionar este reactivo, el procedimiento difirió según la forma en que se encontraban sembradas las células. Para todos los cultivos que fueron realizados en monocapa, las células -previo retiro del medio de cultivo- fueron desprendidas de su placa respectiva por medio del uso de tripsina 0,05%-EDTA (Gibco®, Grand Island, NY, EEUU; 2011), resuspendiendo el precipitado final en 600 μ L de buffer de extracción. En aquellas placas donde se cultivaron las células asociadas a SII se procedió a triturar la matriz de soporte utilizando nitrógeno líquido y un mortero de porcelana, previamente tratado con etanol 70% y solución anti-ARNasas (RNase Zap®; Ambion®, Texas, EEUU; 2008), hasta obtener un pulverizado que se transfirió a un tubo de centrifugación de 50 mL donde se añadieron 10 mL del reactivo de extracción y se agitó durante 5 minutos, dividiendo el producto resultante en 8 tubos de micro centrífuga de 2 mL.

Posterior a la adición del reactivo de extracción y el tratamiento inicial de las muestras, se agregó a cada tubo de micro centrífuga, 600 μ L de una solución cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 24:1, lo que tras un proceso de centrifugación (17000 rcf, 5 minutos) permitió obtener una solución con tres capas: una capa superior acuosa que contenía mayormente ARN, una capa intermedia de proteínas intactas y residuos de polímero, y una capa inferior compuesta de moléculas hidrófobas. De estas capas se separó el sobrenadante, que fue dispuesto en un tubo de micro-centrífuga diferente.

Tras coleccionar la capa acuosa, se efectuó una secuencia de extracción mediante el uso de centrifugación y soluciones de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), isopropanol y etanol al 70%, obteniendo finalmente un precipitado que fue disuelto en 50 μ L de agua

libre de nucleasas. Posteriormente, el producto obtenido es purificado mediante el protocolo de limpieza de ARN del kit RNeasy® de Qiagen® (Ambion®, Texas, EEUU, 2010). El resultado de este proceso de filtración -ARN purificado final- es resuspendido en 20 µL de agua libre de nucleasas (Figura 4).

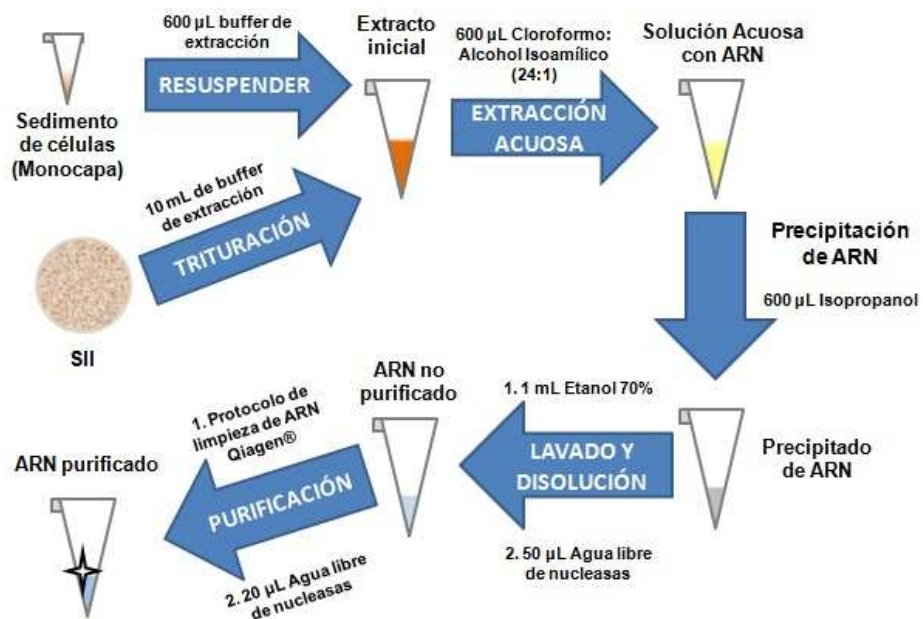


Figura 4. Protocolo de Extracción de ARN. El tratamiento inicial de las muestras con buffer de extracción involucra el uso de tripsina para cultivos en monocapa y nitrógeno líquido para la trituration de las células incluidas en SII. A continuación, se busca la obtención de ARN por medio de una secuencia de extracción con cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, isopropanol y etanol al 70% acompañada de ciclos de centrifugación en cada etapa. Al obtener el extracto primario de ARN, las muestras se purifican con el protocolo de limpieza de Qiagen®, el cual por medio de filtración selectiva y uso de distintos solventes, permite conseguir la muestra de ARN final cuya concentración y pureza debe determinarse antes de proceder a crear la hebra de ADNc correspondiente.

Luego de haberse efectuado el protocolo de extracción antes señalado, la concentración y pureza del ARNm de cada muestra se analizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop® y el software NanoDrop 3.0.1 (Coleman Technologies®). Se determinó como rendimiento espectral objetivo una baja interferencia proteica -relación absorbancia 260 nm/ absorbancia 280 nm cercana a 2,0- y una leve interferencia por

carbohidratos o compuestos aromáticos -relación absorbancia 260 nm/ absorbancia 230 nm similar a 1,0-. Además de ello, fue definida una concentración de ARN igual o superior a 50 ng/ μ L como apropiada seguir con la conformación de su ADN complementario.

La retrotranscripción del ARNm se realizó en un termociclador Thermo Electron® PxE 0,5 con el kit de transcriptasa reversa del virus de leucemia murina de Moloney (M-MLV; Promega®, Madison, EEUU; 2011). Dicho proceso se inició con la adición por duplicado del volumen equivalente a 1 μ g de ARNm extraído a 1 μ L de oligo dT 500 μ mol/mL, siendo disuelta esta solución en agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 12 μ L. Esta mezcla inicial se incubó a 70°C por 10 minutos. Transcurrida esta fase, a la solución anterior se incorporaron 8 μ L de una mezcla compuesta por desoxiribonucleótidos (dNTP), buffer de reacción (compuesto por Tris-HCl pH 8,3; cloruro de potasio, cloruro de magnesio y DTT), inhibidor de ARNasas, la enzima retrotranscriptasa M-MLV y agua libre de nucleasas. Además de la muestra anterior (+RT), se preparó con su duplicado una solución control sin retrotranscriptasa (control -RT) con el objeto de discernir mediante PCR en tiempo real si la muestra de ARNm contaba con ADN distinto del creado por medio del proceso de retrotranscripción (contaminación). Ambas muestras, +RT y -RT, se incubaron a 42°C por 50 minutos para iniciar la creación del ADN complementario (ADNc) y finalmente a 70°C por 15 minutos para frenar la reacción. Con las muestras resultantes se procedió a cuantificar el ARNm para TGF- β_3 y gen constitutivo (GAPDH) por medio de PCR en tiempo real, técnica implementada en el Laboratorio de Cultivos Celulares de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

La reacción de amplificación se realizó a partir de 2 μ L de ADNc mezclados con solución de PCR LightCycler-DNA Master SYBR Green (Reactivo proporcionado por el

fabricante -Roche®, Penzberg, Alemania; 2012- que consiste en *Taq* ADN polimerasa, tampón de reacción, dATP, dCTP, dGTP, dTTP y SYBR Green I), cloruro de magnesio 3-4 mM, partidor sentido 0,5 μ M y partidor antisentido 0,5 μ M, obteniendo un volumen final de 10 μ L que se utilizó para proceder con la amplificación mediante el termociclador LightCycler 1.5 (Roche®). Importante es detallar que las concentraciones del tampón de transferencia, desoxiribonucleótidos y enzima *Taq* ADN polimerasa son las sugeridas en el kit LightCycler-DNA Master SYBR Green I.

Las secuencias de los partidores utilizados fueron diseñadas mediante el software AmplifX 1.37 y fueron sintetizadas por Invitrogen®, correspondiendo a las siguientes:

TGF- β_3 sentido: 5'-AGCGCTATATCGGTGGCAAGAATC-3'

TGF- β_3 antisentido: 5'-CCTCCAAGTTGCGGAAGCAGTAAT-3'

hGAPDH2 sentido: 5'-CAAAATCAAGTGGGGCGATGCTG-3'

hGAPDH2 antisentido: 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT-3'

Para corroborar la existencia de un único producto de amplificación, se sometió a cada muestra a un análisis de denaturación (curva de melting) para los amplicones de TGF- β_3 (temperatura de denaturación = $88,0 \pm 0,8^\circ\text{C}$ ²⁶) que se realizó inmediatamente después del proceso de amplificación. Este análisis consistió en un ciclo en el cual se elevó la temperatura del termociclador a 95°C en un gradiente de 20°C por segundo con el fin de denaturar la doble hebra obtenida. Posteriormente, se efectuó un descenso hasta 65°C a 20°C por segundo con el fin de renaturalizar y se elevó finalmente la temperatura hasta 95°C a $0,1^\circ\text{C}$ por segundo, registrando la pérdida de fluorescencia cada $0,1^\circ\text{C}$.

El tamaño de los amplicones obtenidos se corroboró electroforéticamente. Para este objeto, se prepararon geles de agarosa al 2% donde se adicionaron las muestras en

conjunto con un estándar cuyo peso molecular corresponde a 100 pares de bases (pb; GeneRuler® DNA Ladder 0,5 µg/mL; Fermentas Life Sciences, Hanover, EEUU). Para el caso de TGF-β₃, el tamaño de amplicón esperado corresponde a 390 pb y para el gen constitutivo utilizado como control –GAPDH- el amplicón es de 283 pb ²⁶.

Posterior a la comprobación de la identidad de los amplicones, se obtuvo su expresión relativa en cada período usando el Método Pfaffl²⁹ (Figura 5). Para conseguir esto, se determinó la eficiencia de amplificación de cada uno de los partidores mediante una curva confeccionada a partir de la precipitación de los amplicones creados anteriormente con una solución acetato de amonio 10 M (Merck, Darmstadt, Alemania; 2006) y etanol absoluto a 4°C. Tras centrifugar y resuspender el precipitado en 10 µL de agua libre de nucleasas, se determinó su concentración con el espectrofotómetro Nanodrop®. Esto permitió crear un gradiente de concentraciones conocidas, esencial para la confección de una curva de eficiencia, que relaciona de manera lineal el logaritmo de la concentración del amplicón versus los ciclos umbrales (Ct) empleados para la amplificación de cada punto.

$$\mathbf{a)} \text{ Eficiencia} = (10^{-1/\text{pendiente}}) - 1$$

$$\mathbf{b)} \text{ Expresión Relativa} = \frac{\text{Eficiencia}_{TGF-\beta 3} \Delta Ct_{TGF-\beta 3} (\text{condición basal}-\text{condición evaluada})}{\text{Eficiencia}_{GAPDH} \Delta Ct_{GAPDH} (\text{condición basal}-\text{condición evaluada})}$$

Figura 5. Ecuaciones utilizadas para el cálculo de expresión relativa. **a)** Ecuación general para el cálculo de eficiencia. **b)** Fórmula para la cuantificación relativa de un gen propuesta por Pfaffl.

5. Análisis Estadístico

Los ensayos de ELISA y PCR en tiempo real fueron realizados en una única ocasión ($n=1$), dado el alto número de células CD105+ necesarias –alrededor de $4,8 \cdot 10^6$ células– y la limitada disponibilidad de polímeros en el Centro de Biotecnología Dr. Daniel Alkalay Lowitt obstaculizaron la posibilidad de efectuar experiencias independientes, requisito para un análisis estadístico. Sin embargo, para el inmunoensayo se determinaron las barras de error en función de los resultados obtenidos en la medición de los triplicados de cada muestra analizada, lo que corresponde a pseudoréplicas del experimento.

RESULTADOS

1. Secreción extracelular de TGF- β_3 :

Al iniciar los cultivos en monocapa (MC) y SII, pudo constatar que el límite de detección para la técnica ELISA empleada se establece en los 125 pg/mL (diferencia de absorbancia 450 nm/540 nm cercana a 0,120; ver Anexo 1). Si bien todas las mediciones realizadas en las muestras no activadas arrojaron resultados por debajo de este límite, se presentan sus diferencias de absorbancia en la tabla 2, pues existen algunas diferencias entre sus valores en monocapa y SII.

Tabla 2. Valores de Δ Absorbancia (450 nm - 540 nm) en cultivos en monocapa y SII que no siguieron el protocolo de activación.	
Situación	Δ Absorbancia (450 nm - 540 nm)
MC Día 0	0,090 \pm 0,004
MC Día 3	0,084 \pm 0,001
MC Día 5	0,090 \pm 0,004
SII Día 0	0,052 \pm 0,001
SII Día 3	0,072 \pm 0,001
SII Día 5	0,078 \pm 0,002

En conjunto a esta determinación, se procesó un grupo de muestras liofilizadas mediante la adición de ácido clorhídrico 1 N para activar la totalidad de la citoquina presente en cada situación. Esto permitió detectar tendencia a una mayor concentración de TGF- β_3 en SII respecto a MC al inicio del ensayo, disminuyendo al tercer día y obteniendo un nivel semejante a lo presente en monocapa al cabo de 5 días (Figura 6).

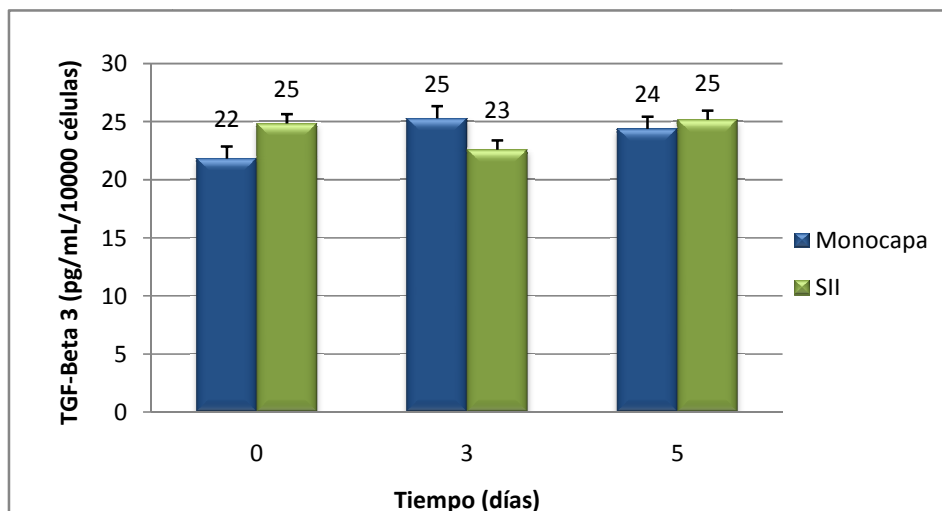


Figura 6. Medición de TGF- β_3 secretado por células CD105+. Antes de realizar las mediciones se procedió a activar las muestras reconstituidas con HCl 1 N. En el caso del SII, La concentración de la citoquina secretada decrece durante el día 3 para volver al quinto día a un valor comparable al de inicio. Esta situación se invierte en el caso de los cultivos realizados en monocapa, en los que la concentración de TGF- β_3 tiende a ser mayor en el tercer día de ensayo, respecto al día inicial y final del cultivo. Cabe mencionar que los resultados expresados en esta figura corresponden a un escalamiento de los valores obtenidos en el cultivo original –de alrededor de 800000 células por placa- a 10000 células (n=1).

2. Expresión de ARNm de TGF- β_3 :

La extracción de ARN con el buffer modificado presentó unos rendimientos muy bajos en la situación de SII, lo cual se describe detalladamente en la tabla 3.

Criterio \ Muestra	MC D-0	MC D-3	MC D-5	SII D-0	SII D-3	SII D-5
Abs 260 nm/Abs 280 nm	1,78	1,99	1,91	0,76	1,22	1,32
Abs 260 nm/Abs 230 nm	0,72	0,85	0,86	0,07	0,07	0,28
Concentración (ng/ μ L)	31,2	216,3	47,0	2,4	7,1	12,0

Sin embargo, la reacción de retrotranscripción y el PCR en tiempo real se efectuó en todas las muestras, revisando posteriormente la identidad de los amplicones mediante curvas de denaturación y electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se comprobó amplificación del gen constitutivo GAPDH para todas las situaciones evaluadas, a

diferencia de TGF- β_3 , que sólo fue amplificado en forma específica en los casos de cultivo en monocapa, pues los datos en polímero, a pesar de otorgar lecturas, estas no correspondían al amplicón específico asociado al gen de interés, lo que se reflejó en las curvas de denaturación y análisis electroforético (Figura 7). Las curvas de denaturación para los amplicones del gen constitutivo GAPDH mostraron una única temperatura que coincidió con la teórica $-88,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ para ambas condiciones de cultivo.

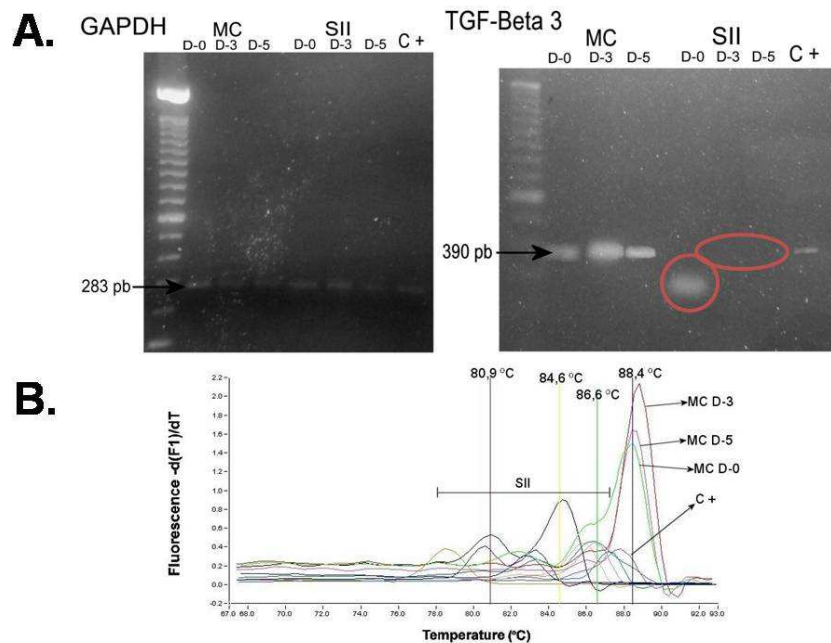


Figura 7. Comprobación de amplicones. **A.** Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Todas las muestras evaluadas amplificaron correctamente para el gen constitutivo GAPDH, mostrando bandas a 283 pb. Los amplicones para TGF- β_3 provenientes del ARNm aislado desde el cultivo en monocapa también presentan el tamaño esperado. Sin embargo, para el ARNm proveniente de SII, las bandas difieren del tamaño adecuado, como es el caso del día 0, o no se observan. **B.** Curvas de denaturación para TGF- β_3 en el conjunto de situaciones analizadas. Ninguna de las muestras cultivadas en SII amplificó la citoquina, sino que los aumentos de fluorescencia detectados fueron producto de señales inespecíficas.

Para el cálculo de la expresión relativa sólo se utilizaron los datos de punto de corte correspondientes a las curvas de fluorescencia de células en monocapa. Para realizar esta operación fue necesario efectuar las curvas de eficiencia para los dos genes amplificados, cuyos datos se resumen en la tabla 4.

Criterio \ Gen	GAPDH	TGF- β_3
Coefficiente de Correlación (r^2)	-0,95	-1,00
Pendiente	-3,437	-4,226
Eficiencia	0,9541	0,7244

Finalmente, para el cálculo de expresión relativa de TGF- β_3 por medio del método de Pfaffl, se estableció el día 0 como condición basal en cada uno de los genes amplificados. Como resultado puede observarse un aumento de la expresión génica de TGF- β_3 al tercer día, tal como se pudo constatar en los datos correspondientes a secreción de esta citoquina (Figura 8).

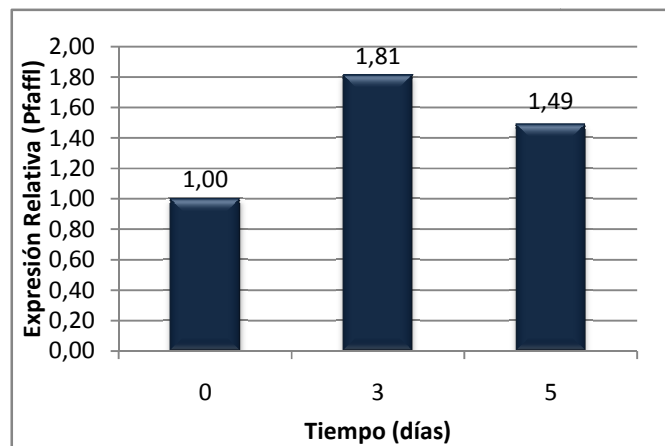


Figura 8. Progresión temporal de la expresión de TGF- β_3 para células CD105+ cultivadas en monocapa. Para el cálculo de expresión relativa se consideró al día 0 como condición basal (n=1).

DISCUSIÓN

1. Secreción extracelular de TGF- β_3 :

Los patrones de secreción de TGF- β_3 activado dan cuenta de una respuesta diferida según el progreso de los días, de acuerdo a si el cultivo se realizó en monocapa o SII. En el caso de los cultivos realizados en matrices poliméricas, este patrón de diferencia concuerda con los hallazgos científicos que demuestran que cultivos tridimensionales de células de menisco en matrices de colágeno consiguieron una mayor producción de componentes de la matriz celular de dicho tejido en comparación a los cultivos en monocapa³⁰. Esto refuerza la hipótesis de que las condiciones de cultivo influyen en el comportamiento celular. El aumento de la secreción de distintos factores que se presenta en células cultivadas en sistemas poliméricos también se ha observado en células madre embrionarias diferenciadas a fibroblastos, las que al ser cultivadas en sustitutos de piel 3D confeccionados a partir de colágeno tipo I, secretaron mayores niveles de factores de crecimiento participantes del ciclo de reparación de heridas al ser estas células estimuladas por el efecto mecánico que supone el estar cultivadas en un sistema polimérico³¹. Sin embargo, los niveles superiores de TGF- β_3 secretados en el día cero en SII se reducen al cabo del día 3, ilustrando uno de los principales factores distintivos del cultivo en soportes tridimensionales: un medio de anclaje distinto al ofrecido en un cultivo convencional en monocapa²⁶, lo que permite inferir que, en una fase intermedia –día 3-, parte de la dotación de células sembradas *ab initio* haya disminuido su actividad al encontrarse en un estado fisiológico diferente, o que hayan muerto al no conseguir adherirse a la matriz tridimensional, reduciendo consecuentemente la cantidad de TGF- β_3 total que se haya secretado al medio extracelular. Esta disminución es revertida al quinto día de iniciado el cultivo, donde se observa un aumento en la concentración de la

citoquina que se eleva hasta niveles cercanos a los que se observan en el cultivo en monocapa al cabo del mismo periodo. Durante esta fase ya se habría conseguido una adherencia de las células y el proceso de proliferación podría continuar en forma ininterrumpida y a un ritmo superior al observado en monocapa, al ofrecer el SII una red tridimensional de un volumen superior que maximiza la progresión del ciclo celular³². Este aumento de la capacidad proliferativa ha sido observado previamente en el Laboratorio de Cultivos Celulares, donde se estima que la confluencia de un cultivo de células madre mesenquimáticas en SII puede obtenerse alrededor de los 21 días de iniciado el cultivo (M. Fuentes, comunicación personal). Por ello será importante en el futuro efectuar cinéticas de tiempo a plazos mayores para comprobar esta hipótesis.

Si bien el patrón de secreción de TGF- β_3 total para SII obedece a un modelo de “campana inversa”, los cultivos en monocapa ilustran una progresión completamente distinta: bajos niveles al día cero con un aumento de secreción a los 3 días que se estabiliza al quinto. Este esquema puede explicarse mediante la dinámica tradicional del cultivo celular en monocapa. Al inicio, las células transferidas desde una suspensión celular poseen una concentración mínima de factores de crecimiento al ser estos lavados y retirados durante el proceso de tripsinización. Una vez adheridas a la placa de cultivo, empiezan a proliferar activamente, motivo por el cual podría explicarse el máximo de secreción a los 3 días, donde las células aún tienen espacio para crecer en forma ininterrumpida. Esta expansión se frena al quinto día, cuando las células CD105+ ya ocupan gran parte del área de cultivo de la placa, marcando el inicio del período de confluencia, donde las células al inhibirse por contacto, modifican sus patrones de expresión y secreción de factores de crecimiento disponibles al no existir más espacio para desarrollarse.

Cabe mencionar que ambos modelos de secreción de TGF- β_3 descritos anteriormente son similares a los observados en células madre mesenquimáticas derivadas de la papila periapical de la raíz dental, donde en una progresión de 3 días se observó para monocapa una secreción estacionaria con leves reducciones acorde al paso del tiempo del experimento²⁶. En el caso de SII, se registró un alza similar al inicio que fue decayendo continuamente hasta un mínimo en el día 3²⁶, permitiendo de esta forma sugerir que este patrón de secreción de TGF- β_3 podría ser transversal a todas las células madre mesenquimáticas cultivadas en SII. Sin embargo, sería necesario realizar nuevos estudios que permitan visualizar la evolución de la secreción de TGF- β_3 y otros factores de crecimiento en distintos tipos de MSC cultivadas en monocapa y SII para dar cuenta de la validez de estas inferencias. Además, un diseño experimental que considere un tiempo mayor de evaluación podría entregar mayores detalles de lo que ocurre con estos niveles a lo largo del tiempo en monocapa y SII.

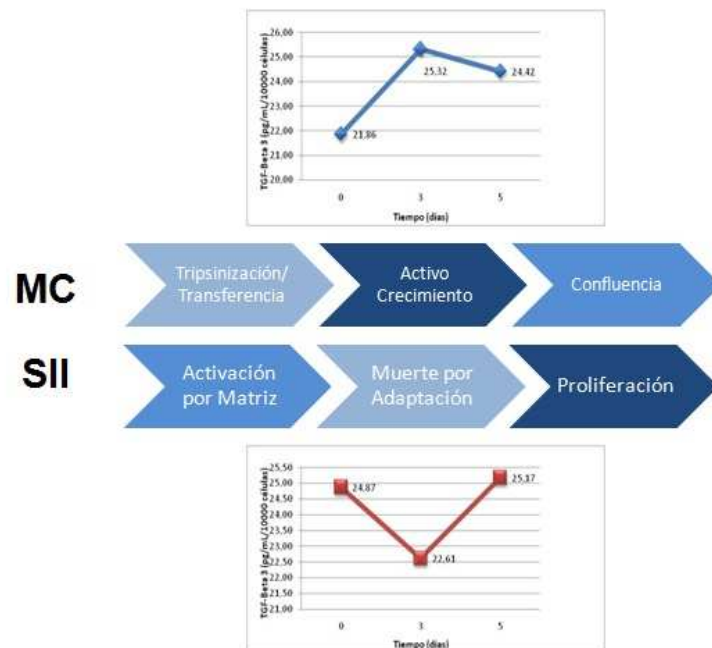


Figura 9. Modelos de secreción de TGF- β_3 para células CD105+ cultivadas en monocapa y SII. El cultivo en monocapa refiere un patrón de secreción con forma de “campana” cuya explicación se basa en las fases que normalmente se observan en un cultivo convencional. Por otra parte, los cultivos en SII, que poseen una progresión con forma de “campana invertida”, dan cuenta de un proceso de secreción que se rige por las respuestas adaptativas de las células CD105+ a una matriz tridimensional. Se consideró a cada día de evaluación como una fase a la que se le asignó un color cuya profundidad es acorde a la concentración de TGF- β_3 determinada a nivel extracelular.

Respecto a la presencia de la forma activa de TGF- β_3 , no pueden realizarse análisis precisos al encontrarse los niveles de esta citoquina activa por debajo del límite de detección de la técnica ELISA de R&D Systems® (125 pg/mL con diferencia de absorbancia 450 nm/540 nm cercana a 0,120). Sin embargo, a partir de los datos de diferencia de absorbancia puede observarse que las células en monocapa presentan un nivel superior de TGF- β_3 activo a lo detectado en SII, lo que se contrapone a lo anteriormente expuesto para TGF- β_3 total. Esto puede atribuirse a que la forma en que se obtuvieron las muestras de sobrenadante de SII para la medición de TGF- β_3 activo - tomando 1,5 mL desde el medio que rodeaba el polímero- no fue la adecuada al obtener la muestra de un área muy distante a la zona donde probablemente se libere el TGF- β_3

activo, incurriendo en un posible caso de sub-valoración. Para estas situaciones, sería preferible tomar el SII y retirar el volumen que ha quedado absorbido dentro de él mediante el estrujado; pues de existir TGF- β_3 activo en estas situaciones, lo más factible es que se encuentre en el medio de cultivo más próximo a las células tras ser liberado desde éstas.

En base a los resultados obtenidos, se puede determinar que la secreción de TGF- β_3 total es superior a la presente en cultivos tradicionales en monocapa, por encontrarse estas en una red 3D con una capacidad proliferativa mayor a los cultivos bidimensionales.

2. Expresión génica de TGF- β_3 :

Desde un inicio, la pureza espectroscópica de las muestras de ARN extraídas desde el SII dan cuenta de una importante contaminación con polisacáridos (razón de absorbancia 260 nm/ absorbancia 230 nm mucho menor a 1,0) provenientes del sistema de implante y una reducida concentración final de material génico extraído. Esto se puede atribuir a una acción insuficiente del buffer de extracción formulado a partir de lo propuesto por Wang y Stegemann en 2010, falla específica que puede atribuirse a que la concentración del tensioactivo catiónico utilizado, cloruro de benzalconio, no fue suficiente para generar una separación efectiva del ARN con los componentes interferentes e inducir la lisis de la mayoría de las células sembradas en la matriz. El criterio considerado para realizar el reemplazo de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) por cloruro de benzalconio fue sólo el cambio por un tensioactivo de similares características de polaridad, pero se ignoraron sus características moleculares específicas –factor que en el caso de los tensioactivos se refleja en su valor de Balance Hidrofílico-Lipofílico (BHL)- y su uso principal como agente preservante por sobre su acción surfactante –razón por la cual su BHL no figura en la literatura-^{33, 34}. Al no disponer de este dato esencial al calcular el volumen necesario de un tensioactivo para reemplazarlo por otro, se asumió que CTAB y cloruro de benzalconio, al ser surfactantes de similares características, poseían un valor de BHL equivalente (BHL=10)³⁵ para así fijar la concentración de este último en el mismo 2% que utilizaron Wang y Stegemann en su buffer de extracción de ARN.

A pesar de lo anterior, la cantidad de ADNc obtenida de SII para la amplificación por PCR en tiempo real fue suficiente para el gen constitutivo, donde se observaron curvas de denaturación precisas, además de una correcta identificación de los amplicones por electroforesis. Por el contrario, al momento de realizar la amplificación para TGF- β_3 , un

gen que está en una proporción menor que GAPDH, y para el cual la eficiencia de amplificación calculada fue 72,4%, la impureza de las muestras impidió una correcta amplificación, presentando como resultado amplicones distintos del objetivo, que en el caso de la electroforesis al día cero, ilustraron una intensa banda fuera de los 390 pb que se esperarían para TGF- β_3 . Esto pone en evidencia que, si bien la mala calidad del material genético extraído impide un análisis de la expresión de factores de crecimiento en células integradas en SII, la técnica de PCR en tiempo real es lo suficientemente sensible para amplificar los ciertos genes requeridos, resultados que no pudieron visualizarse por PCR convencional con muestras de ADNc provenientes de fibroblastos incluidos en un área de polímero menor a la utilizada en la presente investigación (C. Soto, comunicación personal). A pesar de lo anterior, la obtención de una adecuada cantidad y pureza del material genético extraído desde el SII se torna esencial para estudiar el comportamiento de las células, para esto se sugeriría realizar un estudio de reactivos de extracción que permitan determinar, a partir del cálculo de BHL, cuál es el tensioactivo más apropiado para extraer ARN desde el SII, dado que esta matriz, al estar constituida por gelatina, quitosano y ácido hialurónico, puede presentar una mayor interferencia que la utilizada por Wang y Stegemann, compuesta de quitosano y colágeno tipo I, por lo que no sólo sería conveniente analizar el desempeño de CTAB, sino también de otros tensioactivos de características similares como cloruro de n-cetilamonio, aniónicos como laurilsulfato de sodio (LSS) o no iónicos como es el caso de los tensioactivos derivados de la familia Tween® o Span®.

En el caso de la extracción de material genético de células en monocapa, la pureza y concentración fueron adecuadas para una efectiva retrotranscripción y amplificación posterior por PCR en tiempo real. La progresión a lo largo de los cinco días de estudio

permite vislumbrar un patrón de expresión relativa concordante al visto en la secreción de TGF- β_3 total –forma de “campana”-, lo que concuerda con la inferencia de que posiblemente el patrón de secreción de factores de crecimiento varíe con el área disponible que poseen las células para seguir proliferando. Este patrón es inverso al observado en MSC derivadas de la papila periapical de la raíz dental, donde se observa un máximo a día cero que decrece al cabo de 48 horas y aumenta a un nivel inferior al inicial al transcurrir 3 días ²⁶. La diferencia de estos resultados, más allá de las características propias de cada una de las células madre mesenquimáticas utilizadas, puede deberse a que los métodos utilizados para el cálculo de expresión relativa son diferentes a pesar de utilizar partidores para los mismos genes. El estudio realizado por Somoza efectuó el análisis por medio del método 2- $\Delta\Delta Ct$ (Figura 10), el cual posee como ventaja el cálculo sin necesidad de realizar una curva de eficiencia para cada uno de los genes involucrados.

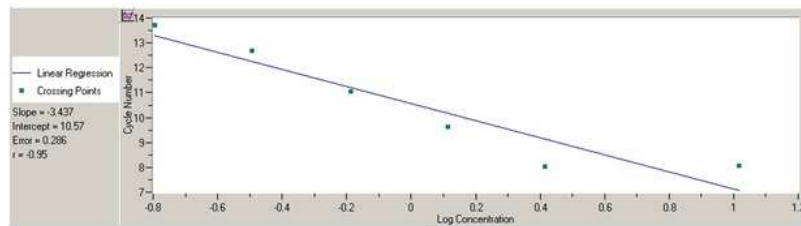
$$\frac{Ct \text{ condición evaluada } TGF - \beta 3 / Ct \text{ condición basal } TGF - \beta 3}{Ct \text{ condición evaluada } GAPDH / Ct \text{ condición basal } GAPDH} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Figura 10. Ecuación del método 2- $\Delta\Delta Ct$ para el cálculo de expresión relativa.

Sin embargo, el método 2- $\Delta\Delta Ct$ tiene como limitación el uso de genes cuya de eficiencia sea similar, factor que fue asumido en el trabajo realizado en células de la raíz dental. Referido a estas materias, Regier y Frey en 2010 sugieren que el método más apropiado para el cálculo de la expresión relativa debe evaluarse según las condiciones específicas de cada situación³⁶. Dado que las eficiencias de cada partidor eran desconocidas, decidió confeccionarse una curva para GAPDH y TGF- β_3 , obteniendo un

valor de eficiencia de considerable diferencia entre ambos genes (Figura 11), por lo que se determinó que el método Pfaffl era el más apropiado para obtener un resultado de expresión relativa de mayor validez.

A.



B.

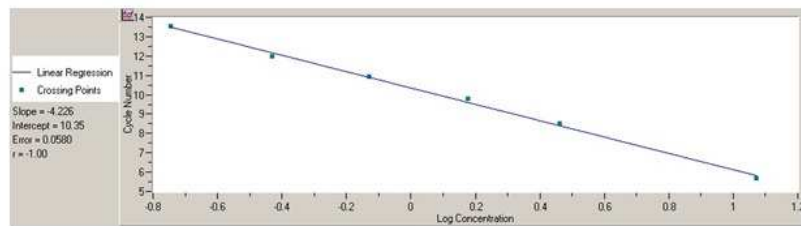


Figura 11. Curvas de Eficiencia. A. GAPDH (eficiencia = 95,4%). **B.** TGF-β₃ (eficiencia = 72,4%). La diferencia entre estos valores corroboró que el método más apropiado para el cálculo de expresión relativa era el método de Pfaffl.

3. Uso de TGF- β_3 en ingeniería de tejidos:

A pesar de lo expuesto en el segmento introductorio, es posible afirmar que el nivel reducido de TGF- β_3 en individuos adultos permite el desarrollo celular adecuado del organismo³⁷, a pesar de poseer un perfil de sanación de heridas que promueve la aparición de cicatrices. Por esta razón, en búsqueda de dilucidar un potencial nocivo o carcinogénico para TGF- β_3 , se han reportado asociaciones de altos niveles de esta citoquina con el desarrollo de cirrosis biliar primaria, donde TGF- β_3 , al encontrarse desregulado, fomenta un proceso de fibrosis e infiltración inmunitaria que promueve el desarrollo de las fases tempranas de esta condición³⁷. A diferencia de esto, se ha determinado en ratas que un aumento en la expresión de TGF- β_3 durante las fases primeras del proceso involutivo de la glándula mamaria –una vez finalizada la lactancia-, permite un proceso de reparación y remodelación adecuada de la misma, reduciendo con esto el riesgo carcinogénico que supone esta fase de retorno de la glándula a su estado inicial³⁸. En esta misma especie también se ha observado que en el desarrollo de fibrosis subretinal, las principales citoquinas cuyos niveles se encuentran alterados son TGF- β_1 y TGF- β_2 ³⁹, resultados parecidos a los encontrados en humanos con terapia anti-rechazo de trasplantes, donde un aumento en la señalización de TGF- β_1 y concentraciones semejantes de las otras isoformas denotaron una situación promotora en el desarrollo de tumores de la piel⁴⁰. Aunque esta información apoya la idea de que TGF- β_3 no posee un potencial carcinogénico apreciable, es necesario realizar más estudios en tejidos humanos para conocer la influencia de esta citoquina en la evolución de distintos procesos neoplásicos.

Otra razón que rebate el riesgo de ocasionar eventos neoplásicos por maximizar los niveles de TGF- β_3 por medio de ingeniería de tejidos es el hecho preciso de utilizar

sistemas de implante en el mismo sitio de la herida, asegurando un efecto aumentado de TGF- β_3 en forma localizada, lo que garantiza que este factor sea empleado en el proceso bioquímico que rige la sanación de la piel o el cartílago, donde se ha evidenciado que TGF- β_3 juega un importante rol en la síntesis de colágeno tipo I ⁴¹ (Figura 12).

En base a estos argumentos se han postulado formas farmacéuticas tópicas e inyectables de TGF- β_3 activo, destacando en esta última categoría el fármaco Juvista® de laboratorios Renovo®, el cual a pesar de sustentarse en una fuerte base teórica como un agente promotor de la regeneración cutánea sin cicatrices, no logró la eficacia esperada en ensayos de fase III. Esto permite dar cuentas de la importancia que supone la creación de un entorno que haga efectiva la acción de variados factores de crecimiento en el lecho de la herida, pues en el caso específico de TGF- β_3 , se ha observado en ratas que una alta concentración de TGF- β_3 puede llevar a un cierre de heridas lento y con presencia de cicatrices al encontrarse en ausencia de fibromodulina, un proteoglicano que permitiría modular la acción inhibitoria de la migración celular que tiene TGF- β_3 ⁴².

En la búsqueda de los mecanismos que generan una sanación de heridas satisfactoria, los investigadores del Centro de Biotecnología Dr. Daniel Alkalay Lowitt en la actualidad evalúan el efecto de los constituyentes de la matriz polimérica, ya sea en la fase de elaboración del polímero base o en su entrecruzamiento, *per se* sobre la expresión y secreción de distintos factores de crecimiento, esto en aras de explicar el reciente éxito que ha tenido el uso de sistemas de implante acelulares en el tratamiento de heridas cutáneas. En forma anexa a esta línea de investigación es propicio también evaluar a futuro perfiles de secreción y expresión de diversos factores de crecimiento –no sólo TGF- β_3 - y moléculas moduladoras, así como también un análisis comparativo de estos perfiles en los casos en que se utilice el plasma de los pacientes o reactivos

comerciales para constituir las cápsulas de fibrina. Todo esto con el fin de obtener una idea precisa de los mecanismos por los cuales se logra observar una mayor eficacia en la sanación de heridas al utilizar el SII, factores que una vez conocidos podrían utilizarse con el propósito final de todos estos estudios: garantizar una regeneración rápida y efectiva que permita difundir el uso de la terapia celular en la práctica médica como una alternativa o complemento al uso del autoinjerto.

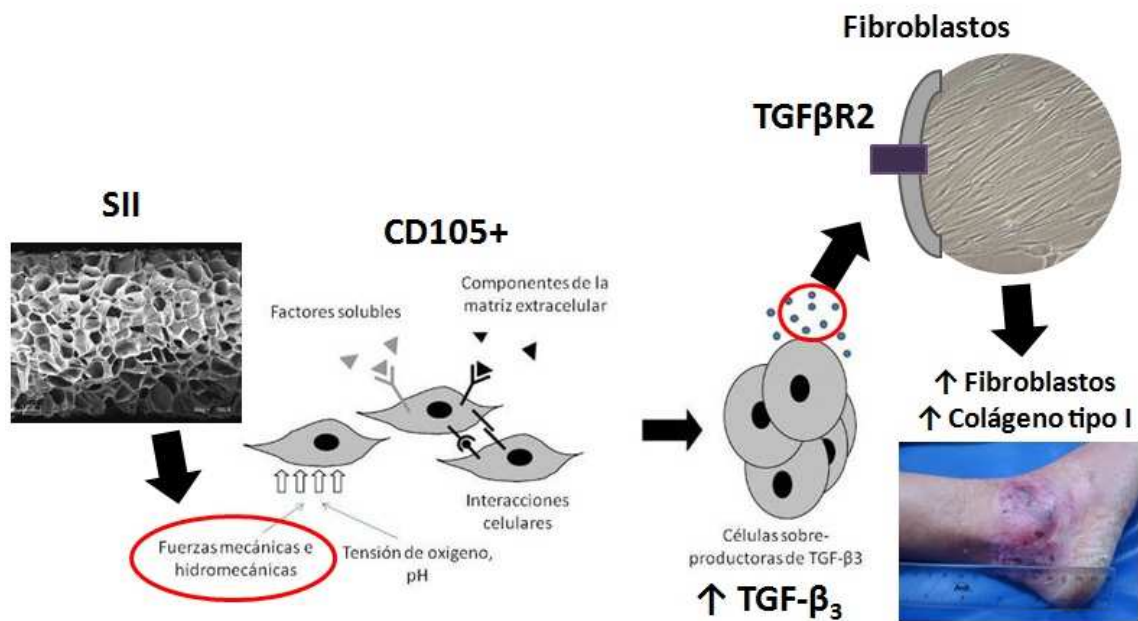


Figura 12. Modelo propuesto para el uso de TGF-β₃ en Ingeniería de Tejidos. En base a los datos presentados en la literatura, se plantea un modelo en que la matriz entrecruzada del SII supone un estímulo mecánico a las células CD105+ que han sido incluidas en ella. Esta influencia mecánica generaría un aumento en la secreción de TGF-β₃ que al interactuar con los receptores presentes en los fibroblastos del lecho de la herida, desencadena una cascada de señalización que finaliza en la expresión de genes que permitan la proliferación de estas células o induzcan la síntesis de biomoléculas esenciales en la reconstitución del tejido, como es el caso del colágeno de tipo I. Estos efectos tendrían por consecuencia una regeneración de la piel más efectiva y con un menor desarrollo de cicatrices (adaptado de Somoza, 2012²⁶).

CONCLUSIONES

1. El patrón de secreción de TGF- β_3 total observado en SII posee una progresión distinta a lo observado en un cultivo tradicional en monocapa. Estas diferencias podrían implicar una sanación de heridas más eficiente al suministrar mayores niveles de esta citoquina en las fases iniciales, cuando son mayormente requeridos.
2. La expresión de TGF- β_3 medida por PCR en tiempo real en monocapa posee una evolución temporal semejante a la observada en su secreción. No fue posible evaluar estos cambios en cultivos en SII debido a una extracción de ARNm con alto grado de impurezas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Metcalfe AD y Ferguson MWJ. 2007. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials*. 28:5100-5113.
2. Falanga V, Isaac C, Paquette D, Downing G, Kouttab N, Butmarc J, Badiavas E y Hardin-Young J. 2002. Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury. *J Invest Dermatol*. 119:653-660.
3. Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Rowley JA y Mooney DJ. 2002. Engineering growing tissues. *PNAS*. 99:12025-12030.
4. Mazlyzam AL, Aminuddin BS, Fuzina NH, Norhayati MM, Fauziah O, Isa MR, Saim L y Ruszymah BHI. 2007. Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. *Burns*. 33:355-363.
5. Ceriani Fernández R. Desarrollo de tecnologías para el cultivo de células de piel para trasplante autólogo: Estudios preclínicos realizados en conejos para su posterior uso en humanos. Memoria para optar al título de profesor de Biología y Ciencias. Universidad de Playa Ancha, Valparaíso, 2006.
6. Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ y O'Connor KC. 2006. *Ex vivo* engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Engineering*. 12.
7. Somoza R, Conget P y Rubio FJ. 2008. Neuropotency of human mesenchymal stem cell cultures: clonal studies reveal the contribution of cell plasticity and cell contamination. *Biology of Blood and Bone Marrow Transplantation*. 14:546-555.
8. Jiang T, Lie W, Ly X, Sun H, Zhang L, Liu Y, Zhang WJ, Cao Y y Zhou G. 2010. Potent *in vitro* chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 31:3564-3571.

9. Blasi A, Martino C, Balducci L, Saldarella M, Soleti A, Navone SE, Canzi L, Cristini S, Invernici G, Parati EA y Alessandri G. 2011. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vascular Cell*.3:5.

10. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD y Dazzi F. 2009. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 94:258-263.

11. Schreml S, Szeimies RF, Prantl L, Landthaler M y Bibilas P. 2010. Wound healing in the 21st century. *J Am Acad Dermatol*. 10:1016-1048.

12. Bandyopadhyay B, Fan J, Guan S, Li Y, Chen M, Woodley DT y Li W. 2006. A "traffic control" role for TGF β 3: orchestrating dermal and epidermal cell motility during wound healing. *J Cell Biol*. 172:1093-1105.

13. Tamariz-Domínguez E, Castro-Muñozledo F y Kuri-Harcuch W. 2002. Growth factors and extracellular matrix proteins during wound healing promoted with frozen cultured sheets of human epidermal keratinocytes. *Cell Tissue Res*. 307:79-89.

14. Ten Dijke P y Arthur HM. 2007. Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 8:857-869.

15. Van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A y Van den Berg WB. 2009. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 17:1539-1545.

16. Giannouli CC y Kletsas D. 2006. TGF- β regulates differentially the proliferation of fetal and adult human skin fibroblasts via the activation of PKA and the autocrine action of FGF-2. *Cellular Signalling*. 18:1417-1429.

17. Yan X, Liu Z y Chen Y. 2009. Regulation of TGF- β signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin*. 41:263-272.

18. Moustakas A y Heldin CH. 2008. Dynamic control of TGF- β signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Letters*. 582:2051-2065.
19. Ferguson MWJ y O'Kane S. 2004. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Phil Trans R Soc Lond*. 359:839-850.
20. Annes JP, Munger JS y Rifkin DB. 2003. Making sense of latent TGF β activation. *J Cell Sci*. 116:217-224.
21. Rifkin DB. 2005. Latent transforming growth factor- β (TGF- β) binding proteins: orchestrators of TGF- β availability. *J Biol Chem*. 280:7409-7412.
22. Lyons RM, Keski-Oja J y Moses HL. 1988. Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol*. 106:1659-1665.
23. Annes JP, Rifkin DB y Munger JS. 2002. The integrin α V β 6 binds and activates latent TGF β 3. *FEBS Letters*. 511:65-68.
24. Aluwihare P, Mu Z, Zhao Z, Yu D, Weinreb PH, Horan GS, Violette SM y Munger JS. 2009. Mice that lack activity of α V β 6- and α V β 8-integrins reproduce the abnormalities of *Tgfb1*- and *Tgfb3*-null mice. *J Cell Sci*. 122:227-232.
25. Eslami A, Gallant-Behm CL, Hart DA, Wiebe C, Honardoust D, Gardner H, Häkkinen L y Larjava HS. 2009. Expression of integrin α V β 6 and TGF- β in scarless vs scar-forming wound healing. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 57:543-557.
26. Somoza Palacios R. Secreción de TGF- β ₃ por células troncales mesenquimáticas y su aplicación en ingeniería de tejidos. Tesis para optar al grado académico de Doctor en Biotecnología. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso y Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, julio de 2012.

27. Wang L y Stegemann JP. 2010. Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. *Biomaterials*. 31:1612.
28. Wang C, Li X, Yao Y y Wang D. 2009. Concurrent extraction of proteins and RNA from cell-laden hydrogel scaffold free of polysaccharide interference. *Journal of Chromatography B*. 877:3762-3766.
29. Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29:2002-2007.
30. Gruber HE, Mauerhan D, Chow Y, Ingram JA, James Norton H, Hanley Jr EN y Sun y. 2008. Three-dimensional culture of human meniscal cells: extracellular matrix and proteoglycan production. *BMC Biotechnology*. 8:54.
31. Shamis Y, Hewitt KJ, Carlson MW, Margvelashvilli M, Dong S, Kuo CK, Daheron L, Egles C y Garlick JA. 2011. Fibroblasts derived from human embryonic stem cells direct development and repair of 3D human skin equivalents. *Stem Cell Res*. 2:10.
32. Jeanes AI, Maya-Mendoza A y Streuli CH. 2011. Cellular microenvironment influences the ability of mammary epithelia to undergo cell cycle. *PLoS One*. 6:e18144.
33. Liu J, Lu GW, Sandoval M, Ciringh Y, Xue G, Jaeger D, Kompanik K, Jiao J y Gelotte KM. 2009. Determination of benzalkonium chloride partition in micelle solutions using ultrafiltration method. *AAPS PharmSciTech*. 10:1216-1223.
34. Rowe RC, Sheskey PJ y Quinn ME, editores. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Sixth Edition. Pharmaceutical Press, London. 56-58, 152-154 pp.
35. Barut KD, Coskun Ari FF y Öner F. 2005. Development and characterization of a cationic emulsion formation as a potential pDNA carrier system. *Turk J Chem*. 29:27-40.
36. Regier N y Frey B. 2010. Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC Molecular Biology*. 11:57.

37. Voumvouraki A, Koulentaki M, Tzardi M, Sfakianaki O, Manousou P, Notas G y Kouroumalis E. 2010. Increased TGF- β_3 in primary biliary cirrhosis: An abnormality related to pathogenesis? *World J Gastroenterol.* 16:5057-5064.
38. Flanders KC y Wakefield LM. 2009. Transforming growth factor- β s and mammary gland involution: functional roles and implication for cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 14:131-144.
39. Zhang H y Liu Z. 2012. Transforming growth factor- β neutralizing antibodies inhibit subretinal fibrosis in a mouse model. *Int J Ophthalmol.* 5:307-311.
40. Harradine KA, Ridd K, Saunier EF, Clermont FF, Perez-Losada J, Moore DH, Epstein Jr EH, Bastian BC y Akhurst RJ. 2009. Elevated cutaneous Smad activation associates with enhanced skin tumor susceptibility in organ transplant recipients. *Clin Cancer Res.* 15:5101.
41. Sampaio de Mara C, Rossi A, Silva A, Lugani AL, Camargo MA y Bellini I. 2011. Periosteum as a source of mesenchymal stem cells: the effects of TGF- β_3 on chondrogenesis. *Clinics.* 66:487-492.
42. Zheng Z, Nguyen C, Zhang X, Khorasani H, Wang JZ, Zara JN, Chu F, Yin W, Pang S, Le A, Ting K y Soo C. 2011. Delayed wound closure in fibromodulin-deficient mice is associated with increased TGF- β_3 signaling. *J Invest Dermatol.* 131:769-778.

ANEXO 1: CURVAS DE CALIBRACIÓN ELISA TGF- β_3

Concentración (pg/mL)	Δ Absorbancia (450 nm - 540 nm)		
	Curva 1	Curva 2	Curva Promedio
2000	0,329	0,323	0,326
1000	0,242	0,224	0,233
500	0,175	0,190	0,183
250	0,142	0,142	0,142
125	0,116	0,119	0,118
62,5	0,122	0,118	0,120
31,25	0,113	0,122	0,118
15,625	0,112	0,116	0,114

Pendiente (mL/pg)	0,000112	0,000104	0,000108
Coef. Correlación	0,9828	0,9784	0,9848

