



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANGIOGÉNICO DE MEDIOS
CONDICIONADOS OBTENIDOS DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO
CULTIVADAS EN UN SISTEMA DINÁMICO EN LA CURACIÓN DE
HERIDAS CUTÁNEAS**

Elga Johanna Vargas Carreño

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Bogotá, Colombia
Abril de 2022

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANGIOGÉNICO DE MEDIOS
CONDICIONADOS OBTENIDOS DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO
CULTIVADAS EN UN SISTEMA DINÁMICO EN LA CURACIÓN DE
HERIDAS CUTÁNEAS**

Elga Johanna Vargas Carreño

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al
título de Doctor en Ciencias Biomédicas

Director:

Orlando Chaparro Garzón, PhD

Línea de Investigación: Mesenchymal Stem Cells
Grupo de Investigación Biología de Células Madre

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Bogotá, Colombia

Abril de 2022

Para mi padre

Siempre estarás en mi corazón.

Para João

Eres la persona perfecta en la distancia equivocada.

Declaración de obra original

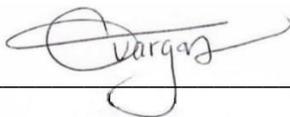
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Elga Johanna Vargas Carreño

Fecha 18/04/2022

Agradecimientos

Quiero resaltar la generosidad y el apoyo de mi tutor PhD Orlando Chaparro Garzón, quien me enseñó sobre su línea de investigación y guio el desarrollo de esta tesis doctoral, la cual corresponde al primer paso del proceso de escalamiento de la producción de medios condicionados (MC) de células madre mesenquimales (MSC) en condiciones dinámicas.

Agradezco a mis compañeros del Doctorado en Ciencias Biomédicas y especialmente a mis amigos del grupo de investigación GIBCM-UNAL, Luisa Fernanda Martínez y Maikel Andrés Álvarez, quienes me apoyaron en mi trabajo en el laboratorio de cultivo celular y lo más importante, me dieron la oportunidad de contar con su amistad, la cual atesoraré el resto de mi vida.

Debo reconocer el apoyo recibido por el Instituto Superior Técnico (IST) de Portugal. Agradezco al Dr. Cabral quien aceptó mi postulación para realizar mi pasantía doctoral y me abrió las puertas del Institute for Bioengineering and Biosciences, y específicamente, a su grupo de investigación y su laboratorio en la sede Taguspark. Doy gracias a las Doctoras Raquel Cunha y Ana Fernández, quienes perfeccionaron mis habilidades de cultivo celular, me enseñaron y apoyaron en la realización de los cultivos dinámicos y la obtención de los MC empleados en este trabajo. Sin su guía permanente y la disponibilidad de los recursos de su laboratorio, no habría sido posible desarrollar mi tesis doctoral.

Agradezco a los veterinarios Manuel Góngora y María Lucia Correal, responsables de la Unidad de Biología Comparativa de la Universidad Pontificia Javeriana de Bogotá, por su ayuda en la realización de los experimentos *in vivo*.

Reconozco el apoyo económico recibido del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia y de la Universidad de La Sabana, esta última institución en la que laboro desde hace más de 14 años, para realizar mis estudios doctorales.

Por último, mis palabras de especial cariño y agradecimiento para mis amigas María Claudia Abaúnza y Nancy Patricia Jara, por su apoyo incondicional durante estos 7 años. Espero seguir contando con su amor, sus consejos y sus deseos sinceros de que sea un ser humano feliz.

Resumen

Evaluación del potencial angiogénico de medios condicionados obtenidos de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo cultivadas en un sistema dinámico en la curación de heridas cutáneas

Introducción

Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (A-MSc) ejercen su acción regenerativa-reparativa mediante un mecanismo de acción paracrino producido por cientos de factores tróficos, componentes de la matriz extracelular, vesículas extracelulares, etc., que son secretados al medio extracelular. Este secretoma puede recolectarse desde los medios de cultivo como medios condicionados (MC).

Los MC de A-MSc poseen un efecto tisular similar al trasplante celular, lo cual permite su uso como alternativa terapéutica. Hasta el momento, los MC de A-MSc son obtenidos esencialmente en cultivos de dos dimensiones (2D) estáticos en normoxia, sin embargo, para escalar su producción es necesario realizar el cultivo en sistemas dinámicos garantizando la conservación de su potencial regenerativo-reparativo.

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar si al escalar la producción de los MC introduciendo dos cambios en el sistema de cultivo (un sistema tridimensional dinámico e hipoxia) se mantiene la capacidad angiogénica y funcional como una medida indirecta de la conservación de su potencial terapéutico.

Materiales y Métodos

Se obtuvieron MC de A-MSC de células cultivadas en un sistema 2D estático y un sistema tridimensional (3D) dinámico que emplea spinners flasks acoplados a microtransportadores, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. Posteriormente se realizó la cuantificación y la caracterización de su composición proteica y se evaluó su potencial de angiogénesis *in vitro* y su capacidad funcional mediante un ensayo *in vivo* de curación de heridas cutáneas agudas en ratas.

Resultados

Los A-MSC cultivadas en el sistema 3D dinámico conservan su inmunofenotipo y su capacidad de diferenciación multilineaje. Los MC obtenidos de estas A-MSC presentan un perfil proteico único dependiente del donante y modificado por las nuevas variables introducidas al cultivo. Los MC obtenidos en el sistema 3D dinámico conservan su potencial angiogénico y su capacidad funcional demostrado mediante 3 ensayos *in vitro* de angiogénesis y un modelo *in vivo* de curación de heridas excisionales agudas en la piel de ratas.

Conclusiones

Es posible escalar la producción de los MC de A-MSC garantizando la conservación de su potencial angiogénico y su capacidad funcional. La obtención de los MC en condiciones 3D dinámicas en hipoxia puede potenciar su efecto terapéutico en el cierre de heridas cutáneas agudas.

Palabras clave: Células madre, células madre mesenquimales, medio condicionado, angiogénesis, reparación de heridas.

Abstract

Evaluation of the angiogenic potential of conditioned media from mesenchymal stem cells derived from adipose tissue cultivated in a dynamic system in the healing of cutaneous wounds

Introduction

Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (A-MSC) perform their regenerative-reparative process through a paracrine action mechanism exerted by hundreds of trophic factors, components of the extracellular matrix, extracellular vesicles, etc., which are secreted into the extracellular medium. This secretome can be gathered from culture media as conditioned media (CM).

MC of A-MSC have a tissue effect similar to cell transplantation, which allows their use as a therapeutic alternative. Until now, the MC of A-MSC is essentially obtained in static two-dimensional cultures in normoxia, however, to scale the production of MC, it's necessary to proceed with the culture A-MSC in dynamic systems guaranteeing the conservation of their regenerative-reparative potential.

The main objective of this work was to evaluate if when scaling the production of MC of A-MSC, introducing two changes in the culture system (a dynamic three-dimensional system and hypoxia), the angiogenic and functional capacity keeps up as an indirect measure of its therapeutic conservation potential.

Materials and methods

MC of A-MSC were obtained from cells that were cultured in the traditional static two-dimensional system and a dynamic three-dimensional system employing spinner flasks coupled to microcarriers, under both normoxic and hypoxic conditions. Subsequently, the quantification and characterization of the protein composition of the MC was performed and their *in vitro* angiogenesis potential and functional capacity were evaluated by means of an *in vivo* acute cutaneous wound healing assay.

Results

A-MSCs cultured in the dynamic three-dimensional system retains their immunophenotype and multilineage differentiation capacity. The MC obtained from these A-MSC shows a unique protein profile dependent on the donor and modified by the new variables introduced into the culture. The CM obtained in the dynamic three-dimensional system retain their angiogenic potential and their functional capacity demonstrated by 3 *in vitro* angiogenesis assays and an *in vivo* model of acute excisional wound healing in rat skin.

Conclusions

It's possible to scale the production of MCs from A-MSC, guaranteeing the conservation of their angiogenic potential and their functional capacity, using a dynamic three-dimensional system (spinner flasks coupled to microcarriers). Obtaining MC under dynamic hypoxic conditions can enhance their therapeutic effect in the closure of acute skin wounds.

Keywords: mesenchymal stem cells/stromal cells, exvivo expansion, scale-up, conditioned media, microcarriers, angiogenesis, wound healing.

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Abstract	XIII
Lista de figuras	19
Lista de tablas	23
Lista de abreviaturas	25
Introducción	29
1. Marco teórico	31
1.1 Células madre mesenquimales	31
1.2 Medios condicionados de las MSC	33
1.3 Sistemas de cultivo de las MSC	35
1.3.1 Condiciones de oxígeno en los cultivos de las MSC	37
1.4 Curación de heridas cutáneas	38
1.4.1 Angiogénesis como proceso fundamental de la curación de heridas cutáneas	41
1.4.2 Papel de las MSC en la curación de heridas cutáneas	44
1.4.3 Papel de los MC de MSC en la curación de heridas cutáneas	48
2. Justificación y Objetivos	51
2.1 Justificación	51
2.2 Objetivo principal	53

2.3	Objetivos específicos	53
3.	Metodología	55
3.1	Aislamiento y cultivo de las A-MSC	55
3.1.1	Expansión de las A-MSC y obtención del MC en cultivos 2D estáticos	56
3.1.2	Expansión de las A-MSC y obtención del MC en cultivos 3D dinámicos	57
3.2	Caracterización celular	59
3.2.1	Evaluación de la proliferación celular	59
3.2.2	Inmunofenotipificación de las A-MSC	60
3.2.3	Evaluación del potencial de diferenciación de las A-MSC	60
3.3	Caracterización de la composición de los MC de las A-MSC	61
3.4	Caracterización funcional de los MC de las A-MSC	62
3.4.1	Modelos de angiogénesis <i>in vitro</i>	62
3.4.1.1	Ensayo de migración celular	62
3.4.1.2	Ensayo de formación de estructuras tubulares	63
3.4.1.3	Ensayo de formación de brotes angiogénicos	67
3.4.2	Modelo <i>in vivo</i> de curación de heridas cutáneas	70
3.5	Análisis estadístico	74
4.	Resultados	77
4.1	Cultivo de las A-MSC	77
4.2	Caracterización celular	79
4.2.1	Evaluación de la proliferación celular de las A-MSC	79
4.2.1.1	En cultivos 2D estáticos	79
4.2.1.2	En cultivos 3D dinámicos	81
4.2.2	Inmunofenotipificación de las A-MSC	88
4.2.3	Evaluación del potencial de diferenciación de las A-MSC	93
4.3	Caracterización de la composición de los MC de las A-MSC	97
4.3.1	Concentración proteica de los MC	97
4.3.2	Composición proteica de los MC	97
4.4	Caracterización funcional de los MC de las A-MSC	107
4.4.1	Modelos de angiogénesis <i>in vitro</i>	107

4.4.1.1	Ensayo de migración celular	107
4.4.1.2	Ensayo de formación de estructuras tubulares	113
4.4.1.3	Ensayo de formación de brotes angiogénicos	123
4.4.2	Modelo <i>in vivo</i> de curación de heridas cutáneas	130
5.	Discusión	157
6.	Conclusiones y recomendaciones	179
6.1	Conclusiones	179
6.2	Recomendaciones	182
<u>Anexo A</u>	Microtransportadores usualmente empleados en los cultivos 3D dinámicos de las MSC	
<u>Anexo B</u>	Protocolo de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica del SCERG-iBB-IST	
<u>Anexo C</u>	Concentraciones de las citocinas detectadas en los MC de dos lotes de células A-MSC.	
<u>Anexo D</u>	Citocinas no detectadas en los MC de dos lotes de A-MSC	
<u>Anexo E</u>	Citocinas incrementadas o detectadas de novo en los MC del lote 1 en las diferentes condiciones de cultivo	
<u>Anexo F</u>	Citocinas incrementadas o detectadas de novo en los MC del lote 3 en las diferentes condiciones de cultivo	
<u>Anexo G</u>	Procesos celulares y vías de señalización relacionadas con las proteínas aumentadas o detectadas de novo en los MC de los cultivos 3D dinámicos en hipoxia de los lotes 1 y 3	

Bibliografía

Lista de figuras

	Nombre	Pág.
Figura 1	Fases del proceso de curación de heridas cutáneas	40
Figura 2	Papel de las MSC en la curación de heridas cutáneas	45
Figura 3	Protocolo del ensayo de migración de celular	64
Figura 4	Protocolo del ensayo de formación de estructuras tubulares	65
Figura 5	Elementos analizados por el software WinTube de WIMASIS	67
Figura 6	Protocolo del ensayo de formación de brotes angiogénicos empleando explantes de corazón de ratón	69
Figura 7	Elementos analizados por el software WinSprout de WIMASIS	70
Figura 8	Localización de las heridas cutáneas en los animales de experimentación	72
Figura 9	Morfología celular de las A-MSc bajo microscopio invertido	77
Figura 10	Diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica de los 4 lotes de A-MSc empleados en este estudio	78
Figura 11	Conteos celulares de las A-MSc en los cultivos 2D estáticos	79
Figura 12	Tasa de crecimiento específico de las A-MSc en los cultivos 2D estáticos	80
Figura 13	Doblaje poblacional de las A-MSc en los cultivos 2D estáticos	81
Figura 14	Crecimiento de las A-MSc del lote 1 sobre los microtransportadores en el cultivo 3D dinámico en normoxia	82
Figura 15	Crecimiento de las A-MSc en los cultivos 3D dinámicos en normoxia	83
Figura 16	Crecimiento de las A-MSc en los cultivos 3D dinámicos en hipoxia	83
Figura 17	Crecimiento celular promedio de las A-MSc en los cultivos 3D dinámicos	84
Figura 18	Tasa de crecimiento específico de las A-MSc en los cultivos 3D dinámicos	85
Figura 19	Doblaje poblacional de las A-MSc en los cultivos 3D dinámicos	85

Figura 20	Comparación de la tasa de crecimiento específica según el sistema de cultivo y nivel de oxigenación por lote de A-MSC	86
Figura 21	Comparación del doblaje poblacional según el sistema de cultivo y nivel de oxigenación por lote de A-MSC	87
Figura 22	Porcentaje de A-MSC positivas para anticuerpos A. CD73, B. CD90, C. CD105, D. CD14, F. CD34, E. CD45, G. CD80, H. HLA-DR evaluadas mediante citometría de flujo.	92
Figura 23	Diferenciaciones adipogénica, osteogénica y condrogénica del lote 1	93
Figura 24	Diferenciaciones adipogénica, osteogénica y condrogénica del lote 2	94
Figura 25	Diferenciaciones adipogénica, osteogénica y condrogénica del lote 3	95
Figura 26	Diferenciaciones adipogénica, osteogénica y condrogénica del lote 4	96
Figura 27	Concentración de proteínas de los MC de las A-MSC obtenidos en los cultivos 2D estáticos y 3D dinámicos, tanto en normoxia como en hipoxia	97
Figura 28	Red de asociaciones funcionales de las citocinas incrementadas o detectadas <i>de novo</i> en los MC de los cultivos en hipoxia del lote 3	102
Figura 29	Red de asociaciones funcionales de las citocinas incrementadas o detectadas <i>de novo</i> en los MC de los cultivos 3D dinámicos del lote 3	106
Figura 30	Imágenes representativas de los controles del ensayo de migración celular a las 0 y 12 horas	107
Figura 31	Imágenes representativas del ensayo de migración celular empleando los MC de las A-MSC del lote 1 a las 0 y 12 horas	108
Figura 32	Imágenes representativas del ensayo de migración celular empleando los MC de las A-MSC del lote 2 a las 0 y 12 horas	109
Figura 33	Imágenes representativas del ensayo de migración celular empleando los MC de las A-MSC del lote 3 a las 0 y 12 horas	110
Figura 34	Imágenes representativas del ensayo de migración celular empleando los MC de las A-MSC del lote 4 a las 0 y 12 horas	111
Figura 35	Porcentaje de cierre de la herida para los 4 lotes de MC de las A-MSC obtenidos en cultivos 2D estáticos	112
Figura 36	Porcentaje de cierre de la herida para los 4 lotes de MC de las A-MSC obtenidos en cultivos 3D dinámicos	112
Figura 37	Imágenes representativas de los controles del ensayo de formación de estructuras tubulares a las 5 horas postratamiento	114
Figura 38	Imágenes representativas del ensayo de formación de estructuras tubulares empleando los MC de las A-MSC del lote 1 a las 5 horas postratamiento	115

Figura 39	Imágenes representativas del ensayo de formación de estructuras tubulares empleando los MC de las A-MSc del lote 2 a las 5 horas postratamiento	116
Figura 40	Imágenes representativas del ensayo de formación de estructuras tubulares empleando los MC de las A-MSc del lote 3 a las 5 horas postratamiento	117
Figura 41	Imágenes representativas del ensayo de formación de estructuras tubulares empleando los MC de las A-MSc del lote 4 a las 5 horas postratamiento	118
Figura 42	Imágenes representativas de los controles del ensayo de formación de brotes angiogénicos	124
Figura 43	Imágenes representativas del ensayo de formación de brotes angiogénicos empleando los MC de las A-MSc del lote 1	125
Figura 44	Imágenes representativas del ensayo de formación de brotes angiogénicos empleando los MC de las A-MSc del lote 2	126
Figura 45	Imágenes representativas del ensayo de formación de brotes angiogénicos empleando los MC de las A-MSc del lote 3	127
Figura 46	Imágenes representativas del ensayo de formación de brotes angiogénicos empleando los MC de las A-MSc del lote 4	128
Figura 47	Resultados de la RCA empleado los MC de A-MSc obtenidos en cultivo 2D estático	129
Figura 48	Resultados de la RCA empleado los MC de A-MSc obtenidos en cultivo 3D dinámico	130
Figura 49	Cierre progresivo de las heridas cutáneas dorsales de la rata 222, grupo 1	131
Figura 50	Resultado del cierre de las heridas cutáneas tratadas con MC de las A-MSc cultivadas en el sistema 2D estático	132
Figura 51	Diámetro promedio de las heridas al día cero del grupo de tratamiento con MC de cultivos en 2D estáticos	133
Figura 52	Diámetro promedio de las heridas al día dos del grupo de tratamiento con MC de cultivos en 2D estáticos	133
Figura 53	Diámetro promedio de las heridas al día tres del grupo de tratamiento con MC de cultivos en 2D estáticos	134
Figura 54	Diámetro promedio de las heridas al día cinco del grupo de tratamiento con MC de cultivos en 2D estáticos	134
Figura 55	Diámetro promedio de las heridas al día siete del grupo de tratamiento con MC de cultivos en 2D estáticos	135
Figura 56	Diámetro promedio de las heridas al día nueve del grupo de tratamiento con MC de cultivos en 2D estáticos	135
Figura 57	Resultado del cierre de las heridas cutáneas tratadas con MC de las A-MSc cultivadas en el sistema 3D dinámico	136
Figura 58	Diámetro promedio de las heridas al día cero del grupo de tratamiento con MC de cultivos 3D dinámicos	137
Figura 59	Diámetro promedio de las heridas al día dos del grupo de tratamiento con MC de cultivos 3D dinámicos	137
Figura 60	Diámetro promedio de las heridas al día tres del grupo de tratamiento con MC de cultivos 3D dinámicos	138
Figura 61	Diámetro promedio de las heridas al día cinco del grupo de tratamiento con MC de cultivos 3D dinámicos	138

Figura 62	Diámetro promedio de las heridas al día siete del grupo de tratamiento con MC de cultivos 3D dinámicos	139
Figura 63	Diámetro promedio de las heridas al día nueve del grupo de tratamiento con MC de cultivos 3D dinámicos	139
Figura 64	Porcentaje de cierre de las heridas al día nueve para todos los tratamientos con MC de A-MSc	140
Figura 65	Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 5	141
Figura 66	Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 6	142
Figura 67	Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 7	143
Figura 68	Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 8	144
Figura 69	Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 10	145
Figura 70	Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 11	146
Figura 71	Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 12	147
Figura 72	Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 13	148
Figura 73	Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 14	149
Figura 74	Resultados del score histológico con diferencias estadísticamente significativas del grupo 2.	152
Figura 75	Score total de los cultivos 2D estáticos en comparación con el score total de los cultivo 3D dinámicos	153
Figura 76	Inmunohistoquímica con AntiCD31	154
Figura 77	Densidad vascular de los cultivos 2D estáticos y 3D dinámicos tanto en normoxia como en hipoxia	156
Figura 78	Citocinas incrementadas o detectadas <i>de novo</i> en los lotes 1 y 3 en los cultivos 3D dinámicos en hipoxia que participan en el proceso de curación de heridas cutáneas	181

Lista de tablas

	Nombre	Pág.
Tabla 1	Principales factores pro y antiangiogénicos producidos por las MSC	43
Tabla 2	Estudios <i>in vivo</i> empleando MSC que demuestran su efecto en la curación de heridas cutáneas	46
Tabla 3	Anticuerpos empleados en la caracterización de las A-MSK	60
Tabla 4	Métricas empleadas por el Software WinTube de WIMASIS	66
Tabla 5	Parámetros para determinar el score de cicatrización de las heridas cutáneas	73
Tabla 6	Citocinas incrementadas o detectadas <i>de novo</i> en los MC de los cultivos en hipoxia del lote 3	99
Tabla 7	Citocinas incrementadas o detectadas <i>de novo</i> en los MC de los cultivos 3D dinámicos del lote 3	103
Tabla 8	Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para los parámetros evaluados por el software WinTube de WIMASIS	119
Tabla 9	Resultados de las pruebas T de Student para las variables de interés del ensayo de tubulogénesis	120
Tabla 10	Resultados de las pruebas de Mann-Whitney para las variables de interés del ensayo de tubulogénesis	120
Tabla 11	Resultados de la prueba de Tukey para la variable longitud total de los tubos	122
Tabla 12	Resultados de la aplicación del score histológico al grupo 1: heridas tratadas con MC de A-MSK obtenidos en los cultivos 2D estáticos	150
Tabla 13	Resultados de la aplicación del score histológico al grupo 2: heridas tratadas con MC de A-MSK obtenidos en los cultivo 3D dinámicos	151
Tabla 14	Densidad vascular de las heridas cutáneas dorsales evaluadas mediante inmunohistoquímica con AntiCD31	155

Lista de abreviaturas

A-MSc	Células estromales mesenquimales multipotentes de origen adiposo
AF-MSc	Células madre mesenquimales del fluido amniótico
ANG-1	Angiopoyetina 1
ANG-2	Angiopoyetina 2
ASC	Células madre adiposas
ANOVA	Análisis de varianza
ATMP	Terapias de medicina avanzada
BM-MSc	MSc derivadas de la médula ósea
CE	Células endoteliales
CO₂	Dióxido de carbono
DAMPS	Patrones moleculares asociados al daño tisular
DAPI	4',6-diamino-2-fenillindol
DFO	Deferoxamina
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12
EDTA	Ácido etilendiammotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EMA	European Medicines Agency
ENOS	Óxido nítrico sintetasa endotelial
FDA	US Food and Drug Administration
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FGF-2	Factor de crecimiento fibroblástico 2
FGF-4	Factor de crecimiento fibroblástico 4
FGF-12	Factor de crecimiento fibroblástico básico 12
G-CSF	Factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos
GIBCM	Grupo de investigación de células madre
GDNF	Factor neurotrófico derivado de células de la glía
GM-CSF	Factor de crecimiento estimulante de colonias de monocitos y granulocitos
HGF	Factor de crecimiento derivado de los hepatocitos
H&E	Hematoxilina y eosina
HIF-1A	Factor de crecimiento inducible por hipoxia alfa

HKA	Cinínógeno escindido de alto peso molecular
HPL	Lisado de plaquetas humano
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana
IBB	Institute for Bioengineering and Biosciences
IFN-γ	Interferon gamma
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1
IL1	Interleucina 1
IL4	Interleucina 4
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
IL10	Interleucina 10
IL12	Interleucina 12
IL13	Interleucina 13
IQR	Rango intercuartílico
ISCT	International Society for Cellular Therapy
IST	Instituto Superior Técnico
KGF	Factor de crecimiento derivado de queratinocitos
MC	Medio condicionado
MCP1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MEC	Membrana extracelular
MIP1A/CCL3	Proteína inflamatoria de monocitos 1 alfa
MIP1B/CCL4	Proteína inflamatoria de monocitos 1 beta
MMP	Metaloproteinasas
MSC	Células madre mesenquimales
NAP2/CXCL17	Quimiocina atrayente de células mieloides
NGF	Factor de crecimiento neural
NK	Linfocitos natural killer
NT3	Neurotrofina 3
O₂	Oxígeno
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDGF-AA	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas isoforma alfa-alfa
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PIGF	Factor de crecimiento derivado de la placenta
PMN	Polimorfonucleares
POE	Procedimiento operativo estándar
PX	Píxeles
RCA	Relación de crecimiento angiogénico
RPM	Rotaciones por minuto
SCERG	Stem Cell Engineering Research Group
SDF-1	Factor de crecimiento derivado del estroma 1
SFB	Suero fetal bovino
SVF	Fracción estromal vascular
TGF-α	Factor de crecimiento transformante alfa

TGF-B1	Factor de crecimiento transformante beta1
TIMPS	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
TIMP1	Inhibidor tisular de metaloproteinasa 1
TIMP2	Inhibidor tisular de metaloproteinasa 2
TNF-A	Factor de necrosis tumoral alfa
UBC	Unidad de Biología Comparativa
UNAL	Universidad Nacional de Colombia
UC-MSC	Células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical
UPJ	Universidad Pontificia Javeriana
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular alfa
VEGFR2	Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
VSMC	Células musculares lisas vasculares
2D	Dos dimensiones o bidimensional
3D	Tres dimensiones o tridimensional

Introducción

En el último quindenio ha crecido el interés por las células madre mesenquimales (MSC) debido a su potencial como herramienta terapéutica en la medicina regenerativa y el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, y se ha avanzado en la producción de las MSC siguiendo protocolos estrictos -bajo condiciones de buenas prácticas de manufactura- que permitan obtener un gran número de células para su uso clínico en el desarrollo de trasplantes autólogos o heterólogos. Sin embargo, una alternativa al trasplante celular, la cual está soportada por el conocimiento actual de los mecanismos de acción de las MSC, es el uso del secretoma celular.

El secretoma de las MSC es el responsable del efecto paracrino, considerado actualmente como el principal mecanismo de acción de las MSC y, por tanto, estudiar su composición es esencial para comprender el papel de las MSC durante el desarrollo del proceso regenerativo-reparativo tisular. Para obtener el secretoma de las MSC en cultivo, es posible recolectar los medios ricos en el secretoma celular, lo que se denomina medios condicionados (MC). Estas ideas motivaron a nuestro Grupo de Investigación Biología de Células Madre (GIBCM) de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL) para generar una línea de trabajo centrada en la producción de MC de MSC y la evaluación de su potencial terapéutico en diferentes tejidos.

En este momento, el grupo de investigación GIBCM de la UNAL, produce, caracteriza y emplea MSC humanas obtenidas de tejido adiposo y gelatina de Wharton, así como, sus MC para evaluar su efecto en la regeneración y reparación. Durante aproximadamente 12

años, se han realizado trabajos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la recuperación de la función motora en lesiones medulares (1), cicatrización de heridas cutáneas (2) y regeneración ósea de huesos de origen membranoso y endocondral (3–6), donde se ha demostrado la eficacia del trasplante celular, y también se ha comparado el efecto del trasplante con el uso de los MC, encontrándose la misma eficacia con cualquiera de estos dos tipos de intervenciones (3,4).

Continuando con esta línea de trabajo, se ha planteado la necesidad de escalar la producción de los MC en condiciones que mantengan o incluso potencien sus efectos tisulares. Por tanto, esta tesis doctoral tiene como objetivo escalar la producción de los MC bajo condiciones que no afecten la capacidad regenerativa y reparativa de este producto, empleando el proceso angiogénico considerado como un proceso esencial para la adecuada progresión de la curación de heridas, como predictor de la conservación de su potencial curativo.

Para alcanzar este objetivo se planteó un trabajo de investigación en el marco de una tesis doctoral para comparar no solo la composición sino la funcionalidad (mediante ensayos *in vitro* de angiogénesis y un ensayo *in vivo* de curación de heridas cutáneas) de los MC obtenidos de MSC de tejido adiposo humano (A-MSC) en dos sistemas de cultivo con variaciones en el nivel de oxígeno. Los resultados de este trabajo, aunque limitados por la variabilidad dependiente del donante, permitieron concluir que es posible la producción de los MC de las A-MSC empleando un sistema 3D dinámico constituido por spinner flasks acoplados a microtransportadores plásticos y haciendo un seguimiento estricto del protocolo de agitación, el régimen de suplementación y efectuando la recolección a las 24 horas desde el inicio del proceso de obtención de los MC para no afectar su funcionalidad.

Esta tesis desarrolla el primer protocolo de producción de MC de A-MSC xenofree empleando un sistema dinámico generado en nuestro país del que se tenga conocimiento y ha sido la base para continuar con el escalamiento de la producción de los MC en un biorreactor de tipo stirred-tank. También, los resultados de los estudios *in vitro* e *in vivo* desarrollados demostraron la conservación del potencial terapéutico de los MC para la curación de heridas cutáneas, lo cual aunado a la posibilidad de la futura liofilización de este material -proceso que facilita su dosificación, conservación, almacenamiento y transporte- le concede ventajas sobre el trasplante celular.

1. Marco Teórico

1.1 Células madre mesenquimales

Las MSC son células adultas multipotentes aisladas inicialmente del estroma de la médula ósea por Friedenstein et al (7,8) y recibieron esta denominación en 1991 por Caplan (9). Estudios posteriores, especialmente los de Crisan et al, sugieren que el origen de estas células no es estromal sino pericítico (10), lo cual explicaría por qué este tipo de células puede aislarse de casi todo tejido vascularizado (11).

Las MSC pueden obtenerse de diversos tejidos como adiposo, músculo esquelético, médula ósea, hueso trabecular, pulpa y ligamento periodontal, gelatina de Wharton del cordón umbilical, sinovia, pulmón, piel, periostio, cérvix, entre otros (4,7,12–14).

Las A-MSC fueron descritas en 2001 por Zuk et al, quienes aislaron este tipo de células mediante digestión enzimática del tejido adiposo humano obtenido de lipoaspirados y, demostraron que pueden diferenciarse *in vitro* a linajes mesodérmicos (15). Sin embargo, sólo hasta el 2007, la International Fat Applied Technology Society, denominó a este tipo de MSC como Adipose Stem Cells (ASC) (16).

En el 2006, The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee de la International Society for Cellular Therapy (ISCT) determinó tres criterios mínimos para definir las MSC: 1. una población de células adherentes al plástico en cultivo en monocapa, 2. expresión del inmunofenotipo CD73+, CD90+, CD 105+ con ausencia de CD11b- o CD14-, CD19-, CD34-, CD45- CD79a- y HLA-DR determinado idealmente mediante citometría de flujo y 3. capacidad de diferenciación *in vitro* a los linajes adipogénico, osteogénico y

condrogénico (8,17,18). Sin embargo, las MSC no sólo se diferencian en linajes mesenquimales (hueso, cartílago, músculo, tendón, ligamento, tejido adiposo) sino que pueden transdiferenciarse a linajes endodérmicos y neuroectodérmicos como hepatocitos y glía (7,8).

Si bien, inicialmente se pensó que el potencial de las MSC en la terapia regenerativa residía en su capacidad de diferenciación, actualmente se considera que el efecto paracrino, producto de la secreción al medio extracelular de citocinas pro y antiinflamatorias, quimiocinas, factores antiapoptóticos, neuroprotectores y angiogénicos, vesículas extracelulares, entre otras sustancias, es el principal mecanismo de acción para ejercer su papel en la reparación tisular y la inmunomodulación (19–22). Es por esta razón, que autores como Caplan, considerado el padre de las MSC, recomiendan cambiar el nombre de células madre mesenquimales por “Medicinal Signaling Cells” (23–25) para resaltar cómo las MSC ejercen su papel en el proceso reparación-regeneración tisular.

Una posición diferente fue asumida por la ISCT, la cual propone renombrarlas como células mesenquimales estromales conservando la sigla original de MSC; sin embargo, Caplan y colaboradores insisten en que la nueva denominación debe destacar su potencial terapéutico fruto de su mecanismo paracrino (11,24,25). A la fecha, no existe un consenso mundial al respecto y es posible encontrar el uso de todas estas denominaciones en la literatura científica.

Inicialmente, las MSC fueron empleadas como una fuente celular para el desarrollo de trasplantes autólogos y heterólogos, siendo las células derivadas de la médula ósea (BM-MS) y del tejido adiposo las más empleadas (26). Como parte del desarrollo de los protocolos de trasplante, fue evidente la necesidad de contar con grandes cantidades de MSC y fue necesario incrementar significativamente la producción celular. Por esta razón, se promovió el cultivo a gran escala, tanto en sistemas estáticos como dinámicos de diversos tipos de MSC.

Así mismo, para disminuir potenciales efectos adversos del trasplante celular, y particularmente, la probabilidad de un rechazo inmunológico del receptor, fue necesario eliminar los productos de origen animal de los cultivos. Como resultado de esto, se han desarrollado medios de cultivo sin necesidad de suplementación con suero fetal bovino

(SFB) o el reemplazo de este tipo de suplemento animal por lisado de plaquetas humanas (HPL) (27).

Actualmente cursan numerosos estudios clínicos en todo el mundo (sólo en la base de datos ClinicalTrials* se registran más de 11000 estudios en diferentes fases) los cuales evalúan el potencial terapéutico del trasplante de las MSC para un gran variedad de entidades congénitas, autoinmunes, infecciosas, degenerativas y neoplásicas como son esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, esclerosis lateral amiotrófica, nefropatía diabética, enfermedad isquémica cardíaca, enfermedad de Crohn, insuficiencia renal, falla hepática, enfisema, lesión medular, discopatía degenerativa, osteoartritis, osteonecrosis de mandíbula, periodontitis, COVID 19, leucemias, etc. Sin embargo, hasta el día de hoy, la US Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA), han aprobado el uso clínico las células madre-progenitoras hematopoyéticas en pacientes tratados por leucemias y, en el caso específico de Europa, la comercialización condicionada del Holoclar®, el primer producto aprobado bajo la denominación de terapias de medicina avanzada (ATMP), el cual emplea células madre del limbo esclero-corneal para el tratamiento de úlceras corneales.

*ClinicalTrials [Internet]. EE.UU. [Consultado 26 de enero 2022]. Recuperado a partir de <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=MSC&cntry=&state=&city=&dist=>

1.2 Medios condicionados de las MSC

Las sustancias y diferentes tipos de vesículas secretadas al medio extracelular (MEC) por las MSC se denominan en conjunto secretoma. En el caso de las MSC en cultivo, el secretoma es liberado al medio y desde allí puede ser colectado y aplicado con fines terapéuticos. Este medio de cultivo rico en sustancias secretadas por cualquier célula se denomina en general medio condicionado (MC).

Dado que el secretoma es el responsable del efecto paracrino de las MSC, se planteó la posibilidad de considerar el tratamiento con MC como una alternativa al trasplante celular (28–31). Trabajos de investigación empleando MC de A-MSC han demostrado efecto neuro y cardioprotector, mejoría del dolor neuropático en modelos murinos de diabetes mellitus (DM), promoción de la regeneración capilar y se han descrito potenciales

efectos terapéuticos en hipertensión y fibrosis pulmonar, falla hepática aguda, lesión renal aguda y osteoartritis, entre otras entidades (28,29,32–35). Estudios realizados por nuestro grupo de investigación GIBCM-UNAL han demostrado la efectividad de los MC de BM-MSK y de A-MSK en recuperación de la función motora en lesiones medulares (1), la cicatrización de heridas cutáneas (2) y la regeneración ósea en modelos animales (3–5) y humanos (6).

Específicamente, cuando se considera el potencial de los MC de las MSK en la curación de heridas cutáneas, se observa que estos contienen citocinas, quimiocinas, enzimas, factores de crecimiento con propiedades proangiogénicas, antiapoptóticas y antifibróticas, componentes proteicos de la MEC, entre otras sustancias, que aceleran el cierre de las heridas cutáneas (36,37).

Se ha demostrado en múltiples estudios *in vitro* que los MC promueven la proliferación y migración de los fibroblastos dermales, la diferenciación de los queratinocitos mediante incremento de la expresión de citoqueratina 10 e involucrina (marcadores del estrato espinoso y granuloso de la epidermis) (38) y la generación de brotes angiogénicos (27). Por ejemplo, el trabajo de Collawn y colaboradores (36) empleando MC de A-MSK para el tratamiento de lesiones inducidas con láser sobre un modelo organotípico de piel, mostró un significativo incremento de la reepitelización en comparación con MC de fibroblastos (grupo control). Así mismo, ensayos *in vivo* en modelos murinos (27,39) como el desarrollado por Bhang y colaboradores, (27) muestran que el uso de MC de A-MSK cultivadas en hipoxia en un sistema dinámico -empleando spinners flasks- promueve significativamente la angiogénesis tisular.

Estos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los MC de las MSK son tan efectivos como el trasplante celular en la reparación tisular (4,40) y la inmunomodulación, con ventajas adicionales como: son potencialmente más seguros (menos probabilidad de rechazo inmune, embolización y transmisión de infecciones), pueden ser evaluados de manera análoga a los agentes farmacológicos convencionales (seguridad, dosis y potencia), el almacenamiento no requiere la adición de criopreservantes tóxicos, son más económicos y fáciles de aplicar, pueden producirse en gran cantidad en condiciones de laboratorio controladas con disponibilidad inmediata y finalmente, pueden ser modificados para alcanzar efectos celulares específicos (8).

1.3 Sistemas de cultivo de las MSC

Tradicionalmente las MSC se han cultivado en un sistema de dos dimensiones (2D) estático, en el cual las células se adhieren a la superficie plástica, migran y proliferan en frascos de cultivo estáticos usualmente en normoxia (41). Sin embargo, estas condiciones están lejos de emular el ambiente fisiológico que permite numerosas interacciones celulares y las interacciones de las células con su MEC en condiciones de hipoxia. Para recrear estas condiciones se han desarrollado sistemas de cultivo tridimensionales (o 3D), tanto estáticos como dinámicos (7).

Los cultivos 3D estáticos incluyen la agregación espontánea (autoensamblaje) de las MSC empleando superficies de baja adherencia o agregación inducida por gravedad, agregación sobre membranas o medios semisólidos y agregación forzada por confinamiento de espacio (7,12,41). Estos agregados tridimensionales promueven la secreción de citocinas antiinflamatorias, proangiogénicas y factores quimiotácticos, mejorando la capacidad regenerativa de las MSC (12,13).

Los cultivos 3D dinámicos incluyen el desarrollo de esferoides en suspensión empleando agitadores de rotación orbital, biorreactores o spinner flasks (7,12,41–43). El cultivo en biorreactores tienen ventajas como la incorporación de sistemas de control y monitoreo durante las 24 horas del proceso de producción a gran escala (incluso *online*) y costo-efectividad (13,41).

Un spinner flask corresponde a un frasco de poliestireno o de vidrio con dos brazos y una apertura central recubierta por una tapa plana de la cual emerge una barra de agitación magnética (que puede o no poseer paletas), la cual dirige el flujo del fluido y crea un ambiente dinámico. Los spinners flasks comercialmente disponibles tienen volúmenes de 25 mL a 6L, siendo los frascos con volúmenes entre 50 a 250 mL los más usados en el laboratorio (43).

El cultivo celular en spinners flasks emplea la fuerza centrípeta intrínseca, resultado de la rotación a velocidades bajas a medias, para promover la agregación y facilitar la interacción celular producto de la colisión debido a la agitación constante (7). Mediante este proceso

se conforman esferoides celulares, estructuras tridimensionales de tamaño variable que en el caso específico de esferoides grandes, pueden desarrollar necrosis central debido a la hipoxia. Por tanto, una estrategia para favorecer la generación de estructuras tridimensionales multicapa es el empleo de microtransportadores. Estas pequeñas microesferas soportan el crecimiento de células adherentes como las MSC, aumentando significativamente la superficie de área por unidad de volumen (13,44–46) y garantizando la viabilidad celular.

Los microtransportadores están hechos de diversos materiales, como poliestireno, dextrano, celulosa, gelatina, vidrio o tejido descelularizado con diferentes propiedades superficiales. Su tamaño oscila de 100 a 300 μm de diámetro y su densidad entre 1.02 and 1.1 g/cm^3 (47,48). En la actualidad existe una amplia gama de microtransportadores disponibles comercialmente los cuales varían en su composición, estructura, tamaño, densidad, presencia de carga y/o recubrimientos superficiales. En el anexo A se listan los microtransportadores más usados en el cultivo dinámico de las MSC (41,44,49–53).

Se recomienda que los microtransportadores empleados en la expansión de las MSC posean una carga eléctrica superficial de 1-2 meq g^{-1} para permitir la adherencia y el crecimiento celular, diámetro entre 100 a 200 μm para garantizar homogeneidad y facilitar la confluencia celular, y densidad entre 1.03 a 1.05 g/cm^3 para permitir la completa suspensión con mínima velocidad de agitación que evite el daño hidrodinámico del cultivo (54). Este sistema de cultivo conformado por el spinner flask, los microtransportadores y las MSC, puede instalarse fácilmente dentro de la incubadora y el control del pH está regulado por la concentración de CO_2 en dicho ambiente. A diferencia de los biorreactores, los sistemas que emplean spinner flasks no tiene sensores que permitan determinar la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (47).

Las MSC obtenidas de cultivos 3D mantienen el inmunofenotipo y su potencial de diferenciación multilínea, y presentan cambios en la composición de su secretoma, lo cual impacta su potencial terapéutico. Por ejemplo, el perfil de factores tróficos relacionados con la cicatrización de heridas presentes en el secretoma de MSC derivadas de cordón umbilical cultivadas en esferoides por Santos JM et al, demostró la expresión *de novo* del factor de crecimiento vascular endotelial α (VEGF-A) y niveles más altos de factor de crecimiento derivado de los hepatocitos (HGF), factor de crecimiento transformante $\beta 1$

(TGF- β 1), interleucina 6 (IL6), factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) y factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF) (42) .

La aplicación subcutánea de MC con este tipo de secretoma en un modelo *in vivo* de ratas con heridas cutáneas, aceleró y mejoró la calidad del proceso de curación (cierre total más rápido, reepitelización completa, presencia de anexos cutáneos y vascularización madura en comparación con las heridas tratadas con los MC obtenidos de cultivos en el sistema 2D estático (42) .

Múltiples estudios se han desarrollado para establecer el protocolo ideal que garantice la producción a gran escala en sistemas dinámicos de las MSC y sus MC (42,43,58,45,48,50,52,54–57) ;sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento, muestran que la heterogeneidad de las poblaciones celulares y variables como el tipo medio de cultivo y suplementación (59,60), el tipo de microtransportador, el tipo de sistema de agitación, la necesidad de recubrimientos que aumenten la adherencia, el régimen de agitación (61) y el protocolo de alimentación limitan la aplicación de un único procedimiento que garantice la potencia y seguridad de los productos.

1.3.1 Condiciones de oxígeno en los cultivos de MSC

La expansión de las MSC se realiza usualmente en condiciones de normoxia (21% de O₂); sin embargo, algunos estudios refieren que la exposición de las células a estos niveles de oxígeno puede inducir daño del DNA, promover la senescencia y disminuir la eficacia terapéutica (62,63). Por el contrario, la hipoxia (niveles de O₂ entre 1 y 5%), aumenta la viabilidad y la proliferación celular (64–66), mantiene el fenotipo indiferenciado (67) incrementa la diferenciación adipogénica y osteogénica (68), aumenta la expresión de moléculas de adhesión y de los transportadores de glucosa (69) y potencia los efectos regenerativos de las MSC debido a la regulación positiva del factor de transcripción inducible por hipoxia 1-alfa (HIF-1 α), el cual promueve la transcripción de múltiples factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis (70,71).

Estudios empleando A-MSC en los cuales se realizó preacondicionamiento durante 48 horas con deferoxamina (DFO) -un agente quelante que induce hipoxia- produjo un aumento dosis dependiente de HIF-1 α , incremento de factores proangiogénicos como VEGF α y angiopoyetina 1 (ANG-1), de citocinas antiinflamatorias (interleucinas 4 y 5) y de

factores neuroprotectores como el factor de crecimiento neural (NGF), el factor neurotrófico derivado de células de la glía (GDNF) y la neurotrofina-3 (NT3). También se observó aumento significativo de la capacidad antioxidante de los secretomas de las A-MSC de manera dependiente de la concentración de la DFO (72).

Sin embargo, otros estudios no han demostrado que la hipoxia favorezca el mantenimiento del estado indiferenciado ni un cambio drástico en la tasa de proliferación de las A-MSC y, por el contrario, se afecta su potencial de diferenciación a linaje muscular (73). También en modelos murinos se ha descrito que el cultivo en hipoxia (al 2% de O₂) disminuye la capacidad de diferenciación osteogénica y condrogénica (70). El trabajo de Oliveira y colaboradores, evidenció que la hipoxia y los pases prolongados inducen una regulación a la baja de genes implicados en la reparación del DNA y las vías de respuesta al daño (MLH1, RAD51, BRCA1 y Ku80) de forma concomitante con la aparición de inestabilidad de microsatélites mientras se mantiene la longitud de los telómeros (74).

Esta aparente variabilidad de la respuesta a la hipoxia por parte de las MSC observada en la literatura científica justifica que se continúen desarrollando estudios sobre este tópico, especialmente tratando de estandarizar parámetros de cultivo que permitan futuras comparaciones.

1.4 Curación de heridas cutáneas

Una herida cutánea es definida como la disrupción de la estructura anatómica con pérdida de la integridad funcional de la piel de etiología química, física, microbiológica o inmunológica (75,76), y se considera de carácter crónico, cuando la lesión no progresa a través de las fases del proceso de curación y resulta en una herida abierta y persistente por más de 12 semanas (77).

El proceso de curación de las heridas cutáneas se ha dividido en 4 fases: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación (77–80) Figura 1. La hemostasia inicia inmediatamente después de la lesión, cuando producto de la interacción de las plaquetas con las proteínas de la MEC (especialmente el colágeno y el factor de von Willebrand), se forma un coágulo que previene la hemorragia y constituye una matriz provisional (78,79). Las plaquetas juegan un papel crucial en esta fase, no solo porque atrapan células

inflamatorias dentro del coágulo, sino por su papel en la inhibición de la infección bacteriana, la liberación de sustancias quimiotácticas y de factores de crecimiento (especialmente del factor de crecimiento derivado de las plaquetas -PDGF- a partir de sus gránulos alfa) los cuales estimulan a los queratinocitos y fibroblastos residentes (77).

La fase inflamatoria inicia con la activación de la inmunidad innata: la liberación de patrones moleculares asociados al daño tisular (DAMPs) por parte de las células necróticas y de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de los componentes bacterianos; activan los mastocitos, células de Langerhans, linfocitos T y macrófagos. (77). Estas células activadas liberan citocinas proinflamatorias y quimiocinas que producen vasodilatación, aumento en la expresión de moléculas de adhesión y favorecen la migración de los leucocitos circulantes al área lesionada.

Migran polimorfonucleares neutrófilos que remueven detritus celulares mediante fagocitosis y liberan especies reactivas de oxígeno (ROS), péptidos antimicrobianos, eicosanoides y enzimas proteolíticas que buscan eliminar agentes patógenos (77). Los neutrófilos también secretan interleucina 1 (IL1) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), entre otras citocinas, que amplifican la cascada inflamatoria (79). En esta fase inflamatoria el ambiente de la herida es rico en factor de crecimiento transformante β (TGF- β), TNF- α , factor de crecimiento epidérmico (EGF), PDGF, VEGF, factor de crecimiento fibroblástico (FGF) e interleucinas 1, 6, 8 y 12 (IL1, IL6, IL8, IL12) (78).

Para progresar a la fase proliferativa, es indispensable que los macrófagos activados en este ambiente proinflamatorio, y denominados de fenotipo M1, cambien a un fenotipo M2 o reparador. El fenotipo M2 se caracteriza por la liberación de citocinas antiinflamatorias como las interleucinas 4, 10 y 13 (IL4, IL10, IL13), así como, la producción de abundantes factores de crecimiento como TGF α y FGF los cuales promueven la reepitelización, la fibroplasia y la angiogénesis (77).

La fase proliferativa se caracteriza por la activación de los queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales (CE) para promover la reepitelización, el depósito de matriz extracelular y la angiogénesis, procesos que permiten el cierre de la herida. La reepitelización es producto de la migración y proliferación de los queratinocitos dispuestos

en el borde de la herida y también, de la proliferación de células madre epiteliales presentes en el folículo piloso y las regiones epidérmicas interfoliculares (77).

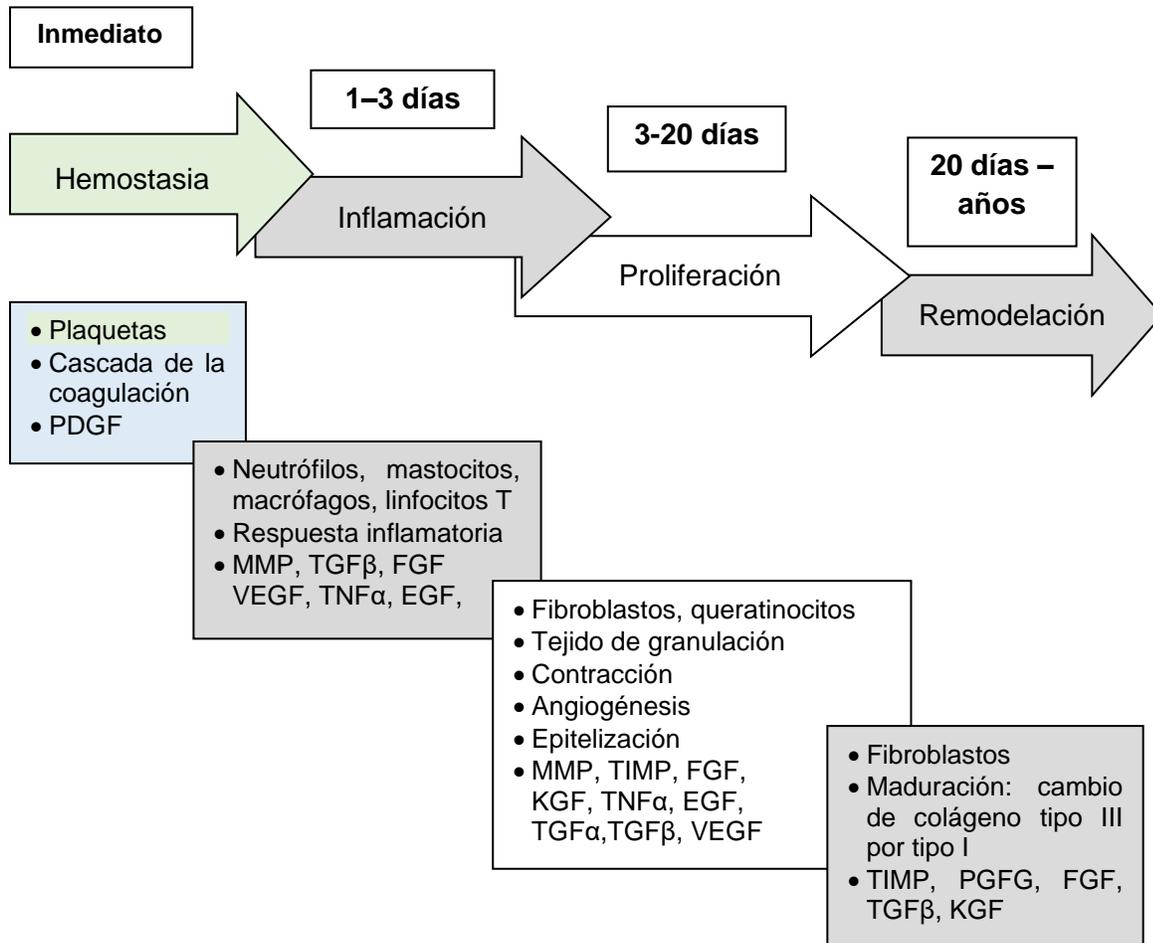


Figura 1. Fases del proceso de curación de heridas

Modificado de Lasocka I., Jastrzębska E., Szulc-Dąbrowska L., Skibniewski M., Pasternak I., et al. The effects of graphene and mesenchymal stem cells in cutaneous wound healing and their putative action mechanism. *Int J Nanomedicine*. 2019; 14: 2281–2299.

Los fibroblastos son los responsables de reemplazar la matriz provisional como respuesta a las moléculas de señalización liberadas por las plaquetas, macrófagos y CE: producen metaloproteinasas de la matriz (MMP) que degradan la matriz provisional y la reemplazan por la matriz del tejido de granulación rico en fibronectina, colágeno inmaduro, glucosaminoglicanos y proteoglucanos (77).

El tejido de granulación también se caracteriza por la presencia de numerosos vasos sanguíneos producto de la angiogénesis inducida por la hipoxia tisular. Las CE aumentan la expresión de HIF- α con la subsecuente producción y liberación de VEGF y de otros factores de crecimiento proangiogénicos. Los macrófagos también desempeñan un papel importante en la angiogénesis: producen MMP para permitir la migración endotelial y factores quimiotácticos que dirigen el crecimiento de los brotes vasculares. También participan en la remodelación de la nueva vasculatura mediante fagocitosis de los vasos superfluos (77).

La fase de remodelación se caracteriza por el recambio de la MEC inmadura por una matriz madura conformada predominantemente por fibras de colágeno tipo I. El tejido de granulación contiene gran cantidad de colágeno tipo III (aproximadamente 30%) y solo un 10% de colágeno tipo I, de modo que este último, debe ser reemplazado progresivamente para aumentar la fuerza tensil de la cicatriz en formación; sin embargo, la cicatriz sólo alcanzará un 70 a 80% de la fuerza tensil original después de un año (78).

Los cambios de la MEC requieren de un fino balance entre la degradación y la síntesis de colágeno cuya esencia es la regulación temporal de las MMP producidas por los macrófagos M2, fibroblastos y los queratinocitos (77).

Esta fase también se caracteriza por el cambio del perfil de los fibroblastos (de profibroblástico a miofibroblástico) para favorecer la contracción de la herida. La acción del TGF- β y la tensión mecánica estimulan la diferenciación miofibroblástica *in vivo* e *in vitro* (77).

1.4.1 Angiogénesis como proceso fundamental de la curación de heridas cutáneas

El proceso de curación implica el desarrollo de una red vascular dinámica que suministre nutrientes y que permita la eliminación de los productos de desecho en un contexto fisiológico.

La angiogénesis es el proceso de desarrollo vascular predominante en la vida postnatal y consiste en la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de redes vasculares preexistentes en los tejidos (81).

Este proceso incluye una serie de pasos denominados: generación de brotes, ramificación, puenteo y remodelación, que finalmente generan vasos sanguíneos maduros (82,83). La generación de brotes ocurre en respuesta a la inflamación y la isquemia, eventos que inducen la liberación de citocinas auto y paracrinas por parte de las CE (81).

Para el desarrollo de los brotes es necesario degradar la membrana basal vascular, romper las uniones intercelulares endoteliales y remover las células murales vasculares (82,83). Esta disrupción de los vasos maduros preexistentes, también produce degradación de la MEC adyacente, permitiendo la liberación de factores proangiogénicos como VEGF y FGF-2 (82).

Posteriormente, las CE proliferan, y las localizadas en la punta de los brotes (denominadas "Tip Cells") poseen la capacidad de migrar en el sentido de los gradientes quimiotácticos y de los estímulos mecánicos y, por tanto, son las responsables de guiar el crecimiento vascular. Las CE localizadas en el tallo también proliferan y van constituyendo la luz del vaso primitivo. Luego el vaso primitivo recién formado, empieza a anastomosarse con otros vasos primitivos adyacentes (82).

Finalmente, se restablece la membrana basal, se reclutan células murales (proliferan y migran células musculares lisas y/o pericitos), se generan las uniones intercelulares y las CE entran en un estado quiescente, de modo que se alcanza la maduración y estabilidad vascular (81,82).

Todos estos acontecimientos son dependientes de la interacción célula-célula, célula-MEC y de la apropiada señalización de factores de crecimiento y citocinas; por tanto, es la interacción física y química de las MSC con los demás componentes celulares y la MEC, lo que permite explicar su efecto proangiogénico, y en general su efecto regenerativo-reparativo, principalmente ejercido a través de su secretoma con acción paracrina.

Los MC de las MSC contienen factores solubles como VEGF, receptor de tipo 2 para el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR2), ANG-1, FGF, IL1 β , HGF, factor de crecimiento similar a la insulina-1 α (IGF1 α) entre otros, los cuales son responsables de

promover la angiogénesis (84). En la tabla 1 se resumen los principales factores pro y antiangiogénicos presentes en el secretoma de las MSC.

Tabla 1. Principales factores pro y antiangiogénicos producidos por las MSC

FACTOR PROANGIOGÉNICO	FUNCIÓN
Angiogenina	Migración, invasión, proliferación de CE y tubulogénesis.
Angiopoyetina 1	Estabilización vascular, supervivencia de las CE y reclutamiento de pericitos.
Angiopoyetina 2	Migración y formación de brotes endoteliales.
Factor de crecimiento fibroblástico-2	Proliferación y migración de las CE. Remodelación de la MEC.
Factor de crecimiento similar a la insulina-1	Proliferación y sobrevida de las CE. Inducción del VEGF y activador del plasminógeno.
Factor de crecimiento hepatocitario	Proliferación y migración de CE y células musculares lisas.
Interleucina 6	Proliferación y migración de las CE.
Interleucina-8	Proliferación, sobrevida, migración de las CE. Tubulogénesis.
Proteína 1 quimioatrayente de los monocitos	Migración de CE.
Proteína 1 α inflamatoria de los macrófagos	Proinflamatorio, quimioatrayente de células inmunes.
Proteína 1 β inflamatoria de los macrófagos	Proinflamatorio, quimioatrayente de células inmunes.
Metaloproteinasa de la matrix 2	Degradación de las matriz extracelular y migración de las CE.
Proteína 2 activante de los neutrófilos	Migración de CE. Reclutamiento de polimorfonucleares (PMN) neutrófilos. Liberación de VEGF y MMP.

Factor de crecimiento placentario	Inducción de nuevos vasos.
Factor de crecimiento tumoral β	Tubulogénesis. Estabilización vascular. Síntesis de MEC.
Factor de crecimiento endotelial vascular	Proliferación, sobrevida y migración de CE. Incremento de la permeabilidad vascular. Degradación de la ME. Tubulogénesis
FACTOR ANTIANGIOGÉNICO	FUNCIÓN
Inhibidor tisular de metaloproteinasa 1	Inhibidor de metaloproteinasas.
Inhibidor tisular de metaloproteinasa 2	Inhibidor de metaloproteinasas.
Monocina inducida por Interferón γ	Inhibición de la angiogénesis. Quimioatrayente de células T

Generado a partir de Bronckaers A, Lambrechts I. The role of mesenchymal stem/stromal cells in angiogenesis. In: Atkinson K. The biology and therapeutic applications of mesenchymal cells. 1 ed. New Jersey (EE. UU.): Wiley Blackwell; 2017. p. 347-365.

1.4.2. Papel de las MSC en la curación de heridas cutáneas

Su principal efecto es ejercido a través de su mecanismo paracrino (78), producto de la secreción de factores proangiogénicos y antiapoptóticos como factor estimulante de colonias granulocito–macrófago (GM-CSF), VEGF, HGF, FGF, factor de crecimiento derivado de las plaquetas homodimérico AA (PDGF-AA), ANG 1, angiogenina, leptina y TGF- α (17,85–87). Las MSC también secretan factor derivado del estroma 1 (SDF-1) el cual induce sobrevida de células endoteliales, generación de ramificaciones vasculares y reclutamiento de pericitos, lo cual impacta positivamente la angiogénesis (86,88,89)

Las MSC promueven la curación de heridas cutáneas agudas y crónicas mediante el incremento en la producción de fibronectina y colágenos de tipo I y III, así como, a través de la disminución concomitante de la producción de MMP-1 y regulando la secreción de TIMP; de modo que favorecen la conformación de la MEC (86). Además, estas células inducen la migración y la proliferación celular mediante la producción de interleucinas: la IL-6 promueve la reepitelización en las fases inflamatoria y proliferativa del proceso de

reparación y la IL-8 incrementa la proliferación y migración de los queratinocitos en la fase proliferativa (85).

Así mismo, participan de la atenuación de la respuesta inflamatoria, disminuyendo la secreción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y el interferón γ (IFN- γ), aumentando la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10 (78,90), inhibiendo los linfocitos T y reduciendo las células natural killer (NK) (17,78). También promueven la polarización de los macrófagos hacia el tipo 2 facilitando el avance hacia la fase de remodelación y modulan la formación de la cicatriz a través de la secreción de prostaglandina E2 (PGE2) (17,91).

Las MSC poseen actividad antimicrobiana directa (mediante secreción de factores antimicrobianos como péptidos de la catelicidina-LL-37 e indirecta mediante la secreción de factores inmunomoduladores que incrementan la fagocitosis y la actividad microbicida de las células del sistema inmune (85,88,92).

En resumen, las MSC están involucradas desde la fase inflamatoria hasta la fase de remodelación del proceso de curación de heridas y facilitan la progresión a través de las mismas evitando el desarrollo de heridas crónicas (90,93). Figura 2.

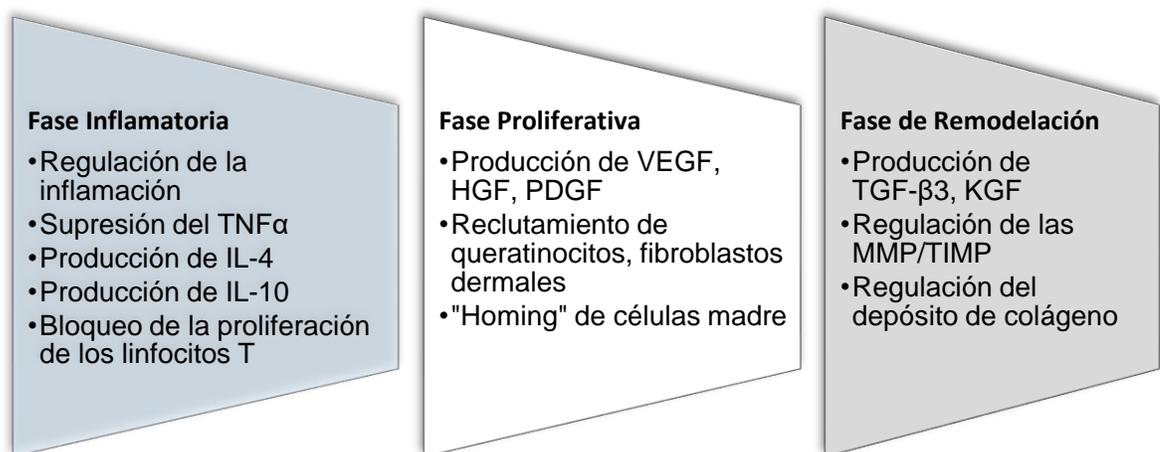


Figura 2. Papel de las MSC en la curación de heridas cutáneas

Modificado de Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miaggkova D. Concise review: role of Mesenchymal Stem Cell in wound repair. Stem Cell Transl Med. 2012; 1(2):142-9. p.144.

También existen múltiples estudios *in vivo* en diferentes modelos animales en los cuales se demuestra que las MSC promueven la regeneración-reparación de heridas cutáneas agudas y crónicas. Tabla 2

Tabla 2. Estudios *in vivo* empleando MSC que demuestran su efecto en la curación de heridas cutáneas

ESTUDIO	MODELO ANIMAL	FUENTE MSC	MECANISMO DE ACCIÓN	HALLAZGOS
Herida cutánea de espesor total (Kim WS et al 2007)	Ratón	Humano	Incremento del colágeno tipo I y III. Disminución de la MMP-1	Incremento de la epitelización y el tejido de granulación
Herida cutánea de espesor total en diabéticos (Javazon et al 2007)	Ratón	Humano	No hay evidencia de diferenciación celular. Efecto paracrino.	Incremento de la epitelización, del tejido de granulación y la angiogénesis
Herida cutánea de espesor total (Altman AM et al 2008)	Ratón	Humano	Diferenciación epitelial, fibroblástica y endotelial	Incremento de la epitelización
Herida cutánea de espesor total (Sasaki M et al 2008)	Ratón	Ratón	Diferenciación en queratinocitos, pericitos y células endoteliales	Aumento de la velocidad de cierre.
Herida cutánea de espesor total (Blanton MW et al 2009)	Cerdo	Cerdo	Diferenciación endotelial, secreción de factores de crecimiento	Incremento de la epitelización y la densidad capilar
Herida cutánea de espesor total (Wu Y et al 2009)	Ratón	Ratón	Diferenciación en queratinocitos epidérmicos	Aumento de la velocidad de cierre. Incremento de la epitelización y la angiogénesis

Herida cutánea de espesor total (Chen L et al 2009)	Ratón	Ratón	Diferenciación en queratinocitos epidérmicos	Aumento de la velocidad de cierre. Incremento de la epitelización y la angiogénesis
Úlcera por radiación (Ebrahimian TG et al 2009)	Ratón	Ratón	Diferenciación endotelial y de queratinocitos. Secreción de factores de crecimiento	Incremento de la epitelización, perfusión sanguínea y densidad capilar
Herida en diabéticos (Nambu M et al 2009)	Ratón	Ratón	Secreción de factores de crecimiento	Incremento de la epitelización, del tejido de granulación y la densidad capilar
Úlcera por radiación (Huang SP et al 2013)	Rata	Rata	Diferenciación endotelial, secreción de factores de crecimiento	Incremento de la epitelización, el tejido de granulación y la densidad capilar
Úlcera por quemadura (Atalay S et al 2014)	Rata	Rata	Incremento de la expresión de VEGF	Incremento de la vascularización y actividad fibroblástica. Reducción de la inflamación

Elaborado a partir de Hocking AM, Gibran N. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res.* 2010; 316 (14): 2213-19 y Shingyochi Y, Orbay H, Mizumo H. Adipose-derived stem cells for wound repair and regeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 2015; 15(9):1285-92.

Igualmente, se ha dado paso a la investigación de las MSC para el tratamiento de heridas en humanos: el primer estudio clínico de fase I sobre curación de heridas crónicas fue publicado en 2005 por García-Olmo et al, quienes emplearon el trasplante celular para el tratamiento de fístulas recurrentes en enfermedad de Crohn. En este estudio se demostró que la inyección en el sitio de la lesión de MSC autólogas era un procedimiento seguro y

se observó el cierre total de la fístula a las 8 semanas postratamiento en 6 de los 8 pacientes (94).

En el 2007, Rigotti et al (95) desarrollaron el primer ensayo clínico para demostrar la reparación de úlceras cutáneas postradiación mediante la aplicación de MSC autólogas obtenidas de la fracción estromal vascular (SVF) de lipoaspirados. En 2009, García-Olmo et al, publicaron los resultados del primer ensayo clínico de fase II, multicéntrico y aleatorizado, sobre la efectividad y seguridad de las MSC para el tratamiento de fístulas perianales complejas (96) y en 2016 (97) publicaron los resultados del estudio de fase III, en el cual demuestran el potencial terapéutico de las MSC para fístulas perianales complejas refractarias a otros tratamientos convencionales.

Actualmente se encuentran registrados en ClinicalTrials* 496 ensayos clínicos que emplean MSC para el tratamiento de diversas patologías cutáneas como esclerodermia, psoriasis, epidermolisis bulosa, dermatitis crónica, síndrome de Lyell, úlcera del pie diabético entre otras entidades.

*ClinicalTrials [Internet]. EE.UU. [Consultado 18 de abril 2022]. Recuperado a partir de <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=skin&term=MSC&cntry=&state=&city=&dist=>

1.4.3 Papel de los MC de MSC en la curación de heridas cutáneas

Los MC de las BM-MSc y de las A-MSc tienen un efecto similar al trasplante de las MSC sobre el incremento de la reepitelización de heridas cutáneas (87,91,98) y actúan como quimioatrayentes para queratinocitos epidérmicos, CE, macrófagos y fibroblastos dermales, lo cual es acorde con el efecto paracrino de estas células (38,98).

Estudios *in vitro* demuestran que los MC regulan la migración celular de queratinocitos y fibroblastos (en modelos de scratch estas células migran más rápido en presencia de los MC) (78,98), inhiben la expresión de MMP1 e incrementan la síntesis de fibronectina, colágeno tipo I (87) y elastina por parte de los fibroblastos dermales (86,87)

La literatura también refiere que los MC de A-MSc cultivadas en hipoxia son más efectivos para acelerar el cierre de heridas cutáneas en comparación con los MC de A-MSc obtenidos en condiciones de normoxia. (87). De acuerdo con Chung et al (99) los MC obtenidos de A-MSc cultivadas en hipoxia aumentan la cicatrización de las heridas debido a su capacidad de inducir la migración de queratinocitos, CE, fibroblastos, favorecer la angiogénesis, incrementar la síntesis de colágeno tipo I y su capacidad de reclutar células madre circulantes.

La explicación para estos efectos tróficos de los MC obtenidos en cultivos en hipoxia se centra en el incremento de la transcripción de genes involucrados en la angiogénesis y la reparación-regeneración tisular como PDGF, TGF- β 1, TGF- β 3, y SDF-1 (78,98). Sin embargo, esta potenciación de la reparación tisular en condiciones de hipoxia no es exclusiva de los MC de A-MSc, también puede observarse en MC de BM-MSc y de las MSc derivadas del líquido amniótico (100).

Así mismo, el cultivo de MSc en hipoxia permite obtener MC con abundantes moléculas inmunomoduladoras (tales como Ligando 1 de muerte programada y 2-3-indolaminodioxigenasa) lo cual impacta positivamente la fase inflamatoria de la curación de heridas, reduciendo la inflamación y favoreciendo la reparación tisular (37,91).

Por tanto, los MC de A-MSc obtenidos en hipoxia presentan un perfil proangiogénico, estimulante de la migración celular e inmunomodulador que favorece la curación de heridas cutáneas, aumentando no solo su velocidad de cierre sino la calidad del proceso de cicatrización.

2. Justificación y Objetivos

2.1. Justificación

La piel es el órgano más grande por área de superficie del cuerpo humano y protege los tejidos internos del daño mecánico, la infección microbiana, la radiación ultravioleta y las temperaturas extremas (101). Este órgano es susceptible al desarrollo de heridas por cirugías, trauma, quemaduras o enfermedad, especialmente en ancianos y en pacientes con diabetes mellitus, quienes presentan alteraciones del proceso de cicatrización y, por tanto, un incremento del riesgo de desarrollar heridas crónicas (101,102).

Las heridas cutáneas afectan las esferas física, emocional y social del paciente debido a la presencia de dolor crónico, limitaciones en la movilidad, desarrollo de ansiedad y/o depresión, sentimientos de enojo y frustración, alteraciones en percepción de la imagen corporal, el desarrollo de comportamientos de aislamiento, la pérdida parcial o total de su independencia y la disminución de su capacidad para trabajar (102). También tienen un impacto significativo en la economía del sistema de salud: solo en los Estados Unidos, el tratamiento de las heridas que no cicatrizan representa 50.000 millones de dólares en costos de atención médica cada año (101).

Sorprendentemente, las intervenciones terapéuticas disponibles son moderadamente efectivas con tasas altas de resistencia y de fracaso, las cuales pueden alcanzar cifras de hasta el 50%, como se observa en úlceras del pie diabético (103). Por lo tanto, la comunidad médica aboga por el desarrollo de nuevas terapias más eficaces para curar heridas agudas y crónicas.

Estudios previos efectuados por nuestro grupo de investigación, han evidenciado que los MC tienen la misma eficacia en comparación con el trasplante celular en la recuperación

de la función motora en lesiones medulares (1), cicatrización de heridas cutáneas (2) y regeneración ósea (3–6). Estos hallazgos no sólo permiten considerar a los MC de A-MSC como una novedosa y eficaz alternativa de tratamiento para heridas cutáneas, sino que, reafirman las ventajas de su aplicación: bajo potencial de rechazo inmunológico, posibilidad de dosificación y de liofilización, lo cual facilita la preservación, almacenamiento y transporte.

Sin embargo, es necesario optimizar los parámetros de cultivo para obtener MC con el mejor perfil angiogénico y reparador posible –asumiendo que la angiogénesis es fundamental para potenciar el proceso de curación cutánea- y producirlos en cantidades suficientes para garantizar la administración continua del tratamiento durante el desarrollo de estudios preclínicos y clínicos que demuestren la seguridad y eficacia de los MC.

Una solución a este problema es reemplazar el cultivo 2D estático por un sistema de cultivo 3D dinámico (spinners flasks acoplados a microtransportadores) en condiciones que favorezcan el perfil angiogénico del secretoma de las MSC y la producción de mayores cantidades de MC por lote. Sin embargo, el cambio del sistema de cultivo y la modificación de la presión de oxígeno, pueden alterar el secretoma y, por tanto, es necesario evaluar no sólo la composición sino la preservación de la capacidad funcional con énfasis en el potencial angiogénico de estos nuevos MC. Para determinar las variaciones de la composición del secretoma, así como su impacto en su potencial terapéutico, se planteó este trabajo de investigación con el objetivo de evaluar si los MC obtenidos de A-MSC cultivadas en el sistema 3D dinámico seleccionado (spinners flasks acoplados a microtransportadores), tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, conservan su potencial angiogénico y su capacidad funcional en la curación de heridas cutáneas.

Los resultados de este proyecto de investigación permitirán avanzar en el proceso de escalamiento de la producción de los MC y analizar el impacto de los cambios introducidos en el sistema de cultivo en la capacidad funcional, con énfasis en el proceso angiogénico, de estos productos. También permitirá avanzar en la determinación de factores críticos del cultivo para promover determinados perfiles de los MC de las MSC con miras a generar nuevas terapéuticas para entidades específicas.

2.2 Objetivo principal

Evaluar si los medios condicionados (MC) obtenidos de A-MSC cultivadas en un sistema 3D dinámico, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, conservan su potencial angiogénico y su capacidad funcional en la curación de heridas cutáneas.

2.3 Objetivos específicos

2.3.1. Analizar comparativamente el inmunofenotipo, la tasa de crecimiento específico, el doblaje poblacional y la capacidad de diferenciación de las A-MSC cultivadas en el sistema 2D estático versus las cultivadas en un sistema 3D dinámico, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, para determinar si las nuevas condiciones de cultivo modifican estos parámetros.

2.3.2. Analizar comparativamente el secretoma de las A-MSC cultivadas en el sistema 2D estático versus las cultivadas en un sistema 3D dinámico, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, para determinar si las nuevas condiciones de cultivo modifican su perfil proteico.

2.3.3. Evaluar mediante ensayos *in vitro* la capacidad angiogénica de los MC obtenidos de las A-MSC cultivadas en el sistema 2D estático y en el sistema 3D dinámico, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia.

2.3.4. Evaluar mediante un ensayo *in vivo* la capacidad regenerativa-reparativa de los MC obtenidos de las A-MSC cultivadas en el sistema 2D estático y en el sistema 3D dinámico, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, en un modelo animal de heridas cutáneas agudas.

3. Metodología

3.1 Aislamiento y cultivo de las A-MSC

El cultivo de las A-MSC se efectuó durante la estancia internacional del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas desarrollada en el Instituto de Bioingeniería y Biociencias del Instituto Superior Técnico (iBB-IST) de Lisboa.

De acuerdo con la información suministrada por funcionarios del Stem Cell Engineering Research Group (SCERG) del iBB-IST, las muestras de tejido adiposo humano empleadas en este trabajo fueron obtenidas en la Clínica de Todos-os-Santos de Lisboa de donantes sanos previa aprobación del consentimiento informado acorde con la directiva 2004/23/EC del Parlamento Europeo y el Comité de ética de la clínica.

Las A-MSC fueron aisladas y expandidas a pases tempranos siguiendo los protocolos establecidos por el SCERG-iBB-IST y se encontraban criopreservadas en el banco de células de la sede TAGUSPARK del iBB-IST de Lisboa.

Los 4 lotes de A-MSC (pertenecientes a 4 pacientes) empleados en este trabajo habían sido cultivadas en medio Dulbecco's modificado de Eagle (DMEM) bajo en glucosa suplementado con 10% de SFB y 1% penicilina–estreptomina–fungizona (Gibco®) (74) y se encontraban congeladas en una mezcla 90/10% de DMEM suplementado con SFB y dimetilsulfóxido. Por tanto, para efectuar los cultivos xenofree fue necesario realizar la adaptación de las MSC a su nuevo suplemento. Para ello se realizaron 2 pases celulares con DMEM bajo en glucosa suplementado con 5 % de HPL y 1% de antibiótico-antimicótico (1x) (Gibco®) antes de su uso en los diferentes ensayos de esta tesis.

3.1.1 Expansión de las A-MSC y obtención del MC en cultivos 2D estáticos

A-MSC de pases 1 o 2 fueron descongeladas y sembradas en cajas de cultivo T75 (Falcon) a una densidad celular de 1000 – 5000 células/cm². Las A-MSC fueron cultivadas en DMEM bajo en glucosa (1g/L) (Gibco®) suplementado con 5% v/v de HPL UltraGRO™-PURE (AventaCell Biomedical) y 1% Antibiótico-antimicótico (1x) (Gibco®) bajo condiciones estándar de cultivo (37° de temperatura y 5% de CO₂ en medio humidificado). Se efectuó cambio del medio de cultivo cada tercer día.

Cuando las células alcanzaron 70 a 80% de confluencia, se realizó el primer pasaje: las A-MSC se desprendieron de las cajas empleando TrypLE Select (1x) (Gibco®) durante cinco minutos a 37°C y la acción enzimática se inactivó empleando medio de cultivo suplementado precalentado a 37°C. El número de células y la viabilidad se determinó con el método de exclusión empleando azul de Tripán (Gibco®).

Las A-MSC fueron expandidas hasta pase 3 garantizando una viabilidad superior al 95% y se sembraron en 6 cajas T175 (Falcon) a una densidad celular de 1000 – 5000 células/cm² con el medio de cultivo suplementado. Tres de las seis cajas se ubicaron en incubadora bajo condiciones de normoxia (37°C de temperatura y 5% de CO₂ en medio humidificado) y las tres cajas de cultivo restantes, en incubadora en condiciones de hipoxia (37°C de temperatura y O₂ del 3%).

Se efectuó cambio del medio de cultivo cada tercer día y se finalizó el cultivo cuando las células alcanzaron 70 a 80% de confluencia (promedio de 7,5 días). Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo, se efectuaron dos lavados de cada una de las monocapas con 10 mL de buffer fosfato salino 1X (PBS 1X) y se adicionó DMEM bajo en glucosa sin suplemento.

A las 48 horas se recolectó el medio de cultivo rico en el secretoma celular (MC de las A-MSC) de las 3 cajas en condiciones de hipoxia en un tubo de polipropileno de 50 mL (Falcon). Se efectuó el mismo procedimiento con los medios de las cajas cultivadas en normoxia. Posteriormente, los 2 tubos fueron centrifugados a 1250 RPM durante 10 min a temperatura ambiente para remover los detritus celulares y los MC se alicuotaron y almacenaron a -80°C.

Las A-MSc se desprendieron de las cajas empleando TrypLE Select (1x) (Gibco®) por 5 minutos a 37°C y la acción enzimática se inactivó empleando medio de cultivo suplementado precalentado a 37°C. El número de células y la viabilidad se determinó con el método de exclusión empleando azul de Tripán (Gibco®).

Las células recuperadas se emplearon para realizar inmunofenotipificación mediante citometría de flujo y los ensayos de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica siguiendo los protocolos previamente generados y empleados en el SCERG-iBB-IST (Anexo B)

3.1.2 Expansión de las A-MSc y obtención del MC en cultivos 3D dinámicos

Los cultivos 3D dinámicos se efectuaron empleando spinners flasks de vidrio de 100 mL (Adjustable Hanging Bar Flat Bottom Spinner Flask Complete 100mL SKU: 1967-00100A. Bellco) previamente recubiertos con Sigmacote® y esterilizados mediante calor seco; así como, microtransportadores SoloHill plásticos (PALL®) a concentración de 1,6 g/80 mL previamente esterilizados y pretratados con HPL al 50% para mejorar la adherencia celular.

Para el montaje de cada spinner flask se emplearon 2×10^6 A-MSc de pase 3 previamente expandidas en condiciones estáticas y 40 mL del medio de cultivo DMEM bajo en glucosa (1g/L) (Gibco®) suplementado con 5% v/v de HPL UltraGRO™-PURE (AventaCell Biomedical) y 1% antibiótico-antimicótico (1x) (Gibco®).

Durante las primeras 24 horas se empleó un régimen de agitación de 30 RPM y se ubicó un spinner flasks en incubadora bajo condiciones de hipoxia y un segundo cultivo dinámico en incubadora bajo condiciones de normoxia.

Pasadas las 24 horas, se evaluó el porcentaje de adherencia de las A-MSc a los microtransportadores e inmediatamente se adicionaron 40 mL de medio suplementado (volumen final de 80 mL) y se aumentó la agitación a 40 RPM por minuto hasta el final del cultivo, manteniendo cada spinner flask en su condición de hipoxia o normoxia.

Se realizó muestreo diario para evaluar el crecimiento celular y observar la adherencia celular mediante visualización directa en microscopio invertido de fluorescencia de los

núcleos celulares previamente marcados con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Sigma, 1,5 µg/mL en PBS). Se efectuó cambio del 50% del medio de cultivo suplementado con adición de un pulso de glucosa (concentración 4g/L) a partir del día 3 y hasta el día previo al inicio de la obtención de los MC.

El día 7 u 8 (cuando el cultivo 3D dinámico finalizó su fase de crecimiento exponencial y se observó la máxima concentración de células) se procedió a obtener el MC: se detuvo la agitación del spinner flask durante 10 a 15 min bajo cabina de flujo laminar para permitir que decantaran los microtransportadores y luego se eliminó el 95% del medio de cultivo mediante aspiración con pipeta desechable (Corning) de 5 mL por uno de los brazos laterales.

A cada spinner le fue adicionado 35 mL de una solución de PBS 1X y se ubicó sobre una plataforma de agitación (dentro de la cabina de flujo laminar) a 40 RPM durante 5 min. Después, se detuvo la agitación para permitir que nuevamente decantaran los microtransportadores y se eliminó el PBS 1X. Finalmente, se adicionaron 80 mL de DMEM bajo en glucosa sin suplementar a cada spinner y se ubicaron nuevamente en sus respectivas incubadoras en condiciones de normoxia e hipoxia. Se reinició la agitación a 40 RPM y se mantuvo por 48 horas.

Al finalizar este tiempo, se ubicaron los spinners flasks completamente cerrados bajo cabina de flujo laminar y se detuvo la agitación para permitir que decantaran los microtransportadores. Se realizó recolección de los MC mediante aspiración con pipeta desechable (Corning) de 10 y 5 mL por uno de los brazos laterales. Los 4 tubos de polipropileno de 50 mL (Falcon) con los MC fueron centrifugados a 1250 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente para remover microtransportadores y detritus celulares. Los MC se alicuotaron y almacenaron a -80°C.

A cada spinner flask se adicionaron 35 mL de PBS 1X-EDTA filtrado (0,2g EDTA por litro de PBS 1X) y se ubicó sobre una plataforma de agitación (dentro de la cabina de flujo laminar) a 40 RPM durante 5 min. Después, se detuvo la agitación para permitir que decantaran los microtransportadores y se eliminó el PBS1X-EDTA empleando pipeta desechable (Corning) de 10 mL por el acceso lateral del frasco. Se repitió este lavado con 35 mL de PBS 1X-EDTA una vez más.

Para desprender las A-MSK de los microtransportadores se adicionaron 35 mL de TrypLE Select (2x) (Gibco®) durante 10 minutos manteniendo el spinner en agitación a 40 RPM. Luego, se detuvo la agitación y se adicionaron 35 mL medio de cultivo suplementado precalentado a 37°C para detener la acción enzimática. Finalmente, empleando unidades de filtración Steriflip® (MERCK®) se removieron los microtransportadores y se determinó el número de células recuperadas empleando el método de exclusión con azul de Tripán (Gibco®).

Las células recuperadas se emplearon para realizar inmunofenotipificación mediante citometría de flujo y los ensayos de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica siguiendo los protocolos previamente generados y empleados en el SCERG-iBB-IST (Anexo B)

3.2 Caracterización celular

Esta sección incluye la evaluación de la proliferación celular, el inmunofenotipo y la capacidad de diferenciación de las A-MSK cultivadas en el sistema 2D estático y en el sistema 3D dinámico -tanto en condiciones de normoxia como hipoxia- de los cuatro lotes de A-MSK empleadas en la realización de este trabajo.

3.2.1 Evaluación de la proliferación celular

Para cada uno de los cuatro lotes de A-MSK cultivados en los sistemas 2D estático y 3D dinámico, tanto en normoxia como en hipoxia, se calculó la tasa de crecimiento específico y el doblaje poblacional.

Para calcular la tasa de crecimiento específico (M) se empleó la fórmula $M = \text{Ln} \left[\frac{Cx(t)}{Cx(0)} \right] / \Delta t$ donde Ln es el logaritmo natural, $Cx(t)$ es el número de células al final de la fase exponencial, $Cx(0)$ el número de células sembradas al inicio del cultivo y Δt es el tiempo de cultivo en días.

Para calcular el doblaje poblacional (Pd) se empleó la fórmula $Pd = \frac{1}{\log(2)} \cdot \log \left[\frac{Cx(t)}{Cx(0)} \right]$ donde $Cx(t)$ es el número de células al final de la fase exponencial y $Cx(0)$ el número de células sembradas al inicio del cultivo.

3.2.2 Inmunofenotipificación de las A-MSC

Cada uno de los cuatro lotes de A-MSC empleados en este trabajo fue inmunofenotipificado mediante citometría de flujo empleando los anticuerpos que se muestran en la tabla 3. Así mismo, 2×10^6 A-MSC recolectadas al final de cada cultivo (como se describe en la sección 3.1.1 y 3.1.2) se utilizaron para repetir la inmunofenotipificación mediante citometría de flujo empleando los mismos anticuerpos monoclonales.

Las lecturas se realizaron en el citómetro de flujo BD FACSCalibur, ubicado en la sede TAGUSPARK, iBB-IST de Lisboa, Portugal. Se evaluaron un mínimo de 10,000 eventos por cada marcador de superficie y el análisis de las lecturas efectuadas se realizó con el software FlowJo™ (BD Company).

Tabla 3. Anticuerpos empleados en la caracterización de las A-MSC

ANTICUERPO	CLON	ISOTIPO	MARCA
Anti-C14 PE	MφP9	IgG2b, kappa	Biosciences - BD®
Anti-CD34 PE	581	IgG1, kappa	BioLegend®
Anti-CD45 PE	HI30	IgG1, kappa	BioLegend®
Anti-CD73 PE	AD2	IgG1, kappa	BioLegend®
Anti-CD80 PE	2D10	IgG1, kappa	BioLegend®
Anti-CD90 (Thy1) PE	5E10	IgG1, kappa	BioLegend®
Anti-CD105 PE	43A3	IgG1, kappa	BioLegend®
Anti-HLA-DR PE	L243	IgG2, kappa	BioLegend®

3.2.3 Evaluación del potencial de diferenciación de las A-MSC

Se efectuaron ensayos de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica de los cuatro lotes de A-MSC siguiendo los protocolos previamente generados y empleados en el SCERG-iBB-IST (Anexo B). Así mismo, 3×10^5 A-MSC fueron recolectadas al final de cada cultivo (como se describe en la sección 3.1.1 y 3.1.2) y se emplearon para repetir los ensayos de diferenciación siguiendo los mismos protocolos.

3.3 Caracterización de la composición de los MC de las A-MSK

Se determinó la concentración total de proteínas de los MC mediante el Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Scientific®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada muestra fue evaluada por triplicado.

Posteriormente, se realizaron las diluciones necesarias para que las alícuotas de los MC que fueron empleados en los ensayos *in vitro* presentaran la misma concentración (22 µg/mL) en todos los experimentos.

La evaluación cuantitativa se limitó a dos de los cuatro lotes celulares y se usó como criterio de selección los resultados del crecimiento celular en el cultivo 2D estático en normoxia: los lotes 1 (donante 140404) y 3 (donante 140326) poseen los mayores conteos celulares al finalizar los cultivos en estas condiciones.

A estos dos lotes MC de A-MSK se les evaluó cuantitativamente la presencia de 640 proteínas empleando el kit Quantibody® Human Cytoquine Antibody Array 640 de RayBiotech. Este kit está compuesto por 16 microarreglos de anticuerpos para la detección mediante fluorescencia de 640 citocinas humanas. La realización de este ensayo estuvo a cargo de la empresa RayBiotech (Norcross, GA 30092, USA).

Para analizar estos resultados se consideró que el MC obtenido en las condiciones de cultivo estándar (2D estático en normoxia) corresponde al patrón de referencia y frente a este se comparan los demás MC (obtenidos con las variaciones en el sistema de cultivo y la concentración de oxígeno). Así mismo, se consideraron significativas los aumentos de dos o más veces en la concentración proteica o la aparición de proteínas de novo con respecto al patrón de referencia .

Las proteínas clasificadas como aumentadas o aquellas que fueron detectadas *de novo* en los cultivos en condiciones de hipoxia o en los cultivos 3D dinámicos de los lotes 1 y 3 fueron ingresadas en la base de datos STRING versión 11.5 para un análisis de

enriquecimiento funcional a través de redes de interacción proteína-proteína enfocado en el proceso de curación de heridas y vías de señalización asociadas a la angiogénesis.

3.4 Caracterización funcional de los MC de las A-MSc

La evaluación funcional de los MC de las A-MSc incluye tres modelos *in vitro* de angiogénesis (ensayo de migración celular, ensayo de formación de estructuras tubulares y ensayo de formación de brotes angiogénicos empleando explantes de corazón de ratón) y un modelo *in vivo* de curación de heridas cutáneas agudas.

3.4.1. Modelos de angiogénesis *in vitro*

• 3.4.1.1 Ensayo de migración celular

Empleando el modelo de migración celular estandarizado por nuestro grupo de investigación (104) se evaluó comparativamente el efecto de los cuatro lotes de MC de A-MSc sobre las células EAhy926.

Las células EAhy926 empleadas en el estudio fueron donadas por el Centro Dermatológico Federico Lleras de Bogotá y corresponden a una línea de células endoteliales producto de la fusión de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) con células de cáncer pulmonar humano (A549). Estas células inmortalizadas mantienen las características de células endoteliales y se emplean en estudios *in vitro* de angiogénesis (105).

Las EAhy926 se sembraron en una placa de cultivo de 24 pozos (Costar) a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células y 500 μ L por pozo de medio DMEM/F12 (1:1 con 15 mM HEPES, L-glutamine) de Lonza suplementado con 10% de SFB (Gibco), 1% de L-glutamina (Gibco®) y 1% de Antibiótico-antimicótico (1x) (Gibco®). La placa se incubó bajo atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO₂ hasta que las células alcanzaron 100% de confluencia.

Aún con el medio de cultivo en los pozos, se realizó una “herida” longitudinal central por pozo empleando la punta estéril de una micropipeta de 200 μ L. Luego se retiró el medio de cultivo con las células desprendidas y se realizó un primer lavado con el medio de cultivo DMEM/F12 no suplementado (500 μ L por cada pozo).

Se revisaron las “heridas” en el microscopio invertido (LEIKA®) empleando aumento de 5X (para seleccionar 18 de los 24 pozos con las mejores heridas para la realización del ensayo). Luego se efectuó un segundo lavado con el medio de cultivo DMEM/F12 no suplementado. Por último, se adicionaron 500 µL de cada uno de los controles y tratamientos por triplicado:

- Control negativo: DMEM bajo en glucosa con piruvato.
- Control positivo: VEGF 10 ng/mL en 500 µL de DMEM bajo en glucosa.
- MC de A-MSK cultivadas en 2D estático normoxia.
- MC de A-MSK cultivadas en 2D estático hipoxia.
- MC de A-MSK cultivadas en 3D dinámico en normoxia
- MC de A-MSK cultivadas en 3D dinámico en hipoxia.

Se tomaron fotografías empleando el microscopio invertido con cámara integrada (LEIKA®) con el objetivo de 5X a las 0, 8, 12 y 15 horas. Las imágenes de las 0 y 12 horas fueron analizadas empleando el software WinScratch (Wound Healing Assay Image Analysis Solution) de WIMASIS Image Analysis (España) el cual midió el porcentaje del área correspondiente a la “herida” en la hora 0 y en la hora 12.

Se calculó la media geométrica del porcentaje del área de la herida -tanto de la hora 0 como de la hora 12- para cada triplicado y luego se calculó el porcentaje final del área de la herida así: $\text{media geométrica hora 12} \times 100 / \text{media geométrica hora 0}$. Por último, se determinó el porcentaje de cierre restando de 100 el porcentaje final del área de la herida. En la figura 3 se presenta el esquema que resume el protocolo empleado en este ensayo.

• 3.4.1.2 Ensayo de formación de estructuras tubulares

Se evaluó comparativamente la capacidad de promover la formación de estructuras tubulares (formación de capilares-like) de los cuatro lotes de MC de A-MSK sobre las células EAhy926 cultivadas en una matriz de membrana basal. Se siguió el protocolo descrito por Aranda y Owen (105) y estandarizado por nuestro grupo de investigación (104).

Se empleó una placa de cultivo de 96 pozos (Costar) y una caja de puntas de 200 µL previamente congeladas a -20°C y ubicadas sobre hielo dentro de la cabina de flujo laminar

para servir 70 pozos con 50 μ L del Matrigel® (Matrix Basement Membrane Growth Factor Reduced x 10 mL. REF 354230. LOT 6067003 CorningTM).

La placa con Matrigel® se ubicó por 15 min en la nevera a 4°C y luego durante 40 minutos en incubadora en ambiente humidificado a 37°C y CO₂ 5%. Faltando 20 min para completar el tiempo de gelificación del Matrigel® se inició la recolección de las células EAhy926 así: se eliminó el medio del frasco de cultivo T75 (Falcon) que contiene las EAhy926 con confluencia del 70%, se lavó la monocapa dos veces con 5 mL de PBS 1X y se adicionó 1mL de TrypLE Express (Gibco®).

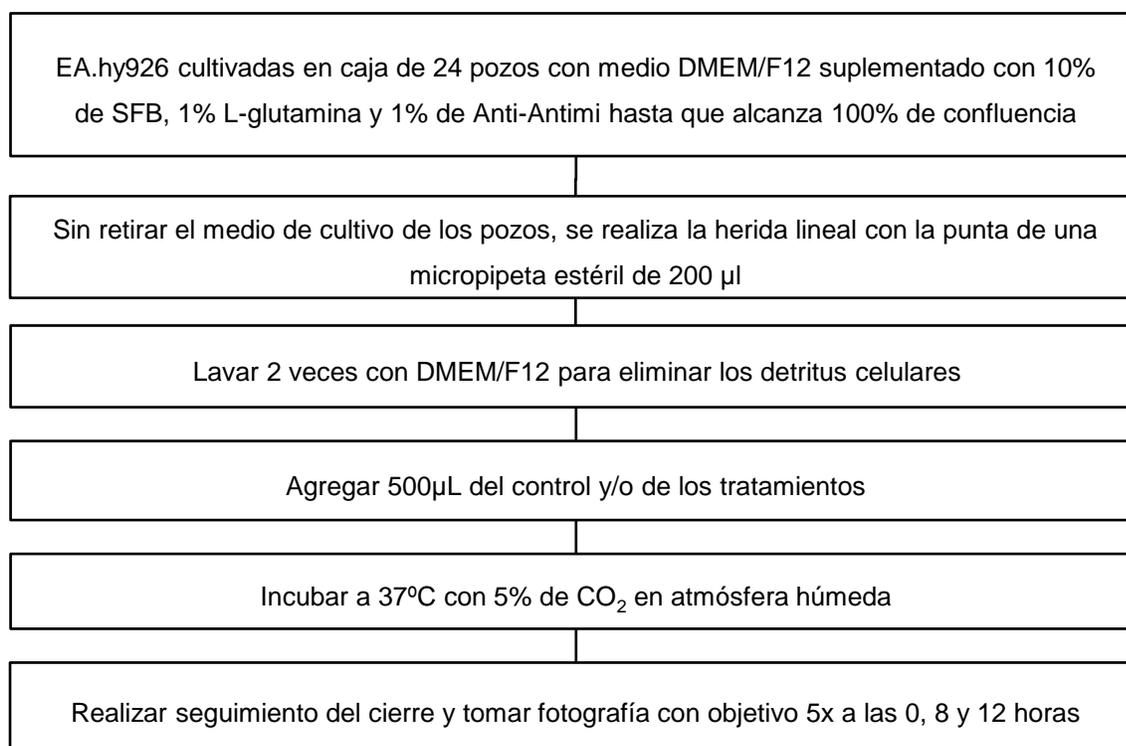


Figura 3. Protocolo del ensayo de migración celular

Se dejó actuar el TrypLE Express por 3 min y se inactivó con 5 mL de medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB, 1% de L-glutamina y 1% de Antibiótico-antimicótico. Se recolectó el medio con las células en un tubo de polipropileno de 15 mL (Falcon) y se centrifugó a 1500 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 10 mL del medio de cultivo ya descrito.

Se realizó el conteo celular empleando cámara de Neübauer y se removió el volumen correspondiente para obtener 360.000 células el cual fue distribuido en 6 tubos de 15 mL (60000 células x tubo). Se completó el volumen hasta 2 mL empleando el medio DMEM-F12 suplementado. Se repitió la centrifugación a 1500 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminaron los sobrenadantes. Se resuspendieron los pellets celulares de las EAhy926 en 600 μ L de cada control/tratamiento (los mismos grupos descritos en el ensayo anterior).

Se retiró de la incubadora la placa con los pozos recubiertos con Matrigel® y se sembraron 200 μ L (20.000 células/pozo) de cada uno de los controles/tratamientos por triplicado sobre la matriz de membrana basal. Se ubicó la placa nuevamente en la incubadora y se tomaron fotografías empleando el microscopio invertido con cámara integrada (LEIKA®) con el objetivo de 5X a las 3 y 5 horas. En la figura 4 se presenta el esquema que resume el protocolo empleado en este ensayo

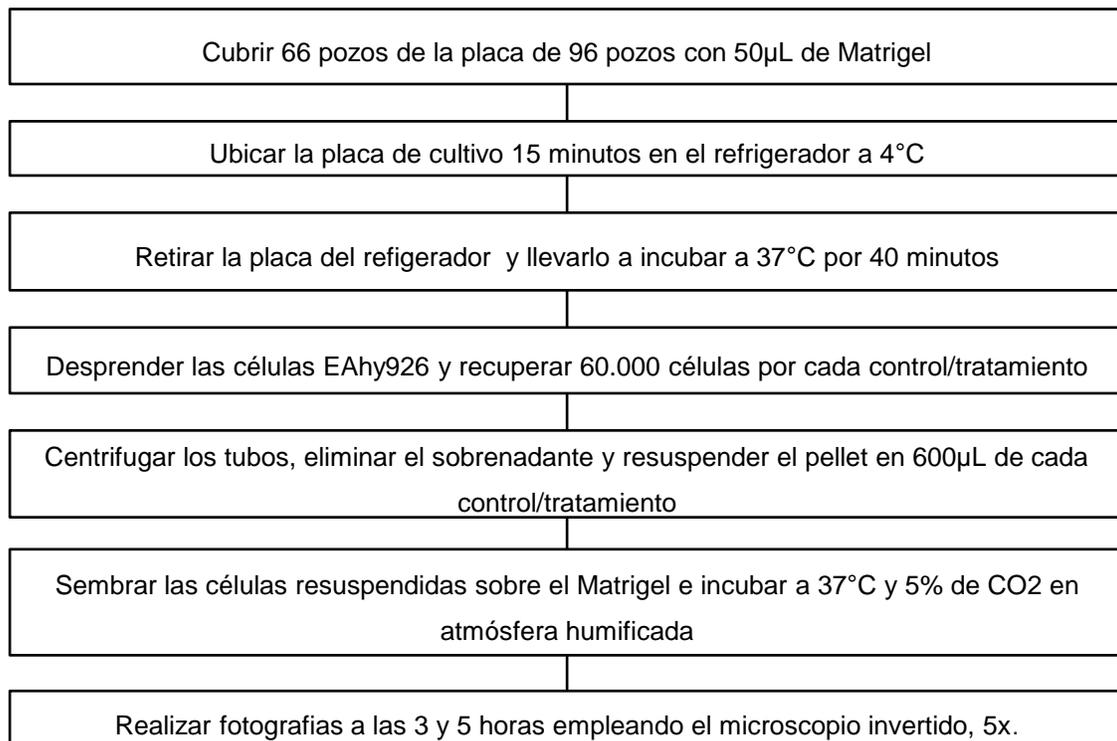


Figura 4. Protocolo del ensayo de formación de estructuras tubulares

Las imágenes captadas a las 5 horas fueron analizadas empleando el software WinTube (Quantification Tube Formation) de WIMASIS Image Analysis (España) el cual informa los parámetros descritos en la tabla 4. Se muestra una imagen representativa de los elementos evaluados y el código de colores empleado por este software en la figura 5.

Tabla 4. Métricas empleadas por el Software WinTube de WIMASIS

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN
Porcentaje de área cubierta	Se calcula dividiendo el número total de píxeles (px) de la imagen en el número de px de la estructura tubular. El área correspondiente a la estructura tubular se observa de color azul. Figura 5.
Número total de tubos	Recuento de los tubos en la imagen. Un tubo es la parte de la estructura entre dos puntos de ramificación o un punto de ramificación y un extremo libre. Los tubos se colorean de rojo. Figura 5.
Longitud total de los tubos	Corresponde a la longitud completa (en píxeles) de la estructura tubular.
Número de puntos de ramificación	Recuento de los puntos de ramificación en la imagen. Los puntos de ramificación son las partes de la estructura tubular donde convergen 3 o más tubos. Se aprecian como puntos blancos en la figura 5.
Número de bucles (Loops)	Recuento de bucles en la imagen. Un bucle es un área del fondo encerrada por la estructura tubular. Se identificada por números en color amarillo. Figura 5.
Número de redes (Nets)	Una red es la región aislada de tubos que contiene al menos un punto de ramificación. Los tubos aislados no se consideran redes.

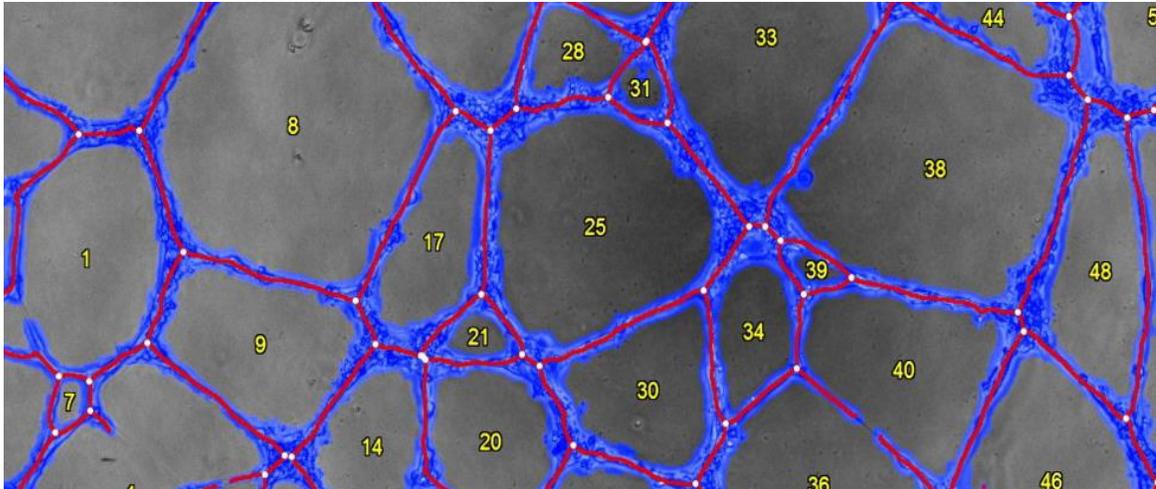


Figura 5. Elementos analizados por el software WinTube de WIMASIS

La imagen muestra en rojo los tubos angiogénicos, en azul el área cubierta por los tubos, los puntos de ramificación en blanco y los bucles numerados en amarillo. Wimasis [Internet]. Córdoba, España. [Citado 6 de noviembre 2021]. Recuperado a partir de <https://www.wimasis.com/en/WimTube>

• 3.4.1.3 Ensayo de formación de brotes angiogénicos

Se empleó el modelo de cultivo tridimensional de explantes de corazón de ratón en matrices de fibrina descrito por Aplin y Nicosia (106) siguiendo el protocolo estandarizado por nuestro grupo de investigación (104). En este ensayo se evaluó la capacidad de los MC de potenciar la formación de brotes angiogénicos alrededor del explante para los 4 lotes de MC de A-MSK.

Se emplearon 2 ratones BALB/c machos de 8 semanas de vida provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAL. Se practicó anestesia con éter y luego eutanasia mediante dislocación cervical.

Se realizó limpieza del tórax con yodopovidona espuma (MK®) y agua destilada empleando gases estériles. Se trasladó el animal -fijado a un soporte plástico desinfectado con alcohol al 70%- a la cabina de flujo laminar donde se le practicó apertura de la cavidad torácica con tijeras. Se extrajo el corazón y se eliminó la sangre efectuando lavado externo e interno mediante instilación de PBS 1X pH 7.4 suplementado con 2% de antibiótico /antimicótico.

Se diseccionaron los ventrículos y se cortaron en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 mm^3 empleando bisturí. Se lavaron los fragmentos tres veces con PBS 1X pH 7.4 suplementado con 2% de Antibiótico -Antimicótico (Gibco®) y se sumergieron (3 fragmentos por eppendorf estéril de 1.5 mL) en 1 mL de cada uno de los controles/tratamientos (ya descritos en el ensayo de migración celular) durante mínimo 30 minutos.

Durante el tiempo de acondicionamiento, se realizó la mezcla para producir la matriz de fibrina (compuesta por plasma humano, solución salina estéril, ácido tranexámico, DMEM bajo en glucosa suplementado con 10% de SFB y cloruro de calcio) a las concentraciones descritas por Doncel (104) y se sirvieron $300 \mu\text{L}$ x pozo en 18 pozos de una placa de cultivo de 24 pozos de fondo plano (Costar). Después, un fragmento de ventrículo se depositó en el centro de la matriz en cada pozo y se incubó por espacio de 40 min en atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO_2 hasta que gelificó la matriz de fibrina.

Finalmente, se adicionaron $300 \mu\text{L}$ de cada uno de los controles/ tratamientos a evaluar (se reusó el MC contenido en los eppendorf) y se ubicó la placa en la incubadora en atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO_2 . Se realizó cambio de los controles/tratamientos cada dos días hasta completar 6 días de cultivo. Este ensayo se efectuó por triplicado.

El último día del experimento se fijaron las estructuras vasculares con $500 \mu\text{L}$ de formol buferado al 10% durante 30 minutos y se observó bajo microscopio invertido (LEIKA®) el crecimiento de los microvasos desde los bordes de cada explante. Se realizó registro fotográfico con objetivo de 5X. En la figura 6 se presenta el esquema que resume el protocolo empleado en este ensayo.

Las imágenes fueron analizadas empleando el software WinSprout – Aortic ring (Sprouting Assay) de WIMASIS Image Analysis (España) el cual informa los siguientes parámetros: área en pixeles ocupada por el explante, área en pixeles ocupada por los brotes, distancia mínima, distancia máxima y promedio de la distancia alcanzada por los brotes con su desviación estándar. Se muestra una imagen representativa de los elementos evaluados y el código de colores empleado por este software en la figura 7.

Con los resultados de las áreas ocupadas por el explante y por los brotes, se calculó la relación de crecimiento angiogénico (RCA):
$$RCA = \frac{\text{áreas de los brotes angiogénicos}}{\text{área del explante de corazón de ratón}}$$

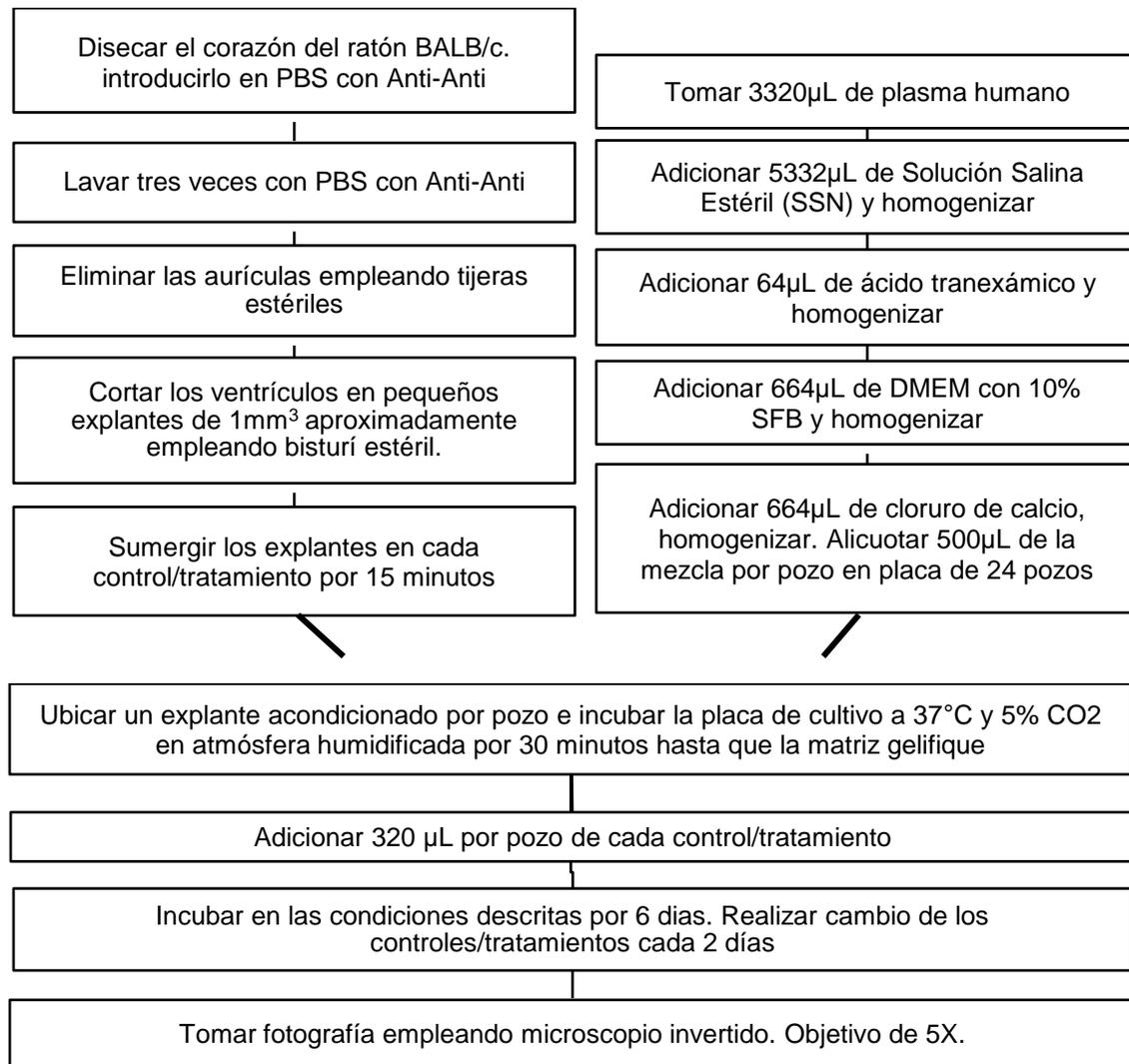


Figura 6. Protocolo del ensayo formación de brotes angiogénicos empleando explantes de corazón de ratón

Modificado de Doncel Pacheco A. Comparación *in vitro* del efecto angiogénico de medios condicionados de células madre mesenquimales humanas obtenidas a partir de tejido adiposo y médula ósea cultivadas en condiciones de normoxia e hipoxia [Tesis de Maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2010.

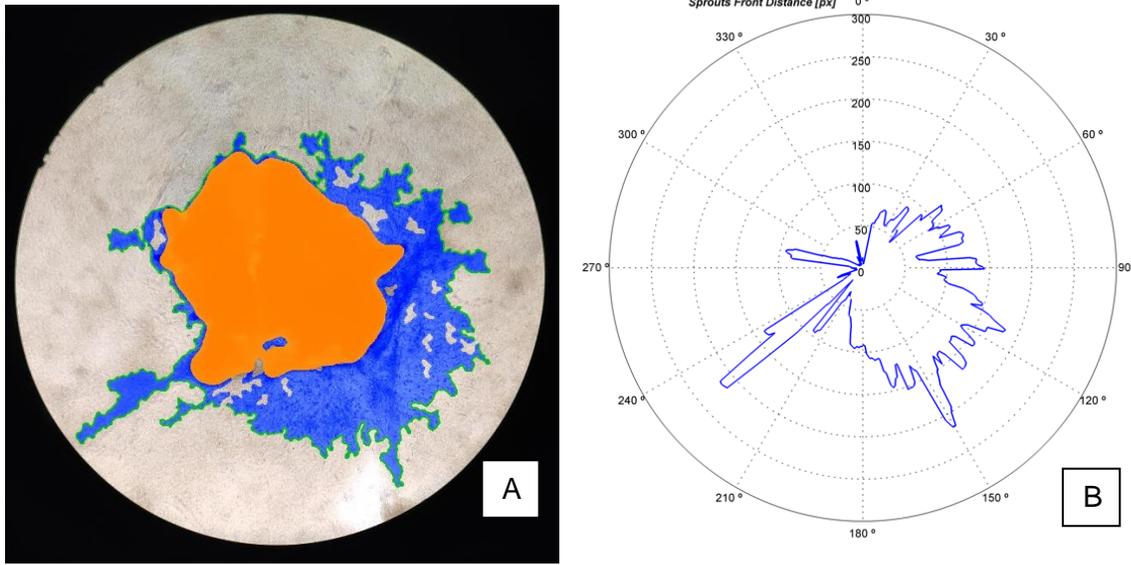


Figura 7. Elementos analizados por el software WinSprout de WIMASIS

A. El área ocupada por el explante de corazón corresponde a la zona naranja. El azul corresponde al área ocupado por los brotes. La línea amarilla delimita el frente de crecimiento de los brotes.
 B. Gráfico empleado para determinar las distancias mínima y máxima (en píxeles) del frente de crecimiento angiogénico.

3.4.2 Modelo in vivo de curación de heridas cutáneas

Inicialmente se consideró el empleo de un modelo de heridas excisionales de piel en ratones para evaluar el proceso de curación de heridas cutáneas. Este modelo fue previamente estandarizado en nuestro grupo de investigación por Sánchez (2). Sin embargo, durante el desarrollo de los experimentos, fue necesario efectuar el cambio de especie siguiendo las recomendaciones de Masson-Meyers et al, (76).

Se utilizaron 10 ratas (*Rattus norvegicus*) de linaje Wistar provenientes de la Unidad de Biología Comparativa (UBC) de la Universidad Pontificia Javeriana (UPJ) de Bogotá. Se incluyeron animales machos de 7 a 10 semanas con peso entre 200 y 400 gramos, los cuales corresponden a adultos jóvenes.

Los animales estaban alojados en la UBC en cajas de polisulfona (Zyphon™, Labproducts, USA) con material particulado (aspen bed) como material de encamado. Se

utilizaron como fuentes de enriquecimiento ambiental materiales de anidación (fibras de papel kraft-envirodri y afeitados de madera-aspen) y refugios (shepherd shacks domes). Se alimentaron con concentrado labdiet 5010, purina, USA; estimando frecuentemente las necesidades de consumo, y como fuente de agua, se administró agua filtrada y auto clavada.

Las cajas estaban ubicadas en posiciones del rack en donde las variables ambientales fueron homogéneas (temperatura, humedad, intensidad de luz, sonido y fotoperiodo). Los animales se mantuvieron en aclimatación/habituaación durante 3 días; tiempo durante el cual se verificó diariamente la adecuada interacción social y se descartaron signos adversos relacionados con las condiciones de alojamiento.

Tres días antes de la cirugía los animales seleccionados fueron pesados y se inició el alojamiento individual, el cual se mantuvo hasta finalizar el experimento, para evitar interacción de los congéneres con el área quirúrgica.

El día 0 del experimento, se ubicaron los animales de cada grupo (N=5) en el área quirúrgica. Cada animal fue anestesiado con isoflurano inhalado (3% con 0,5 L/min de oxígeno hasta garantizar la pérdida completa de reflejos), se le rasuró el dorso con hojas de cuchilla de afeitar desechables y se le practicaron dos lavados del área rasurada con yodopovidona. Posteriormente, se practicaron tres heridas de espesor completo en la piel dorsal empleando un punch de 0.8 cm de diámetro. Las heridas estaban distribuidas como muestra la figura 8 y distanciadas entre sí a 1.5 – 2 cm.

Cada herida fue delimitada por un anillo estéril de foami de 1 mm de espesor con una perforación central de 0,8 mm – correspondiente al área de la herida- y un borde exterior de 0,5 mm, y luego, cada herida fue recubierta con Transpore® (Nexcare).

Para el control del dolor, se utilizó tramadol (5-10 mg/kg) subcutáneo durante los primeros 3 días postquirúrgicos, iniciando el suministro 30 minutos antes de realizar las cirugías para disminuir los efectos adversos del estímulo nociceptivo.

El día 1 se trasladaron nuevamente los animales al área quirúrgica, y bajo anestesia, se retiró el cubrimiento, se lavaron las heridas con solución salina normal y se realizó la aplicación intradérmica de los tratamientos. La aplicación se efectuó en el borde de la

herida, desde 4 puntos de ingreso, distribuyendo homogéneamente el líquido. En una herida se administraba 100 μ L del control (DMEM bajo en glucosa) y en cada una de las dos heridas restantes 100 μ L de cada MC de A-MSK a evaluar. Se efectuó rotación de los tratamientos en los animales de experimentación.

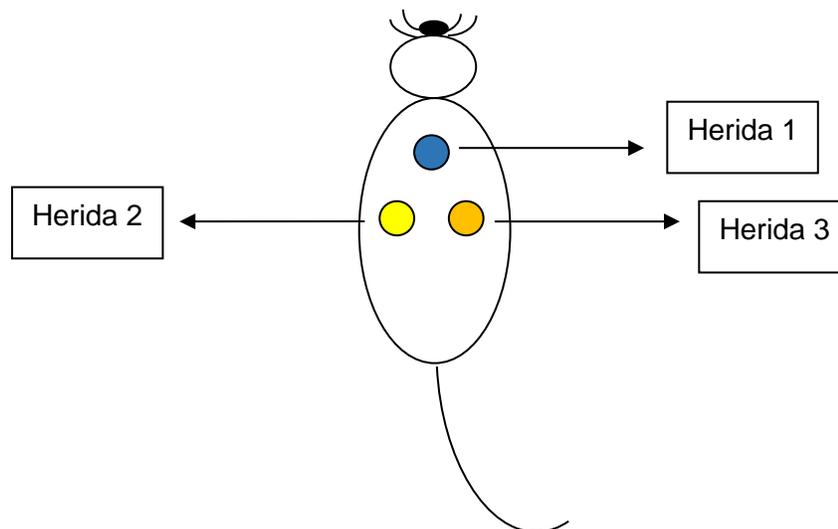


Figura 8. Localización de las heridas cutáneas dorsales en los animales de experimentación

Se efectuó medición del diámetro horizontal de cada una de las heridas empleando un calibre digital y se tomó registro fotográfico del proceso los días 0, 2, 3, 5, 7 y 9 empleando una cámara digital posicionada en trípode a 20 cm e iluminación con lámpara halógena. Se calculó el porcentaje de cierre de la herida al día 9 (último día del experimento) empleando la fórmula: $\text{área original} - \text{área actual} / \text{área original} \times 100$.

Se realizó eutanasia de los 5 animales de cada grupo el día 9 empleando inyección intracardiaca de Euthanex®, previa anestesia con isoflurano inhalado de acuerdo con el procedimiento operativo estándar (POE): Eutanasia y necropsia de animales de laboratorio de la UBC-UPJ. Se realizó confirmación de la muerte por evaluación de signos clínicos (ausencia de pulso, ausencia de latido cardíaco, ausencia de reflejo corneal, palidez o *rigor mortis*) y se practicó resección de la piel del dorso donde se realizaron las intervenciones.

Cada una de las heridas cutáneas en proceso de curación se depositó en un frasco debidamente rotulado que contenía 10 mL de formol buferado al 10%. Se fijaron las

muestras por 24 horas, se procesaron mediante histotécnica convencional y se obtuvieron las láminas para análisis histológico teñidas con Hematoxilina & Eosina (H&E).

Para observar las láminas coloreadas con H&E se empleó el microscopio óptico AxioScope A1 Carl Zeiss® y para el análisis de los resultados se basó en el score de cicatrización de la herida desarrollado por Santos J et al, (42), el cual evalúa cuatro parámetros histológicos: reepitelización, distancia entre los bordes de la herida, tejido de granulación y vascularización. Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros para determinar el score de cicatrización de las heridas cutáneas

SCORE	REEPITELIZACIÓN	DISTANCIA ENTRE LOS BORDES	TEJIDO DE GRANULACIÓN	VASCULARIZACIÓN
0	< 25%	Bordes distantes	Abundante	Presencia de hemorragias
1	25-50%	Bordes distantes, pero con tejido de granulación entre ellos	75-50% en el lecho de la herida	Presencia de hemorragias y algunos capilares
2	51-75%	Distancia moderada	25-49% en el lecho de la herida	Presencia de muchos capilares
3	>75%	Distancia reducida	Menos de 25% en el lecho de la herida	Presencia de pocos capilares
4	Completa	Herida cerrada	Ausente	Vascularización no evidente

Modificado de Santos JM, Camoes SP, Filippe E, Cipriano M, Barcia RN, et al. Three-dimensional spheroid cell culture of umbilical cord tissue derived mesenchymal stromal cells leads to enhanced paracrine induction of wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6:90. p.7

Para evaluar la angiogénesis, se practicó estudio de inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal anti-CD31 (Clon EP78) de cada biopsia cutánea incluida en parafina con el objetivo de cuantificar la densidad de los vasos sanguíneos en el tejido (76).

Para evaluar las láminas de inmunohistoquímica se empleó el microscopio óptico AxioScope A1 Carl Zeiss® y se seleccionó el área con la mayor intensidad de marcación a bajo aumento (5X). Luego, empleando magnificación de 20X, se seleccionaron 5 focos dentro de esta área y se tomaron las fotografías de estos puntos empleando la cámara IC C5 Carl Zeiss® y el software ZEN® acoplados al microscopio AxioScope A1 Carl Zeiss®. Se efectuó el conteo de los vasos positivos para anti-CD31 en los 5 focos y se obtuvo el promedio de los vasos sanguíneos. Este promedio por campo de 20X equivale a la densidad vascular (76).

Los dos análisis histológicos (con H&E e inmunohistoquímica) fueron efectuados por dos patólogos de manera independiente y los resultados definitivos corresponden al promedio de dichas lecturas.

3.5 Análisis estadístico

Para los ensayos *in vitro* se realizó estadística descriptiva de las variables de interés. Para las variables continuas se determinó su normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para las variables con distribución normal se efectuó la prueba T de Student y para las que no presentaron distribución normal se utilizó la suma de rangos Wilcoxon (Mann-Whitney). Para efectuar el análisis bivariado, se agruparon las variables según el tipo de cultivo y las condiciones de oxígeno. Para realizar la comparación entre grupos se consideró como patrón de referencia los resultados del cultivo 2D estático en normoxia.

Para las variables que presentaron distribución normal se empleó ANOVA de un factor y para las que no cumplieron con el supuesto de distribución normal, se empleó Kruskal Wallis. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como un nivel significativo y el análisis estadístico se realizó mediante el software RStudio versión 1.4.1103 de 2009-2021.

Para el ensayo *in vivo* se realizó estadística descriptiva de las variables de interés. Para las variables continuas se determinó su normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Dado que la variable diámetro de la herida no tenía distribución normal, se consideró

emplear ANOVA no paramétrico de medidas repetidas; sin embargo, debido al pequeño tamaño de la muestra, finalmente se efectuó ANOVA funcional de dos colas. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como un nivel significativo y el análisis estadístico se realizó mediante el software RStudio versión 1.4.1103 de 2009-2021.

Así mismo, las variables porcentaje de cierre de las heridas, score total (histológico) y densidad vascular, tampoco presentaban distribución normal por lo que se utilizó la suma de rangos Wilcoxon (Mann-Whitney). Se consideró un valor de $p < 0,05$ como un nivel significativo y el análisis estadístico se realizó mediante el software RStudio versión 1.4.1103 de 2009-2021.

4. Resultados

4.1 Cultivo de las A-MSC

Las A-MSC fueron descongeladas y expandidas hasta pase 3. Estas células presentaban morfología fibroblastoide y adherencia al plástico del frasco de cultivo. Con estas células se realizaron los cultivos 2D estáticos y 3D dinámicos, tanto en normoxia como en hipoxia, y se obtuvieron sus respectivos MC. Figura 9.

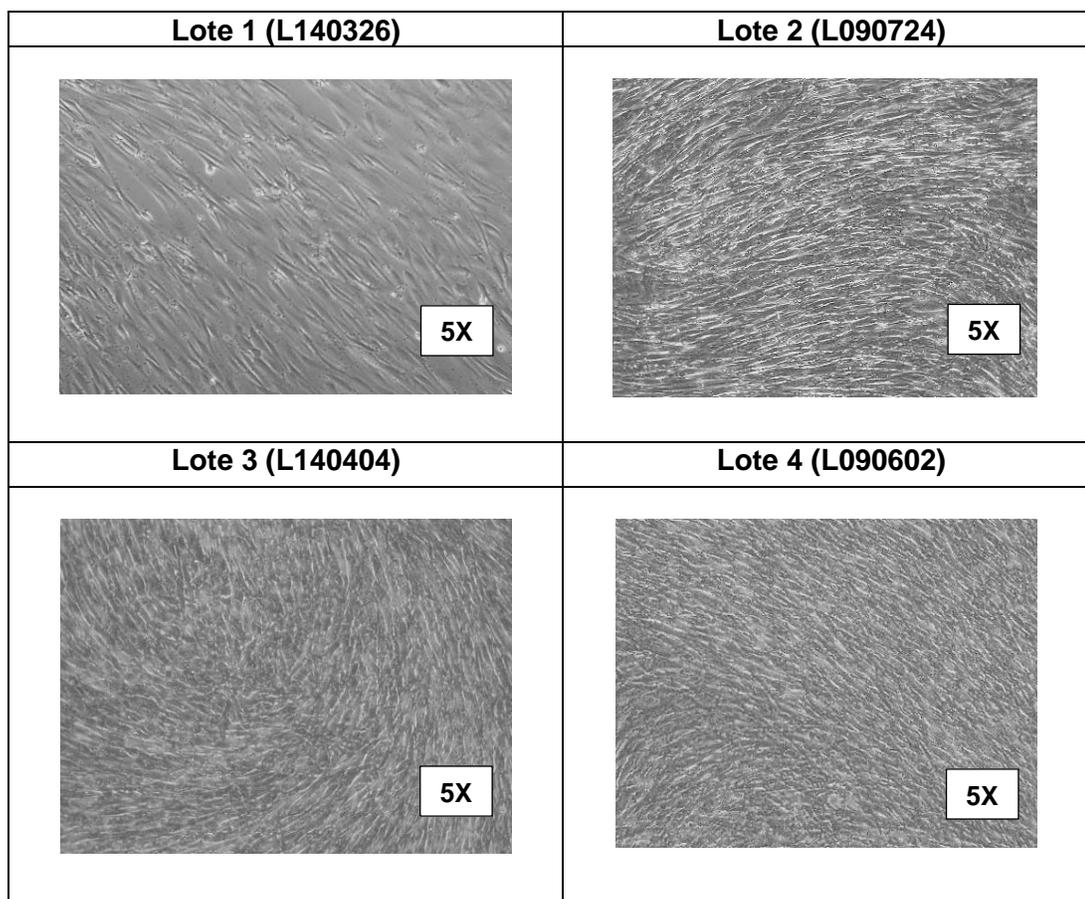


Figura 9. Morfología celular de las A-MSC bajo microscopio invertido*

También se comprobó que los cuatro lotes de A-MSC poseen capacidad de diferenciación a los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico. Figura 10.

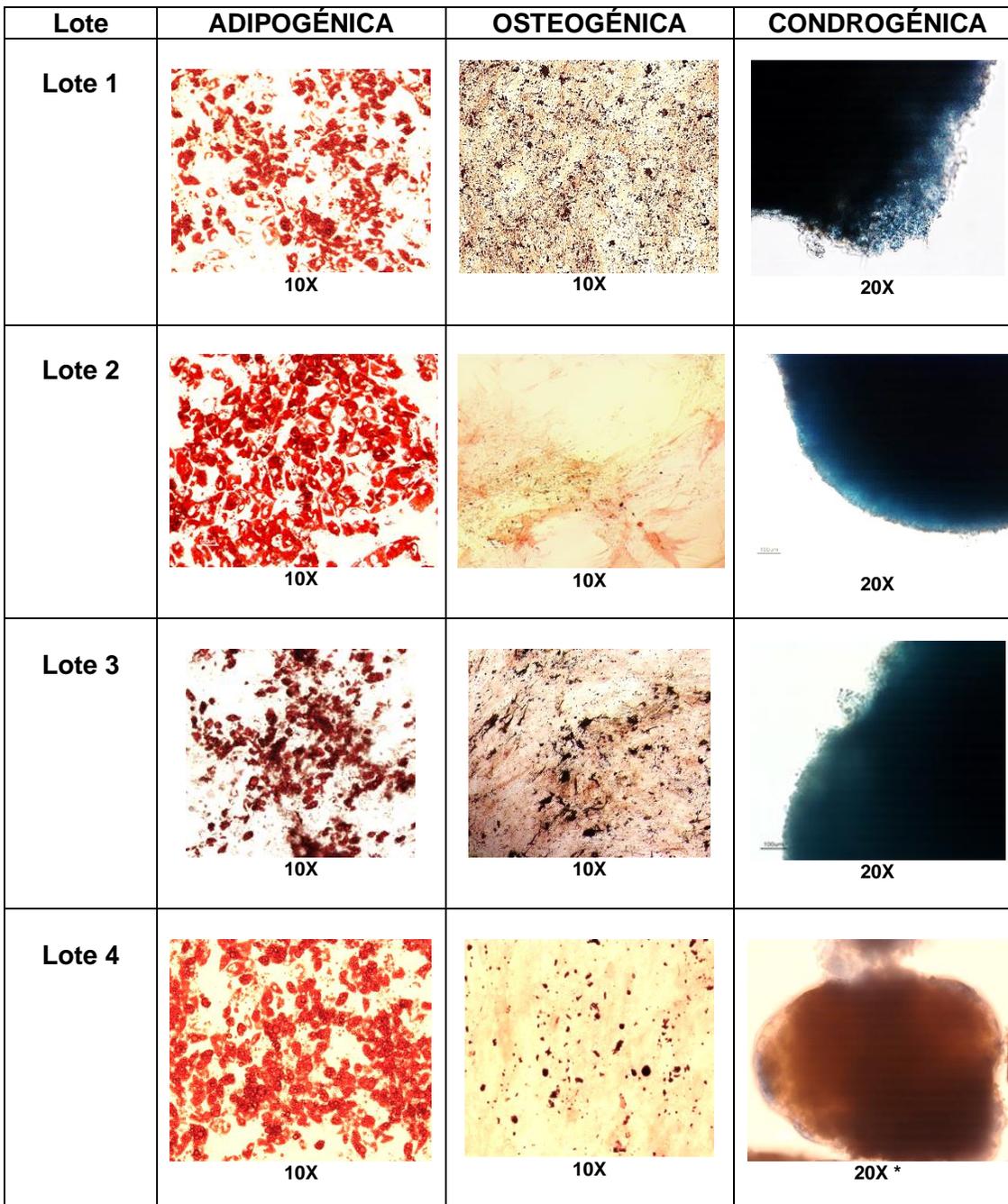


Figura 10. Diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica de los 4 lotes de A-MSC empleados en este estudio

4.2 Caracterización celular

4.2.1 Evaluación de la proliferación celular de las A-MSC

Cada lote celular se descongeló, amplificó, caracterizó y empleó para desarrollar los cultivos 2D estáticos y 3D dinámicos, tanto en normoxia como hipoxia, con aproximadamente un mes de diferencia.

• 4.2.1.1 En cultivos 2D estático

Cuando los cultivos 2D estáticos alcanzaron el 70-80% de confluencia, lo cual tomó entre 6 y 9 días de cultivo, se inició el proceso de obtención de los MC por 48 horas. Durante estas 48 horas se eliminó la suplementación con HPL y se adicionó DMEM con 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco®) para obtener los MC. Al finalizar este periodo de tiempo, se recolectó el MC y las células para efectuar su conteo (empleando cámara de Neübauer por triplicado), inmunofenotipificación y realizar los ensayos de diferenciación. El número de células determinado en este momento se consideró como el número de células al final del cultivo.

La figura 11 muestra los datos correspondientes a los promedios de los conteos celulares de las A-MSC cultivadas en el sistema 2D estático.

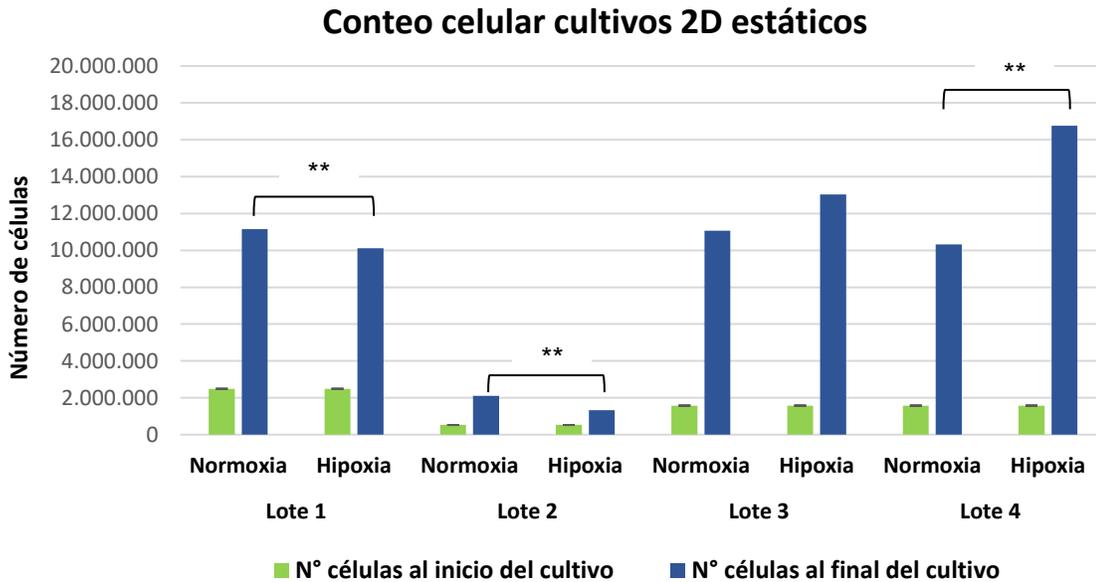


Figura 11. Conteos celulares de las A-MSC en los cultivos 2D estáticos.

Se observa mayor crecimiento celular de los lotes 1 y 2 en condiciones de normoxia ($p=0.04953$ y $p=0.03389$ respectivamente), mientras que, las A-MSC del Lote 4 crecen más en hipoxia ($p=0.04953$). No hay diferencias estadísticamente significativas en los resultados de los conteos celulares al comparar las condiciones de normoxia e hipoxia para el lote 3.

Una vez efectuado el conteo celular se calcularon la tasa de crecimiento específico y el doblaje poblacional, tanto en normoxia como en hipoxia.

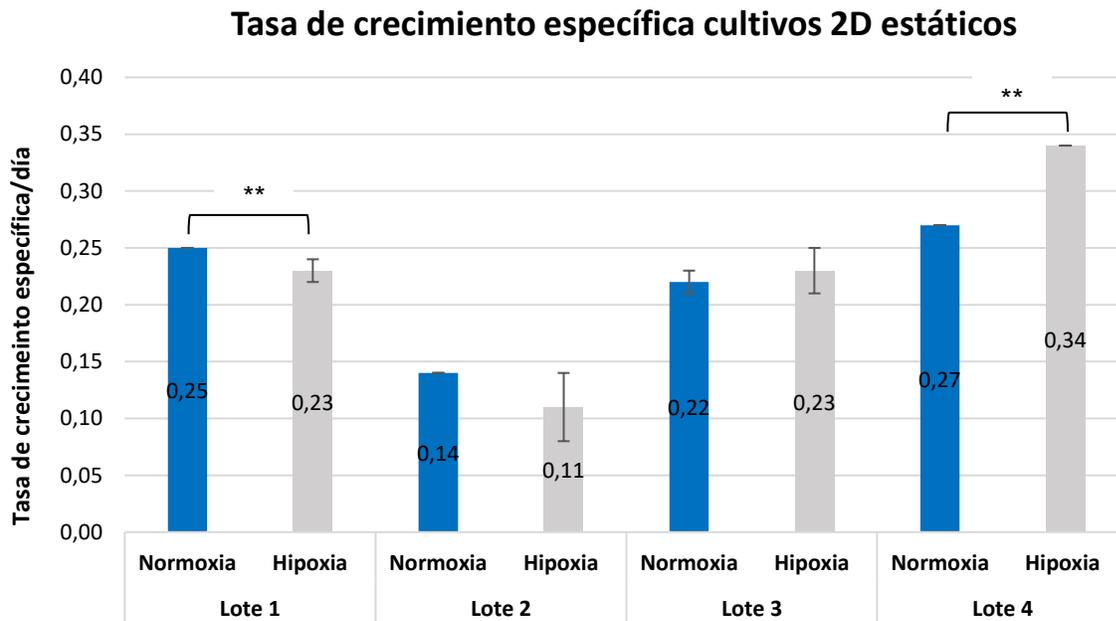


Figura 12. Tasa de crecimiento específica de las A-MSC en los cultivos 2D estáticos.

La tasa de crecimiento específica de los lotes 1 y 4 presenta diferencias estadísticamente significativas al comparar cultivo en normoxia con cultivo en hipoxia ($p=0.04953$ y $p=0.04953$ respectivamente). El lote 1 muestra una mayor tasa de crecimiento en normoxia y el lote 4 presenta una mayor tasa de crecimiento en hipoxia.

En la figura 13 se muestran los resultados del doblaje poblacional para los cultivos 2D estáticos. Se aprecia una mayor doblaje poblacional en normoxia para los lotes 1 y 2 ($p=0.04953$ y $p=0.03389$ respectivamente), mientras que el lote 4 se comporta de manera opuesta, mostrando un mayor doblaje poblacional en hipoxia ($p=0.04953$).

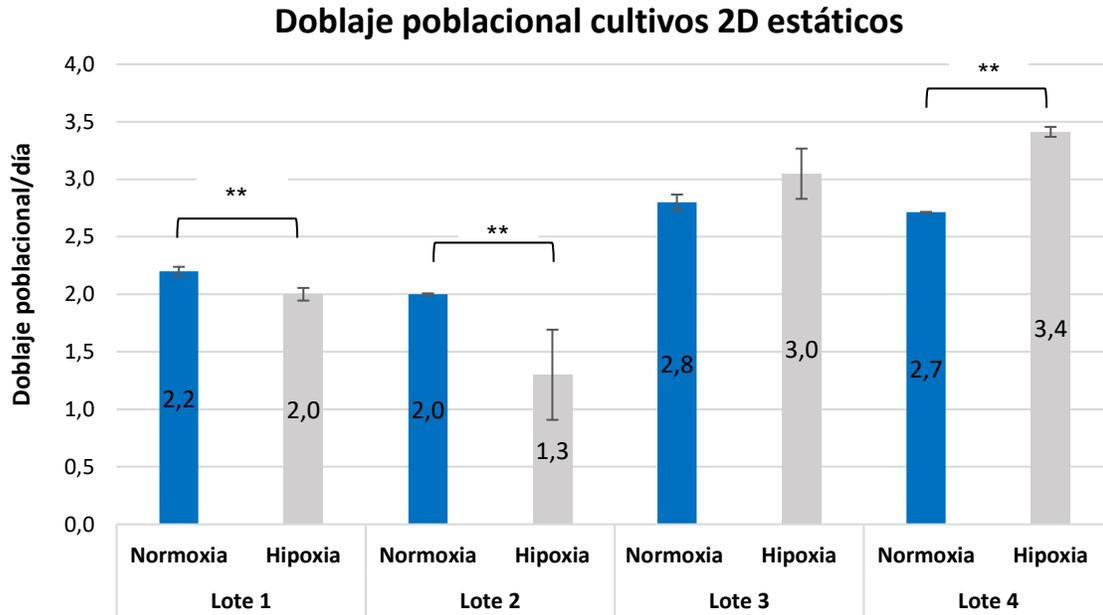


Figura 13. Doblaje poblacional de las A-MSC en los cultivos 2D estáticos

- **4.2.1.2 En cultivos 3D dinámicos**

Todos los cultivos 3D dinámicos comenzaron con 2 millones de A-MSC (Día 0) y el proceso de obtención de los MC comenzó el día 7 u 8 de cultivo, cuando se determinó la finalización de la etapa de crecimiento exponencial de cada lote.

Durante las últimas 48 horas de cultivo (correspondientes a los días 8-10) se eliminó la suplementación con HPL y se adicionó solo DMEM con 1% de Antibiótico-antimicótico (Gibco®) para obtener los MC. Al finalizar este periodo de tiempo, se recolectó el MC y se recuperaron las células para efectuar su conteo (empleando cámara de Neübauer por triplicado), inmunofenotipificación y ensayos de diferenciación.

La visualización directa de las A-MSC (empleando el microscopio invertido de fluorescencia para reconocer los núcleos previamente marcados con DAPI) permitió observar la laminación sobre los microtransportadores a medida que aumentaba el tiempo de cultivo, así como, la formación de agregados por transferencia celular de un microtransportador a otro desde el día 4 como se observa en la Figura 14.

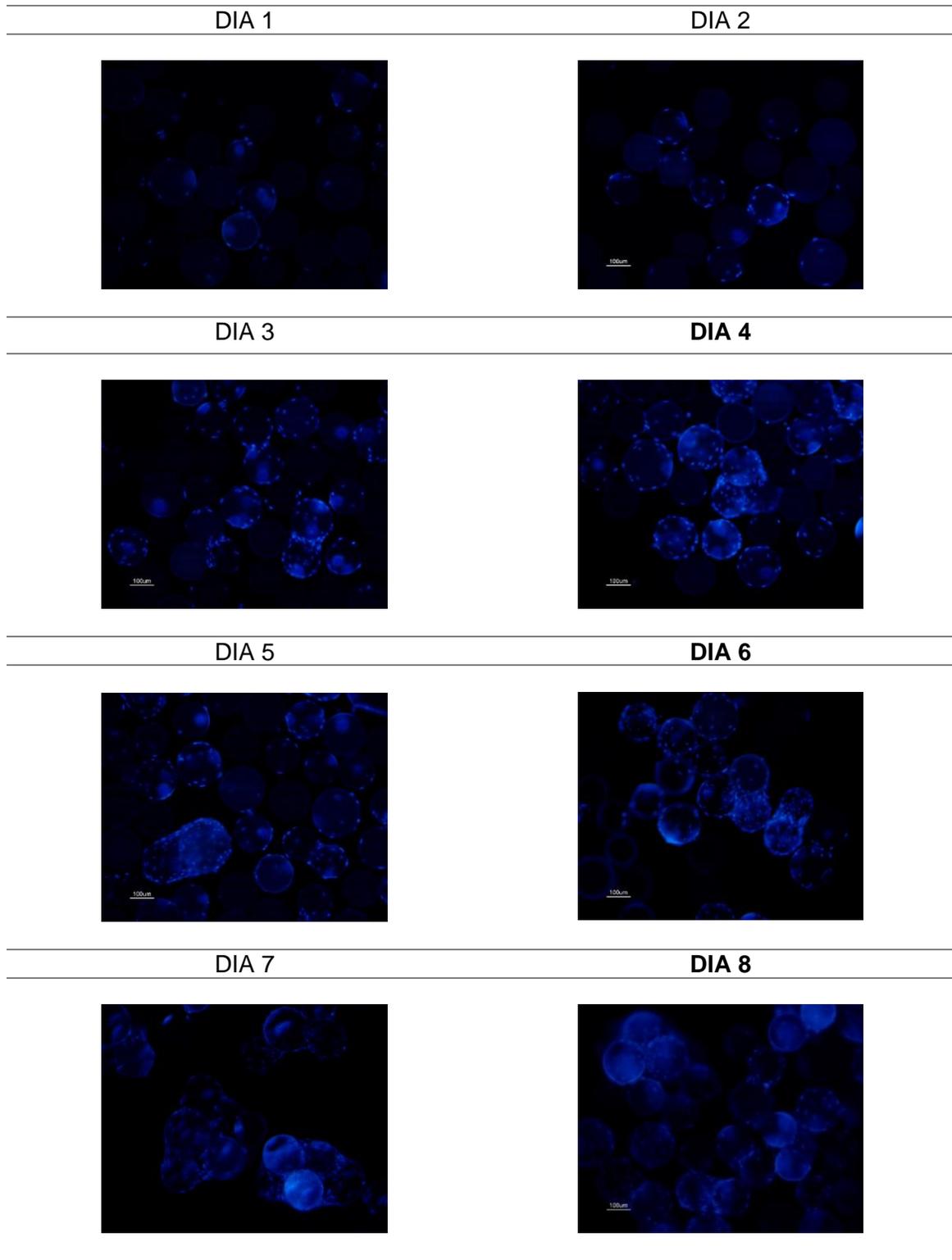
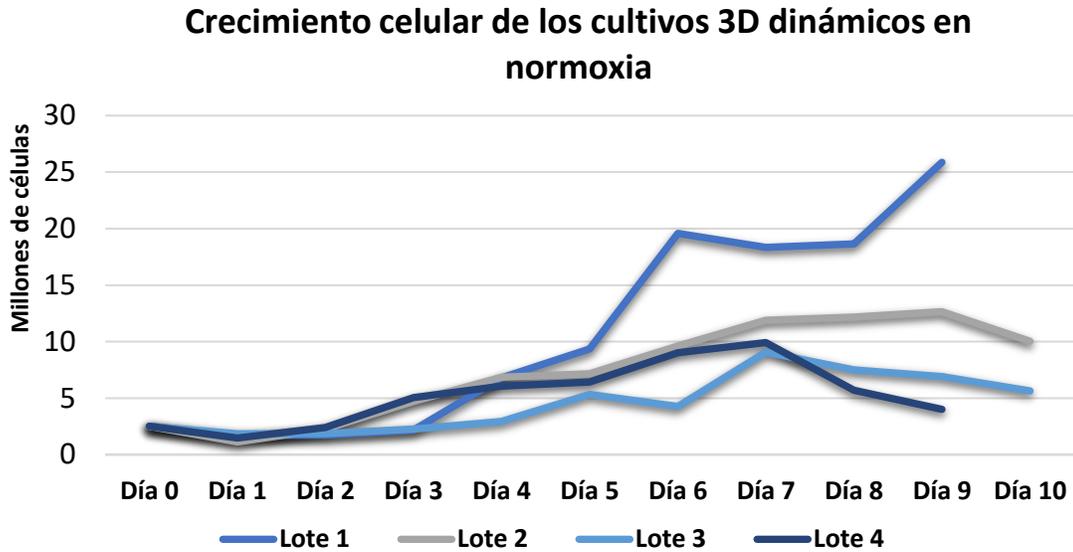
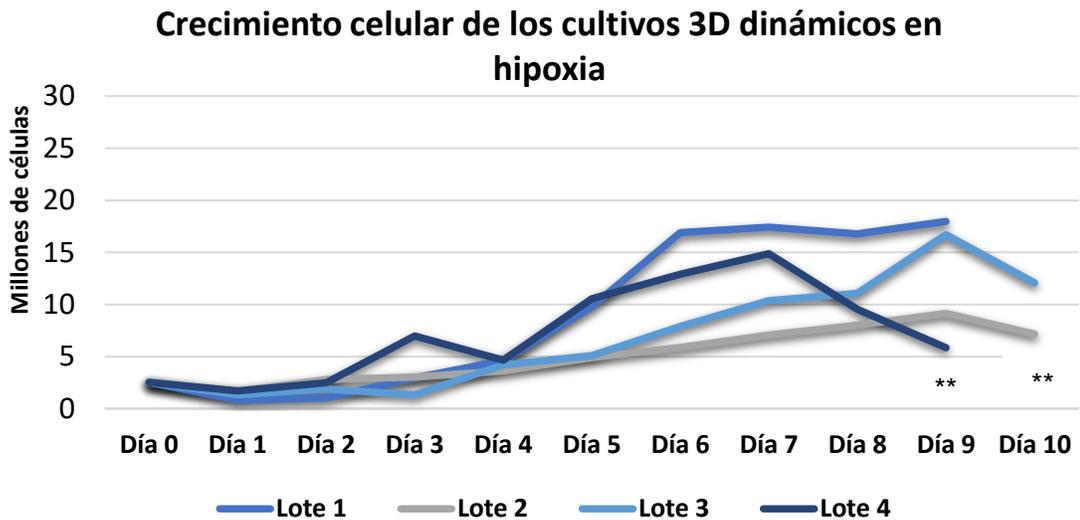


Figura 14. Crecimiento de las A-MSC del lote 1 sobre los microtransportadores en el cultivo 3D dinámico en normoxia

Se continuó con la evaluación del crecimiento celular de los cultivos 3D dinámicos de acuerdo con los niveles de O₂, cuyos resultados se muestran en las figuras 15 y 16.



Figuras 15. Crecimiento celular promedio de las A-MSC en los cultivos 3D dinámicos en normoxia.



Figuras 16. Crecimiento celular promedio de las A-MSC en los cultivos 3D dinámicos en hipoxia.

El lote 3 y el lote 4 muestran diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.04953$ para ambos lotes) a favor del crecimiento celular en hipoxia. Llama la atención el comportamiento del lote 1, dado que fue el único que experimentó un aumento del número de células el día 9 del cultivo, periodo en el cual las células se encontraban sin suplementación para la obtención del MC, mientras que, los lotes restantes presentaron una disminución notoria de la celularidad en el periodo de obtención de los MC (últimas 48 horas del cultivo).

También se calculó el promedio del crecimiento celular de los 4 lotes, tanto en normoxia como en hipoxia, y se construyó la gráfica de crecimiento celular promedio. Figura 17.

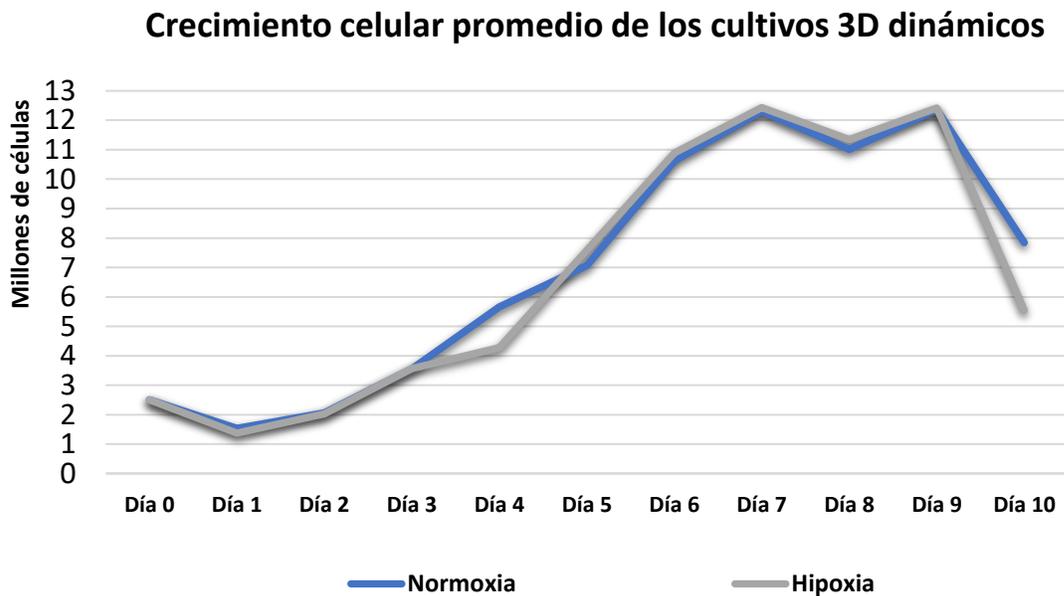


Figura 17. Crecimiento celular promedio de los cultivos 3D dinámicos.

Se observa que la fase de crecimiento exponencial se extiende desde el día 4 al 7 de cultivo. No se observan diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento celular promedio relacionadas con el nivel de oxigenación.

Luego se calcularon la tasa de crecimiento específico y el doblaje poblacional para los cultivos dinámicos, tanto en normoxia como en hipoxia, cuyos resultados se aprecian en las figuras 18 y 19.

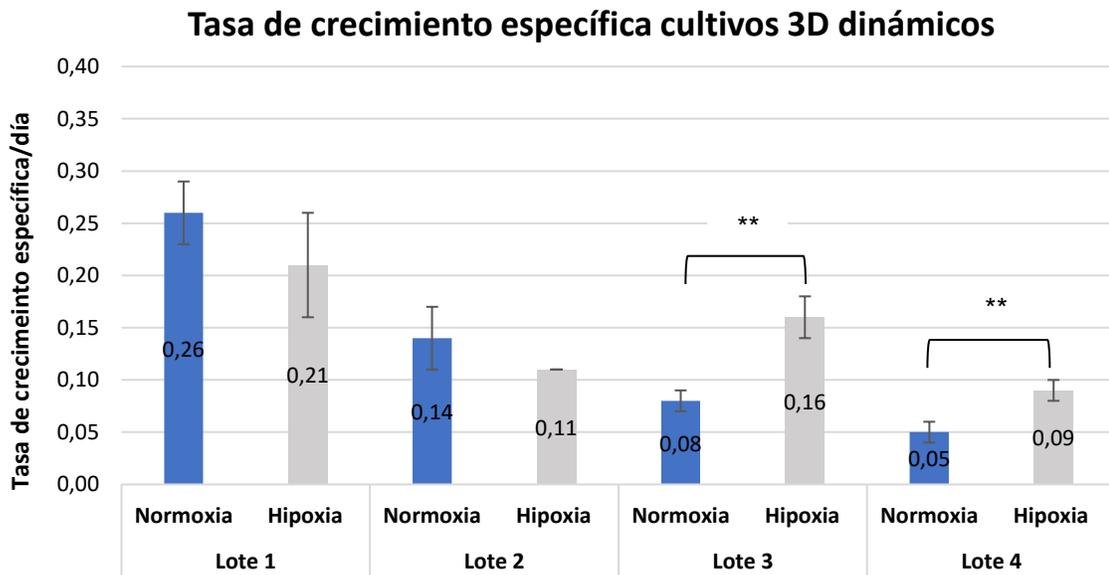


Figura 18. Tasa de crecimiento específico de las A-MSC en los cultivos 3D dinámicos.

Se aprecia una mayor tasa de crecimiento en condiciones de hipoxia para los lotes 3 y 4 ($p=0.04953$ en ambos lotes).

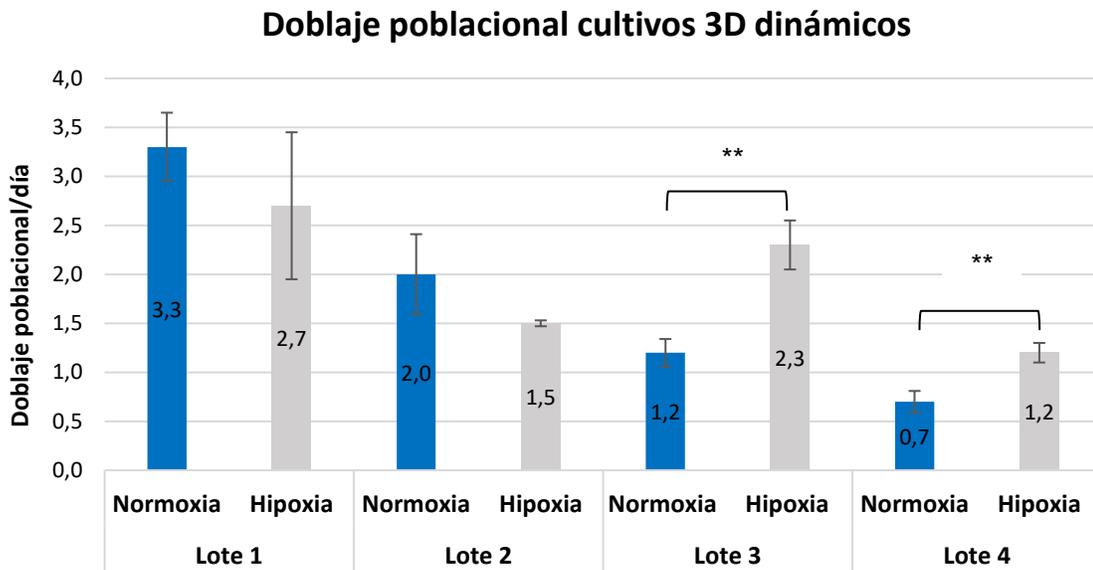
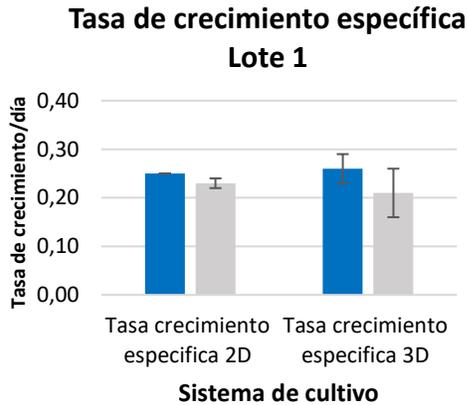


Figura 19. Doblaje poblacional de las A-MSC en los cultivos 3D dinámicos.

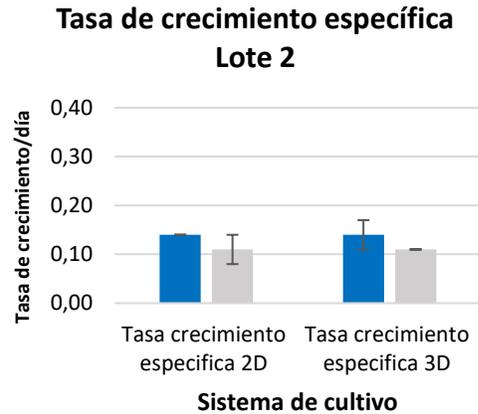
Se aprecia mayor doblaje poblacional en condiciones de hipoxia para los lotes 3 y 4. ($p=0.04953$ en ambos lotes)

Posteriormente, se compararon los resultados obtenidos al calcular la tasa de crecimiento específica y el doblaje poblacional para cada uno de los lotes en las diferentes condiciones de cultivo y oxigenación. Figuras 20 y 21.

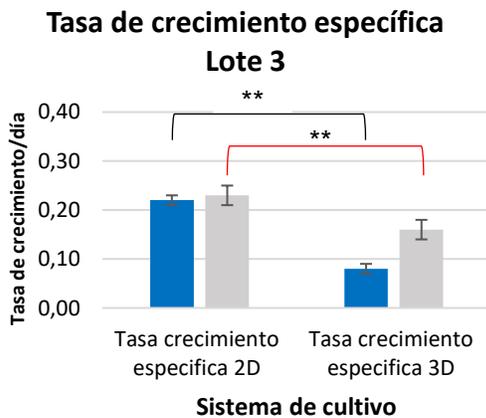
A.



B.



C.



D.

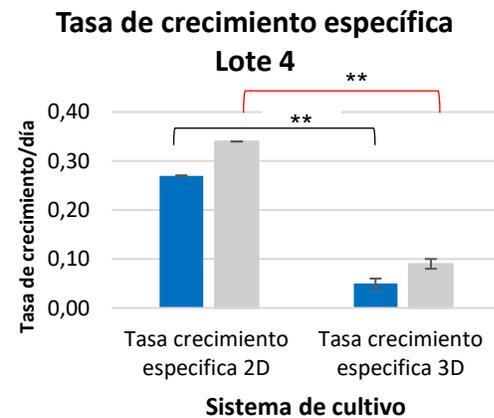
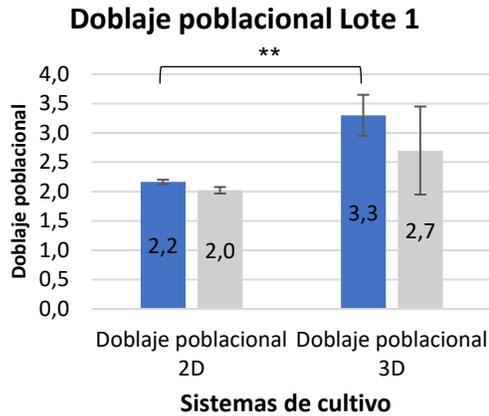


Figura 20. Comparación de la tasa de crecimiento específica según el sistema de cultivo y nivel de oxigenación por lote de A-MSC. Barras azules: normoxia. Barras grises: hipoxia.

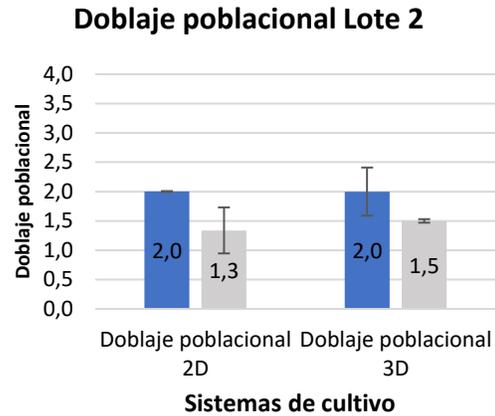
Al comparar los resultados de las tasas de crecimiento específica de los cultivos 2D estáticos con las tasas de los cultivos 3D dinámicos, se aprecia que los lotes 1 y 2 no presenta diferencias estadísticamente significativas en este parámetro, mientras que, los

lotes 3 y 4 tienen una mayor tasa de crecimiento específico en el sistema 2D estático ($p=0.04953$, tanto en normoxia como en hipoxia, para ambos lotes).

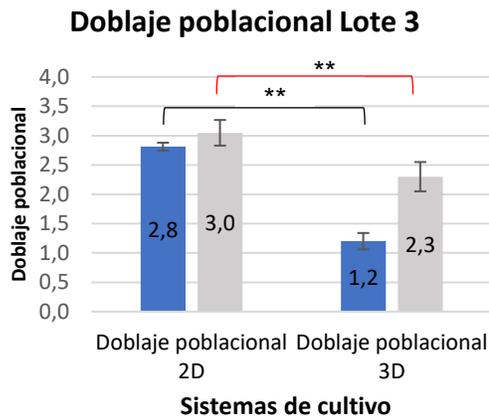
A.



B.



C.



D.

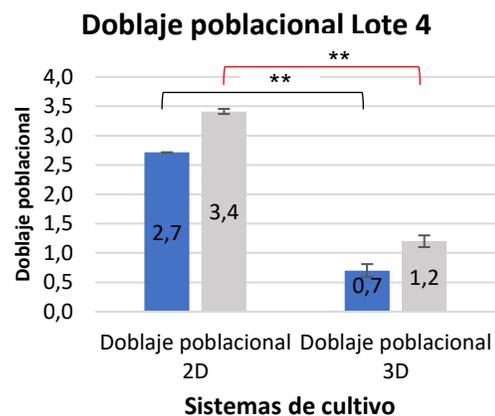


Figura 21. Comparación doblaje poblacional según el sistema de cultivo y nivel de oxigenación por lote de A-MSK. Barras azules: normoxia. Barras grises: hipoxia.

Al comparar los resultados del doblaje poblacional de los cultivos 2D estáticos con los resultados del doblaje poblacional en el sistema 3D dinámico, se aprecia que el lote 1 tiene mayor doblaje poblacional en los cultivos 3D en normoxia ($p=0,03389$), mientras que, los lotes 3 y 4 presentan un mayor doblaje poblacional en los cultivos 2D estáticos ($p=0.04953$, tanto en normoxia como en hipoxia, para ambos lotes).

4.2.2 Inmunofenotipificación de las A-MSC

La inmunofenotipificación de los cuatro lotes de A-MSC antes de efectuar los cultivos 2D estáticos y 3D dinámicos mostró que las células eran positivas en $\geq 98\%$ para CD73 y CD90. Se observó una disminución en la inmunoexpresión del CD90 en las A-MSC obtenidas al final de los cultivos 3D dinámicos del lote 1 y del CD73 en el mismo sistema de cultivo en hipoxia.

Se observó una disminución de la inmunoexpresión del CD105, la cual osciló desde 19% hasta el 88% en las A-MSC en fase 3 (antes de efectuar los cultivos 2D y 3D), y se aprecia una tendencia a la baja en las células recolectadas después de efectuar los cultivos 2D estáticos y 3D dinámicos.

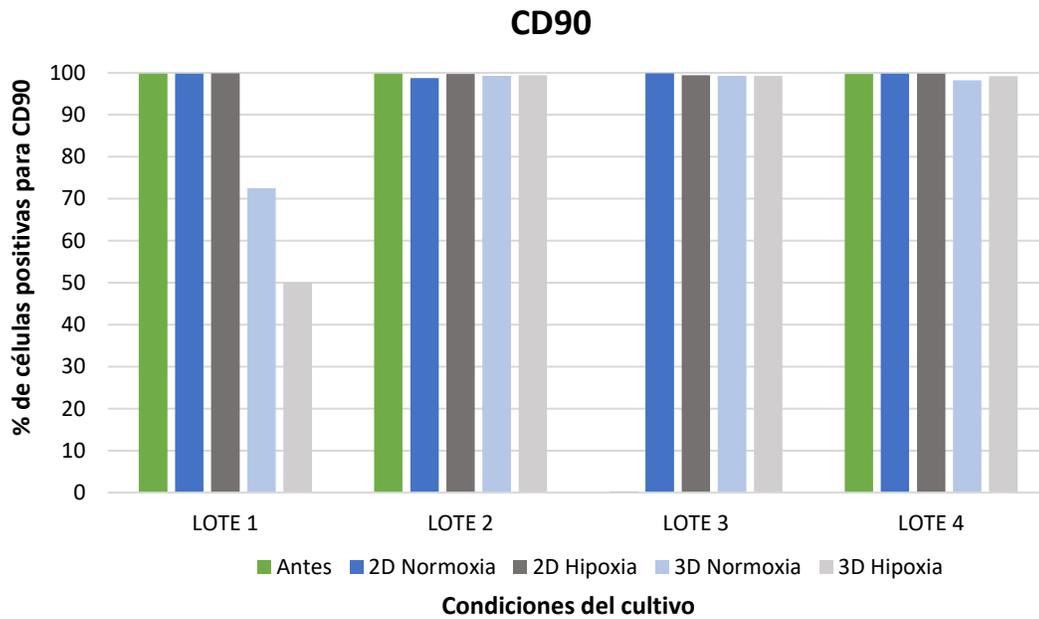
El CD14 se aprecia aumentado en las A-MSC del lote 1 al final de los cultivos 3D dinámicos en normoxia, sin embargo, no hay evidencia de expresión en las células expandidas antes de efectuar los cultivos ni tampoco en las A-MSC recolectadas al finalizar los ensayos. Tampoco se observa correlación en la marcación de este grupo con el CD 45 ni el CD80 los cuales son negativos.

El CD34 fue negativo en la caracterización inicial de los lotes de A-MSC, pero en las células de los lotes 1 al 3 recolectadas al final del cultivo 2D estático se observó un aumento, especialmente para el lote 2 en normoxia (26%).

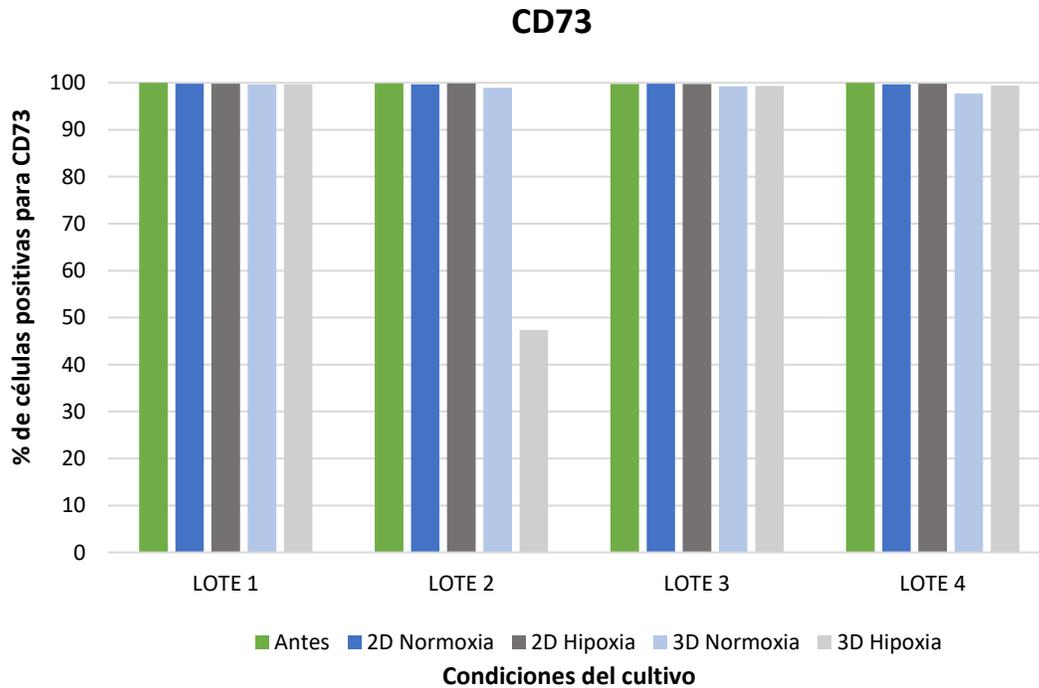
Las A-MSC fueron negativas para CD80, CD45 y HLA-DR, tanto en la etapa inicial como en la inmunofenotipificación efectuada al final de los cultivos, lo cual es acorde con el perfil esperado para este tipo de células.

En la figura 22 se muestra el porcentaje de A-MSC positivas para cada uno de los marcadores de superficie en todas las condiciones de cultivo desarrolladas en este trabajo de investigación.

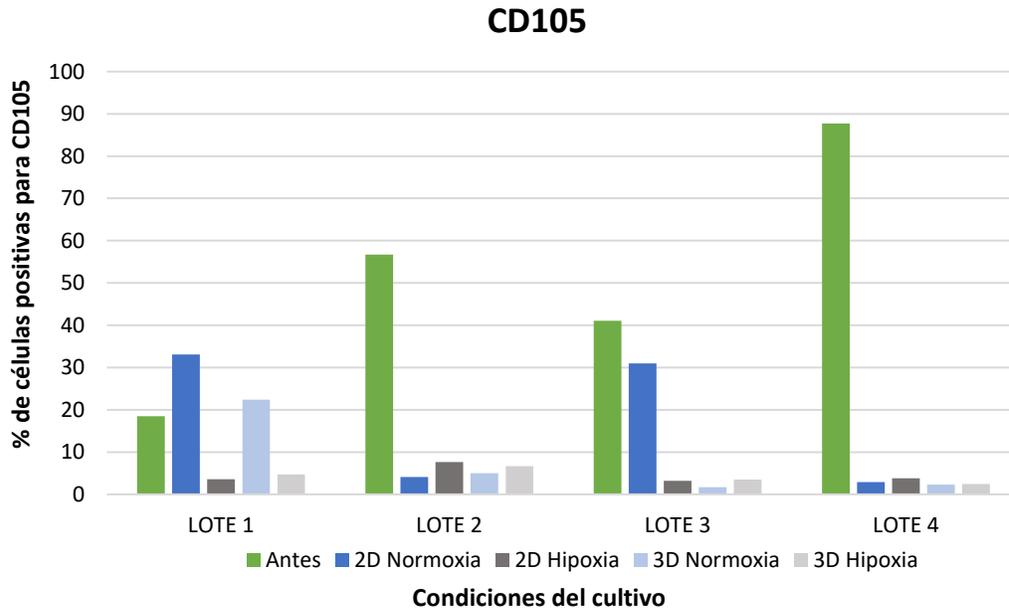
A



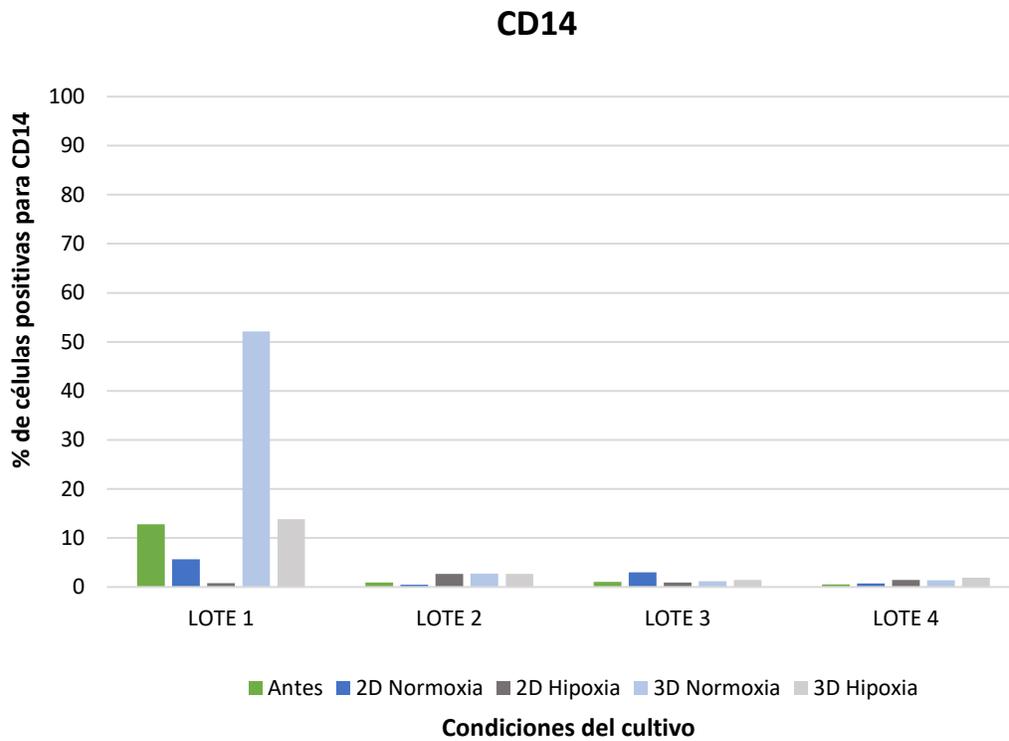
B



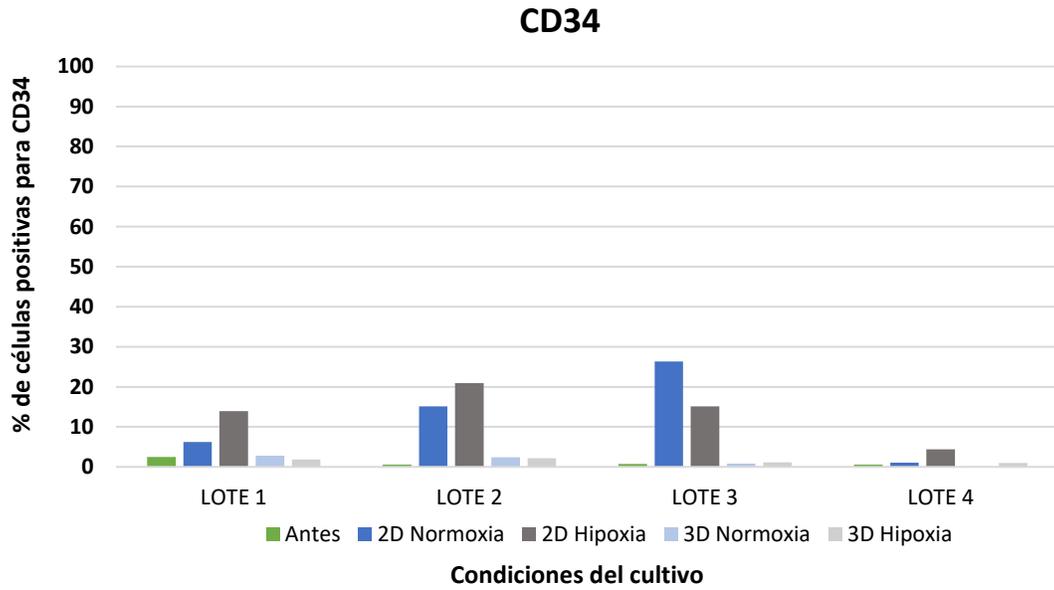
C



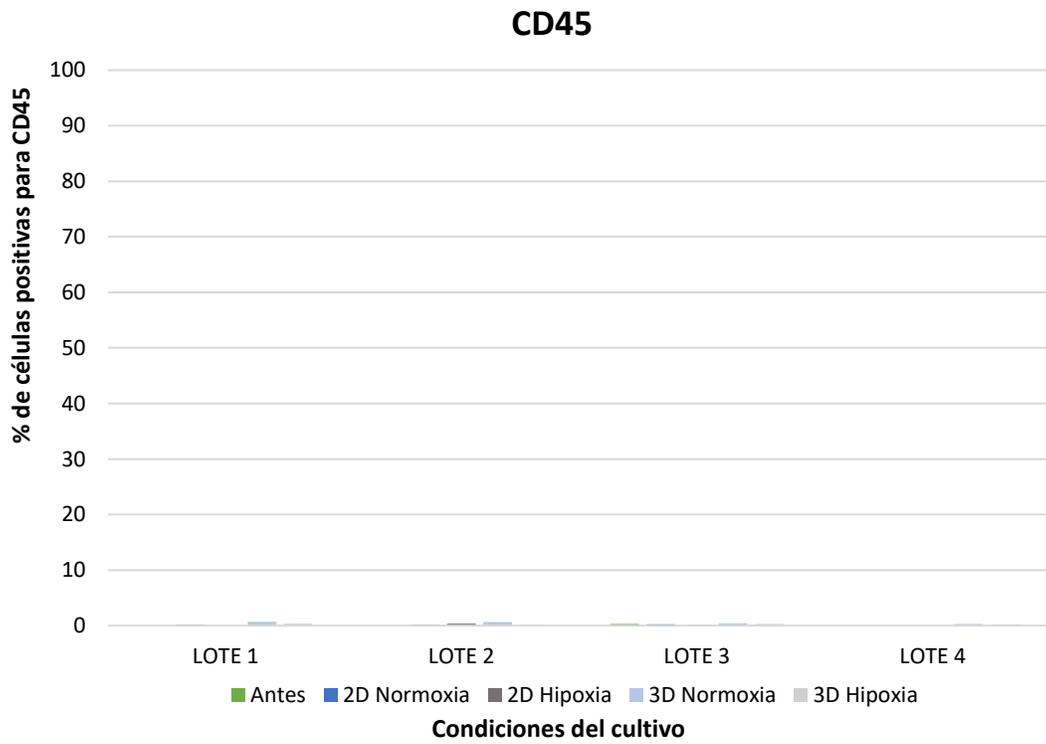
D



F



F



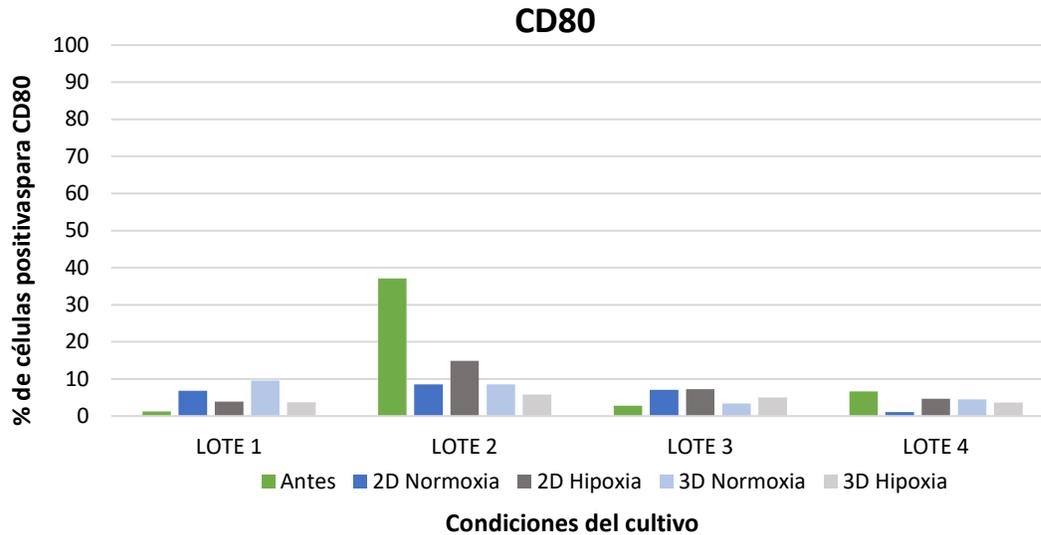
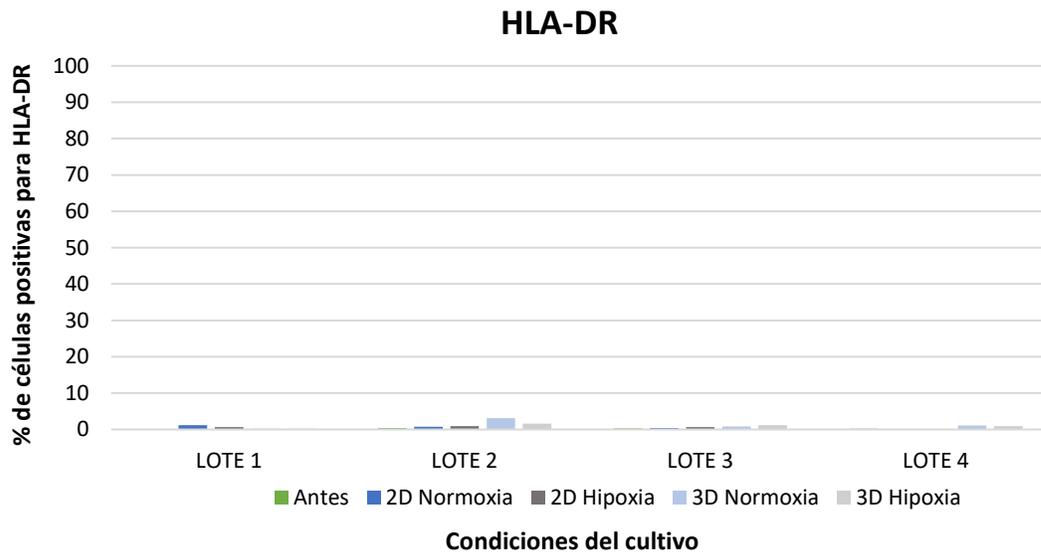
G**H**

Figura 22 . Porcentaje de A-MSC positivas para anticuerpos **A.** CD73, **B.** CD90, **C.** CD105. **D.** CD14, **F.** CD34, **E.** CD45, **G.**CD80, **H.** HLA-DR evaluadas mediante citometría de flujo.

La denominación “antes” hace referencia a los resultados de la inmunofenotipificación de las A-MSC en fase 3 antes de efectuar los cultivos 2D estáticos y 3D dinámicos incluidos en este trabajo de investigación.

4.2.3 Evaluación del potencial de diferenciación de las A-MSC

Los cuatro lotes de A-MSC empleados en este estudio poseen capacidad de diferenciación *in vitro* a los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico como se observó en la figura 10. Esta capacidad se mantiene después de efectuar los cultivos 2D estáticos y 3D dinámicos en las diferentes condiciones de oxigenación. Figuras 23 a 26.

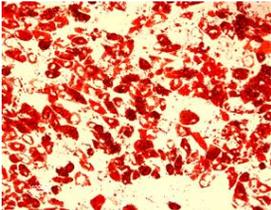
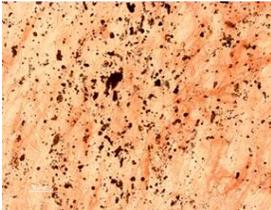
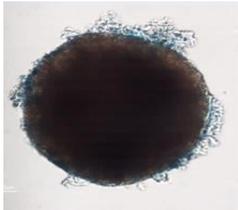
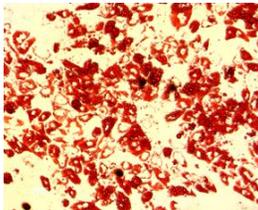
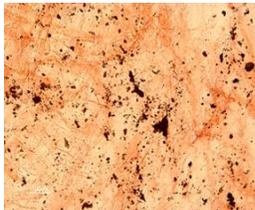
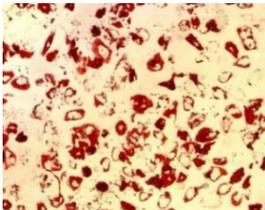
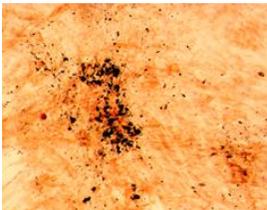
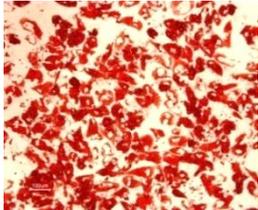
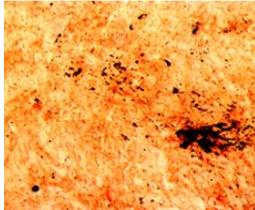
Lote 1	ADIPOGÉNICA	OSTEOGÉNICA	CONDROGÉNICA
Cultivo 2D estático en normoxia	 10X	 10X	 20X
Cultivo 2D estático en hipoxia	 10X	 10X	 20X
Cultivo 3D dinámico normoxia	 10X	 10X	 20X
Cultivo 3D dinámico hipoxia	 10X	 10X	 20X

Figura 23. Diferenciaciones adipogénica, osteogénica y condrogénico del lote 1

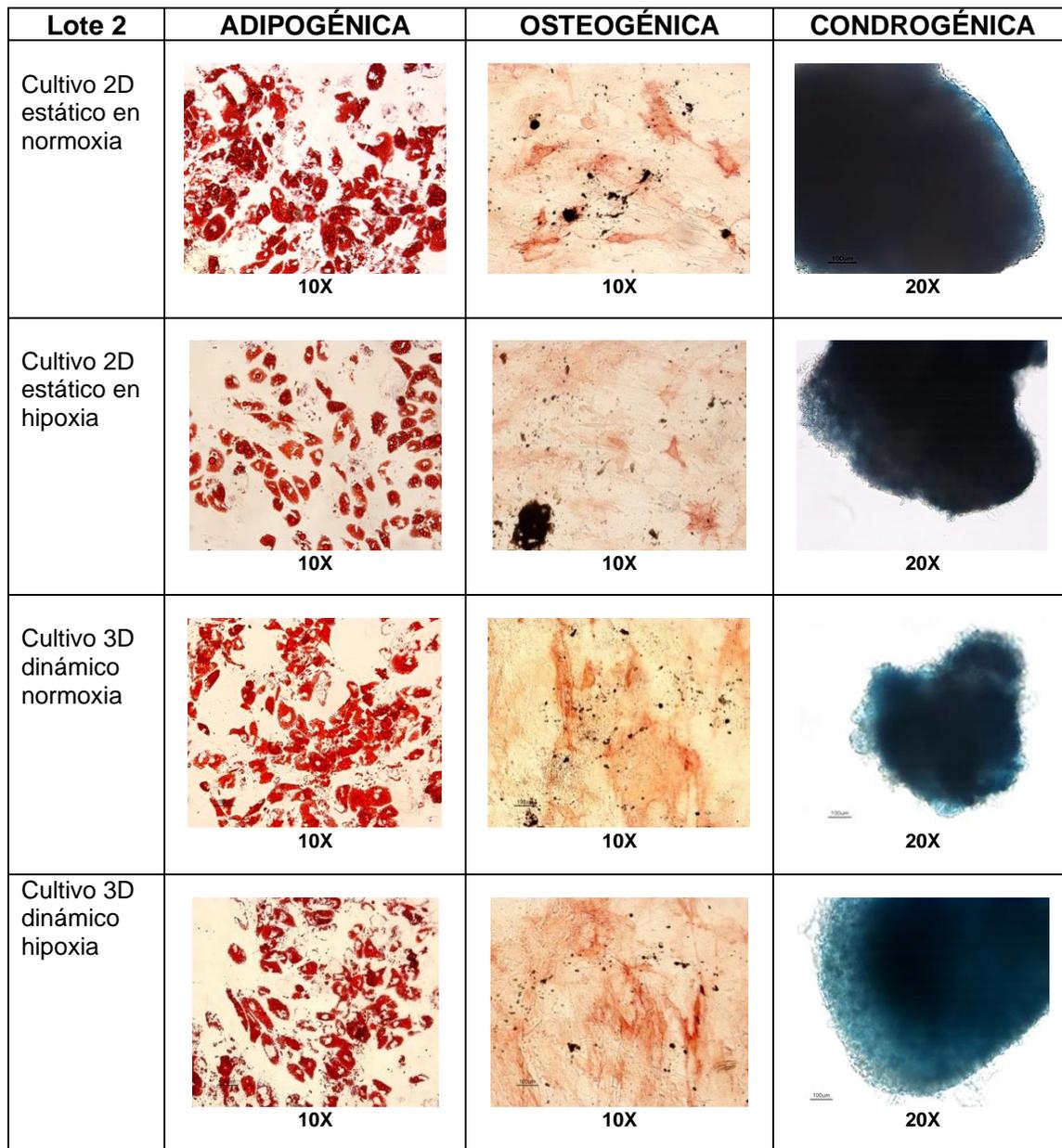


Figura 24. Diferenciaciones adipogénica, osteogénica y condrogénica del lote 2

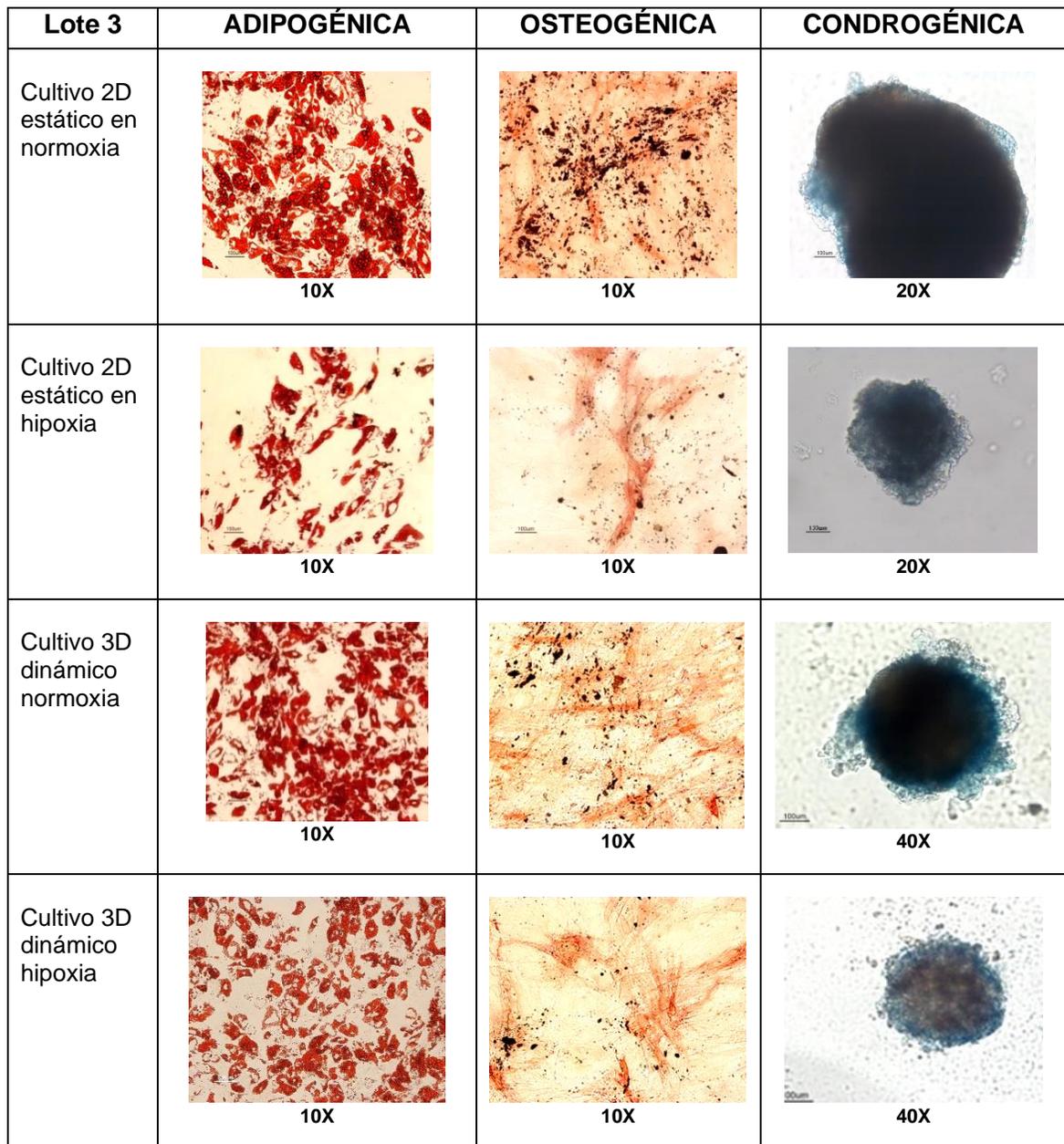


Figura 25. Diferenciaciones adipogénica, osteogénica y condrogénica del lote 3

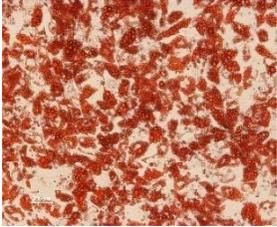
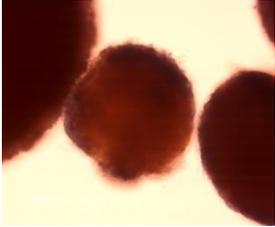
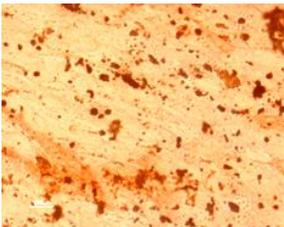
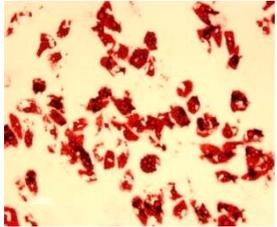
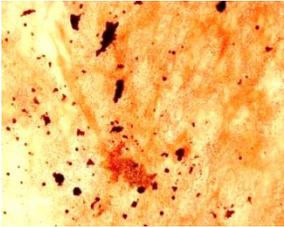
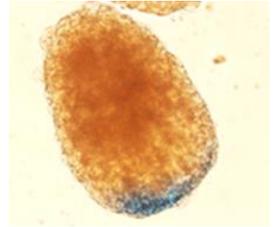
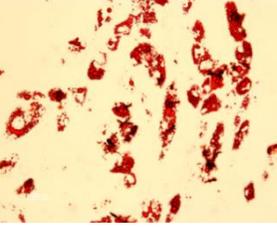
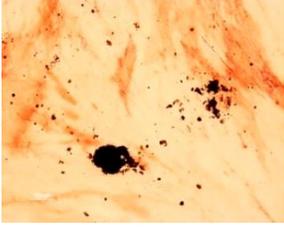
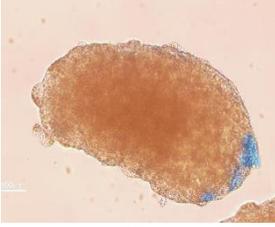
Lote 4	ADIPOGÉNICA	OSTEOGÉNICA	CONDROGÉNICA *
Cultivo 2D estático en normoxia	 <p style="text-align: center;">10X</p>	 <p style="text-align: center;">10X</p>	 <p style="text-align: center;">20X</p>
Cultivo 2D estático en hipoxia	 <p style="text-align: center;">10X</p>	 <p style="text-align: center;">10X</p>	 <p style="text-align: center;">20X</p>
Cultivo 3D dinámico normoxia	 <p style="text-align: center;">10X</p>	 <p style="text-align: center;">10X</p>	 <p style="text-align: center;">20X</p>
Cultivo 3D dinámico hipoxia	 <p style="text-align: center;">10X</p>	 <p style="text-align: center;">10X</p>	 <p style="text-align: center;">20X</p>

Figura 26. Diferenciaciones adipogénica, osteogénica y condrogénica del lote 4

4.3 Caracterización de la composición de los MC de las A-MSc

4.3.1 Concentración proteica de los MC

La gráfica 26 muestra los resultados de la medición de la concentración de proteínas de los MC empleando el kit Coomassie Plus Bradford (Thermo Scientific®) efectuadas por triplicado. Posteriormente, se realizaron las diluciones necesarias para que las alícuotas de los MC que fueron empleados en los ensayos *in vitro* quedaran a una concentración de 22 µg/mL con el fin de igualar las condiciones experimentales.

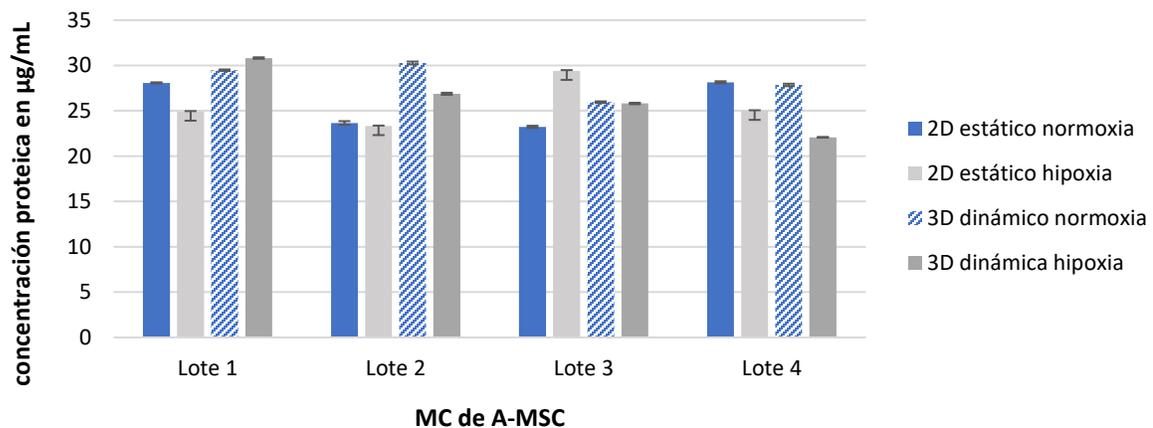


Figura 27. Concentración de proteínas de los MC de las A-MSc obtenidos en los cultivos 2D estáticos y 3D dinámicos, tanto en normoxia como en hipoxia.

4.3.2 Composición proteica de los MC

Se efectuó la evaluación cuantitativa de las citocinas presentes en los MC de dos de los cuatro lotes empleados en este estudio. Se seleccionó el Lote 1 porque presentaba el conteo celular, la tasa de crecimiento específico y el doblaje poblacional más elevados en los cultivos 2D estáticos en normoxia y el lote 3, porque no tenía diferencias estadísticamente significativas al comparar el conteo celular, la tasa de crecimiento específica y el doblaje poblacional en los cultivos 2D estáticos.

En el anexo D se muestran los resultados entregados por RayBiotech de la evaluación de las citocinas en los MC de las A-MSC de los lotes 1 y 3 empleando el kit Quantibody® Human Cytokine Antibody Array. En el anexo E, se muestra el listado de las proteínas no detectadas mediante esta prueba en los MC de los mismos lotes celulares.

Se detectaron 503 y 526 proteínas en los MC de los lotes 1 y 3 respectivamente. Se consideraron para el análisis de la composición de los MC, las proteínas que incrementaron sus concentraciones en dos o más veces con respecto al MC de referencia (MC obtenido en cultivo 2D estático en normoxia) o que fueron detectadas *de novo*.

En el lote 1 se detectaron 39 citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en el MC de las A-MSC cultivadas en 2D estático en hipoxia, 83 en los MC obtenidos en el sistema 3D dinámico en normoxia y 104 en los MC obtenidos en el sistema 3D en hipoxia. Anexo F.

En el lote 3 se detectaron 180 citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en el MC de las A-MSC cultivadas en 2D estático hipoxia, 135 en los MC obtenidos en el sistema 3D dinámico en normoxia y 111 en los MC obtenidos en el sistema 3D en hipoxia. Anexo G.

Posteriormente se agruparon las proteínas comunes para las variables hipoxia y cultivo 3D dinámico para ambos lotes. El lote 1 presentaba un escaso número de citocinas comunes (solo 13 para la variable hipoxia y 44 para la condición cultivo 3D dinámico) por lo que se seleccionó únicamente el lote 3 para efectuar los análisis funcionales. En las tablas 6 y 7 se enuncian las proteínas comunes para las dos variables elegidas del lote 3.

Después de cada una de las tablas se anexan las figuras correspondientes a la red de asociación funcional elaboradas en STRING. Para elaborar estas redes se aplicaron los parámetros: full STRING network, meaning of network edges en evidence, all active interactions sources, minimum required interaction score low (0,175).

Tabla 6. Citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en los MC de los cultivos en hipoxia del lote 3.

Citocinas incrementadas en los MC de los cultivos en hipoxia del lote 3				
INCREMENTO	#	PROTEÍNA	2D ESTÁTICO	3D DINÁMICO
2 a 10 veces	1	ALCAM	2,42	2,77
	2	I-TAC (CXCL11)	2,38	4,38
	3	Siglec-10	3,47	3,28
	4	Notch-3	3,50	3,98
	5	CILP-1 (CILP)	3,53	4,86
	6	IL-7 R alpha (IL7R)	3,92	2,46
	7	B7-H3 (CD276)	4,41	3,30
	8	GITR (TNFRSF18)	4,46	2,14
	9	Pepsinogen II (PGC)	4,55	7,61
	10	Semaphorin 6D (SEMA6D)	4,98	2,00
	11	IL-29 (IFNL1)	6,15	3,62
	12	MMP-3 (MMP3)	7,48	4,15
	13	CCL28	8,62	7,09
11 a 100 veces	14	Endoglin (ENG)	3,19	20,47
	15	GITRL (TNFSF18)	4,30	16,50
	16	CEACAM-1	4,42	10,53
	17	Fractalkine (CX3CL1)	10,95	68,77
	18	GPVI (GP6)	13,00	23,00
	19	IL-6	14,79	3,12
	20	IL-1b	14,89	3,22
	21	TFPI-2	15,67	9,95
	22	Ferritin (FTH1)	19,36	3,63
	23	MMP-10	22,50	19,00
	24	MIP-3 ^a (CCL20)	23,20	2,14
	25	(CXCL1)	26,23	9,06
	26	NSE (ENO2)	37,86	2,91
	27	IL-8 (CXCL8)	48,60	49,50
101 a 1000 veces	28	IL-2 Rb	14,00	144,33
	29	FCRL1	22,22	130,52

Citocinas detectadas <i>de novo</i> en los MC de los cultivos en hipoxia del lote 3			
#	PROTEÍNA	2D ESTÁTICO Concentración en pg/mL	3D DINÁMICO Concentración en pg/mL
1	BLAME (SLAMF8)	2,70	6,60
2	PDGF-AB (PDGF-B)	5,40	6,80
3	CD163	6,80	3,00
4	Plexin B3 (PLXNB3)	7,90	4,50
5	JAM-A (JAM3)	9,70	4,50
6	ICAM-3	6,30	10,60
7	CXADR	10,90	13,20
8	CEACAM-5	11,90	13,90
9	Hepsin (HPN)	11,90	12,10
10	CD300c	12,70	24,80
11	ErbB4	14,80	8,50
12	JAM-C	15,70	25,50
13	FCRL2	19,40	5,30
14	CD34	20,90	27,20
15	ADAM9	22,30	10,90
16	Galectin-8 (LGALS8)	31,90	9,80
17	FGF-12	38,90	32,50
18	Glypican 5 (GPC5)	40,70	24,70
19	LAIR1	43,20	36,00
20	PYY	51,60	70,90
21	MDGA1	63,80	25,40
22	Epiregulin (EREG)	76,30	79,30
23	DSPG3 (EPYC)	12,40	421,70
24	CRTAC1	32,30	155,00
25	CHST4	36,30	124,60
26	GCP-2 (CXCL-6)	116,90	7,90
27	Angiostatin (PLG)	245,20	58,20
28	CD6	287,40	941,80
29	Angiotensinogen (AGT)	402,60	776,30
30	Jagged 2 (JAG2)	407,70	45,30

31	OSM R beta (OSMR)	592,00	413,60
32	ENA-78 (CXCL5)	975,70	64,80
33	6Ckine (CCL21)	891,10	722,60
34	PAPP-A (PAPPA)	109,60	1423,50

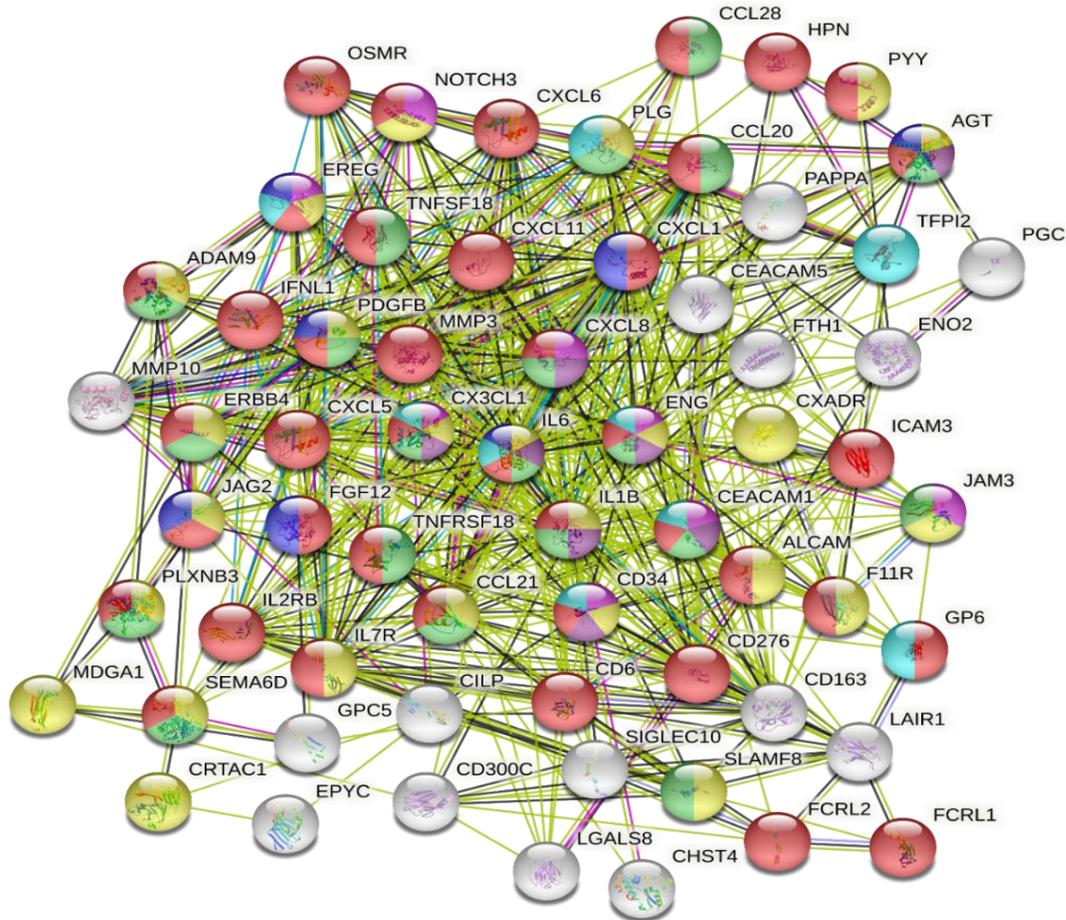


Figura 28. Red de asociaciones funcionales de las citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en los MC de los cultivos en hipoxia del lote 3.

Se identificaron 29 citocinas incrementadas y 34 detectadas *de novo* en los MC de los cultivos en hipoxia del lote 3. Según el análisis de anotación funcional de la base de datos STRING 41 citocinas (rojo) se encuentran asociadas al proceso de transducción de señales (GO:0007165), 25 citocinas (amarillo) están asociadas a la diferenciación celular (GO:0030154), 20 citocinas (verde) están asociadas a la regulación de la migración celular (GO:0030334), **11 citocinas (magenta) están asociadas al proceso de angiogénesis (GO:0001525 y GO:0045765), de las cuales 5 han demostrado regular positivamente el proceso de angiogénesis (IL1B, ENG, CD34, CX3CL1, y CXCL8)**. Asimismo, **11 citocinas (azul claro) se han visto asociadas con el proceso de reparación de heridas (JAM3, GP6, PLG, CEACAM1, IL6, CD34, CX3CL1, PDGFB, TFPI2, EREG, y ENG)**, en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas, y expresión génica, 9 de las cuales hacen parte de la serie de eventos que restauran la integridad de un tejido dañado. Por último, 7 citocinas (azul) tienen actividad de factor de crecimiento (GO:0008083).

Tabla 7. Citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en los MC de los cultivos 3D dinámicos del lote 3.

Citocinas incrementadas en los MC de los cultivos 3D dinámicos del lote 3				
INCREMENTO	#	PROTEÍNA	NORMOXIA	HIPOXIA
2 a 10 veces	1	Leptin (LEP)	2,00	2,00
	2	IL-7 R alpha (IL7R)	4,02	2,46
	3	CD40L (CD40LG)	3,22	2,67
	4	Common beta Chain (CSF2RB)	3,96	2,68
	5	CD84	2,13	2,74
	6	ALCAM	2,96	2,77
	7	DPPIV (DDP4)	3,15	3,12
	8	Siglec-10	4,12	3,28
	9	B7-H3 (CD276)	3,10	3,30
	10	IL-29	3,91	3,62
	11	Ferritin (FTH1)	8,23	3,63
	12	Notch-3	4,77	3,98
	13	MMP-3	4,49	4,15
	14	I-TAC (CXCL11)	4,34	4,38
	15	IFN-gamma R1 (INFGR1)	2,00	4,67
	16	CILP-1 (CILP)	7,51	4,86
	17	CCL28	9,09	7,09
	18	Pepsinogen II (PGC)	6,00	7,61
	19	GROa (CXCL1)	7,40	9,06
	20	TFPI-2	3,98	9,95
11 a 100 veces	21	Semaphorin 6D (SEMA6D)	37,43	2,00
	22	MIP-3a (CCL20)	16,43	2,14
	23	NSE (ENO2)	10,20	2,91
	24	CEACAM-1	9,53	10,53
	25	GITR L (TNFRSF18)	12,30	16,50
	26	MMP-10	31,00	19,00
	27	Endoglin (ENG)	11,09	20,47
	28	GPVI (GP6)	49,00	23,00

	29	IL-8	17,70	49,50
	30	Fractalkine (CX3CL1)	6,14	68,77
101 a 1000 veces	31	Galectin-7 (LGALS7B)	109,10	17,92
	32	Uromodulin (UMOD)	272,00	24,00
	33	FCRL1	123,87	130,52
	34	IL-2 Rb	106,00	144,33

Citocinas detectadas *de novo* en los MC de los cultivos 3D dinámicos del lote 3

#	PROTEÍNA	NORMOXIA Concentración en pg/mL	HIPOXIA Concentración en pg/mL
1	JAM-A (F11R)	4,00	4,50
2	CNTF R alpha (CNTFR)	3,20	5,70
3	SLAM (SLAMF1)	5,60	5,90
4	BLAME (SLAMF8)	2,90	6,60
5	PDGF-AB	8,00	6,80
6	GCP-2 (CXCL6)	5,60	7,90
7	FCRL2	16,10	5,30
8	ErbB4	10,60	8,50
9	Galectin-8 (LGALS8)	13,60	9,80
10	GHR	7,40	10,10
11	Hepsin (HPN)	2,40	12,10
12	CXADR	20,40	13,20
13	CEACAM-5	12,30	13,90
14	Glypican 5 (GPC5)	26,70	24,70
15	CD300c	48,20	24,80
16	Desmoglein-3 (DSG3)	29,70	25,50
17	JAM-C (JAM3)	13,90	25,50
18	CD34	30,20	27,20
19	MICA	45,40	28,50
20	FGF-12	41,20	32,50
21	LAIR1	32,50	36,00

22	Axl (AXL)	17,40	38,50
23	ENA-78 (CXCL5)	37,30	64,80
24	OX40 Ligand (TNFRSF4)	37,10	85,50
25	Jagged 2 (JAG2)	138,00	45,30
26	Jagged 1 (JAG1)	582,90	51,00
27	Siglec-11	656,60	56,70
28	Angiostatin (PLG)	384,20	58,20
29	Cytokeratin-8 (KRT8)	115,10	74,80
30	Epiregulin (EREG)	163,20	79,30
31	Cystatin E M (CST6)	118,80	96,00
32	CHST4	358,80	124,60
33	Ephrin-B3 (EFNB3)	8,10	138,90
34	CRTAC1	126,10	155,00
35	ProGRP (GRP)	587,10	253,10
36	OSM R beta (OSMR)	381,40	413,60
37	DSPG3 (EPYC)	354,40	421,70
38	AMIGO (AMIGO1)	301,60	501,90
39	6Ckine (CCL21)	697,20	722,60
40	IL-9	998,30	603,00
41	Endoglycan (PODLX2)	752,70	667,60
42	CD6	601,10	941,80
43	Ephrin-A4 (EFNA4)	1783,40	1085,50
44	PAPP-A (PAPPA)	1552,80	1423,50

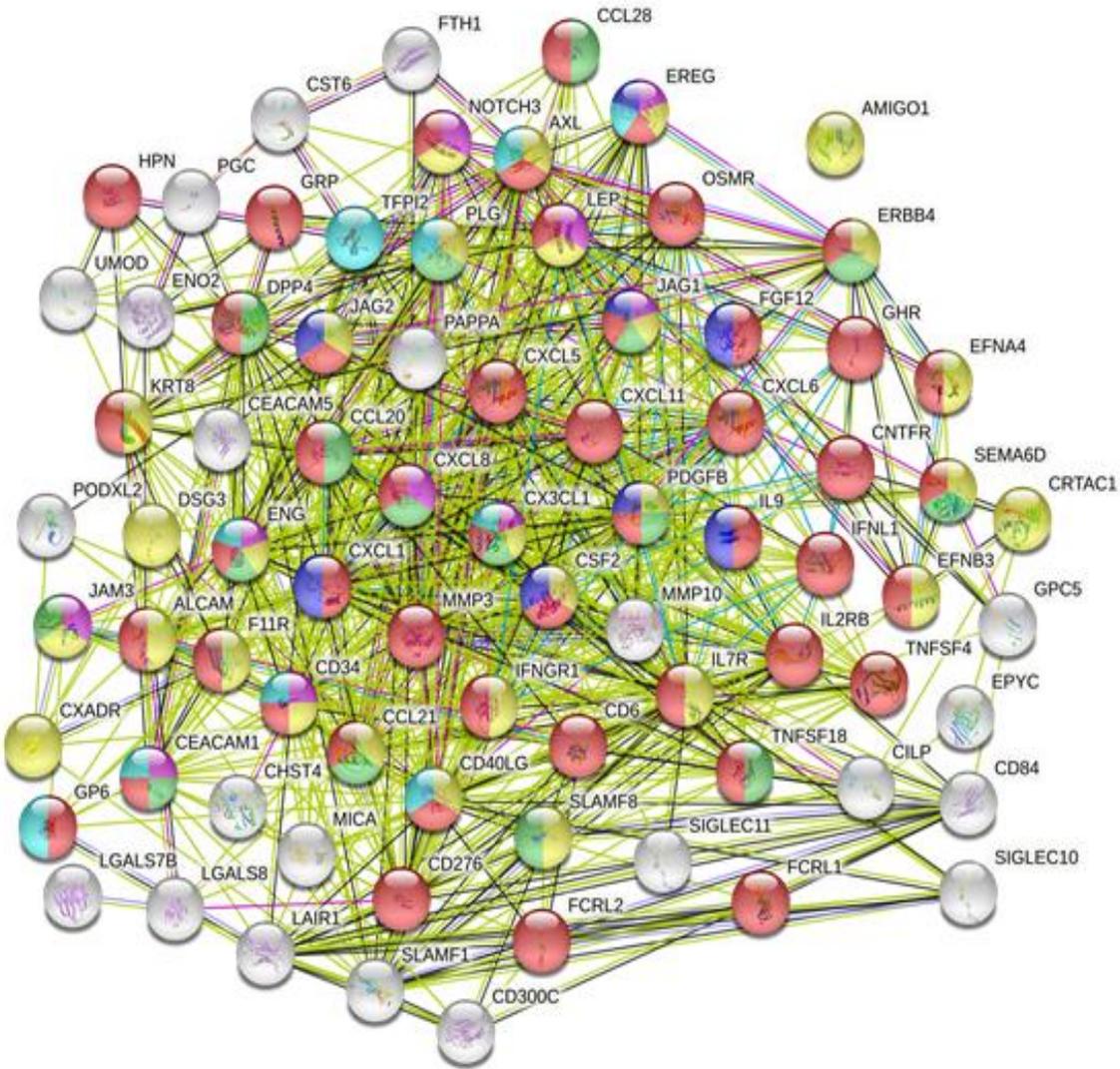


Figura 29. Red de asociaciones de las citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en los MC de los cultivos 3D dinámicos del lote 3.

Se identificaron 34 citocinas incrementadas y 44 detectadas *de novo* en los MC de los cultivos 3D dinámicos del lote 3. Según el análisis de anotación funcional de la base de datos STRING, 48 citocinas (rojo) se encuentran asociadas al proceso de transducción de señales (GO:0007165), 29 citocinas (amarillo) están asociadas a la diferenciación celular (GO:0030154), 16 citocinas (verde) están asociadas a la regulación de la migración celular (GO:0030334), **10 citocinas (magenta) están asociadas al proceso de angiogénesis (GO:0001525)**, **10 citocinas (azul claro) están asociadas al proceso de reparación de heridas (GO:0042060)** y 8 citocinas (azul) tienen actividad de factor de crecimiento (GO:0008083).

4.4 Caracterización funcional de los MC de las A-MSK

4.4.1 Modelos de angiogénesis *in vitro*

• 4.4.1.1 Ensayo de migración celular

En las figuras 30 a 34 se muestran imágenes representativas de las heridas efectuadas a las 0 horas y de su evolución a las 12 horas (controles y cada uno de los lotes de MC de las A-MSK). Este ensayo se efectuó por triplicado y las imágenes fueron analizadas empleando el software WinScratch de WIMASIS Image Analysis.

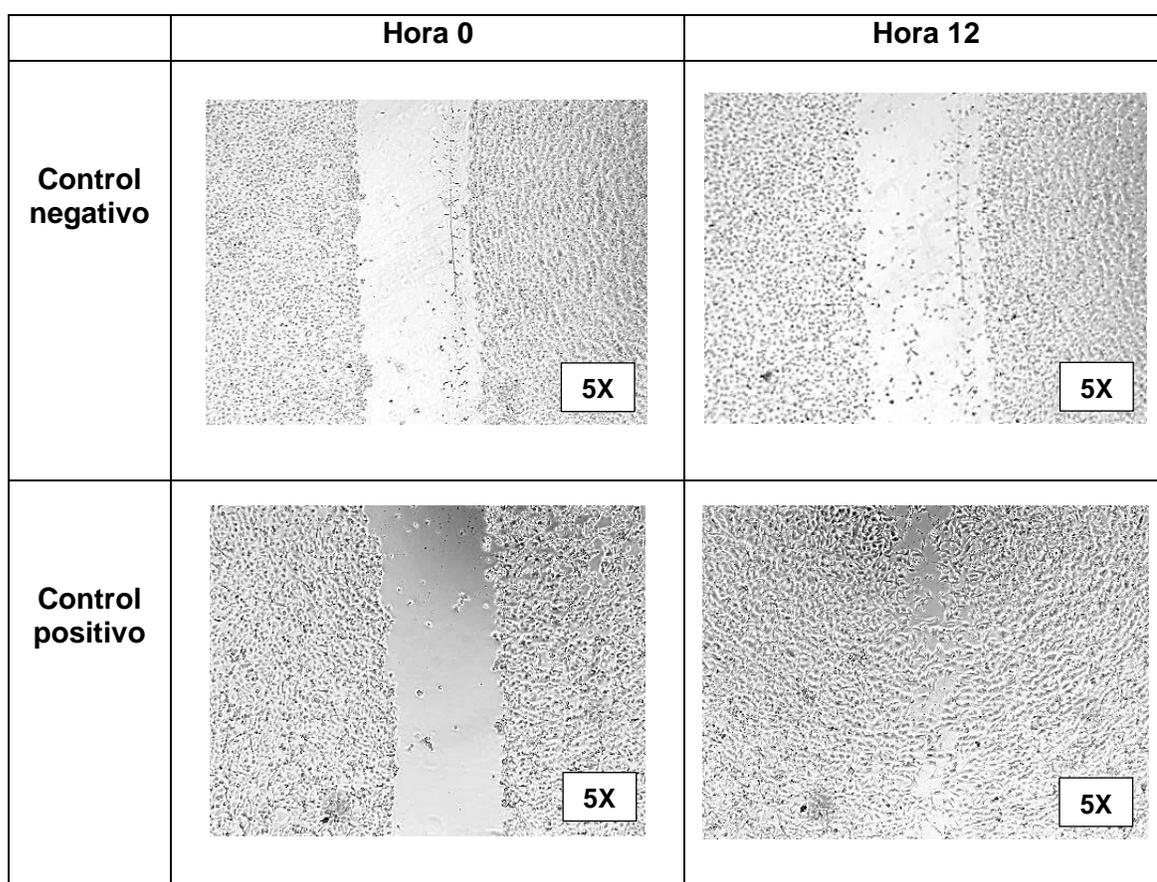


Figura 30. Imágenes representativas de los controles del ensayo de migración celular a las 0 y 12 horas. Se empleó microscopio invertido con cámara integrada LEIKA para efectuar el registro fotográfico.

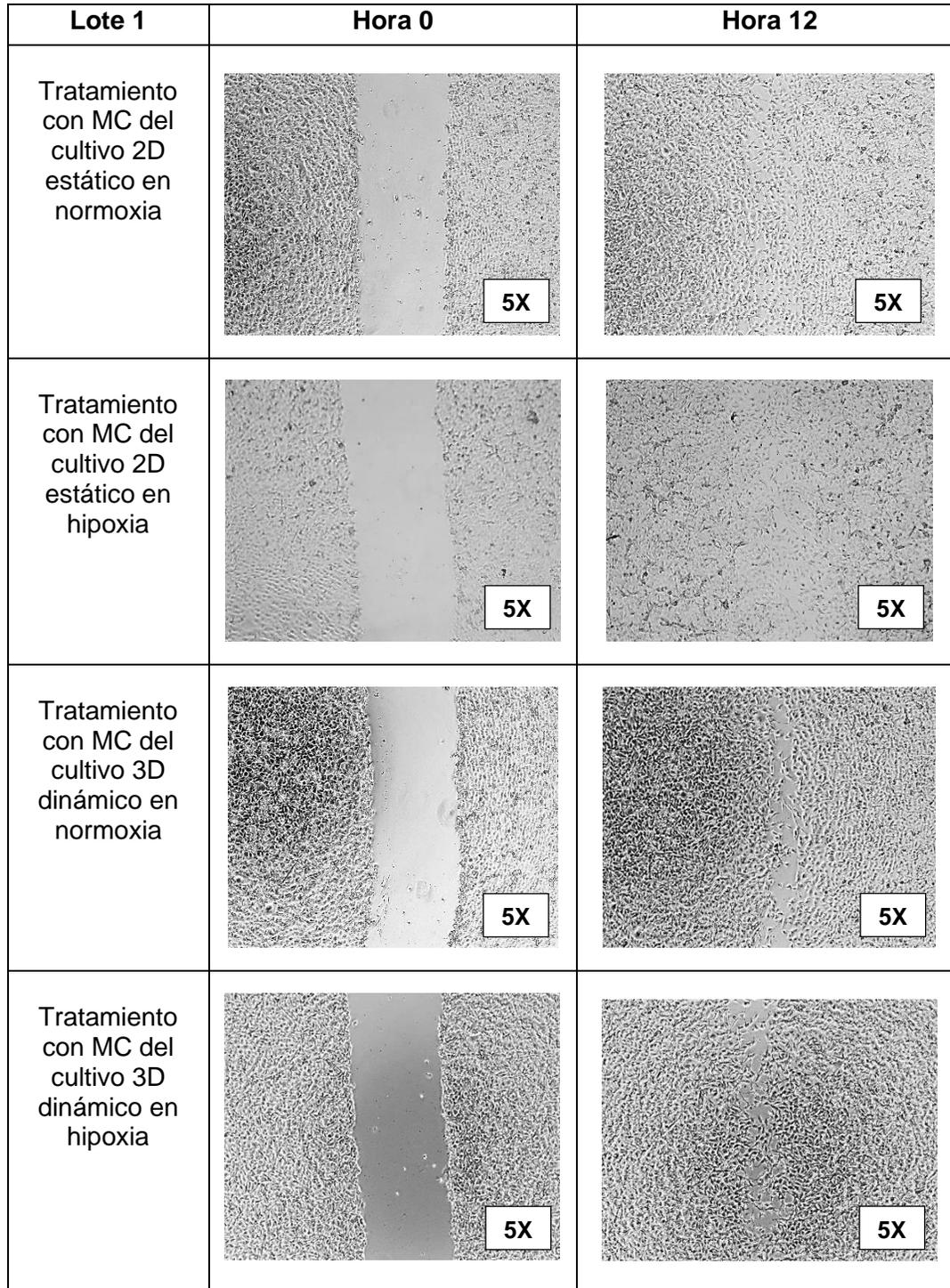


Figura 31. Imágenes representativas del ensayo de migración celular empleando los MC de las A-MSC del lote 1 a las 0 y 12 horas. Se empleó microscopio invertido con cámara integrada LEIKA para efectuar el registro fotográfico.

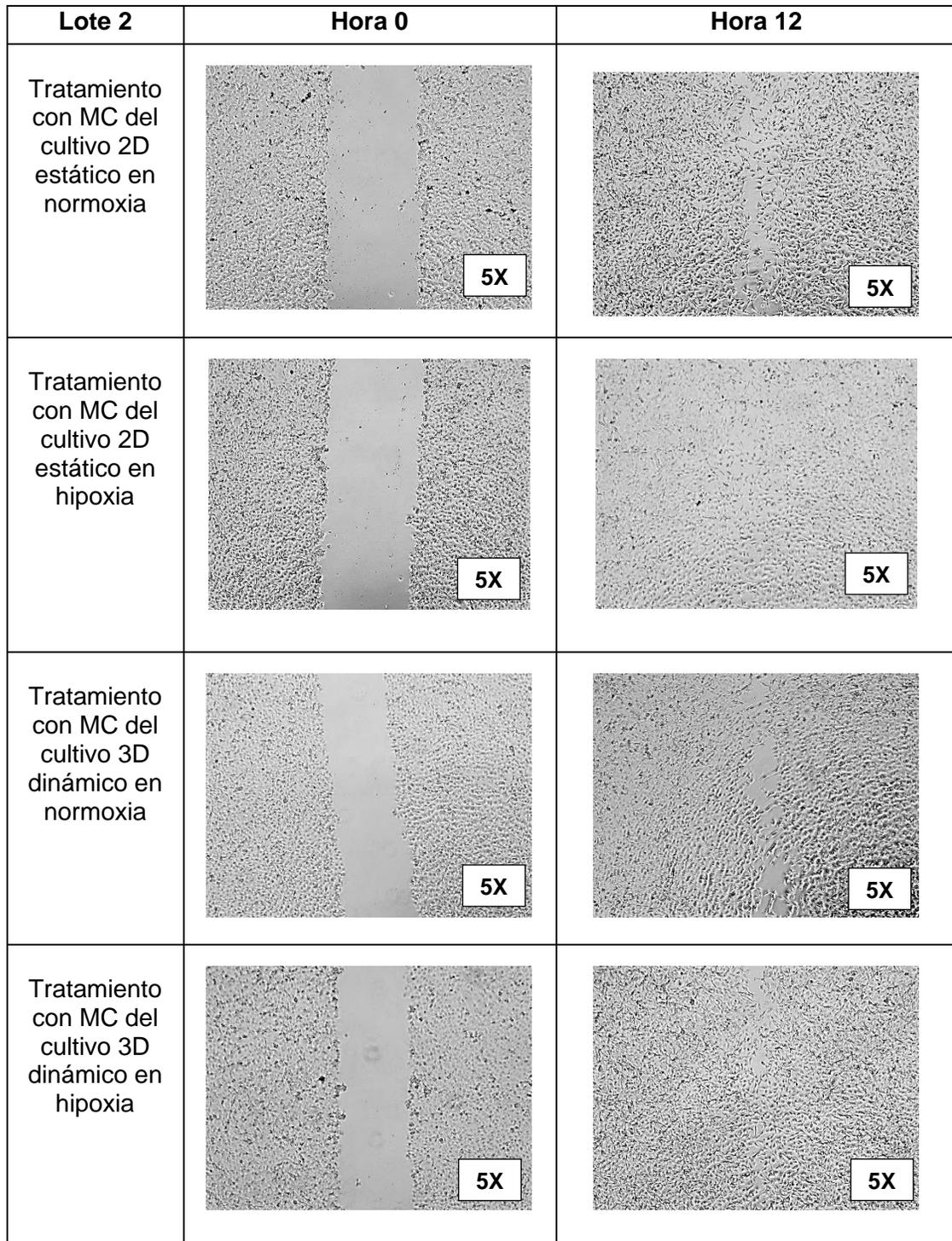


Figura 32. Imágenes representativas del ensayo de migración celular empleando los MC de las A-MSC del lote 2 a las 0 y 12 horas. Se empleó microscopio invertido con cámara integrada LEIKA para efectuar el registro fotográfico.

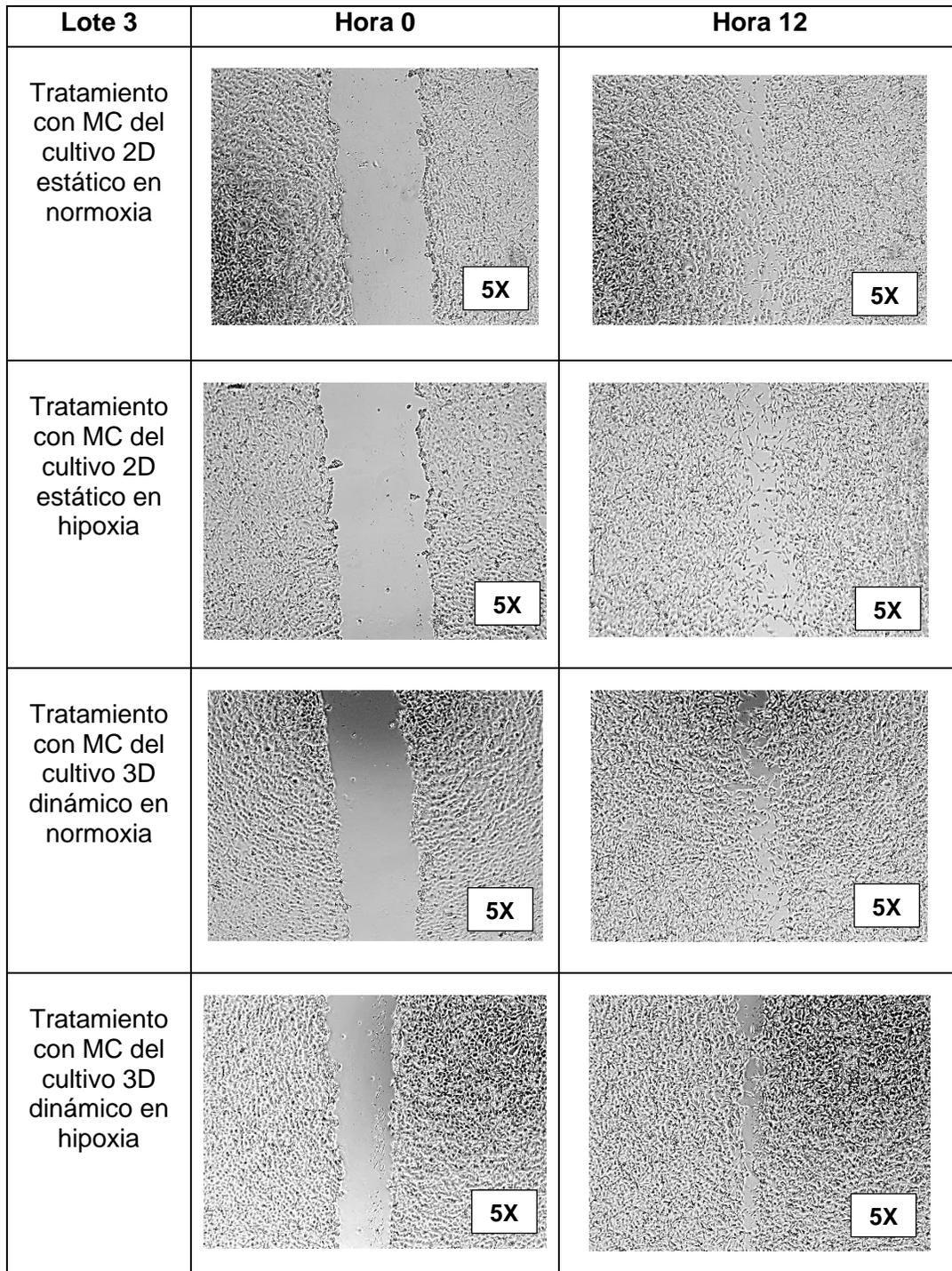


Figura 33. Imágenes representativas del ensayo de migración celular empleando los MC de las A-MSc del lote 3 a las 0 y 12 horas. Se empleó microscopio invertido con cámara integrada LEIKA para efectuar el registro fotográfico.

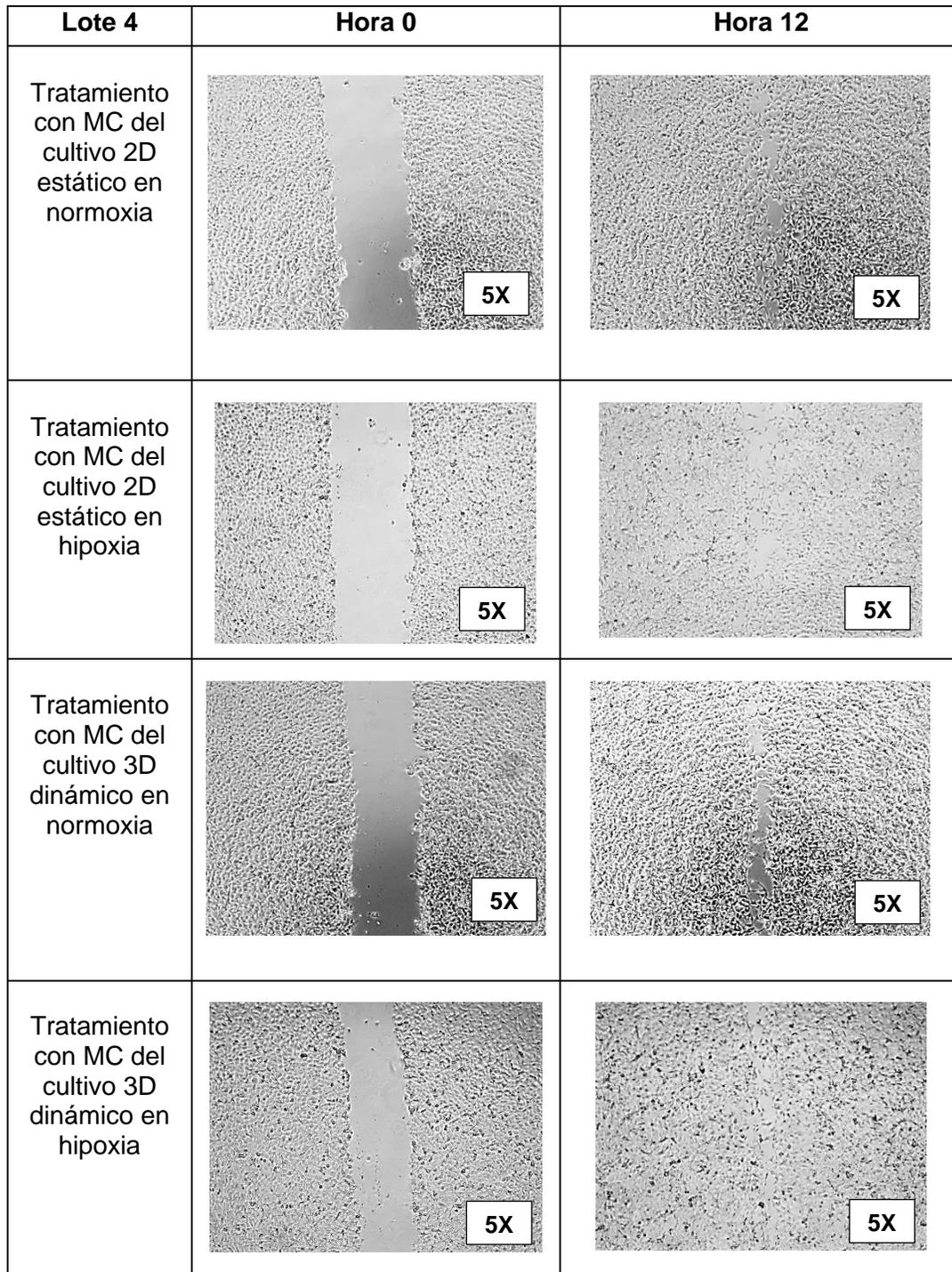


Figura 34. Imágenes representativas del ensayo de migración celular empleando los MC de las A-MSC del lote 4 a las 0 y 12 horas. Se empleó microscopio invertido con cámara integrada LEIKA para efectuar el registro fotográfico.

Se obtuvo el promedio de los triplicados de las áreas correspondientes a la herida en el tiempo 0 y la hora 12. Posteriormente, se calculó el porcentaje de cierre de la herida y los resultados se muestran en las figura 35 y 36.

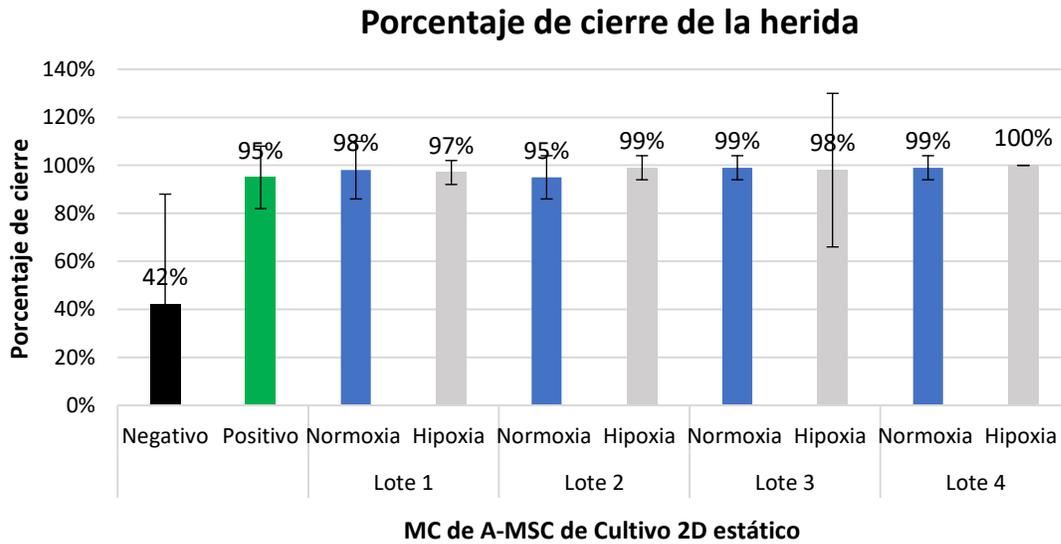


Figura 35. Porcentaje de cierre de la herida para los 4 lotes de MC de las A-MSC obtenidos en cultivos 2D estáticos

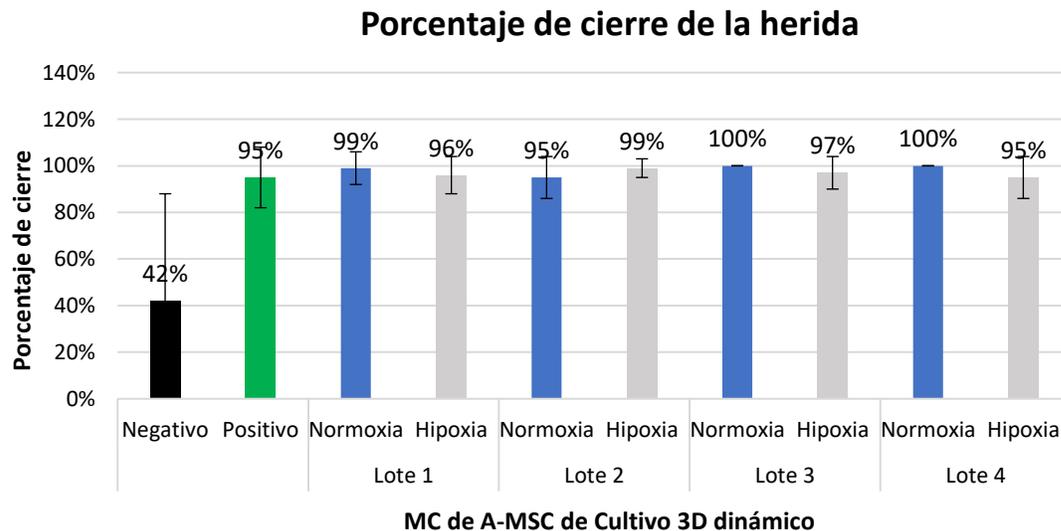


Figura 36. Porcentaje de cierre de la herida para los 4 lotes de MC de las A-MSC obtenidos en cultivos 3D dinámicos

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para la variable porcentaje de cierre de la herida encontrando que no tiene distribución normal. La estadística descriptiva muestra una mediana de 99.48 y un rango intercuartílico (IQR) de 10.38. Así mismo, la estadística descriptiva de esta variable para cada una de las condiciones de cultivo fue: cultivo 2D estático (mediana 99.48, IQR 10.15), cultivo 3D dinámico (mediana 99.60, IQR 7.40), cultivo en normoxia (mediana 99.77, IQR 6.66) y cultivo en hipoxia (mediana 91.90, IQR 10.38).

Las pruebas de Mann-Whitney para las diferentes condiciones de cultivo mostraron: cultivo 2D estático-cultivo 3D dinámico: $Z = -0.299$ Probabilidad $> |Z| = 0.7649$ y para cultivo en normoxia-cultivo en hipoxia: $Z = -0.587$ Probabilidad $> |Z| = 0.5570$. Por tanto, no hay diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de cierre de la herida en los diferentes tipos de cultivo (2D estático-3D dinámico) ni entre los niveles de O_2 (normoxia-hipoxia).

Al efectuar la prueba de Kruskal-Wallis para las 4 condiciones ($n = 4$: cultivo 2D estático en normoxia, cultivo 2D estático en hipoxia, cultivo 3D dinámico normoxia y cultivo 3D dinámico hipoxia) se encuentra un valor de $p = 0.0617$; es decir, no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los 4 grupos. Por tanto, se puede concluir que los MC de las A-MSK favorecen la migración de las CE independiente de las condiciones en que se cultivaron las A-MSK.

- **4.4.1.2 Ensayo de formación de estructuras tubulares**

Este ensayo se efectuó por triplicado y las imágenes fueron analizadas empleando el software WinTube (Quantification Tube Formation) de WIMASIS Analysis el cual mide seis parámetros: porcentaje de área cubierta por los brotes angiogénicos, número total de tubos, longitud total de los tubos, número de puntos de ramificación, número de bucles y número de redes.

En la figura 38 se muestran imágenes representativas de la tubulogénesis de los controles y, en las figuras 37 a 41, las imágenes representativas de la tubulogénesis de los tratamientos con los cuatro lotes de MC de A-MSK a las cinco horas postratamiento.

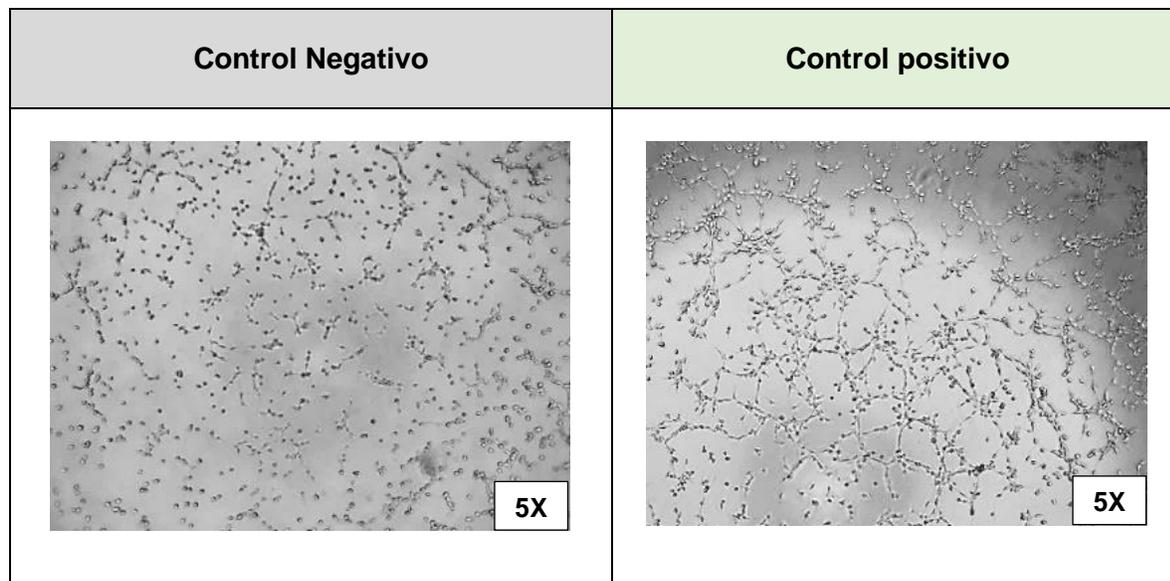


Figura 37. Imágenes representativas de los controles del ensayo de formación de estructuras tubulares a las 5 horas postratamiento. Se empleó microscopio invertido con cámara integrada LEIKA para efectuar el registro fotográfico.

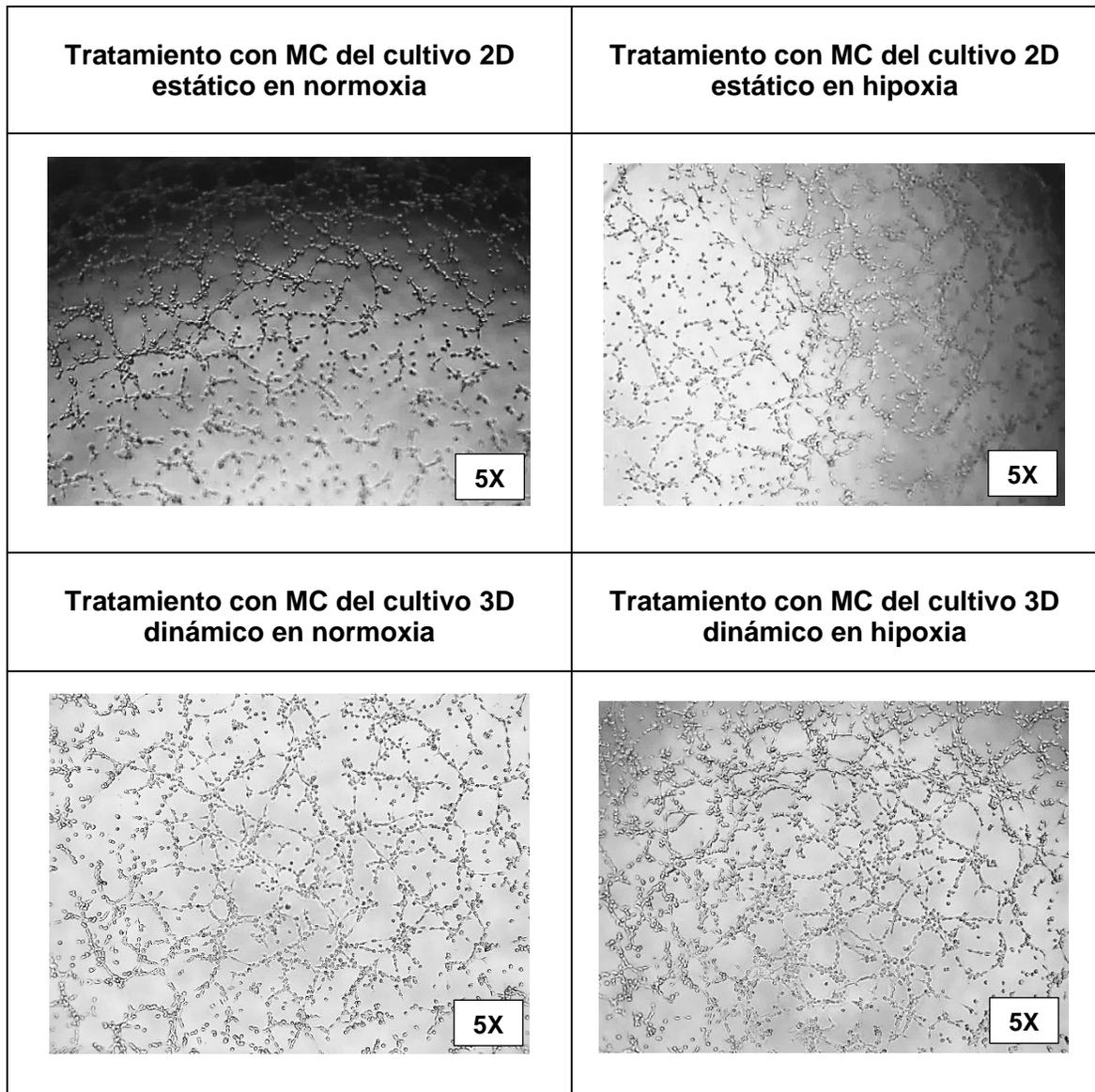


Figura 38. Imágenes representativas del ensayo de formación de estructuras tubulares empleando los MC obtenidos de las A-MSC del lote 1 a las 5 horas postratamiento. Se empleó microscopio invertido con cámara integrada LEIKA para efectuar el registro fotográfico.

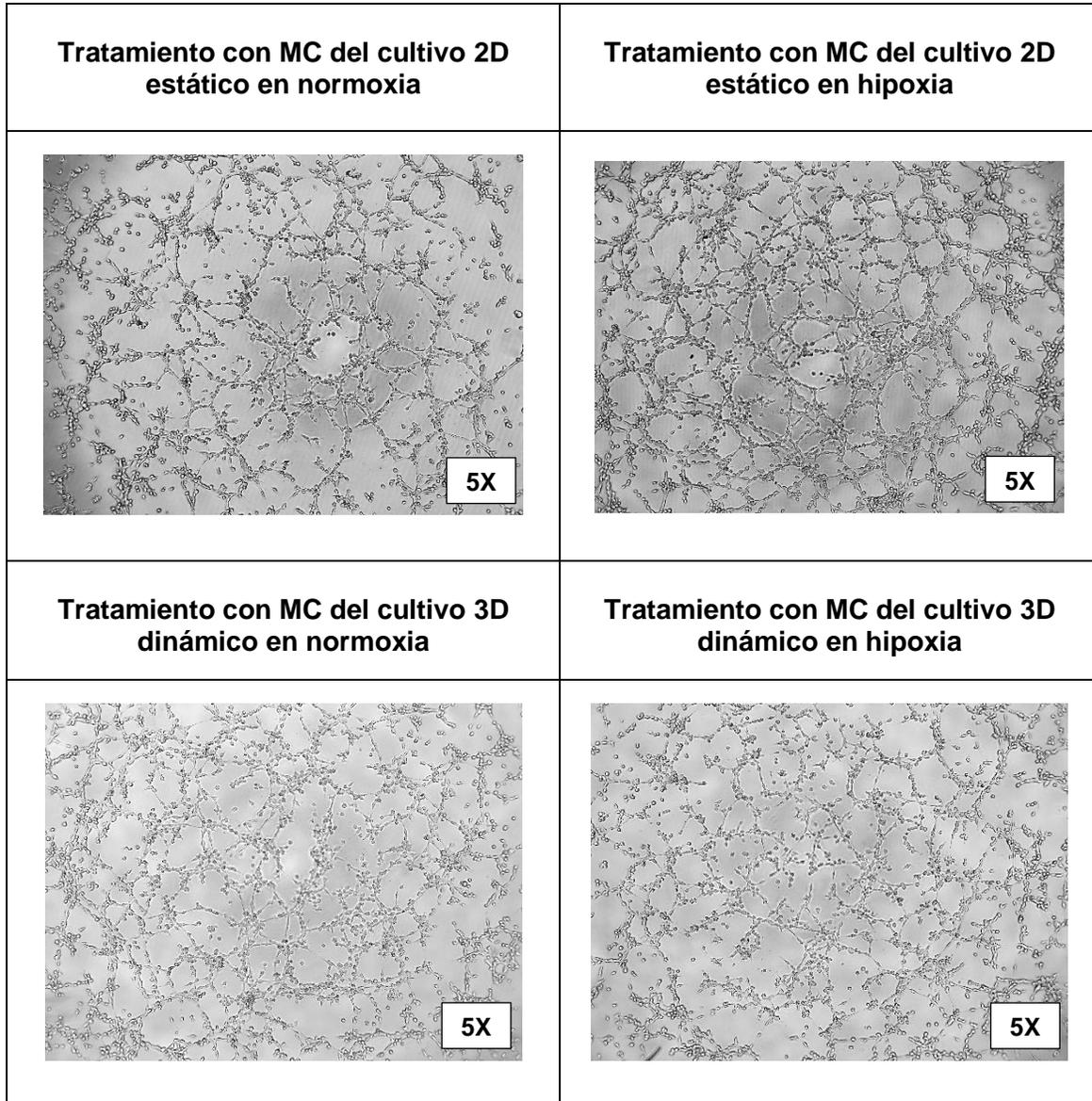


Figura 39. Imágenes representativas del ensayo de formación de estructuras tubulares empleando los MC obtenidos de las A-MSC del lote 2 a las 5 horas postratamiento. Se empleó microscopio invertido con cámara integrada LEIKA para efectuar el registro fotográfico.

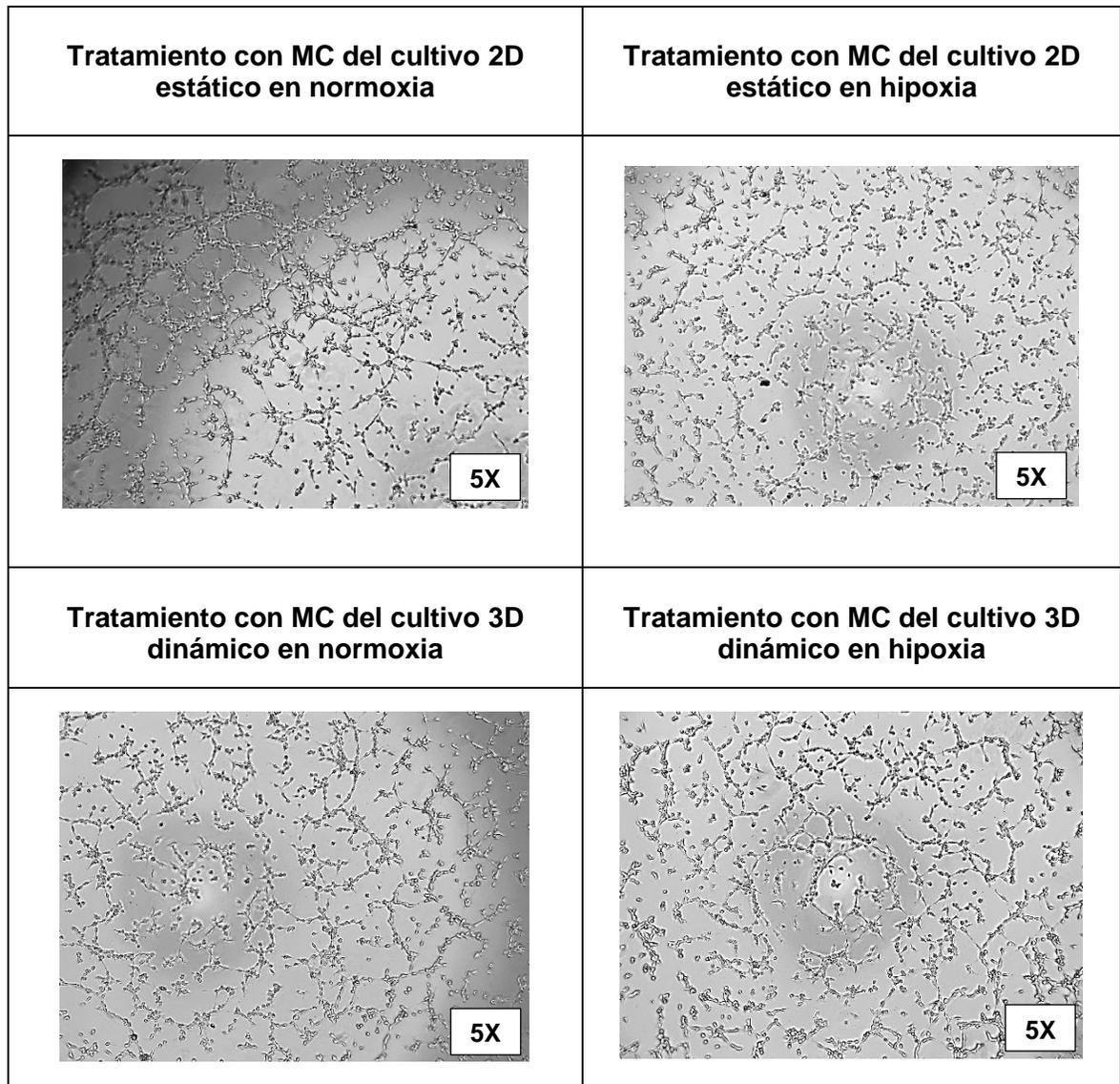


Figura 40. Imágenes representativas del ensayo de formación de estructuras tubulares empleando los MC obtenidos de las A-MSC del lote 3 a las 5 horas postratamiento. Se empleó microscopio invertido con cámara integrada LEIKA para efectuar el registro fotográfico.

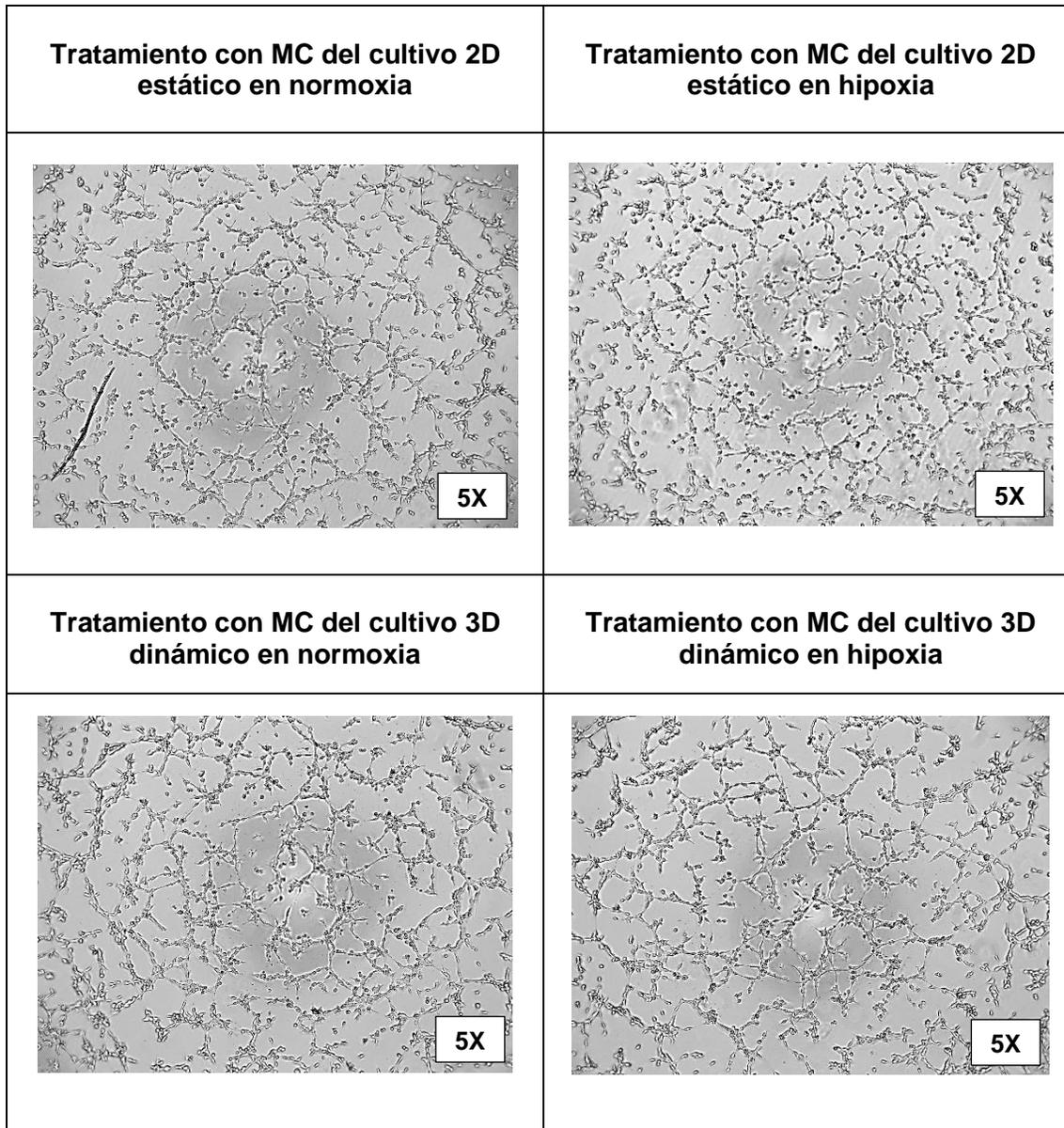


Figura 41. Imágenes representativas del ensayo de formación de estructuras tubulares empleando los MC obtenidos de las A-MSC del lote 4 a las 5 horas postratamiento. Se empleó microscopio invertido con cámara integrada LEIKA para efectuar el registro fotográfico.

Se efectuó la prueba de Shapiro-Wilk a los 6 parámetros del WinTube de WIMASIS Analysis para determinar su normalidad encontrando dos variables con distribución normal (longitud total de los tubos y total de redes) y cuatro que no cumplen con este supuesto (área cubierta por los brotes, total de tubos, total de punto de ramificación y total de bucles). Los resultados y valores p se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para los parámetros evaluados por el software WinTube de WIMASIS

Variables	W	Valor de p
Porcentaje de área cubierta por los brotes	0.98366	0.690
Número total de tubos	0.96226	0.098
Longitud total de los tubos	0.95399	0.043
Número de puntos de ramificación	0.9693	0.197
Número de bucles	0.97979	0.517
Número de redes	0.89114	0.00018

La estadística descriptiva de las variables normales es: longitud de tubos (media 52428, desviación estándar 9198.97) y número de redes (media 10.17, Desviación estándar 8.15). Para las variables no normales: porcentaje de área cubierta (mediana 44.5, IQR 15), número total de tubos (mediana 501.5 IQR 159.5), número de puntos de ramificación (mediana 268, IQR 113.5) y número de bucles (mediana 106, IQR 62.25).

Se efectuaron pruebas T de dos colas para los parámetros normales encontrando que el único valor de p (0,00131) que muestra diferencia estadísticamente significativa corresponde a la comparación entre cultivo normoxia-cultivo hipoxia para la longitud total de los tubos (todos los resultados de esta prueba T se muestran en la Tabla 9). Luego, se efectuó una prueba T de una cola y se encontró que el promedio es mayor que cero para el valor de la variable cultivo hipoxia con $p= 0.0006653$.

Tabla 9. Resultados de las pruebas T de Student para las variables de interés del ensayo de tubulogénesis

Condiciones de cultivo	Longitud total de los tubos	Número de redes
Cultivo 2D estático-cultivo 3D dinámico	t= 0.0822 (p: 0,9349)	t= -0.55768 (p: 0,5798)
Cultivo en normoxia- cultivo en hipoxia	t= 3,4256 (p: 0,00131)	t= -1.8353 (p: 0,07303)

Los resultados de las pruebas de Mann-Whitney para las variables que no presentan distribución normal se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados de las pruebas de Mann-Whitney para las variables de interés del ensayo de tubulogénesis

Condiciones de cultivo	Porcentaje de área cubierta por los brotes	Número total de tubos	Número de puntos de ramificación	Número de bucles
Cultivo 2D estático-cultivo 3D dinámico	W= 324 (p: 0,4638)	W= 276.5 (p: 0,8206)	W= 302 (p: 0,7827)	W= 297,5 (p: 0,8528)
Cultivo en normoxia-cultivo en hipoxia	W= 161 (p: 0.009033)	W= 128 (p: 0,00100)	W= 435 (p: 0,002026)	W= 425,5 (p: 0,00472)

El valor p de 0,009033 demuestra diferencias estadísticamente significativas entre cultivo en normoxia y cultivo en hipoxia para el parámetro porcentaje de área cubierta por los brotes angiogénicos. Al efectuar una prueba de Mann-Whitney de una cola se encuentra que es mayor el valor de la variable cultivo en hipoxia con valor de p: 0.004517.

El valor p de 0,00100 demuestra diferencias estadísticamente significativas entre cultivo en normoxia y cultivo en hipoxia para el número total de tubos. Al efectuar una prueba de

Mann-Whitney de una cola se encuentra que es mayor el valor de la variable cultivo hipoxia con valor de p : 0.0005027.

El valor p de 0,002026 demuestra diferencias estadísticamente significativas entre cultivo en normoxia y cultivo en hipoxia para el número de puntos de ramificación. Al efectuar una prueba de Mann-Whitney de una cola se encuentra que es mayor el valor de la variable cultivo en hipoxia con valor de p : 0,001013.

El valor p de 0,00472 demuestra diferencias estadísticamente significativas entre cultivo en normoxia y cultivo en hipoxia para el número de bucles. Al efectuar una prueba de Mann-Whitney de una cola se encuentra que es mayor el valor de la variable cultivo en hipoxia con valor de p : 0,002364.

Con esto se puede concluir que existe una diferencia estadísticamente significativa en 5 de las 6 variables evaluadas en los cultivos tratados con MC obtenidos en hipoxia. Por tanto, se concluye que las células EAhy926 desarrollan una mayor área cubierta por los brotes angiogénicos y longitud total de los tubos, así como, un incremento en el número de tubos, puntos de ramificación y bucles angiogénicos cuando se tratan con MC de A-MSK obtenidos en hipoxia.

Se efectuó el test de Bartlett encontrando valores de p estadísticamente no significativos para las variables normales (Longitud total de los tubos $p=0.7093$ y total de redes $p=0,1402$); es decir, que no hay evidencia de falta de homocedasticidad. Por tanto, se puede efectuar las pruebas ANOVA ($n=4$: cultivo 2D estático en normoxia, cultivo 2D estático en hipoxia, cultivo 3D dinámico en normoxia, cultivo 3D dinámico en hipoxia).

La prueba ANOVA de un factor para longitud total de los tubos encontró valor de $p= 0,00814$. Es decir que hay evidencia de que al menos dos medias presentan diferencias estadísticamente significativas. Por tanto, se desarrolló la prueba de Tukey cuyos resultados se muestran en la tabla 11. Se aprecia que el único grupo cuyas medias muestran diferencias estadísticamente significativas es el 2D estático en normoxia-2D estático en hipoxia. Se efectúa T de Student de una cola que muestra que el promedio es mayor que cero para el valor de la variable cultivo 2D estático en hipoxia ($p= 0.001826$).

Tabla 11. Resultados de la prueba de Tukey para la variable longitud total de los tubos

Condiciones de los cultivos	Valor de p
2D estático en normoxia-2D estático en hipoxia	0,0091
2D estático en normoxia-3D dinámico en normoxia	0,8282
2D estático en normoxia-3D dinámico en hipoxia	0,1024
2D estático en hipoxia-3D dinámico en normoxia	0,0773
2D estático en hipoxia-3D dinámico en hipoxia	0,7593
3D dinámico en normoxia-3D dinámico en hipoxia	0,4488

La prueba ANOVA de un factor para el número total de redes encontró un valor de $p=0,247$. Es decir que no hay evidencia de que al menos dos medias presentan diferencias estadísticamente significativas.

La variable número de tubos presenta diferencias estadísticamente significativas ($p=0,006858$). Por tanto, se efectúan las pruebas de Mann-Whitney encontrando diferencias estadísticamente significativas entre: 2D estático en normoxia-3D dinámico en hipoxia ($p=0,01752$), 3D dinámico en normoxia-2D estático en hipoxia ($p=0,006047$), y 2D estático en normoxia-2D estático en hipoxia ($p=0,002257$); en todos los casos a favor de los cultivos en hipoxia.

La variable número de puntos de ramificación presenta diferencias estadísticamente significativas ($p=0,01562$). Por tanto, se efectúan las pruebas de Mann-Whitney encontrando diferencias estadísticamente significativas entre: 2D estático en normoxia-2D estático en hipoxia ($p=0,01209$) y 3D dinámico en normoxia-2D estático en hipoxia ($p=0,01449$) en ambos casos a favor de los cultivos en hipoxia.

La variable número de bucles presenta diferencias estadísticamente significativas ($p=0,02377$). Por tanto, se efectúan las pruebas de Mann-Whitney encontrando diferencias estadísticamente significativas entre: 2D estático en normoxia-2D estático en hipoxia ($p=0,01209$) y 3D dinámico en normoxia-2D estático en hipoxia ($p=0,01727$) en ambos casos a favor de los cultivos en hipoxia.

Con estos resultados se puede concluir que existe una diferencia estadísticamente significativa en 4 de los 6 parámetros evaluados por el software WinTube de WIMASIS, (variables longitud total de los tubos, el número de tubos, el número de puntos de ramificación y el número de bucles angiogénicos) en los cultivos 2D estáticos con un incremento estadísticamente significativo de sus medias o medianas cuando se desarrollan en condiciones de hipoxia.

Al comparar los resultados de los cultivos 3D dinámicos con los resultados de los cultivos 2D estáticos para las variables número de tubos, número de puntos de ramificación y número de bucles, se aprecia que los ensayos realizados en hipoxia, independiente del sistema de cultivo, presentan mejores resultados con diferencias estadísticamente significativas.

• 4.4.1.3 Ensayo de formación de brotes angiogénicos

Se empleó el modelo de cultivo tridimensional de explantes de corazón de ratón en Matrigel® y se obtuvieron las imágenes de formación de brotes angiogénicos a los 6 días postratamiento.

Empleando el software Sprouting Assay se determinó en cada imagen el área ocupada por el explante de corazón y por los brotes angiogénicos en píxeles, luego se calcularon los promedios de cada triplicado para estas dos áreas y, finalmente, se calculó la relación de crecimiento angiogénico (RCA).

En las figuras 42 a 46 se muestran imágenes representativas de los controles y cada uno de los tratamientos empleados en este ensayo. Posteriormente se presentan los resultados del análisis estadístico de la variable área ocupada por los brotes angiogénicos, la cual no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa.

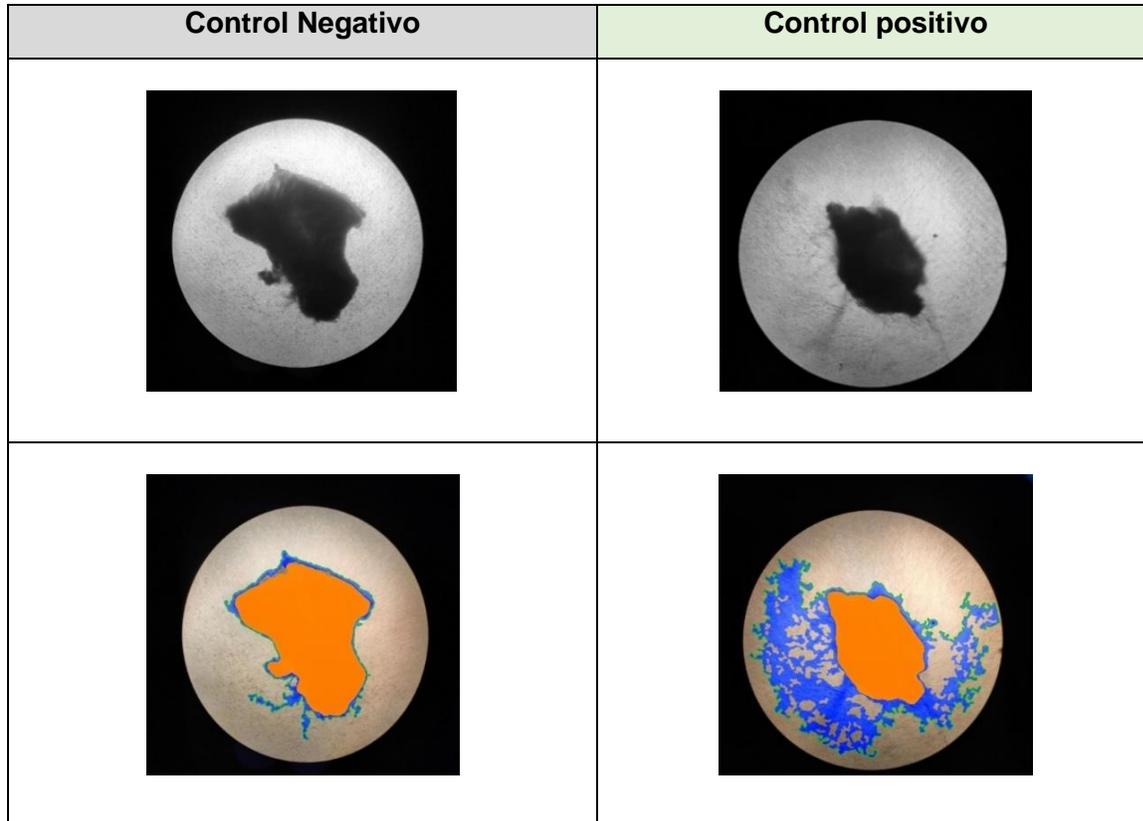


Figura 42 . Imágenes representativas de los controles del ensayo de formación de brotes angiogénicos.

En las imágenes superiores se aprecia la fotografía original del pozo de cultivo (2,5X). En las imágenes inferiores se observan las áreas seleccionadas por el software de WIMASIS: el área de color naranja corresponde al explante de corazón y el área de color azul, al área que ocupan los brotes angiogénicos.

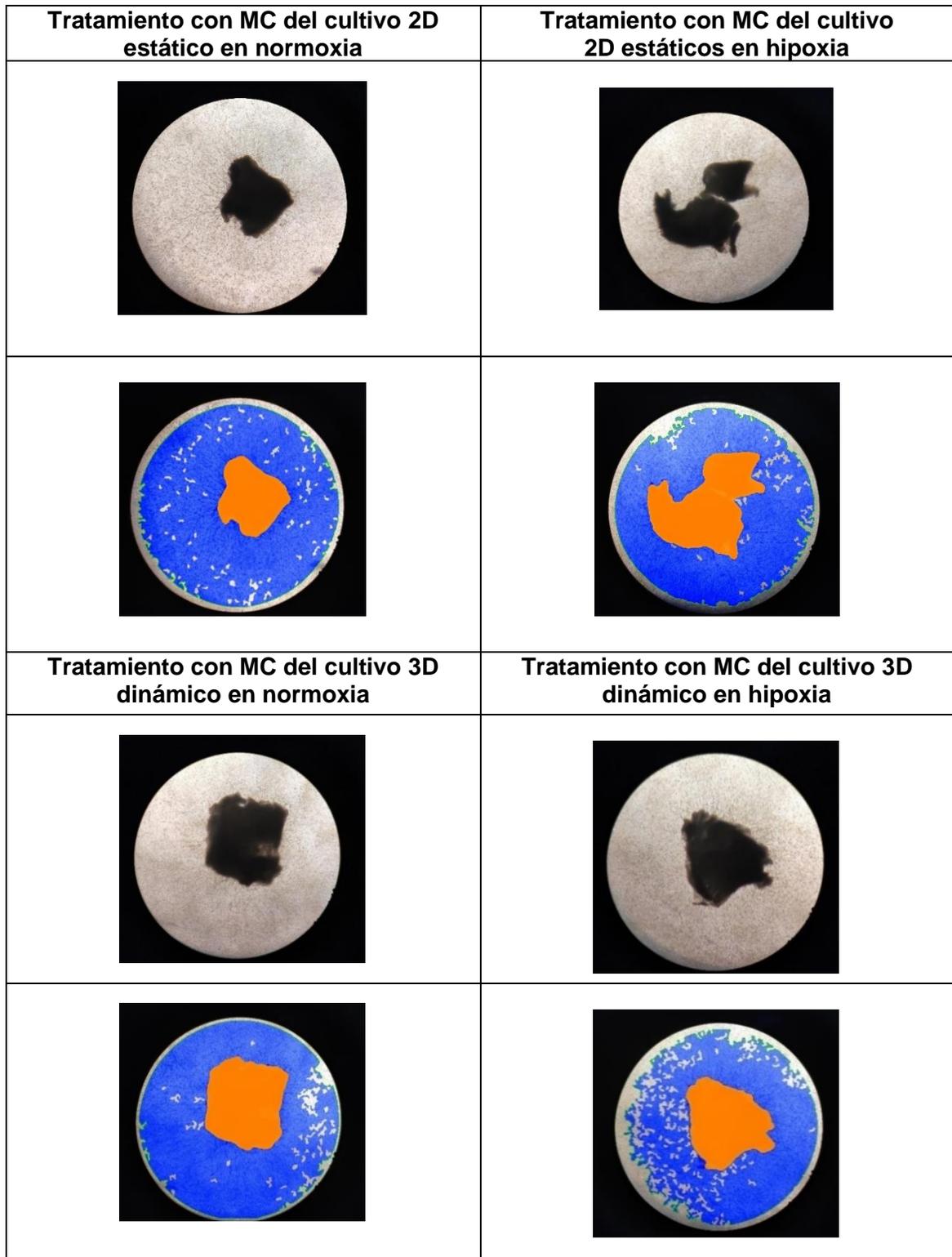


Figura 43. Imágenes representativas del ensayo de formación de brotes angiogénicos con los MC de las A-MSC del lote 1

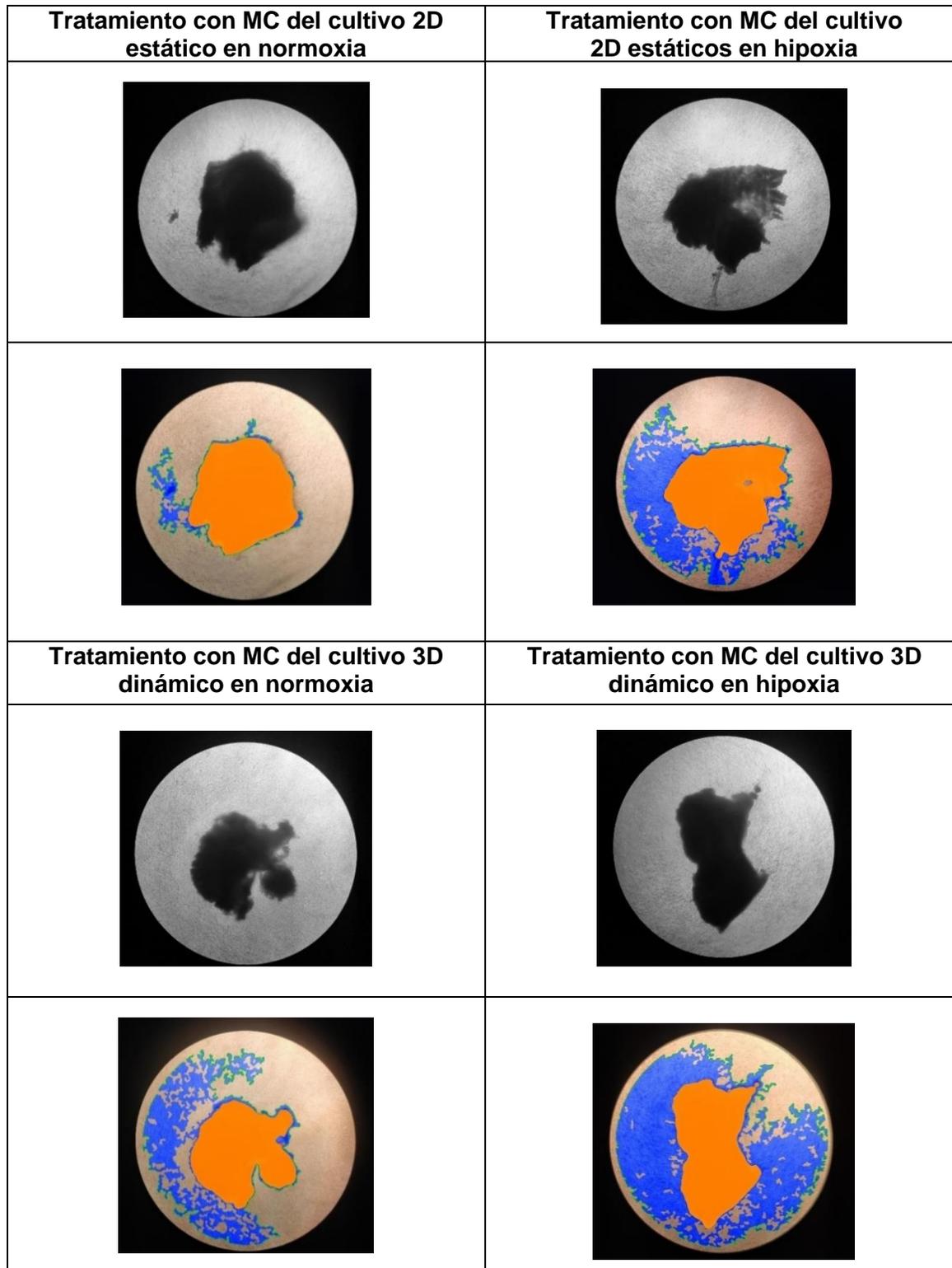


Figura 44. Imágenes representativas del ensayo de formación de brotes angiogénicos con los MC de las A-MSC del lote 2

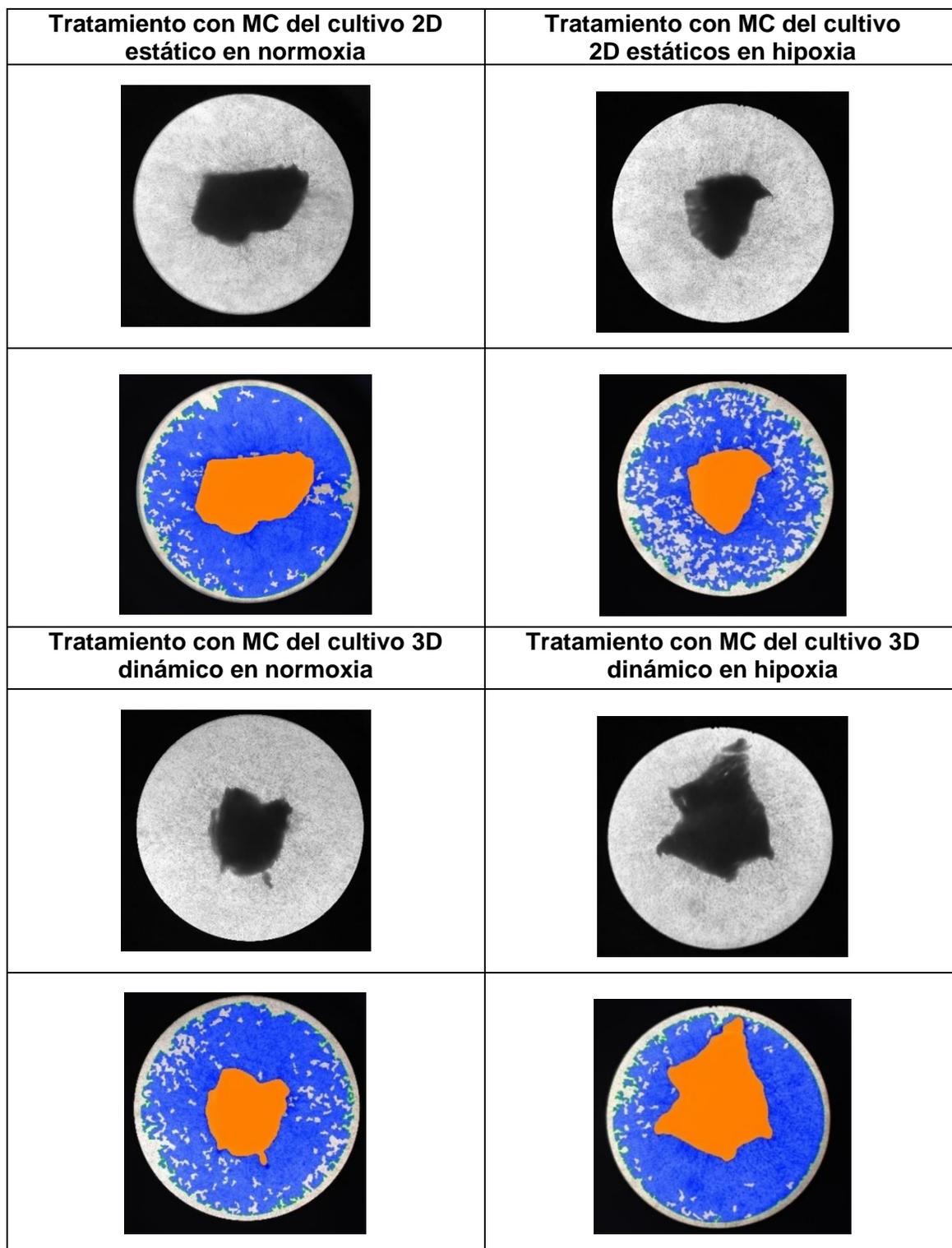


Figura 45. Imágenes representativas del ensayo de formación de brotes angiogénicos con los MC de las A-MSC del lote 3

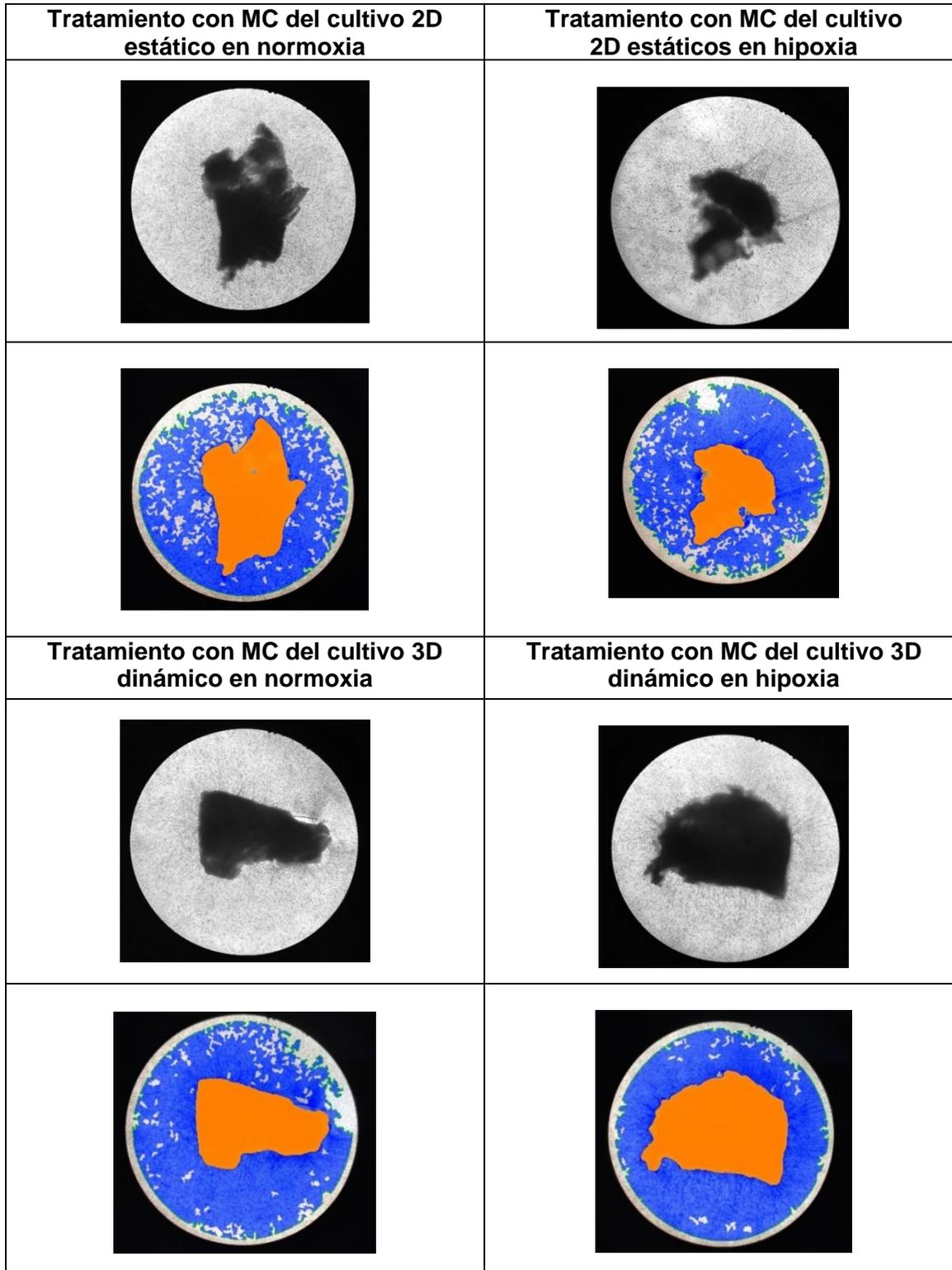


Figura 46. Imágenes representativas del ensayo de formación de brotes angiogénicos con los MC de las A-MSC del lote 4

Al aplicar la prueba de Shapiro-Wilk a la variable área ocupada por los brotes angiogénicos se encontró que no tiene distribución normal (mediana de 1.10×10^7 , IQR de $1,01 \times 10^7$).

La estadística descriptiva para la variable brotes angiogénicos para cada una de las condiciones de cultivo fue: cultivo 2D estático (mediana 1.25×10^7 , IQR 9365224), cultivo 3D dinámico (mediana 8356933, IQR 9543286), cultivo en normoxia (mediana 1.20×10^7 , IQR 1.0×10^7) y cultivo en hipoxia (mediana 1.10×10^7 , IQR 0.71×10^7).

Los resultados de las pruebas de Mann-Whitney para la variable área ocupada por los brotes angiogénicos para las diferentes condiciones de cultivo mostraron: cultivo 2D estático-cultivo 3D dinámico: $Z = -0.979$, probabilidad $> |Z| = 0.3276$ y, para el par, cultivo normoxia-cultivo en hipoxia: $Z = -0.213$, probabilidad $> |Z| = 0.8315$. Por tanto, no hay diferencias en las medianas del área ocupada por los brotes angiogénicos entre los grupos analizados. En conclusión, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las formas de cultivo ni las concentraciones de oxígeno en este ensayo.

Se calculó la RCA (área de los brotes angiogénicos /área del explante de corazón de ratón) y los resultados se presentan en las figuras 47 y 48.

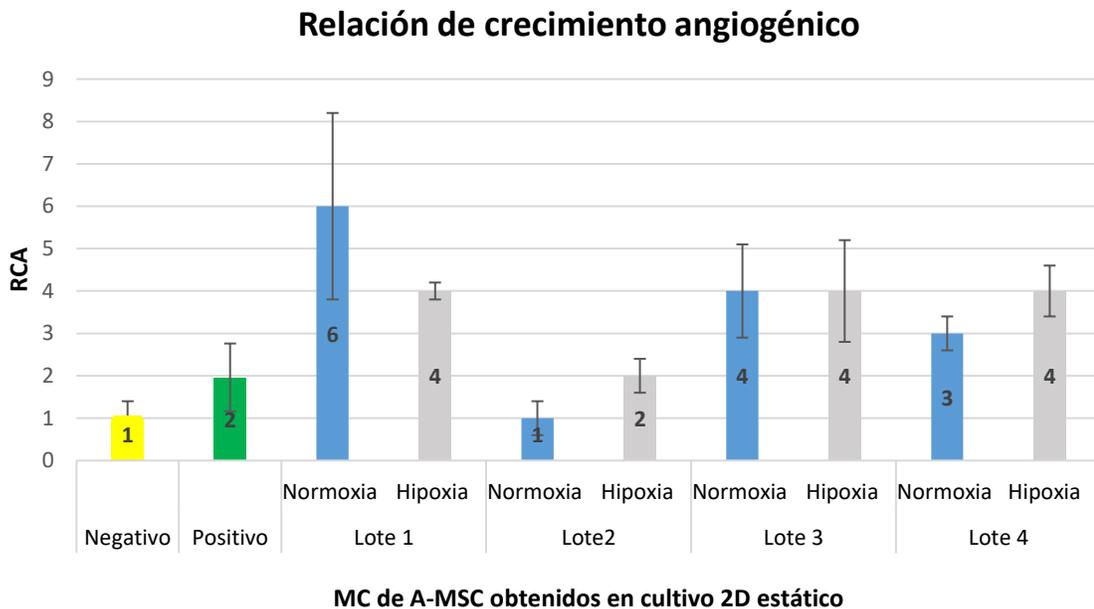


Figura 47. Resultados de la RCA empleado los MC de A-MSc obtenidos en cultivo 2D estático

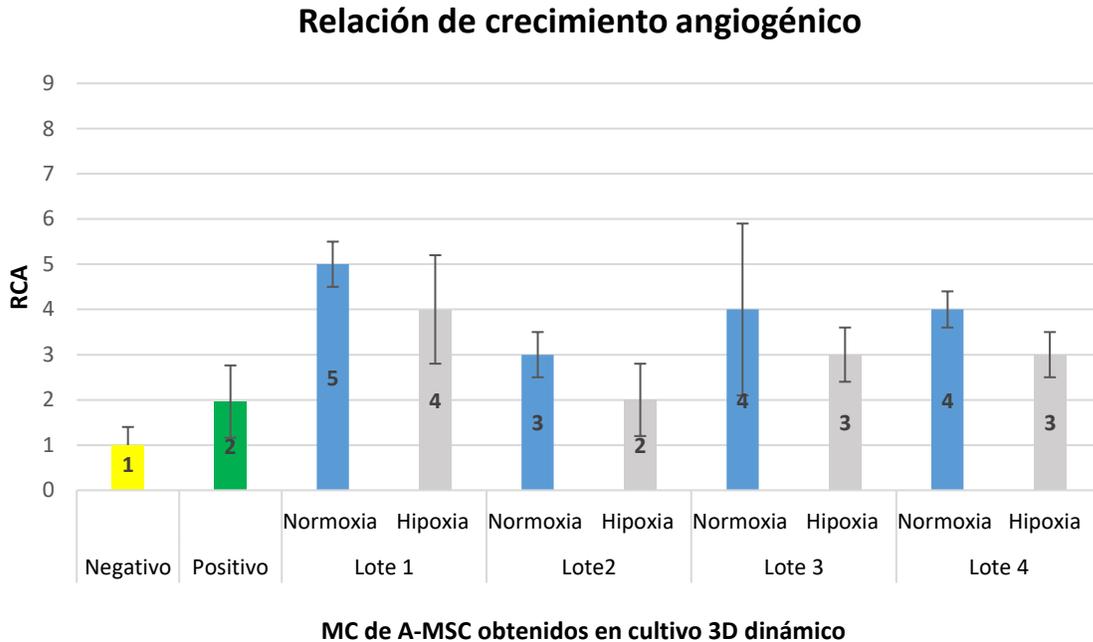


Figura 48. Resultados de la RCA empleado los MC de A-MSC obtenidos en cultivo 3D dinámico.

Al efectuar el análisis estadístico de los resultados del RCA dependiendo de las condiciones de cultivo se encuentra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre 3D dinámico en hipoxia-3D dinámico en normoxia ($p= 0,25$), 3D dinámico en hipoxia-2D estático en hipoxia ($p=0,15$), 3D dinámico en hipoxia-2D estático en normoxia ($p= 0,78$), 3D dinámico en normoxia-2D estático en normoxia ($p=0,57$), 3D dinámico en normoxia-2D estático en hipoxia ($p=0,78$) ni 2D estático en hipoxia-2D estático en normoxia ($p= 0,56$).

4.4.2 Modelo in vivo de curación de heridas cutáneas

A cada animal de experimentación se le practicaron 3 heridas de espesor total en la piel dorsal las cuales fueron tratadas a la 24, 48 y 72 horas con medio DMEM bajo en glucosa (control) y MC de A-MSC del lote 3 obtenidos en cultivo 2D estático o 3D dinámico, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, dependiendo del grupo al que fue asignado el animal.

Se efectuó seguimiento hasta el día 9 y se midieron los diámetros horizontales de cada herida los días 0, 2, 3, 5, 7 y 9 empleando un calibre digital. En la figura 49 se presentan fotografías representativas del proceso de cierre de las heridas cutáneas.



Figura 49. Cierre progresivo de las heridas cutáneas dorsales de la rata 222, grupo 1.

En A se aprecian las tres heridas efectuadas el dorso de la rata 222 empleando un punch de 0,8 mm el día de inicio del experimento. B. Día 2 de seguimiento. C. Cierre parcial de las heridas cutáneas al día 9.

La figura 50 muestra la disminución progresiva del tamaño de la herida para el grupo de animales tratados con los MC de A-MSC obtenidos en el cultivo 2D estático. Se aprecia como a partir del día 3 hay una tendencia a la disminución del diámetro en los animales tratados con los MC en comparación con el control.

En las figuras 51 a 56 se muestran los boxes plots de la medición del diámetro promedio ($n=5$) para cada día del seguimiento, reconociéndose una mayor variabilidad del diámetro de la herida tratada con el control (DMEM bajo en glucosa), un cierre importante desde el día 7 de las heridas tratadas con los MC y un menor diámetro de las heridas tratadas con el MC obtenido en la condición 2D en normoxia en comparación con el MC obtenido en la condición 2D en hipoxia.

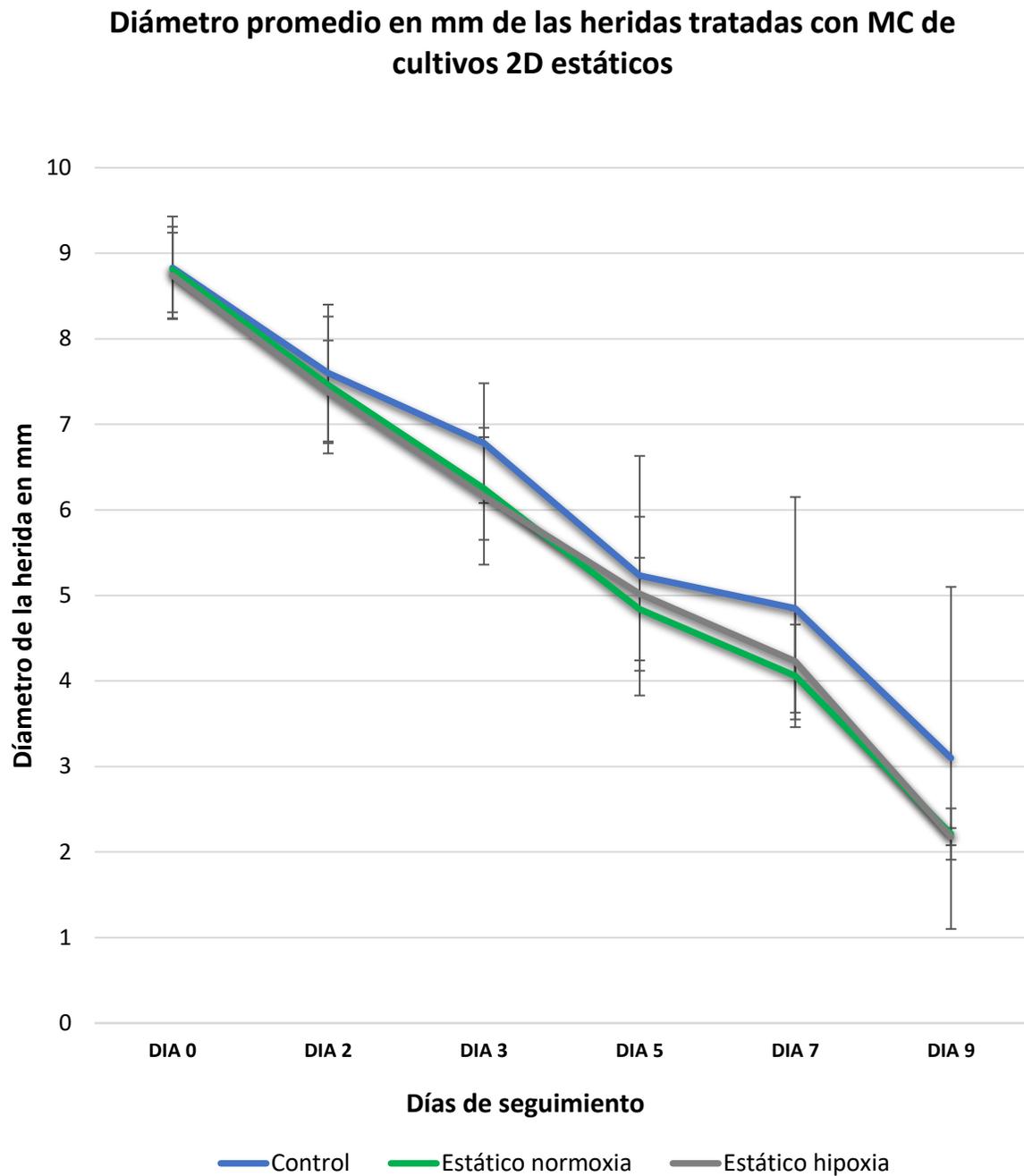


Figura 50. Resultado del cierre de las heridas cutáneas tratadas con MC de las A-MSK cultivadas en el sistema 2D estático

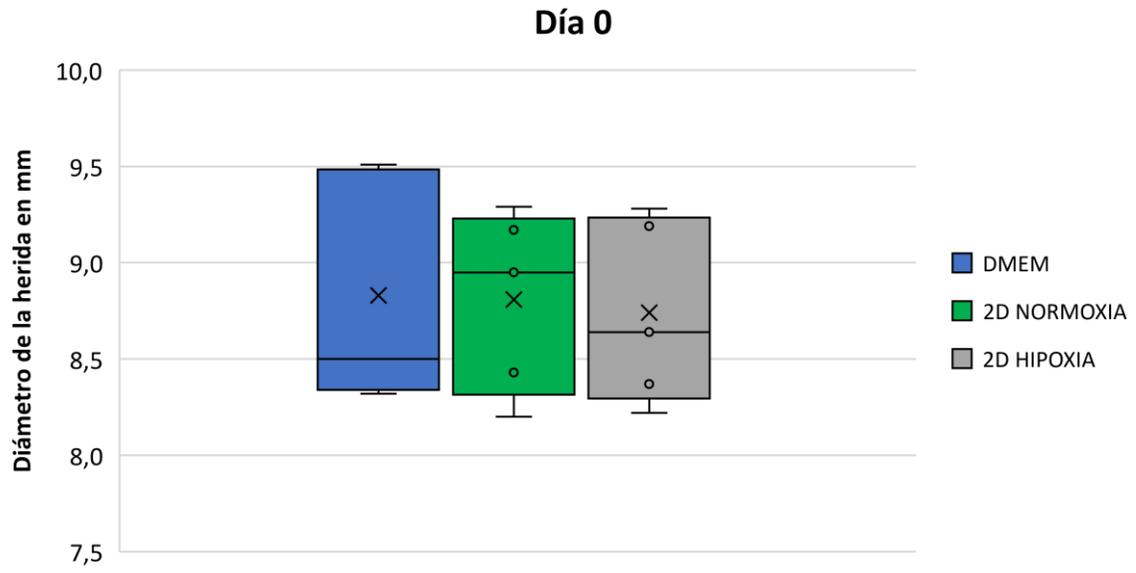


Figura 51. Diámetro promedio de las heridas al día cero del grupo de tratamiento con MC de cultivos 2D estáticos

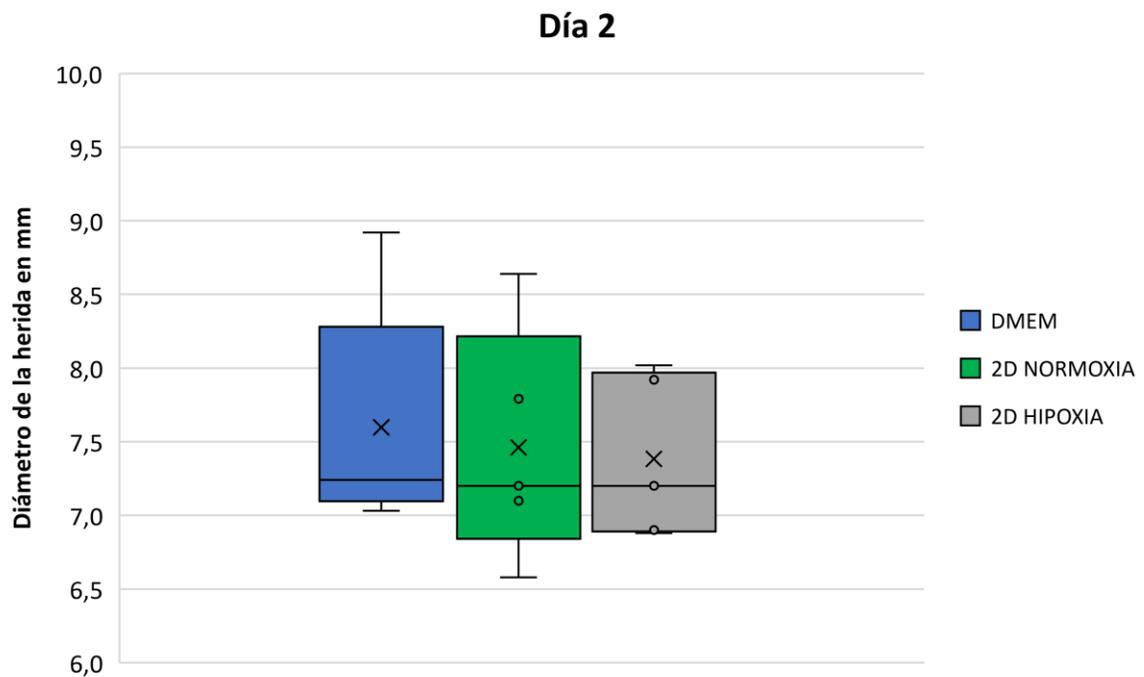


Figura 52. Diámetro promedio de las heridas al día dos del grupo de tratamiento con MC de cultivos 2D estáticos

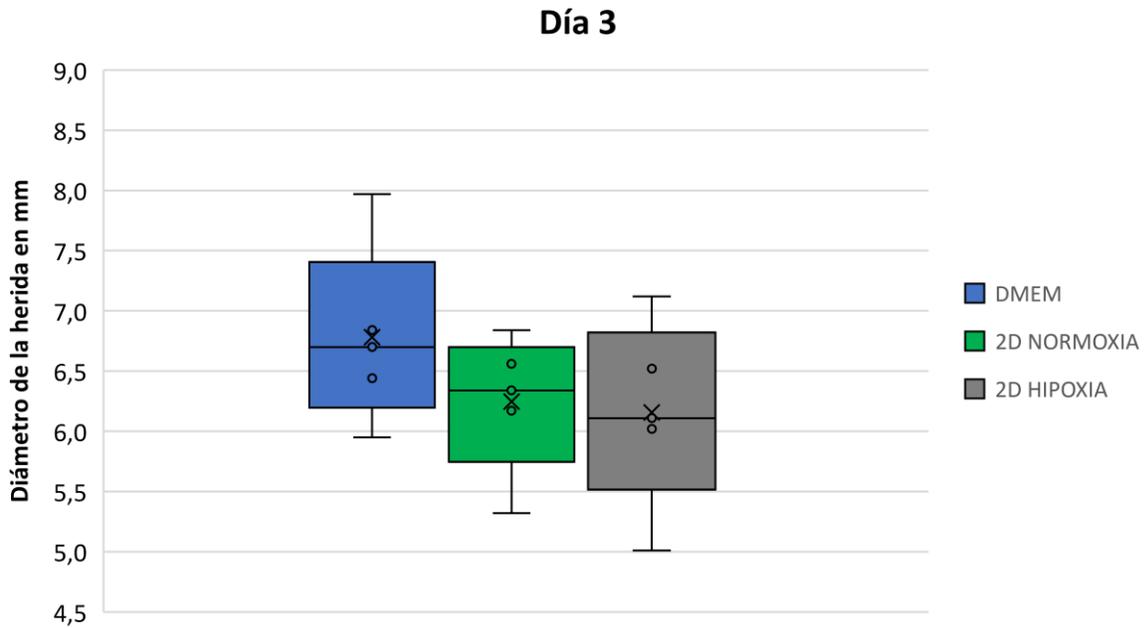


Figura 53. Diámetro promedio de las heridas al día tres del grupo de tratamiento con MC de cultivos 2D estáticos

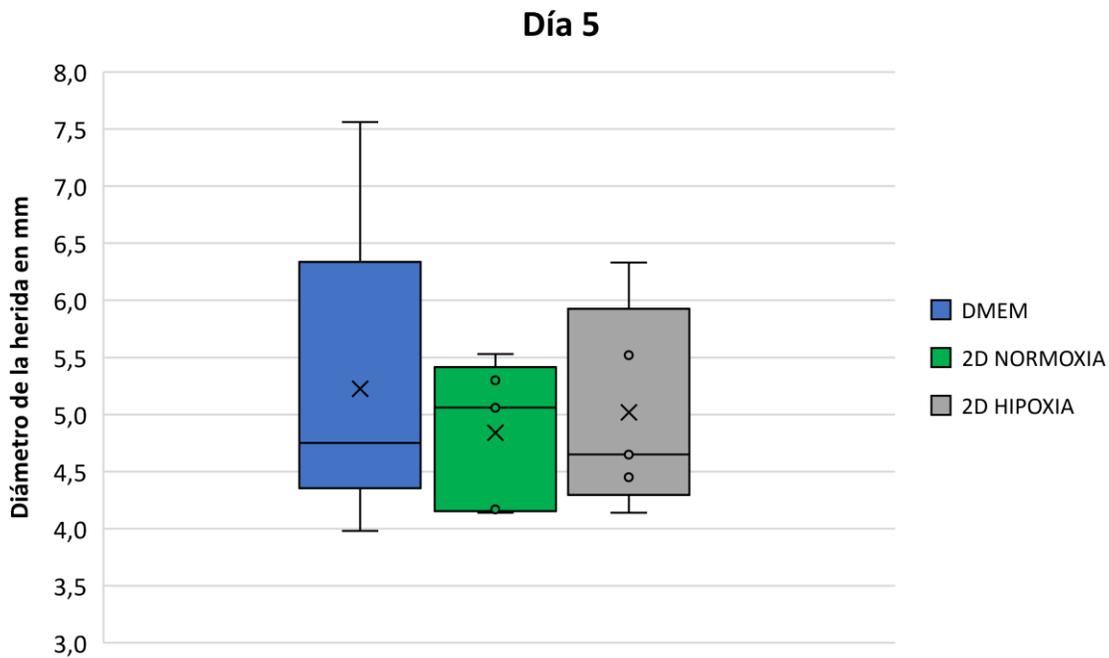


Figura 54. Diámetro promedio de las heridas al día cinco del grupo de tratamiento con MC de cultivos 2D estáticos

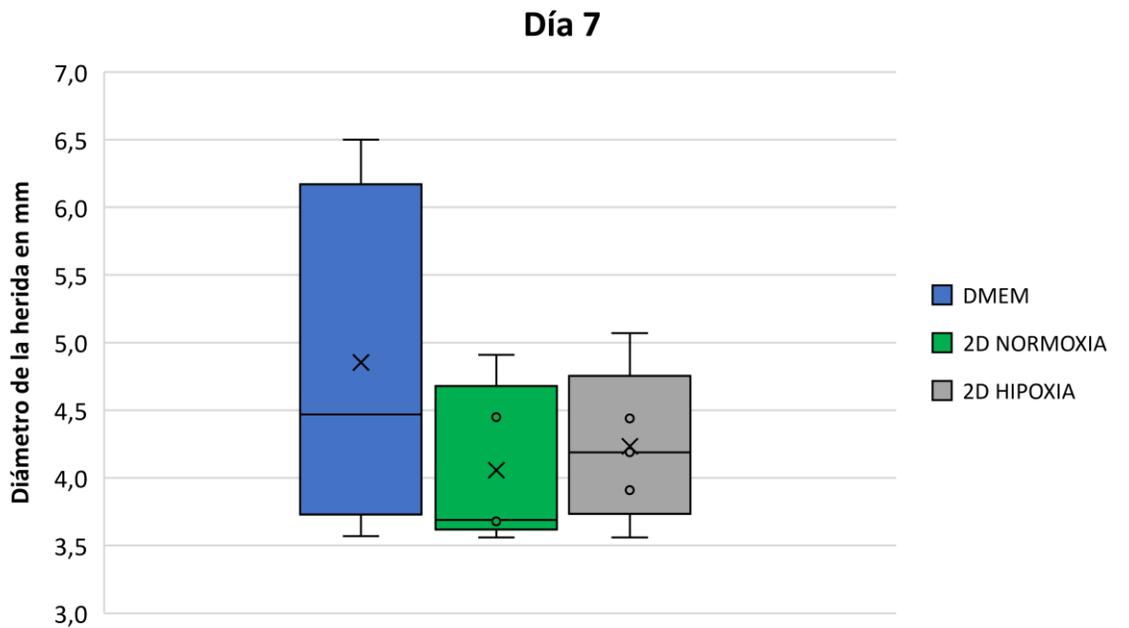


Figura 55. Diámetro promedio de las heridas al día siete del grupo de tratamiento con MC de cultivos 2D estáticos

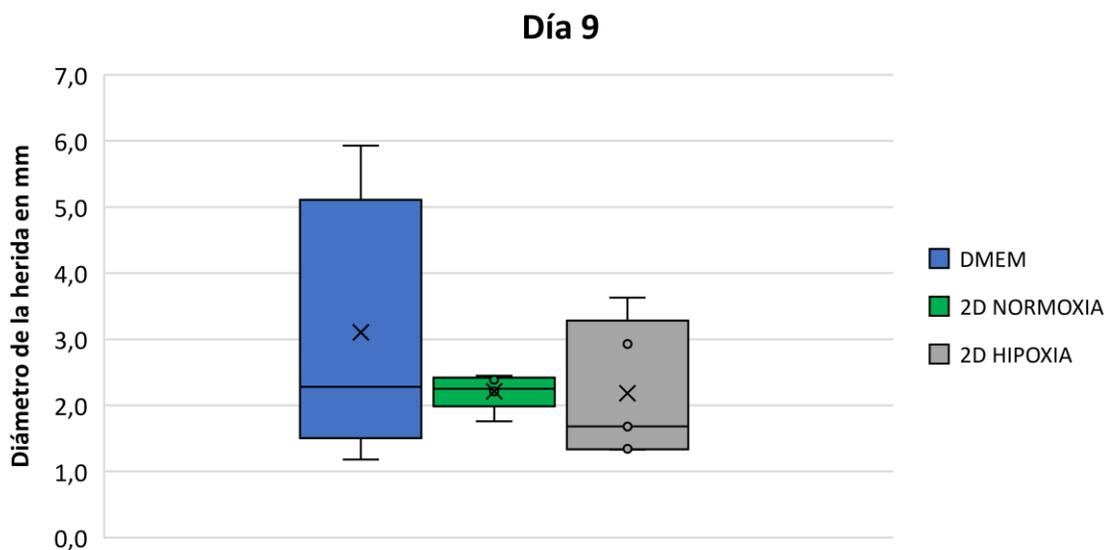


Figura 56. Diámetro promedio de las heridas al día nueve del grupo de tratamiento con MC de cultivos 2D estáticos

La figura 57 muestra la disminución progresiva del tamaño de la herida para el grupo de animales tratados con los MC de A-MSC obtenidos en cultivo 3D dinámico. Se aprecia una diferencia en el diámetro de la herida entre el control y los tratamientos en los días 7 y 9.

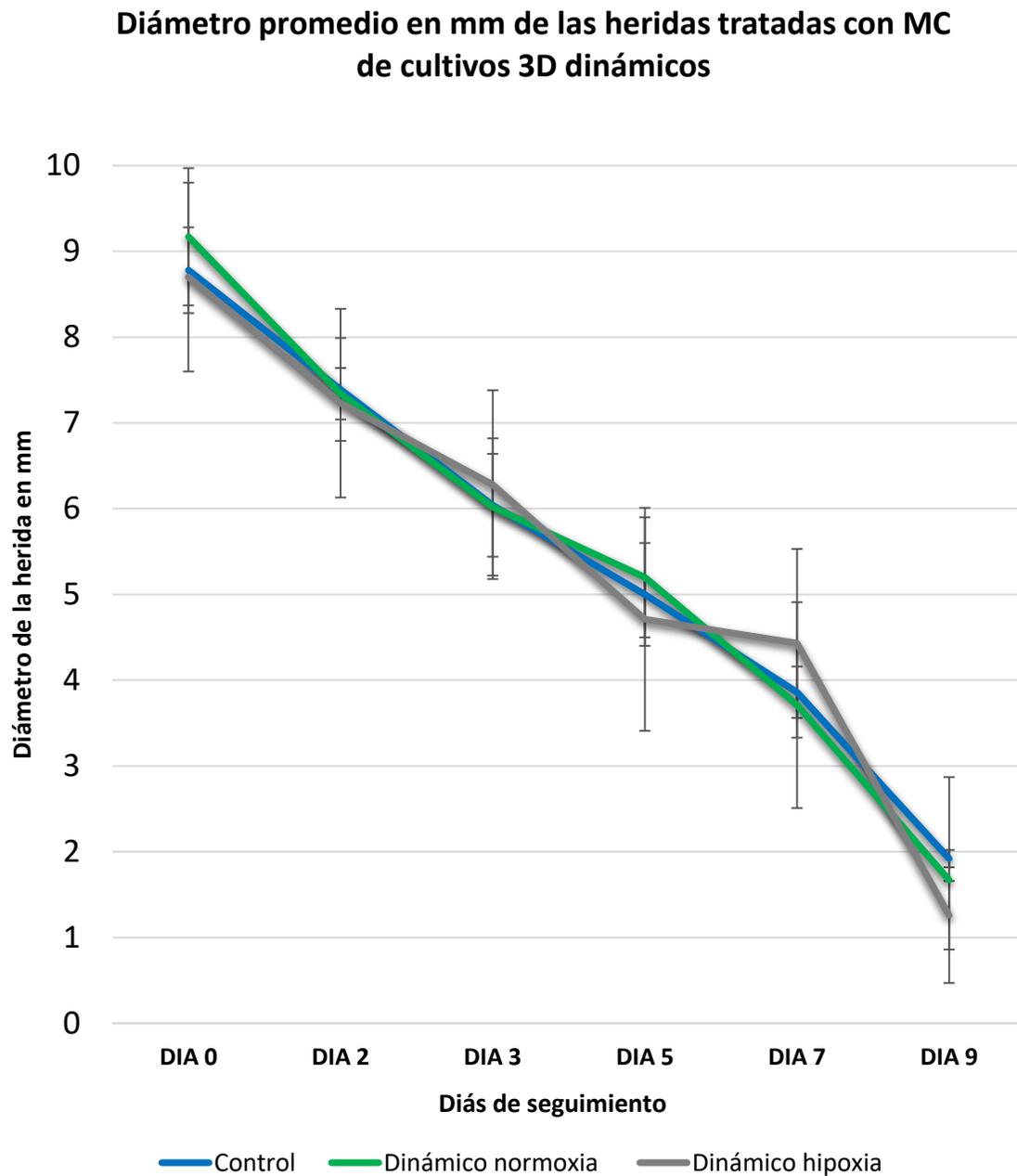


Figura 57. Resultado del cierre de las heridas cutáneas tratadas con MC de las A-MSC cultivadas en el sistema 3D dinámico

En las figuras 58 a 63 se muestran los boxes plots de la medición del diámetro promedio ($n=5$) para cada día del seguimiento, reconociéndose una diferencia estadísticamente significativa entre la herida tratada con el control (DMEM) y la herida tratada con el MC del cultivo 3D dinámico en hipoxia en el día 9 ($p= 0.00902$).

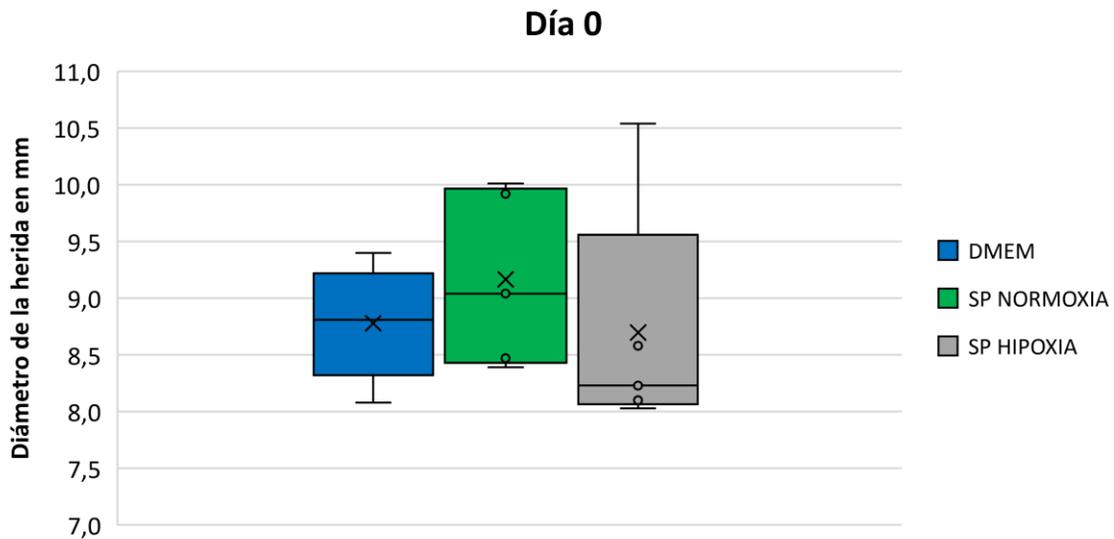


Figura 58. Diámetro promedio de las heridas al día cero del grupo de tratamiento con MC de cultivos 3D dinámicos. SP = cultivo 3D dinámico en spinner flasks

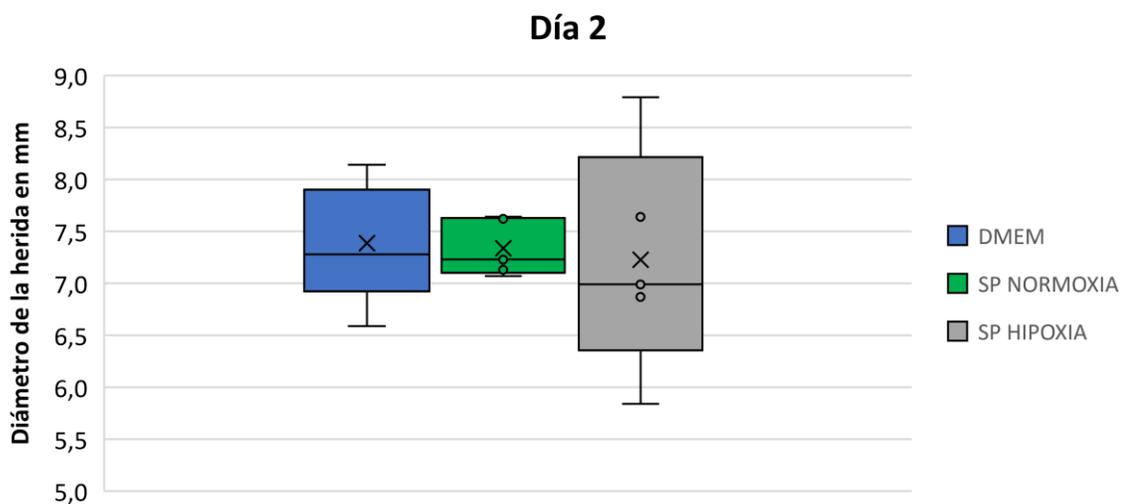


Figura 59. Diámetro promedio de las heridas al día dos del grupo de tratamiento con MC de cultivos 3D dinámicos. SP = cultivo 3D dinámico en spinner flasks

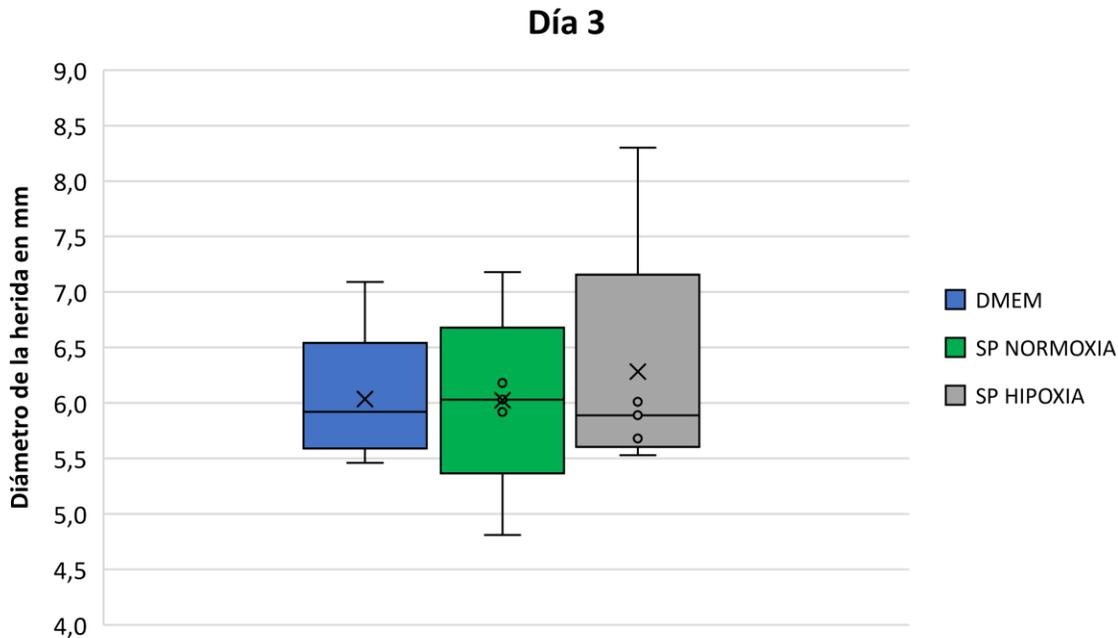


Figura 60. Diámetro promedio de las heridas al día tres del grupo de tratamiento con MC de cultivos 3D dinámicos. SP = cultivo 3D dinámico en spinner flasks

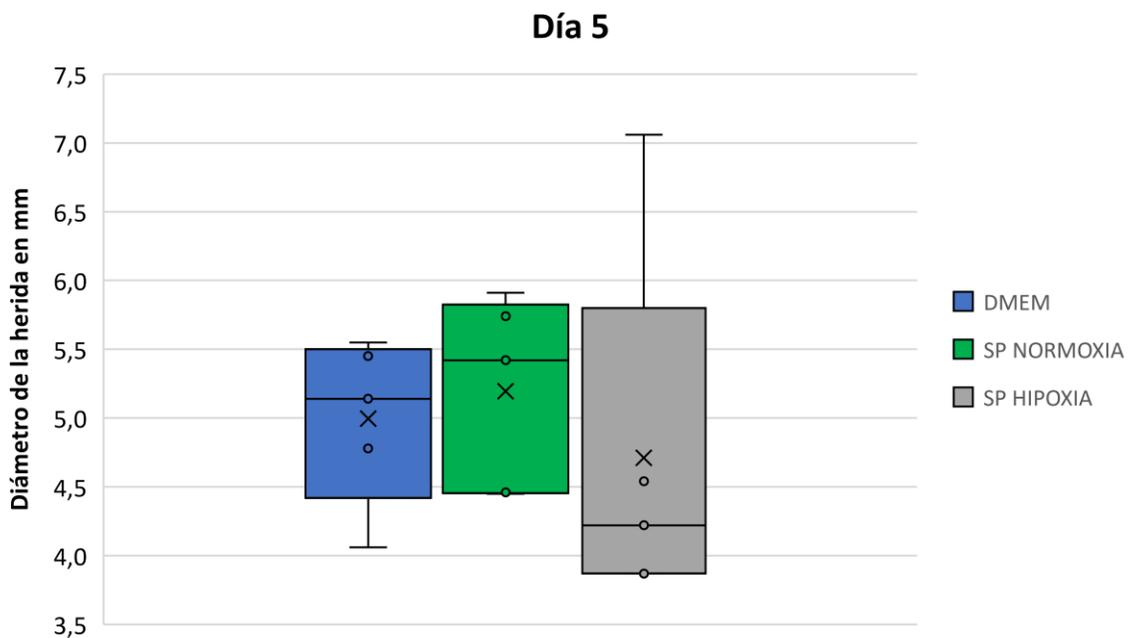


Figura 61. Diámetro promedio de las heridas al día cinco del grupo de tratamiento con MC de cultivos 3D dinámicos. SP = cultivo 3D dinámico en spinner flasks

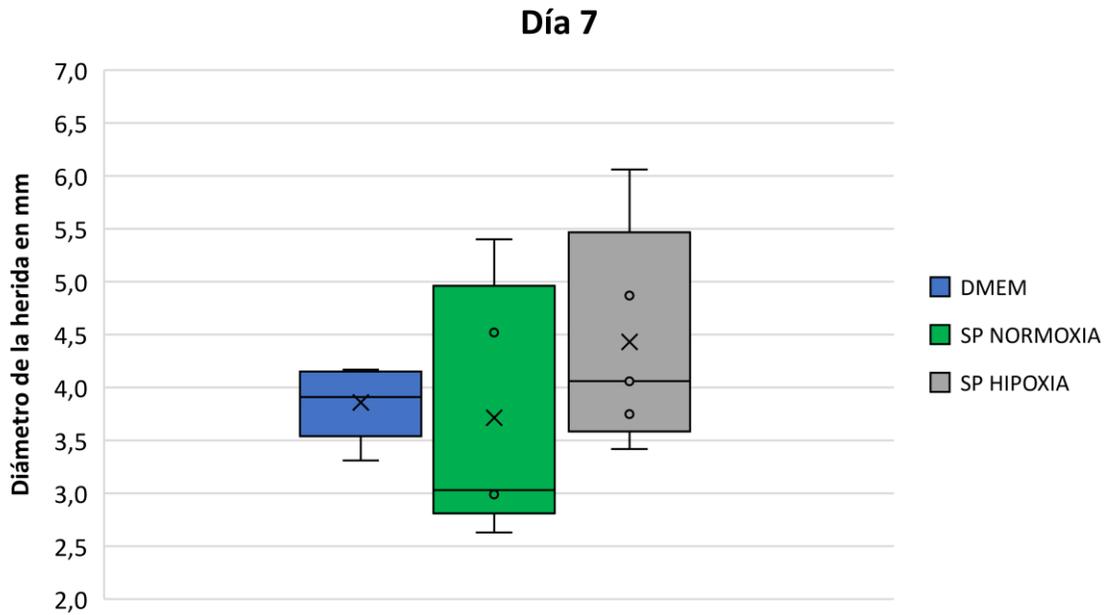


Figura 62. Diámetro promedio de las heridas al día siete del grupo de tratamiento con MC de cultivos 3D dinámicos. SP = cultivo 3D dinámico en spinner flasks

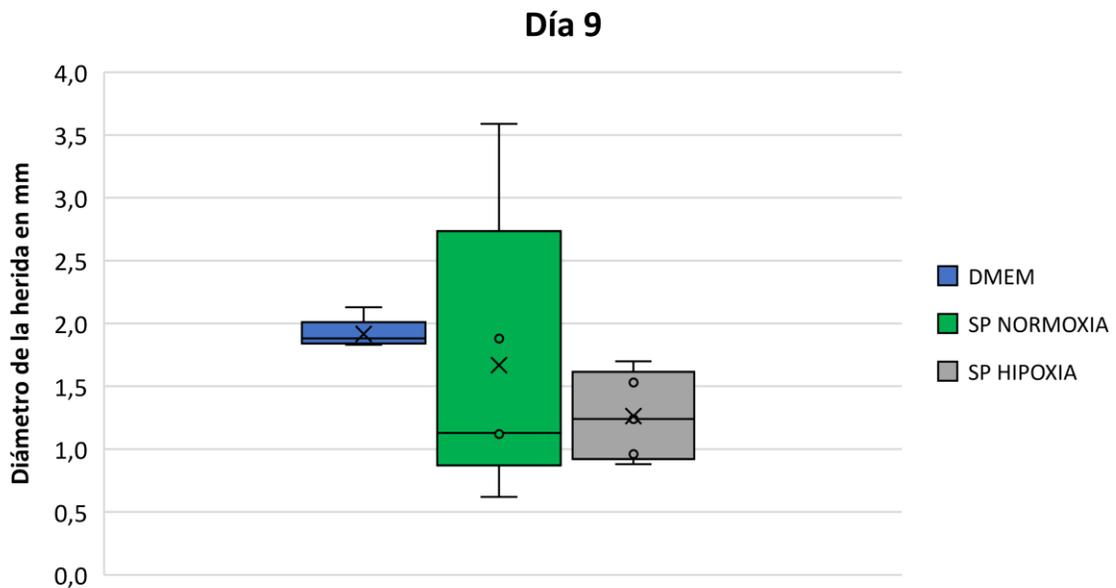


Figura 63. Diámetro promedio de las heridas al día nueve del grupo de tratamiento con MC de cultivos 3D dinámicos. SP = cultivo 3D dinámico en spinner flasks

Se calculó el porcentaje de cierre de la herida al día 9 empleando la fórmula $\text{área original} - \text{área actual} / \text{área original} \times 100$ para cada grupo de experimentación. El grupo 1 correspondiente a los animales con heridas tratadas con MC obtenido en cultivo 2D estático mostró diferencias entre el control (70%) y los tratamientos en normoxia (75%) y en hipoxia (78%). El grupo 2, correspondiente a los animales tratados con el MC obtenido en cultivo 3D dinámico, también mostró diferencias entre el control (78%) y los tratamientos en normoxia (85%) y en hipoxia (86%).

Al efectuar el análisis estadístico se determinó que la variable porcentaje de cierre no tenía distribución normal. Las pruebas de Mann-Whitney para 2D estático en normoxia-2D estático en hipoxia, 2D estático en normoxia-3D dinámico en normoxia, 2D estático en hipoxia-3D dinámico en normoxia y 2D estático en hipoxia-3D dinámico en hipoxia no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.691, 0.222, 0,30$ y $0,141$ respectivamente). Se encontró diferencia estadísticamente significativa para la variable porcentaje de cierre en 2D estático en normoxia-3D dinámico en hipoxia ($p=0,016$). Figura 64.

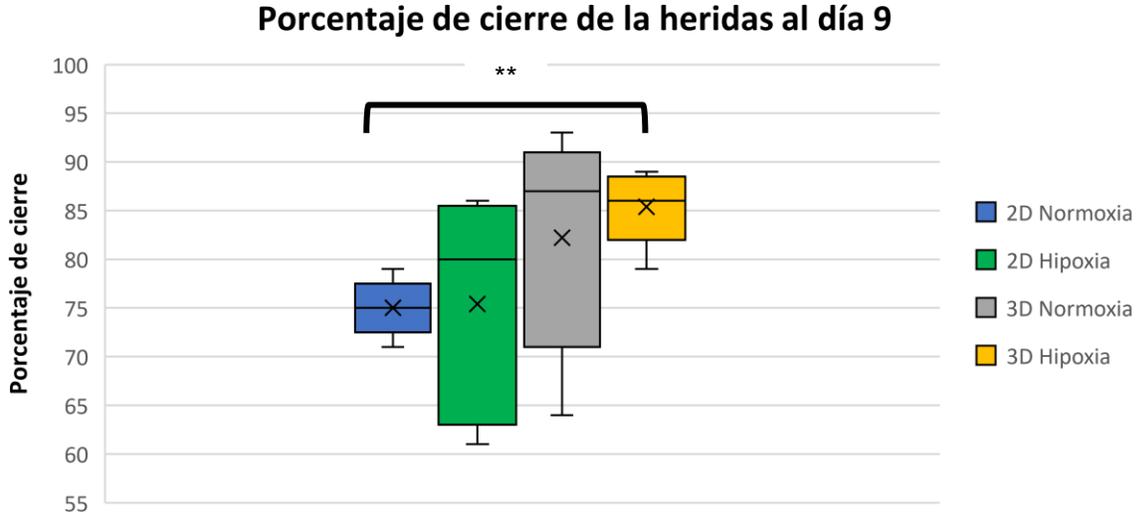


Figura 64. Porcentaje de cierre de las heridas al día nueve para todos los tratamientos con MC de A-MSK. 2D=cultivo 2D estático. 3D =cultivo 3D dinámico.

Se encontró diferencia estadísticamente significativa para la variable porcentaje de cierre en 2D estático en normoxia-3D dinámico en hipoxia ($p=0,016$).

Al final del experimento se efectuó eutanasia de los animales de experimentación y se realizaron las resecciones de la piel donde se efectuaron las heridas iniciales. Estas muestras fueron procesadas con histotécnica convencional y se aplicó el score de cicatrización histológica descrito por Santos et al (43). En las figuras 65 a 73 se muestran imágenes representativas de los cortes histológicos y el valor del score asignado a cada una de ellas.

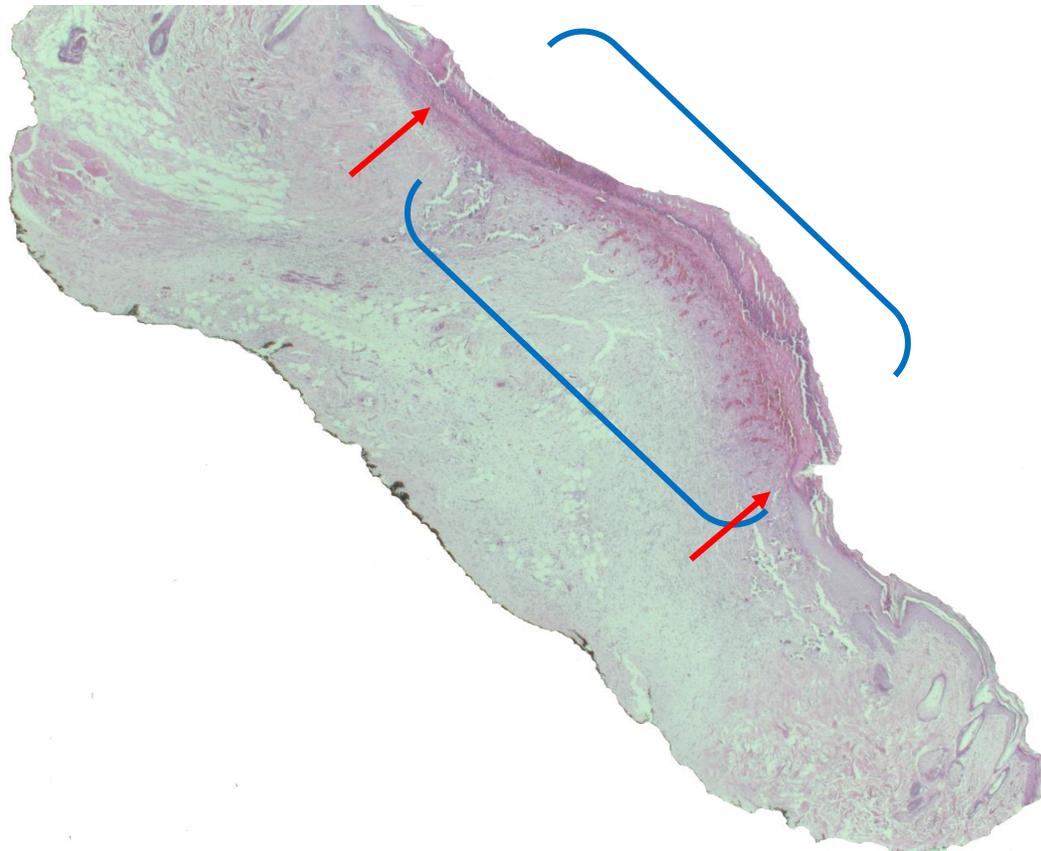


Figura 65. Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 5

La imagen es representativa del score 5 (reepitelización 1, distancia entre márgenes 1, tejido de granulación 1, vascularización 2). Las flechas rojas indican los márgenes epidérmicos y el área entre los corchetes azules muestra un extenso tejido de granulación con numerosos neovasos congestivos con algunos focos de hemorragia reciente superficial. El tejido de granulación está recubierto por costra serohemática. En la dermis reticular se aprecia reacción granulomatosa de tipo cuerpo extraño focal.

Se empleó microscopio óptico con objetivo de 2,5X para efectuar el registro fotográfico.

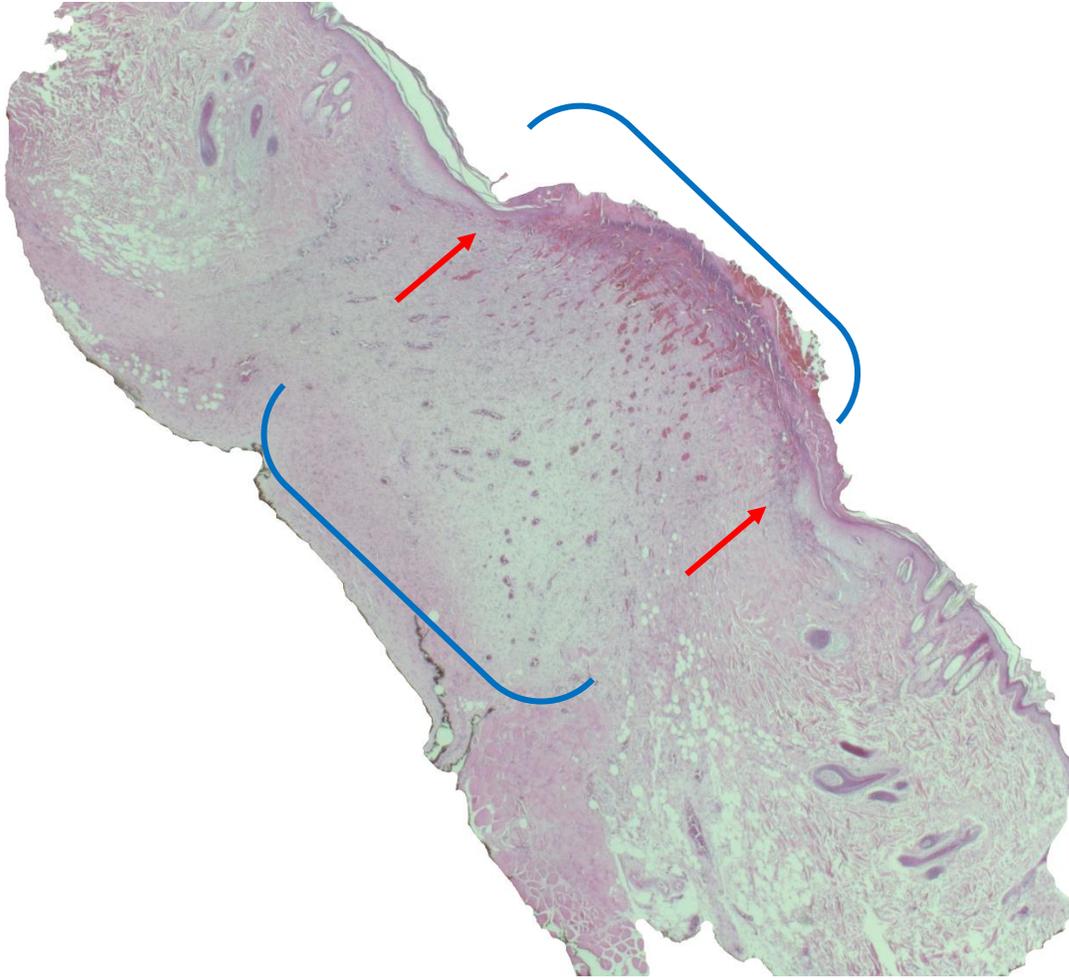


Figura 66. Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 6

La imagen es representativa del score 6 (reepitelización 1, distancia entre márgenes 2, tejido de granulación 1, vascularización 2). Las flechas rojas indican los márgenes epidérmicos y el área entre los corchetes azules muestra un tejido de granulación con numerosos neovasos que se extienden hasta la dermis reticular con edema intersticial. El tejido de granulación está recubierto por costra serohemática.

Se empleó microscopio óptico con objetivo de 2,5X para efectuar el registro fotográfico.

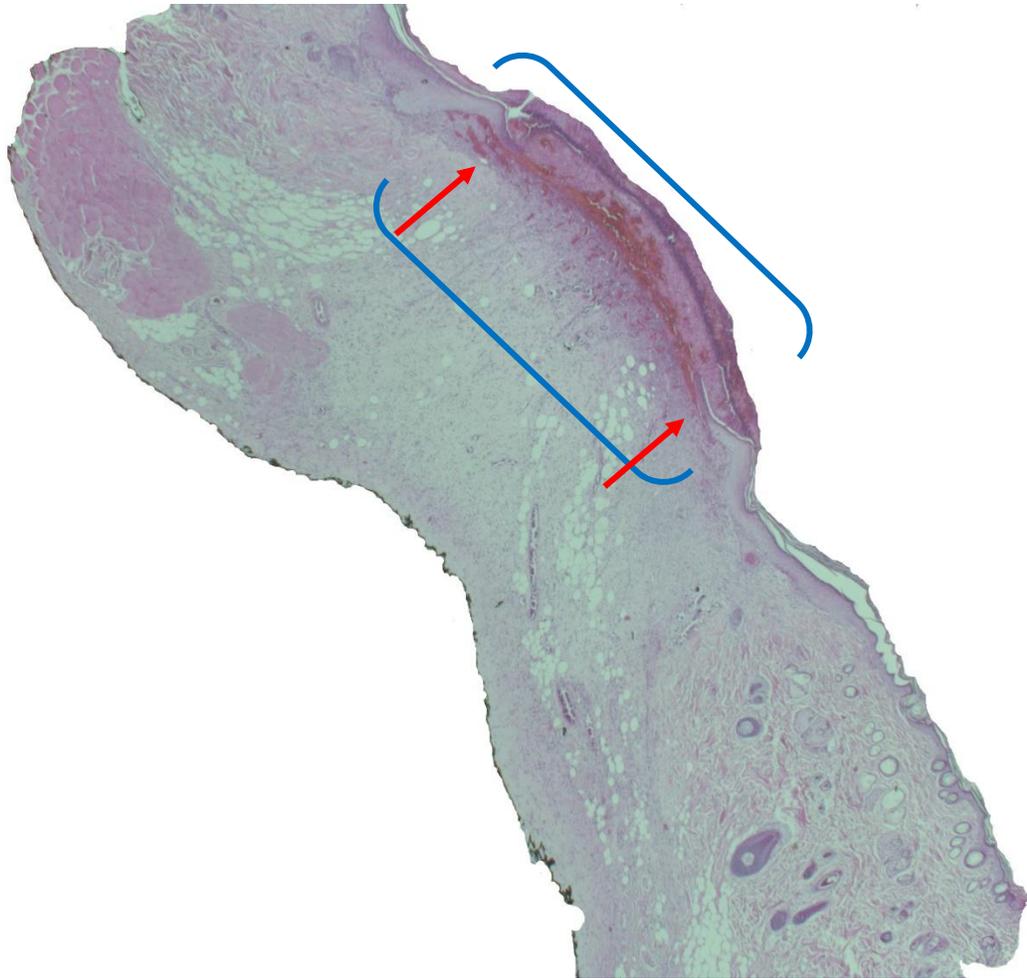


Figura 67. Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 7

La imagen es representativa del score 7 (reepitelización 2, distancia entre márgenes 2, tejido de granulación 1, vascularización 2). Las flechas rojas indican los márgenes epiteliales y el área entre los corchetes azules muestra un tejido de granulación con numerosos neovasos.

Se empleó microscopio óptico con objetivo de 2,5X para efectuar el registro fotográfico.

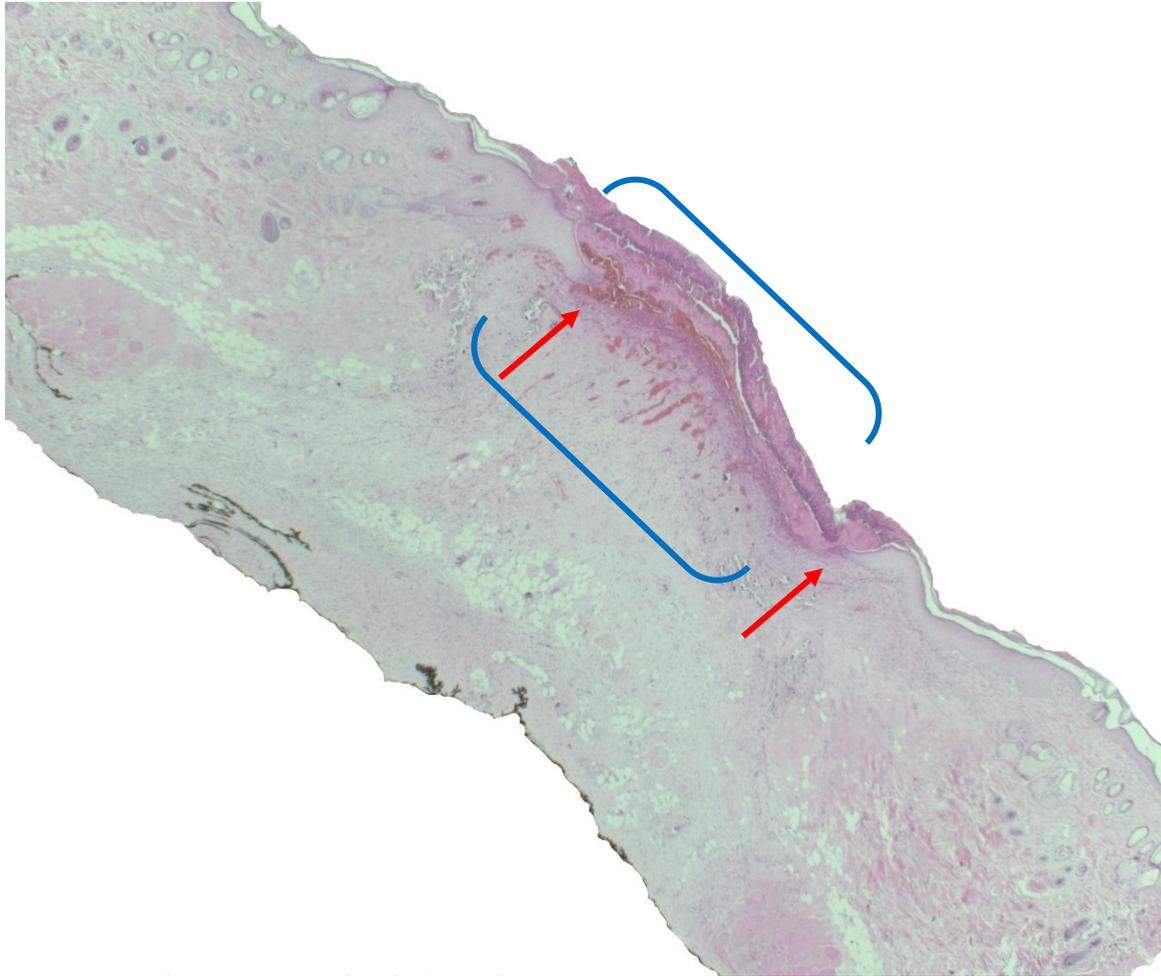


Figura 68. Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 8

La imagen es representativa del score 8 (reepitelización 2, distancia entre márgenes 2, tejido de granulación 2 vascularización 2). Las flechas rojas indican los márgenes epiteliales y el área entre los corchetes azules muestra el tejido de granulación congestivo y recubierto por costra serohemática. Se aprecia ligera

Se empleó microscopio óptico con objetivo de 2,5X para efectuar el registro fotográfico.

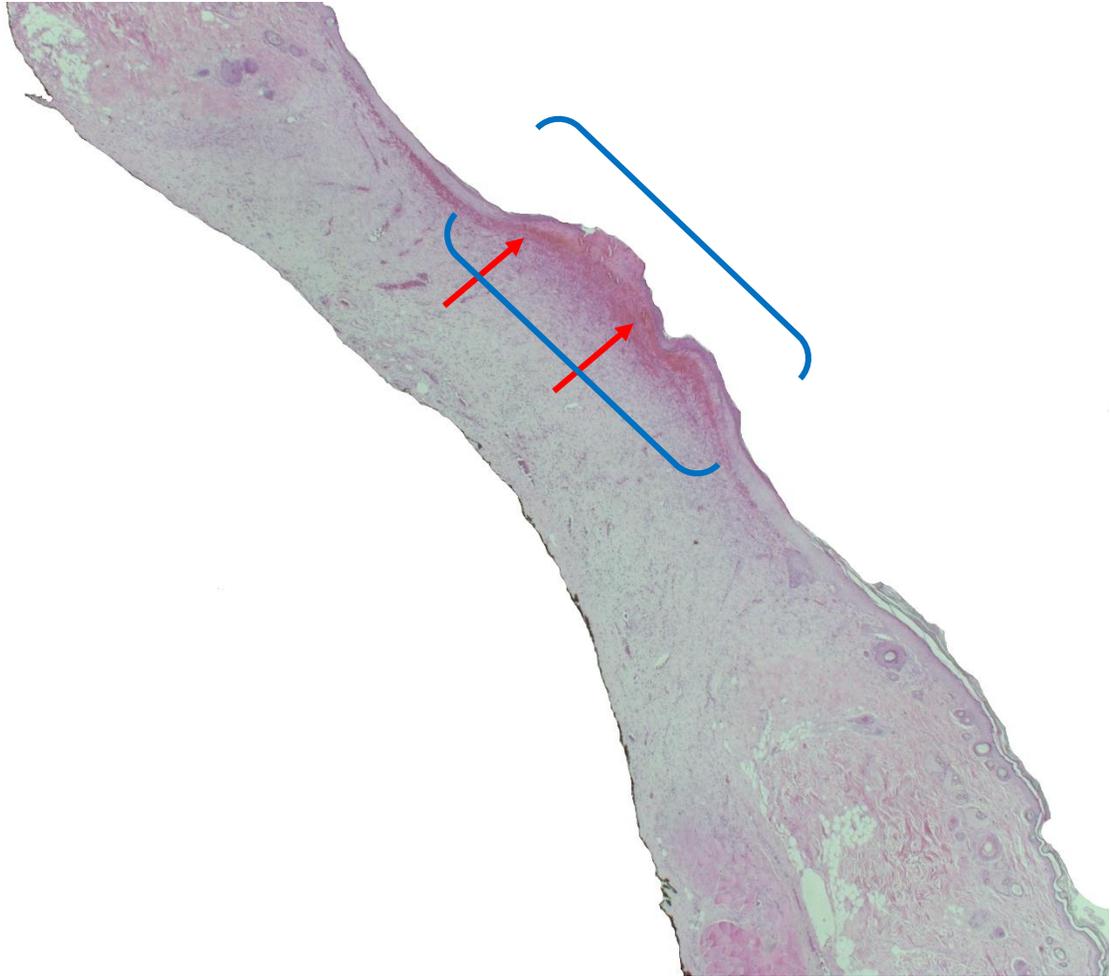


Figura 69. Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 10

La imagen es representativa del score 10 (reepitelización 3, distancia entre márgenes 3, tejido de granulación 3, vascularización 1). Las flechas rojas indican los márgenes epiteliales y el área entre los corchetes azules muestra el tejido de granulación. Se aprecian hemorragias recientes subepidérmica y epidermis regenerada con maduración, aunque con reducción de las papilas intradérmicas.

Se empleó microscopio óptico con objetivo de 2,5X para efectuar el registro fotográfico.



Figura 70. Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata con score histológico 11

La imagen es representativa del score 11 (reepitelización 3, distancia entre márgenes 3, tejido de granulación 3, vascularización 2). Las flechas rojas indican los márgenes epiteliales y el área entre los corchetes azules muestra el reducido tejido de granulación con persistencia de los neovasos congestivos, pero sin hemorragias. Está recubierto por costra serohemática. La epidermis continúa su proceso de cierre y muestra papilomatosis incipiente y engrosamiento de la capa córnea.

Se empleó microscopio óptico con objetivo de 2,5X para efectuar el registro fotográfico.

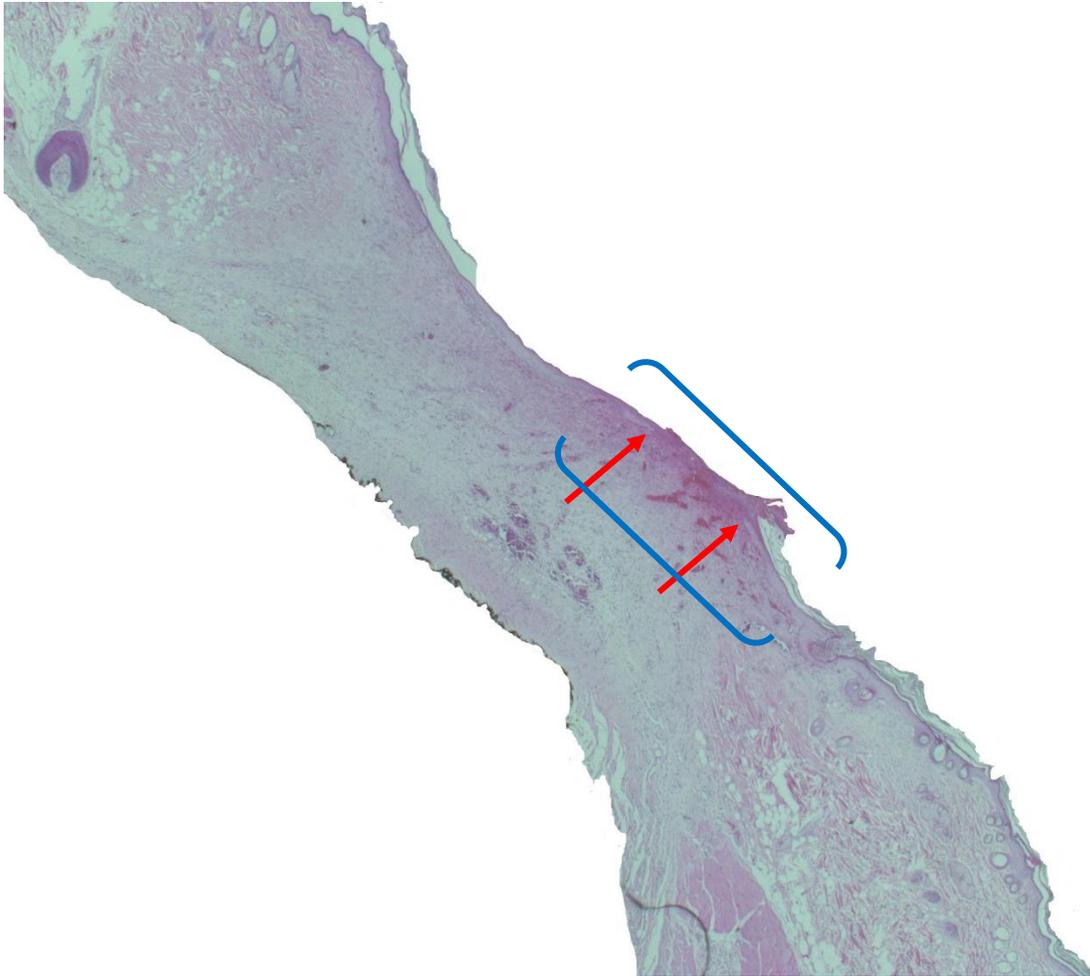


Figura 71. Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata score histológico 12

La imagen es representativa del score 12 (reepitelización 3, distancia entre márgenes 3, tejido de granulación 3, vascularización 3). Las flechas rojas indican los márgenes epiteliales y el área entre los corchetes azules muestra el reducido tejido de granulación con persistencia de los neovasos congestivos. En la dermis se aprecian áreas de reacción granulomatosa de tipo cuerpo extraño y edema intersticial. La epidermis continúa su proceso de cierre y muestra papilomatosis incipiente y engrosamiento de la capa córnea.

Se empleó microscopio óptico con objetivo de 2,5X para efectuar el registro fotográfico.



Figura 72. Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal de rata score histológico 13

La imagen es representativa del score 13 (reepitelización 3, distancia entre márgenes 3, tejido de granulación 3, vascularización 4). Las flechas rojas indican los márgenes epiteliales conectados por una pequeña esclero-costra que descansa sobre tejido dérmico inmaduro, edematoso.

Se empleó microscopio óptico con objetivo de 2,5X para efectuar el registro fotográfico.

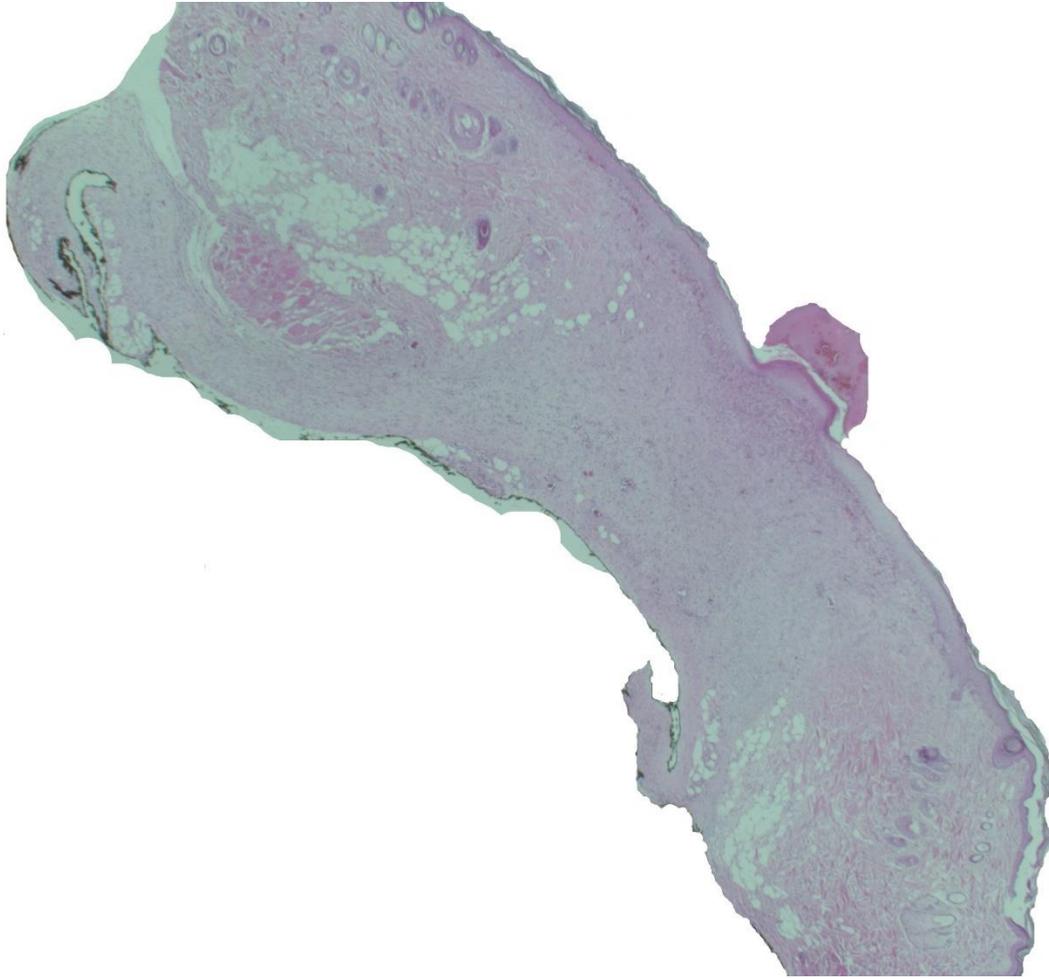


Figura 73. Biopsia del cierre de la herida en piel dorsal con score histológico 14

La imagen es representativa del score 14 (reepitelización 4, distancia entre márgenes 4, tejido de granulación 3, vascularización 3). Se aprecia reepitelización completa, y desaparición del tejido de granulación. Dermis papilar celular con desaparición del edema intersticial. Dermis reticular cicatrizada. No se aprecia formación de anexos ni de panículo carnoso en la zona de la herida original.

Se empleó microscopio óptico con objetivo de 2,5X para efectuar el registro fotográfico.

En las tablas 12 y 13 se presentan los resultados de la aplicación del score histológico a cada grupo de experimentación. Estos resultados corresponden al promedio de la evaluación efectuada para cada lámina histológica por parte de dos patólogos de manera independiente.

Tabla 12. Resultados de la aplicación del score histológico grupo 1: heridas tratadas con MC de A-MSc obtenidos en cultivo 2D estático

Animal	Condiciones	Reepitelización		Distancia entre márgenes		Tejido de granulación		Vascularización		Score Total (Promedio)
		#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2	
	Patólogo									
Rata 221	Control	2	1	2	1	2	0	2	1	5,5
	Normoxia	2	1	2	1	2	0	2	1	5,5
	Hipoxia	1	0	1	1	1	1	2	1	4
Rata 222	Control	3	3	3	3	1	1	1	1	8
	Normoxia	3	4	3	4	2	2	2	2	10
	Hipoxia	4	4	4	4	4	4	4	2	15
Rata 224	Control	1	1	1	1	1	0	2	2	4,5
	Normoxia	2	1	2	1	2	1	1	1	5,5
	Hipoxia	4	4	4	4	4	2	3	3	14
Rata 225	Control	3	3	3	3	3	1	1	3	10
	Normoxia	2	3	2	3	2	2	2	3	9,5
	Hipoxia	2	3	2	3	2	0	2	1	7,5
Rata 226	Control	1	3	2	3	1	2	2	2	8
	Normoxia	3	3	3	2	2	1	2	1	8,5
	Hipoxia	4	3	4	3	4	2	3	3	13

Al efectuar el análisis estadístico de la variable score total para los dos grupos de tratamiento se encuentra que no presenta distribución normal por lo cual se emplean pruebas no paramétricas.

Las pruebas de Mann-Whitney para el grupo 1 no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el control y la variable MC obtenido en cultivo 2D estático en normoxia ($p= 0,523$) ni al comparar el control y la variable MC obtenido en cultivo 2D estático en hipoxia ($p= 0,345$). Tampoco hay diferencias estadísticamente significativas al comparar

los resultados de los tratamientos con MC obtenido en cultivo 2D estático en normoxia- MC obtenido en cultivo 2D estático en hipoxia ($p= 0,3457$).

Tabla 13. Resultados de la aplicación del score histológico grupo 2: heridas tratadas con MC de A- MSC obtenidos en cultivo 3D dinámico

Animal	Condiciones	Reepitelización		Distancia entre márgenes		Tejido de granulación		Vascularización		Score Total (promedio)
		#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2	
	Patólogo									
Rata 227	Control	2	2	2	2	0	1	1	1	5,5
	Normoxia	3	3	3	3	3	1	3	2	10,5
	Hipoxia	4	4	4	4	4	2	3	3	14
Rata 229	Control	3	4	3	4	1	0	1	0	8
	Normoxia	4	4	3	4	4	4	3	3	14,5
	Hipoxia	3	4	3	4	3	3	2	3	12
Rata 230	Control	1	1	1	1	1	1	2	1	4,5
	Normoxia	4	4	4	4	4	3	3	3	14,5
	Hipoxia	4	4	4	4	4	1	3	3	13,5
Rata 231	Control	3	3	3	3	2	2	2	2	10
	Normoxia	4	4	4	4	2	0	1	2	10,5
	Hipoxia	4	4	4	4	4	1	3	2	13
Rata 232	Control	2	3	2	3	2	0	2	2	8
	Normoxia	3	3	3	3	3	1	2	2	10
	Hipoxia	4	3	4	3	4	2	2	3	12,5

Las pruebas de Mann-Whitney para el grupo 2 muestran diferencias estadísticamente significativas entre el control y la variable MC obtenido en cultivo 3D dinámico en normoxia, ($p= 0.01116$); así como, entre el control y la variable MC obtenido en 3D dinámico en hipoxia ($p= 0, 0.0088$). Figura 74.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los resultados de MC obtenido en cultivo 3D dinámico en normoxia - MC obtenido en cultivo 3D dinámico en hipoxia ($p=0,5993$).

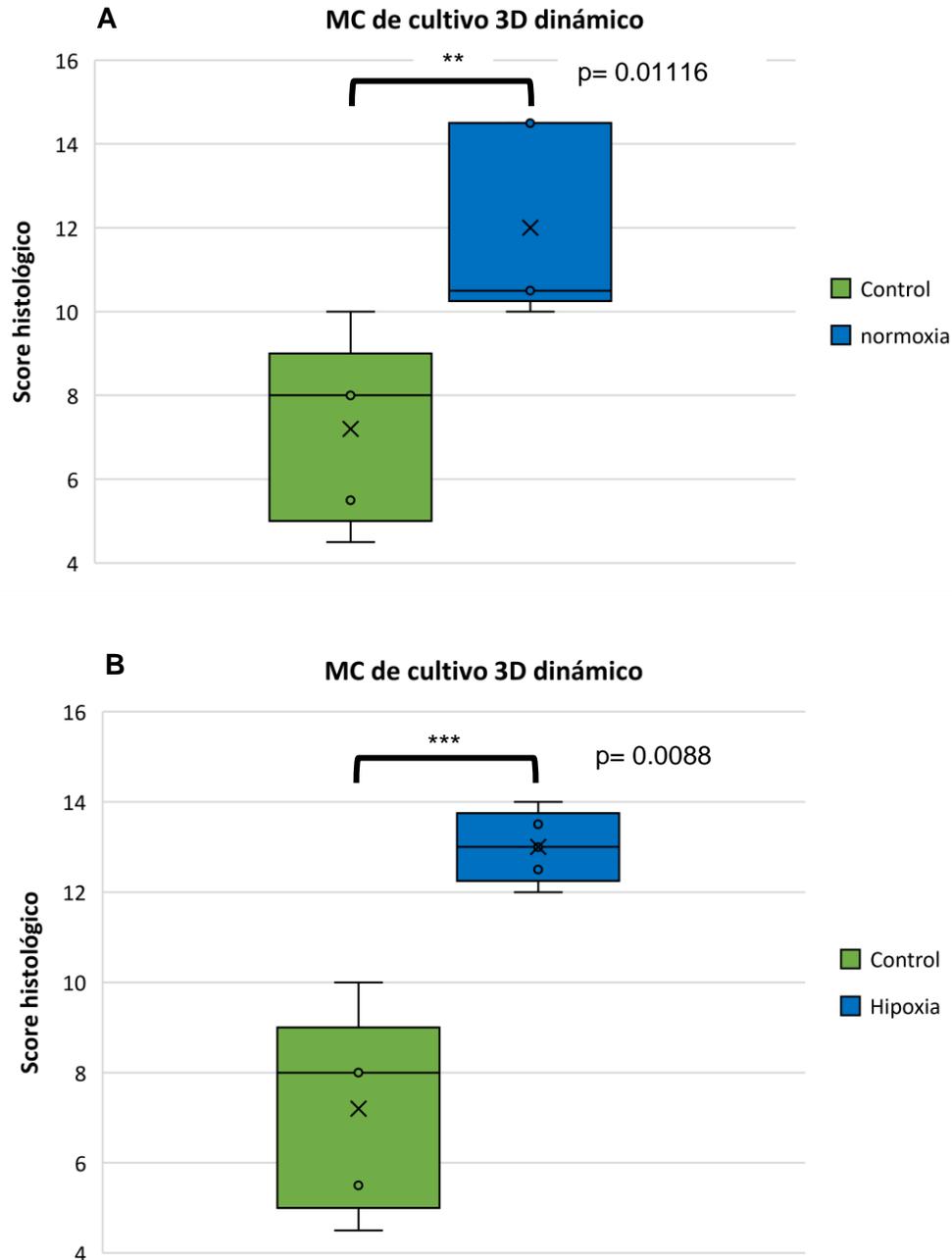


Figura 74. Resultados del score histológico con diferencias estadísticamente significativas del grupo 2.

Las pruebas de Mann-Whitney para el grupo 2 muestran diferencias estadísticamente significativas para: **A.** el control y la variable MC obtenido en cultivo 3D dinámico en normoxia ($p=0.01116$). **B.** el control y la variable MC obtenido en 3D dinámico en hipoxia ($p=0,0088$).

En la figura 75 se muestran los resultados de la comparación del score histológico entre los diferentes sistemas de cultivo, tanto en normoxia como en hipoxia.

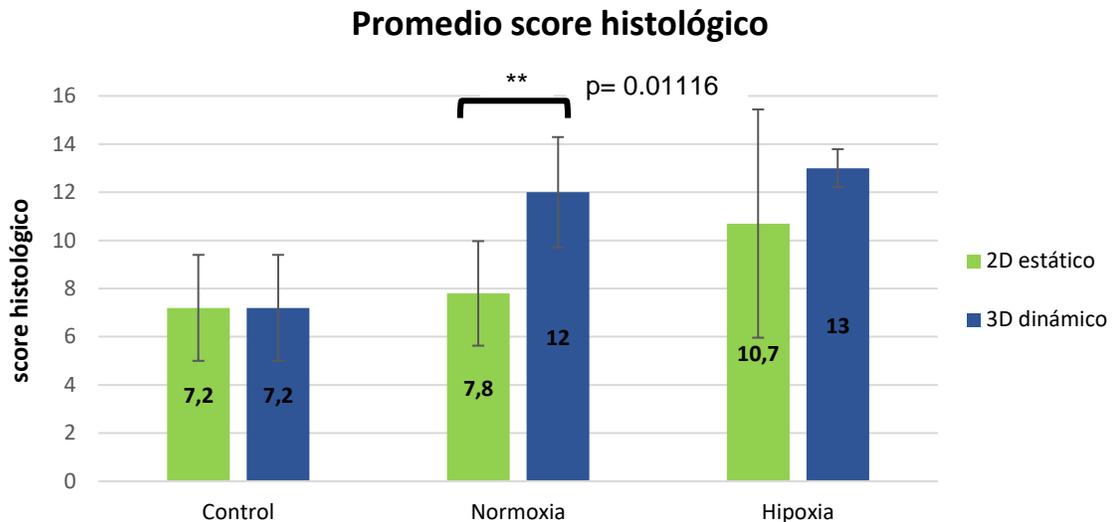


Figura 75. Score total de los cultivos 2D estáticos en comparación con el score total de los cultivo 3D dinámicos. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los scores histológicos de los MC obtenidos en normoxia para los diferentes sistemas de cultivo ($p= 0.01116$),

Para evaluar la angiogénesis, se practicó estudio de inmunohistoquímica con anti-CD31 de cada biopsia cutánea incluida en parafina con el objetivo de cuantificar la densidad de los vasos sanguíneos en el tejido. El conteo total de los vasos se efectuó en 5 campos de 20X para cada una de las muestras de piel reseca y el promedio de dicho conteo corresponde a la densidad vascular. En la figura 76 se muestra una imagen representativa de un campo de 20X donde se señalan con una estrella los vasos sanguíneos positivos para anti-CD31.

En la tabla 14 se presentan los resultados de la densidad vascular para cada una de las heridas tratadas con el DMEM bajo en glucosa (control) o con los diferentes tipos de MC. Estos resultados corresponden al promedio de la evaluación efectuada a todas las fotografías por parte de dos patólogos de manera independiente.

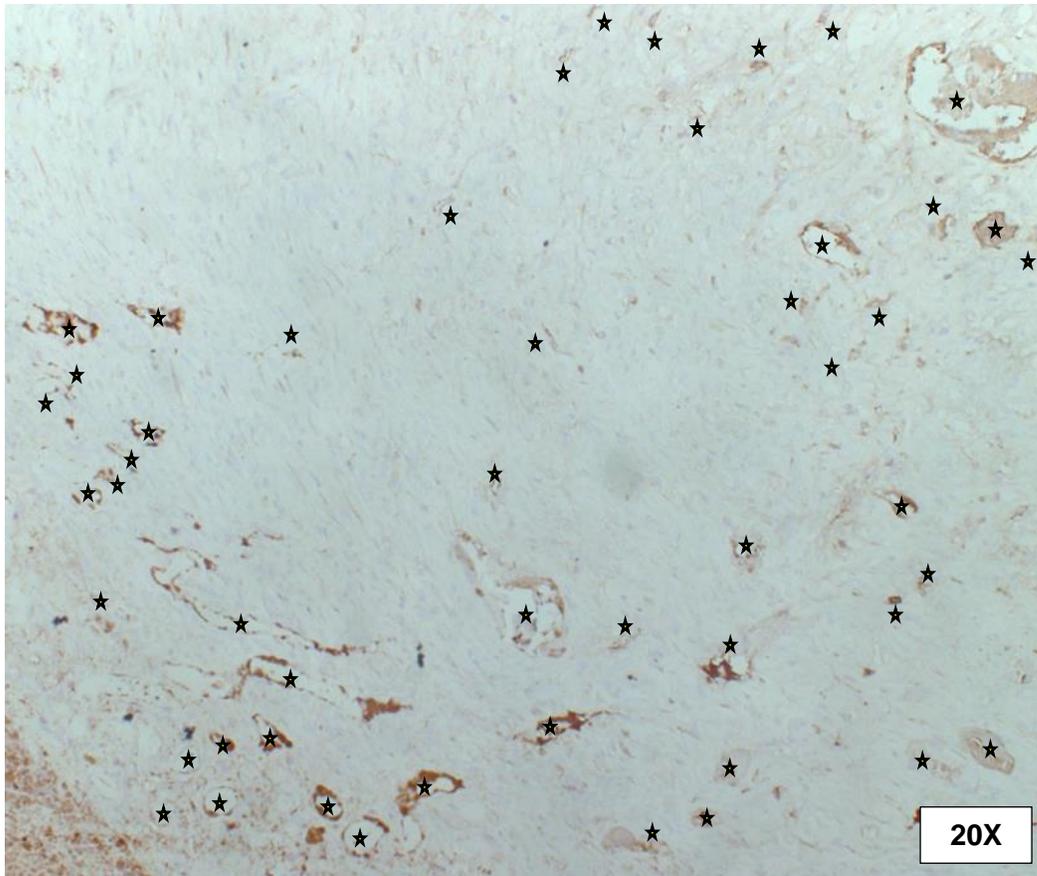


Figura 76. Inmunohistoquímica con AntiCD31. Fotografía representativa de un campo de 20X en el que se efectuó el conteo de los vasos sanguíneos marcados con el anticuerpo monoclonal CD31.

Al efectuar el análisis estadístico de la variable densidad vascular para los dos grupos de tratamiento se encuentra que no presenta distribución normal por lo cual se emplean pruebas no paramétricas. Las pruebas de Mann-Whitney para el grupo 1 no demostraron diferencias estadísticamente significativas entre el control y la variable cultivo 2D estático en normoxia ($p= 0,55$) ni entre el control y la variable cultivo 2D estático en hipoxia ($p= 0,42$).

Las pruebas de Mann-Whitney para el grupo 2 no demostraron diferencias estadísticamente significativas entre el control y la variable cultivo 3D dinámico en normoxia ($p= 0,55$) ni entre el control y la variable cultivo 3D dinámico en hipoxia ($p= 0,093$).

Tabla 14. Densidad vascular de las heridas cutáneas dorsales evaluadas mediante inmunohistoquímica con AntiCD31

Condiciones	GRUPO 1 MC DE A-MSc CULTIVADAS EN EL SISTEMA 2D ESTÁTICO		GRUPO 2 MC DE A-MSc CULTIVADAS EN EL SISTEMA 3D DINÁMICO	
	Animal	Densidad vascular	Animal	Densidad vascular
Control	Rata 221	109	Rata 227	94
Normoxia		128		41
Hipoxia		129		34
Control	Rata 222	72	Rata 229	33
Normoxia		12		46
Hipoxia		40		28
Control	Rata 224	238	Rata 230	40
Normoxia		107		32
Hipoxia		97		34
Control	Rata 225	59	Rata 231	70
Normoxia		35		47
Hipoxia		58		28
Control	Rata 226	33	Rata 232	99
Normoxia		14		88
Hipoxia		24		67

Sin embargo, aunque no se aprecia diferencia estadísticamente significativa, si se observó durante la evaluación histológica de las heridas (en 4 de las 5 biopsias del grupo 1 y en 3 de las 5 biopsias del grupo 2) tratadas con MC de A-MSc existe una menor densidad vascular en comparación con sus respectivos controles, lo cual está acorde con la observación de los patólogos que refiere la presencia de un proceso de cicatrización dermal más avanzado.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre los resultados de la densidad vascular de los grupos 1 y 2: cultivo 2D estático en normoxia-3D dinámico en normoxia ($p= 0.84$) ni entre cultivo 2D estático en hipoxia-3D dinámico en hipoxia ($p=0,29$). Figura 77.

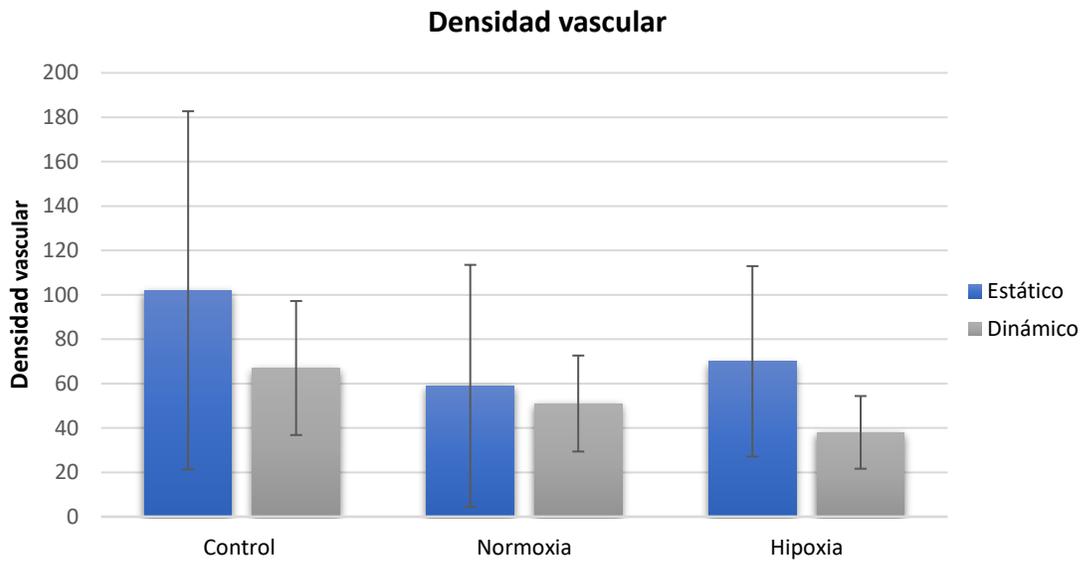


Figura 77. Densidad vascular de los cultivos 2D estáticos y 3D dinámicos tanto en normoxia como en hipoxia.

5. DISCUSIÓN

El proceso de evaluación de los MC de A-MSc como posible opción terapéutica en la regeneración-reparación de heridas óseas y cutáneas requiere no solo de aumentar el volumen de producción, sino evaluar las variables de cultivo que pueden afectar la composición y, por tanto, la capacidad funcional del producto. Así mismo, es necesario determinar cuáles variables promueven el enriquecimiento de los MC con fines terapéuticos particulares.

Este trabajo de investigación no sólo dio el primer paso del proceso de escalamiento de la producción de MC de A-MSc, sino que se desarrolló una metodología que permitió comparar la composición y la funcionalidad (mediante ensayos *in vitro* de angiogénesis y un ensayo *in vivo* de curación de heridas cutáneas) de los MC obtenidos en dos diferentes sistemas de cultivo: uno 2D estático y uno 3D dinámico, tanto en normoxia como en hipoxia.

Los cultivos 3D dinámicos pueden efectuarse en biorreactores acoplados a microtransportadores (de modo que pueda permitirse el crecimiento de billones de células adherentes) y existen múltiples publicaciones que plantean las condiciones para el desarrollo del protocolo ideal. Así mismo, estas refieren que el cambio del sistema de cultivo 2D estático a uno dinámico debe hacerse mediante un proceso de escalamiento gradual siguiendo buenas prácticas de manufactura (43,45,47,53,55,56,107–109).

Con estas recomendaciones en mente y teniendo el apoyo del grupo de investigación SGERG-iBB-IST, se inició el escalamiento de la producción de los MC empleando un sistema 3D dinámico de volumen pequeño a mediano (spinner flasks acoplados a microtransportadores). Para desarrollar el protocolo de cultivo en este nuevo sistema se consideraron las siguientes variables: medio de cultivo a emplear, tipo de suplementación,

tipo de microtransportadores, protocolo de recubrimiento de los microtransportadores, régimen de agitación y protocolo para el desprendimiento celular (52,110,111).

La selección del medio de cultivo DMEM bajo en glucosa y la suplementación con HPL se basó en la experiencia exitosa de nuestro grupo de investigación con el uso de estos reactivos en cultivos 2D estáticos (112), los resultados obtenidos por Heathman y colaboradores en los cultivos dinámicos de BM-MSK (107), el crecimiento óptimo de las MSK empleando esta combinación de reactivos en cultivos en spinner flasks acoplados a microtransportadores informado en la literatura (41,58,111) y la necesidad de mantener las condiciones xenofree. El HPL también se empleó para mejorar la adherencia celular a los microtransportadores empleando el protocolo de recubrimiento descrito por Sousa et al (113), el cual es empleado rutinariamente en ensayos que incorporan microtransportadores plásticos SoloHill en el grupo SGERG-iBB-IST.

La elección de los microtransportadores se basó en la conservación de las condiciones xenofree del cultivo, los resultados del estudio de Rafiq y colaboradores (114) quienes recomiendan el uso de microtransportadores plásticos cuya composición concede mayor resistencia a la ruptura en comparación con los constituidos por gelatina o dextrano, los cuales se han fragmentado en otros ensayos con las velocidades de agitación usadas en nuestro protocolo (114), la experiencia del SGERG-iBB-IST (41,57,111,113), la disponibilidad de recursos y el costo de los mismos.

Otro factor esencial para el éxito del cultivo es determinar el régimen de agitación que garantice el mantenimiento de los microtransportadores en suspensión homogénea, la transferencia de nutrientes y el menor estrés hemodinámico (41). El SGERG-iBB-IST ha evaluado el estrés hemodinámico generado en spinners flasks de vidrio Bellco® con volúmenes de 80 mL empleando un régimen de agitación continua (velocidad entre 30 y 40 RPM) como el empleado en este estudio, encontrando valores de 3-4 dyn/cm² (41,58,110). Estos valores de estrés hemodinámico garantizan una adecuada viabilidad y adherencia celular sin comprometer el fenotipo (115–117).

El régimen de desprendimiento celular fue modificado del descrito por Carmelo et al (58) reduciendo de 60 a 35 mL la cantidad de TrypLE Select (Gibco®) usada para la disociación enzimática y disminuyendo el régimen de agitación de 60 a 40 RPM para mantener en un

rango aceptable el estrés hemodinámico. Con estas modificaciones se alcanzó un porcentaje promedio de recolección del 61%, que en nuestro caso es suficiente, dado que el objetivo de nuestros cultivos celulares es la recolección de los MC y no de las células A-MSc para trasplante celular.

Una vez establecidas todas las condiciones del cultivo 3D dinámico se seleccionaron las A-MSc. Los cuatro lotes empleados mostraron los perfiles de inmunofenotipificación esperados para los marcadores CD45, CD73, CD80, CD90 y HLA-DR con disminución de la expresión del CD105 (de las A-MSc antes y después de los cultivos), un aumento del CD34 (en las células de los lotes 1 al 3 recolectadas al final de los cultivos 2D estáticos) y un aumento del CD14 (52%) en las células recolectadas al final del cultivo 3D dinámico en normoxia.

Esta reducción en la expresión del CD105 está descrita en la literatura y se explica por variaciones en las condiciones de cultivo: cultivos de A-MSc empleando medios libre de suplementación muestran una expresión disminuida de esta proteína (118) y células mesenquimales de fluido amniótico (AF-MSc) cultivadas en DMEN suplementado con SFB muestra una expresión en solo el 38,75% de la población (119). Adicionalmente, se ha demostrado que existen subpoblaciones de MSc que son negativas para CD105 que parecen poseer una capacidad de modulación inmunológica mucho más fuerte en comparación con las células CD105 positivas de las mismas fuentes (120).

Por el contrario, se esperaba que las MSc fueran negativas para CD34, sin embargo, la presencia de unas subpoblaciones positivas puede corresponder a células madre vasculares que residen en los capilares y en la adventicia de grandes vasos sanguíneos, las cuales se caracterizan por un perfil CD34+CD31-CD140b-SMA- (121). En cuanto al CD14 positivo en las MSc del cultivo 3D en normoxia, nos muestra una subpoblación adherente que no correspondería al perfil de inmunofenotipificación de las MSc ni de células presentadoras de antígeno (dado que son CD45, CD80 y HLA-DR negativas) y que, con los marcadores empleados en el estudio, no es posible de caracterizar.

Las A-MSc empleadas en este estudio poseían capacidad de diferenciación a linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico, y no se evidenció que el cultivo 3D dinámico ni las diferentes concentraciones de oxígeno impactaran negativamente el potencial de diferenciación, lo cual es acorde con lo descrito por otros autores (43,122).

Al evaluar el crecimiento celular de las A-MSC, la tasa de crecimiento específica y el doblaje poblacional en los cultivos 2D estáticos se aprecia que estos parámetros se encuentran aumentados en el lote 1 en condición de normoxia, mientras que, el lote 3 no mostró diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos en estos mismos parámetros en relación con los niveles de O₂. Estos resultados del lote 3 son semejantes a lo descrito por Oliveira et al (74), quienes no hallaron en sus cultivos de BM-MSC y A-MSC cambios significativos en el doblaje poblacional al comparar las células cultivadas en normoxia con las células cultivadas en hipoxia durante 14 días.

Por el contrario, el lote 4 muestra una mayor tasa de crecimiento en hipoxia en ambos sistemas de cultivo, lo cual también aparece referido en la literatura científica donde se describe que el cultivo 2D estático bajo condiciones de hipoxia incrementa la tasa de proliferación celular (64,66,99,123).

La tasa de crecimiento específico y el doblaje poblacional de las A-MSC en los cultivos 3D dinámicos de los lotes 1 y 2 no muestran diferencias estadísticamente significativas dependientes del nivel de oxígeno del cultivo. Llama la atención el cambio de comportamiento del lote 3, el cual mostraba mejores resultados en los cultivos 2D en normoxia y, en el cultivo 3D dinámico, la tasa de crecimiento y el doblaje poblacional es mayor en hipoxia. Esto sugiere un cambio del comportamiento biológico complejo y sinérgico donde se conjugan los efectos del cambio del sistema de cultivo y los niveles de oxígeno del mismo.

Se destaca el comportamiento del lote 1, el cual muestra un incremento significativo del doblaje poblacional con el cambio del sistema de cultivo sin evidencia de cambios relacionados con el nivel de O₂ (se mantiene el mayor crecimiento en normoxia en ambos sistemas), sin embargo, llama la atención, que específicamente en los cultivos 3D dinámicos en normoxia se presenta una subpoblación celular que es positiva para CD73, CD90, CD14 pero negativa para CD34, CD45, CD80 y HLADR, lo cual no es el perfil esperado de las A-MSC ni tampoco de los macrófagos ni otro tipo de células presentadoras de antígenos. Con la información disponible no es posible determinar a qué tipo de células corresponde esta subpoblación.

Al observar la curva de crecimiento de los cultivos 3D dinámicos se puede establecer que la etapa de crecimiento exponencial se extiende desde el día 4 al 7 y se observa una disminución del número de células después de las 24 horas del inicio del proceso de

recolección de los MC (cuando las células se encuentran en el DMEM sin suplementación). Estos hallazgos sugieren que debe ajustarse el protocolo de cultivo en el sistema 3D dinámico: el séptimo día debe iniciarse el proceso de recolección de los MC y la exposición al DMEM sin suplementación debe limitarse a 24 horas. Así mismo, debe considerarse mantener el suplemento de glucosa en este periodo de tiempo.

Cuando se compara el número de A-MSC obtenidas al final de cada cultivo con la concentración proteica de sus MC, no se reconoce correlación entre estas variables, es decir, tener un mayor número de células no garantiza una mayor concentración de proteínas en el MC. Tampoco se aprecia que un sistema de cultivo en particular o determinados niveles de oxígeno tengan alguna relación con las concentraciones proteicas de los MC.

Cuando se revisan los resultados obtenidos con la prueba de detección de 640 citocinas de Raybiotech y, se limita a aquellas que incrementaron sus concentraciones en dos o más veces con respecto al MC de referencia (MC obtenido en cultivo 2D estático en normoxia) o que fueron detectadas de novo, el lote 1 solo tiene 39 citocinas que cumplen con estos requisitos en el MC de las A-MSC cultivadas en 2D estático en hipoxia y 83 en los MC obtenidos en el sistema 3D dinámico en normoxia. Estos resultados nos muestran una pobreza en la composición, lo cual, sumado a la presencia de una subpoblación (en los cultivos 3D dinámicos en normoxia) que no cumple con el perfil esperado de inmunofenotipificación, llevó a descartar este lote del análisis funcional de las citocinas.

En el lote 3 se detectaron 180 citocinas incrementadas o detectadas de novo en el MC de las A-MSC cultivadas en 2D estático hipoxia, 135 en los MC obtenidos en el sistema 3D dinámico en normoxia y 111 en los MC obtenidos en el sistema 3D en hipoxia (Anexo G) y estos resultados fueron nuevamente depurados. La razón para efectuar esta nueva selección, está de acuerdo con Teng Ma et al (70), quien afirma que la influencia de la hipoxia sobre las A-MSC depende en gran medida de las condiciones de cultivo, es decir, es el efecto conjunto de las dos variables lo que impacta el secretoma y por tanto la composición de los MC.

El resultado de esta nueva selección de proteínas comunes empleando las variables hipoxia y cultivo 3D dinámico, permitió identificar 63 citocinas incrementadas o detectadas de novo en los MC de los cultivos en hipoxia y 78 citocinas en los MC de los cultivos 3D dinámicos.

Finalmente, revisando los listados correspondientes a las 63 y las 78 proteínas de los MC del lote 3, nuevamente se identificaron 50 proteínas comunes de las cuales 48 (excepto NSE y CHST4) están relacionadas con el proceso de curación de heridas.

Las 48 proteínas son: 4 quimiocinas de la familia CXC (GRO α , ENA-78, IL-8, I-TAC), 4 ligandos de quimiocinas de la familia CC (6Ckine, CCL28, MIP-3a, GCP-2), 11 receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas (ALCAM, CD126, BLAME, CD300c, FCRL1, FCRL2, IL2 R β , IL7-R, IL29, LAIR-1, GPVI), un receptor de proteoglicano de heparán sulfato (Glypican 5), un componente del plasminógeno (angiostatina), una proteína de unión a glicanos (Galectina 8), un antígeno de linfocitos T (CD6), una proteína de unión CAP-gly (CILP1), una proteína del cartílago (CRTAC1), 6 moléculas de adhesión celular (CXADR, CEACAM 1 y 5, Siglec 10, JAM 1 y 2), un proteoglicano rico en leucina (DSPG5), una citocina con función dual (CX3CL1), un miembro de la familia del TNF- β (GITRL), una serina proteasa (hepsina), una proteína de almacenamiento de hierro (ferritina), 2 miembros de la familia Notch (Notch 3, Jagged2), 3 metaloproteinasas (MMP 3, MMP10 y PAPP-1), un miembro de la familia de receptores de citocinas tipo I (OSMR), un integrante de la familia de las semaforinas (Semaphorin 6D), un inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI-1), un miembro de la familia del EGF (epirregulina), dos proteínas de la vía del TGF- β (endoglina, HERB4) y 2 factores de crecimiento (PGDF-AB y FGF-12). Al revisar cada una de sus funciones estas moléculas participan en las diferentes fases del proceso de curación cutánea así:

Las **quimiocinas de la familia CXC** se caracterizan por un motivo cisteína-X-cisteína (CXC) en sus extremos amino terminales y actúan como potentes inductores o inhibidores de la angiogénesis. Aquellos que contienen los aminoácidos ácido glutámico-Leucina-Arginina (ELR) adyacentes al motivo CXC se unen al receptor CXCR2 y promueven la angiogénesis, mientras que aquellos que carecen del motivo ELR se unen principalmente a CXCR3 e inhiben la angiogénesis.

Al primer grupo pertenecen **GRO α** , (actualmente denominado CXCL1), **ENA-78** (CXCL5), **IL-8** (CXCL 8) con funciones angiogénicas y arteriogénicas y, al segundo grupo pertenece **I-TAC** (CXCL11), que carece del motivo ELR y es inducida por los interferones tipo 1 y tipo 2 (IFN- α/β e IFN- γ), la cual posee acción antiangiogénica (124,125). Las quimiocinas CXC positivas para ELR y su receptor CXCR2 son

importantes mediadores de la reparación de heridas. CXCL1 y CXCR2 se expresan durante la cicatrización de heridas en los queratinocitos y las células endoteliales en las áreas donde se produce epitelización y neovascularización (125).

La **IL-8** humana induce la proliferación de células endoteliales y la organización del tubo capilar, inhibe la apoptosis de las CE y aumenta la producción de MMP-2 y MMP-9 (126).

6Ckine o ligando 21 de quimiocinas (**CCL21**) induce el reclutamiento de MSC circulantes hacia las heridas cutáneas mediante una interacción específica (SLC/CCL21)/receptor de quimiocina (CCR7) tanto *in vitro* como *in vivo* (137). Sasaki et al demostró en un ensayo *in vivo* que la inyección intradérmica de SLC/CCL21 aceleró significativamente el cierre de la herida al aumentar las tasas de acumulación de MSC en el tejido (127).

CCL28 es el ligando 28 de quimiocinas o quimiocina epitelial asociada a mucosas. Esta es secretada por las células epiteliales de las mucosas y se encuentra en la saliva y en la leche materna (128). La señalización CCL28/CCR10 juega un papel importante en la regulación de la angiogénesis de heridas cutáneas a través de la señalización Src, PI3K y MAPK dependiente de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (129) .

MIP-3a (CCL20) es la única quimiocina que se sabe que interactúa con el receptor 6 de quimiocina CC (CCR6). El par ligando-receptor CCL20-CCR6 es responsable de la quimioatracción de células dendríticas inmaduras, linfocitos T (efectores y de memoria) y linfocitos B. Desempeña un papel en la piel y las superficies mucosas en condiciones homeostáticas e inflamatorias, así como en patologías, incluyendo el cáncer y la artritis reumatoide (130).

La **GCP-2** (proteína quimiotáctica de granulocitos humanos-2 o **CCL2**) es una molécula proangiogénica secretada por MSC, CE y fibroblastos (131). En las A-MSK la GPC-2 interactúa con MCP-1 para promover la angiogénesis y la arteriogénesis través del aumento de VEGF (137).

ALCAM (molécula de adhesión celular de leucocitos activados) o CD116 está presente en células hematopoyéticas, células del estroma de la médula ósea, CE

extraoculares, células T activadas, linfocitos B, monocitos, fibroblastos de la piel, queratinocitos, MSC y algunas células tumorales (132–134). Esta molécula participa en la activación de linfocitos T, la hematopoyesis, la migración transendotelial de los neutrófilos, la angiogénesis, la inflamación y la invasión tumoral (133).

Estudios *in vitro* sugieren que **B7-H3** (también denominada CD126) promueve la angiogénesis a través del incremento de la secreción de VEGF (135).

BLAME, **CD353** o **SLAMF8** funciona como molécula de señalización para activación de linfocitos. Este receptor de superficie con función coestimuladora se expresa en macrófagos activados y su ligando no ha sido identificado (136).

CD300c se expresa en células presentadoras de antígenos profesionales, incluidas las células B, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Se considera que CD300c actúa como una molécula coinhibidora de células T que comparte una homología de secuencia significativa con los miembros de la familia B7 (137).

Las **moléculas tipo receptor Fc (FCRL1 y FCRL2)**. Las FCRL1 a 5 se expresan preferentemente en diferentes etapas del desarrollo de las células B, pero FCRL6 se expresa esencialmente en diferentes subgrupos de células T y NK. Las FCRL1 a 5 regulan diferentes características de la evolución de las células B tales como desarrollo, diferenciación, activación, secreción de anticuerpos y cambio de isotipo (138). Por tanto, participa de la fase inflamatoria de la curación de heridas.

IL-2 Rb. El **receptor de interleucina 2** está involucrado en las respuestas inmunitarias mediadas por células T. Existen 3 formas con respecto a la capacidad de unirse a la IL2: la forma de baja afinidad es un monómero de la subunidad alfa y no está involucrada en la transducción de señales. La forma de afinidad intermedia consta de un heterodímero de subunidad alfa/beta, mientras que la forma de alta afinidad consta de un heterotrímero de subunidad alfa/beta/gamma. Tanto la forma intermedia como la de alta afinidad del receptor están implicadas en la endocitosis mediada por receptor y en la transducción de señales miogénicas de la IL 2 (139).

IL-7 R (CD127) se une a un receptor de superficie celular compuesto por IL-7R (CD127) y la cadena común (CD132), recluta JAK1-3 y produce la dimerización y traslocación nuclear de STAT5 para la transcripción de genes, activación de la vía

PI3K y la regulación al alza de BCL-2 promoviendo la proliferación y supervivencia celular (140).

El mantenimiento de la expresión de IL-7R en células T vírgenes y de memoria juega un papel vital en el control de la homeostasis normal de las células T aunque IL7R también se expresa en NK y algunos subgrupos de linfocitos B, macrófagos, células dendríticas y CE (140).

LAIR1 o receptor-1 similar a las inmunoglobulinas asociado a leucocitos, es un receptor de colágeno perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Este se une a C1q, un componente de la vía clásica del complemento, el cual promueve la angiogénesis a través de una regulación al alza de VEGF a través del eje a LAIR1-HIF1 α -VEGF después de eventos cerebrovasculares en ensayos animales (141).

IL-29 o **IFN λ 1** está relacionado con la defensa inmunológica. Se ha descrito que el IFN- λ inhibe la formación de estructuras vasculares en ensayos *in vitro* de angiogénesis (142) y también, disminuye la formación del tejido de granulación al disminuir la síntesis de colágeno en ensayos *in vivo* de curación de heridas (143).

La gamma glicoproteína VI (**GPVI**) es un receptor ITAM que se expresa en megacariocitos y plaquetas. Inicia una potente activación de las plaquetas por exposición a las proteínas de la matriz subendotelial (colágeno y laminina) a través de la vía de señalización Src/Syk/PLC γ 2. GPVI cumple un rol fundamental en la integridad vascular en zonas de piel inflamada (144).

Glipican 5 (**GPC5**) es un proteoglicano de sulfato de heparán localizado en la membrana plasmática. En la línea de células madre mesenquimales humanas U3DT, este proteoglicano se localizó en los cilios primarios, en el borde de avance de las células migratorias, en el puente intercelular, en las prominencias durante la citocinesis y en las vesículas extracelulares. En cada región subcelular, GPC5 se colocalizó con el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y las pequeñas GTPasas Rab11 y ARF6, lo que indica que GPC5 es liberado en estas regiones mediante endosomas de reciclaje asociados con Rab11. Estas colocalizaciones sugieren que GPC5 juega un papel importante en la estimulación de la migración celular dependiente de FGF-2, la cual es anulada por la disminución

de GPC5. Estos hallazgos indican que GPC5 desempeña un papel en la regulación de la migración de las células madre (145).

La **angiostatina** es un componente del plasminógeno. Se produce por acción del factor tisular del plasminógeno sobre esta proteína y se convierte en plasmina por la acción de otras serina proteasas y metaloproteinasas. La angiostatina inhibe la angiogénesis porque previene la degradación de la membrana basal e impide la proliferación y migración de las CE. La angiostatina solo previene la angiogénesis en contextos patológicos pero no tiene efecto en las condiciones fisiológicas (146).

Las galectinas o lectinas Gal son una familia de proteínas de unión a glicanos con afinidad por los β -galactósidos que pueden mediar en la comunicación célula-célula. La **galectina-8 (Gal-8)** es una galectina bivalente de tipo "repetición en tándem" que en estudios *in vitro* y funcionales *in vivo* ha demostrado un papel en la regulación de la formación de tubos capilares, la migración de las CE y la inducción de angiogénesis in vivo (147,148). En el trabajo de Cárdenas VM, et al se identificó a la molécula CD116 (ALCAM) como un socio específico de unión a Gal-8 en CE vasculares normales (147).

El **CD6** es el antígeno de diferenciación de células T. Es una glicoproteína (serina-proteasa) de la membrana celular de tipo I que pertenece al grupo B de la superfamilia del receptor rico en cisteína (SRCR), expresado predominantemente por los linfocitos T y un subconjunto de linfocitos B. CD6 se une a ALCAM, un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (134).

El gen **CILP-1** codifica la proteína de unión citoplasmática 170 (**CLIP-170**) que contiene el dominio CAP-Gly para unirse al extremo positivo de los microtúbulos y regular la dinámica del citoesqueleto de los microtúbulos. CLIP-170 promueve el crecimiento, la agrupación y la unión de vesículas citoplasmáticas a los microtúbulos desempeñando un papel importante en el tráfico vesicular. También interviene en la macropinocitosis y el tráfico de endosomas (149).

CRTAC1 o proteína ácida del cartílago. Es una proteína de matriz extracelular del tejido condrogénico humano. La función de CRTAC1 sigue siendo desconocida, pero la estructura de la proteína indica un papel en las interacciones célula-célula o célula-matriz y en la unión del calcio (150). Algunos estudios recientes informan que

CRTAC-1A promueve la migración de fibroblastos dérmicos humanos, lo cual puede ser promovido por cambios en el citoesqueleto relacionados con la actina y mejora la generación y remodelación de la MEC en experimentos *in vitro* (150,151).

CXADR también denominado como CAR (receptor de adenovirus y virus coxsackie) o molécula de adhesión similar a las inmunoglobulinas. Este receptor interactúa con JAML (proteína similar a la molécula de adhesión de la unión) en el proceso de migración de leucocitos y para activar las respuestas de las células T de tipo $\gamma\delta$ interviniendo en procesos de inflamación, inmunidad, reparación de heridas y homeostasis tisular (152).

La molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 1 (**CEACAM-1**) se expresa en células epiteliales y células del sistema inmune activas. Esta molécula proangiogénica se incrementa por una regulación al alza (junto con otras moléculas proangiogénicas como HIF1, VEGF, FGF4) en condiciones de hipoxia (153).

El antígeno carcinoembrionario (**CD66e, CEA, CEACAM-5**) es una glicoproteína sobreexpresada y liberada por tumores sólidos, la cual actúa de forma autocrina para promover la supervivencia y diferenciación de las células tumorales. El CEA soluble es suficiente para modificar el comportamiento de las CE (adhesión, propagación, proliferación y migración *in vitro* y microvascularización tumoral *in vivo*). La activación de las CE inducida por CEA depende de señales de la integrina β -3 que activan la cinasa de adhesión focal c-Src y sus vías corriente abajo: MAP-ERK y PI3K/Akt (154).

Siglec-10 es una molécula de adhesión de superficie celular de la subfamilia de las lectinas que se une al ácido siálico presente en glicoproteínas y glicolípidos, la cual se expresa en las células del sistema inmune innato (155). Su unión firme a CD24, de manera dependiente de la sialilación, suprime de manera selectiva la respuesta inmune a DAMPs (156) y su unión a CD52 soluble inhibe la señalización de células T (157). Se puede afirmar, que siglec-10 está relacionada con la inhibición de la respuesta inmune.

Las **JAM** son moléculas de adhesión celular que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas involucradas en múltiples procesos como la inflamación, la

angiogénesis, la hemostasia y la formación de barreras epiteliales. Varias de estas dependen de una interacción física y funcional de las JAM con las integrinas (158).

La interacción de la integrina $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ –**JAM-A** coopera con la interacción de la integrina $\alpha\text{L}\beta$ –ICAM-1 para mediar la adhesión de las células T al endotelio inflamado. A su vez, la interacción **JAM-C**– $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ está involucrada en el proceso de trasmigración de los leucocitos a través del endotelio vascular (158). También la unión de JAM-A la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ y de JAM C la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ (dos receptores de vitronectina expresados por las CE) produce la activación de la vía MAPK-ERK por el FGF- $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ o por VEGF- $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ (158).

El **DSPG3** o **epifican** pertenece a la familia de los proteoglicanos ricos en leucina (SLRP) los cuales tienen una doble función biológica en la piel: la primera, regular el colágeno: fibrillogénesis, organización de fibrillas y ensamblaje de la MEC para controlar la fuerza y la biomecánica de los tejidos, y la segunda, modular las bioactividades de una miríada de citoquinas quimiocinas, ligandos y receptores que orquestan el proceso de cicatrización de heridas (159).

Fractalkine, fractalquina o **CX3CL1** es una citocina cuyo único ligando conocido es CX3CR1 y que actúa al mismo tiempo como quimioatrayente y molécula de adhesión celular. Se expresa en las CE activadas por citoquinas proinflamatorias, como el IFN λ y el FNT α , para promover la adhesión fuerte de los leucocitos (160)

El receptor de la fractalquina se expresa en los linfocitos efectores citotóxicos que contienen altos niveles de perforina intracelular y granzima B, así como, en los macrófagos. La interacción de este receptor con la fractalquina soluble provoca la migración de células NK, linfocitos T citotóxicos y macrófagos, mientras que la forma unida a la membrana captura y potencia la migración posterior de estas células en respuesta a la estimulación secundaria a otras quimiocinas. Además, la estimulación a través de la fractalquina unida a la membrana activa las células NK, lo que aumenta la citotoxicidad y la producción de IFN λ (160).

El ligando de proteínas relacionado con la familia del receptor del TNF inducido por glucocorticoides o **GITRL**, es el miembro 18 de la superfamilia del TNF expresado en células presentadoras de antígenos donde actúa como una molécula coestimuladora en el sistema inmunitario. La sobreexpresión de GITRL sesgó la

polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M1, acelerando la proliferación y la migración de estas células y regulando la fagocitosis (161).

La **hepsina** es una serina proteasa transmembrana de tipo II que degrada la laminina y también cliva a pro-HGF para producir HGF biológicamente activo (162)

La **ferritina** es una proteína conocida principalmente por su papel en el almacenamiento de hierro, sin embargo, también está involucrada en la angiogénesis: la ferritina se une al cininógeno escindido de alto peso molecular (HKa) para antagonizar sus efectos antiangiogénicos. Se ha demostrado que la ferritina mejora la migración, el ensamblaje y la supervivencia de las CE de manera independiente de su contenido de hierro (163).

Notch 3. Existen 4 receptores Notch transmembrana de un solo paso (Notch1–4), los cuales se unen a sus ligandos Jagged1, **Jagged2** o tipo Delta (1, 3 o 4) de células vecinas. Esta interacción provoca la escisión proteolítica del receptor Notch a través del complejo γ -secretasa permitiendo que el dominio intracelular de Notch (NICD) se libere de la membrana celular al citoplasma. Durante la señalización canónica de Notch, el NICD se transloca al núcleo y se une con factores de transcripción CSL (proteína de unión a señales de recombinación para la región J de inmunoglobulina kappa (RBP κ)/supresor de sin pelo/lag-1) y coactivadores, formando un complejo que induce la transcripción de genes diana aguas abajo (164).

La señalización de Notch regula la angiogénesis a través de receptores para el VEGF: en un modelo de retina murina, se sugirió que Delta-like 4 actúa aguas debajo de VEGF como un regulador negativo en la angiogénesis mediada por este factor y en otro estudio *in vitro* se demostró que Jagged1 es un potente regulador proangiogénico que antagoniza la señalización de Notch mediada por Delta-like 4 en la angiogénesis. También se ha demostrado que la activación de Notch vía Jagged aumenta la migración de CE y fibroblastos y queratinocitos en ensayos *in vitro* y se evidencia mejoría del proceso de cicatrización en modelos murinos de heridas cutáneas tratadas con Jagged (165).

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) participan de todas las fases de la cicatrización cutánea al regular la migración de las células inflamatorias, facilitar la

migración de fibroblastos y queratinocitos, mejorar la proliferación y migración de CE, así como un papel fundamental en la remodelación de la matriz cicatricial.

El trabajo Zheng, L et al (166) demostró que la **MMP-3 (estromielisina-1)** mejoró la proliferación, migración y supervivencia de las HUVEC en estudios *in vitro* y que la aplicación tópica de la MMP-3 en el tejido pulpar lesionado en un modelo animal de rata indujo la angiogénesis y formación de dentina reparadora a niveles significativamente más altos en comparación con los controles a las 24 y 72 horas después del tratamiento. Estos resultados proporcionan evidencia de que la MMP-3 liberada de las CE y/o las células progenitoras endoteliales en la pulpa dental lesionada juegan un papel fundamental en la angiogénesis y la cicatrización de heridas pulpares.

La **MMP-10 (estromielisina 2)** en la piel se expresa exclusivamente en los queratinocitos localizados en el borde de cierre (o punta de reepitelización) de las herida favoreciendo su migración (167).

PAPP-1 la papalislina-1 pertenece a la familia de proteínas que contiene un dominio LAMGL. Esta metaloproteinasas escinde específicamente IGFBP-4 e IGFBP-5, lo que da como resultado la liberación del IGF unido (168).

OSMR β . La subunidad beta del receptor de oncostatina M o simplemente OSMR, es un miembro de la familia de receptores de citocinas de tipo I. Esta proteína se heterodimeriza con el transductor de señal de la IL 6 para formar el receptor de oncostatina M de tipo II y con el receptor A de la IL 31 para formar el receptor de la interleucina 31 y, por lo tanto, transduce los eventos de señalización inducidos por la oncostatina M y la IL 31 (169).

Las semaforinas y sus receptores participan en la regulación inmunitaria, la remodelación de la MEC, la organogénesis y la angiogénesis. Estas moléculas tienen un papel significativo en el desarrollo vascular con efectos tanto proangiogénicos como antiangiogénicos (170).

La **semaforina 6D (Sema6D)** promueve la formación de tubos por las CE (170) y la unión a su receptor Plexina D1 regula la asignación espacial de la capacidad angiogénica dentro de un vaso primario y la guía de los brotes. Esta señalización de

Sema6D-PlexinaD1 ejerce este efecto al antagonizar la actividad proangiogénica del VEGF mediante una abundante producción de flt1 soluble, una forma alternativa del receptor Flt1 de VEGF, por parte de las CE (171)

El inhibidor 2 de la vía del factor tisular (**TFPI-2**) es un inhibidor de proteasas contenido en las plaquetas que se une al FV/Va y regula la coagulación y la fibrinólisis (172).

La **epirregulina** es una proteína que pertenece a la familia del EGF. La epirregulina se une tanto al receptor de EGF (EGFR/ErbB1) como a **ErbB4** (HER4) y puede estimular la señalización de ErbB2 (HER2/Neu) y ErbB3 (HER3). La epirregulina contribuye a la inflamación, la cicatrización de heridas, la reparación de tejidos al regular la angiogénesis, la remodelación vascular y estimular la proliferación celular (173).

Endoglina (CD105) es un correceptor de TGF- β expresado predominantemente en las CE. El mecanismo por el cual regula la angiogénesis sigue siendo en gran parte desconocido. En el trabajo de Tian et al, se demuestra la interacción mecánica de la endoglina con el receptor VEGFR-2 de manera dependiente de VEGF, lo que mantuvo a VEGFR2 en la superficie celular y evitó su degradación. Además, un anticuerpo monoclonal dirigido a la endoglina (TRC105), cooperó con el bevacizumab para inhibir la señalización de VEGF y la formación de células de la punta *in vitro*, así como, para inhibir el crecimiento tumoral, la metástasis y la angiogénesis asociada a tumores en un modelo de tumor murino (174).

PDGF-AB es un heterodímero perteneciente a la familia del factor de crecimiento derivado de las plaquetas. La familia de señalización PDGF está relacionada con la familia del VEGF y cumplen un rol esencial en la angiogénesis.

FGF-12. El factor de crecimiento fibroblástico 12 pertenece a la subfamilia del FGF-11 de localización intracelular (175). Las células del músculo liso vascular (VSMC) modulan su fenotipo entre estados sintéticos y contráctiles en respuesta a cambios ambientales y un regulador clave de esta modulación del fenotipo es el FGF-12. Este cambio fenotípico inducido por FGF-12 estuvo mediado por la vía p38 MAPK (176) y experimentos de ganancia y pérdida de función mostraron que FGF-12 era necesario

y suficiente para inducir y mantener los fenotipos inactivos y contráctiles de las VSMC (176).

Para generar la integración de las funciones de las proteínas descritas, se realizó una búsqueda en el sistema de clasificación PANTHER Versión 17.0 (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) encontrando que 33 se incluyen en la categoría procesos celulares (GO:0009987) donde se destaca su participación en la respuesta a estímulos, comunicación y transducción de señales. Así mismo, 24 están involucradas en la regulación de procesos biológicos (GO: 0065007) como proliferación, migración, metabolismo, ciclo celular, respuesta a estímulos, transducción de señales y homeostasis celular entre otros, como se aprecia en las figuras del Anexo H.

Por último, al consultar las vías de señalización involucradas en estos procesos se encuentran referidas 14, una de las cuales corresponde específicamente a angiogénesis (P00005), categoría en la que solo incluyen las proteínas PDGF y JAGGED 2. Sin embargo, al observar el listado completo, es posible identificar otras 4 vías de señalización (PDGF, FGF, TGF- β y Notch) las cuales están involucrados en la angiogénesis (78,123,175,177–179). Anexo G.

Con toda esta información puede afirmarse que el cultivo de las A-MSC en el sistema 3D en hipoxia incrementa la producción de moléculas que regulan procesos como coagulación y fibrinólisis; inflamación, proliferación, migración, metabolismo y supervivencia celular (de queratinocitos, fibroblastos, melanocitos, CE, células musculares lisas vasculares y células madre), angiogénesis y remodelación de la matriz extracelular, los cuales enriquecen el secretoma, y por tanto la composición de los MC, explicando su potencial terapéutico en la curación de heridas cutáneas. Figura 68.

Para evaluar el potencial angiogénico de estos MC se desarrollaron tres ensayos *in vitro*: el primero correspondió a un ensayo de migración endotelial el cual demostró que los MC de A-MSC obtenidos en el sistema 2D estático y 3D dinámico (independiente de los niveles de O₂) promovían la migración de las CE. Nuestros resultados son semejantes a los descritos en los ensayos de migración de Doncel (104) -quien encontró el mismo efecto con resultados estadísticamente significativos- y por otros autores en la literatura científica (66,104,180).

.El ensayo de formación de estructuras tubulares evidenció que los MC de A-MSC promueven la tubulogénesis en hipoxia (independiente del sistema de cultivo). Estos resultados son acordes con la literatura y pueden explicarse por un incremento del factor de transcripción HIF- α , y de múltiples factores proangiogénicos (como VEGF, PDGF, FGF, TGF- β y IGF-1) y antiapoptóticos, los cuales favorecen los procesos de proliferación, migración y organización de las células endoteliales (64–66,70,71,99,123,181). Nuestros resultados difieren de lo reportado por Doncel (104) quien no halló diferencias en sus ensayos de tubulogénesis al emplear MC de A-MSC obtenidos en el sistema 2D estático en normoxia versus hipoxia.

El tercer ensayo de angiogénesis expuso la capacidad de los MC de A-MSC para promover la formación de brotes angiogénicos a partir de los vasos preexistentes en el explante de corazón murino. Este fenómeno se observó en todos los ensayos efectuados independiente del sistema de cultivo o los niveles de oxigenación empleados en la producción de dichos MC. En este experimento observamos una diferencia con respecto a lo informado por Doncel (104), quien evidenció un mayor crecimiento (más del doble) de los vasos sanguíneos cuando se empleaba MC obtenido en condiciones de hipoxia en comparación con los MC obtenidos en normoxia.

Una posible explicación para esta diferencia es la concentración proteica de los MC empleados en este ensayo (la cual oscila entre 22 y 30 $\mu\text{g/mL}$) la cual es menor a la empleada por Doncel (quien empleó 134 $\mu\text{g/mL}$). También debe considerarse la variabilidad en el perfil de secreción de factores proangiogénicos dependiente del donante (66,182).

Por último, se desarrolló un modelo de heridas excisionales en piel, el cual es comúnmente usado para evaluar el proceso de curación cutánea y se considera que emula las heridas agudas que requieren cierre por segunda intención. Este modelo permite investigar la inflamación, la formación del tejido de granulación, la reepitelización, la angiogénesis y la remodelación (52). Adicionalmente, puede desarrollarse en diferentes especies, siendo el cerdo, el animal más apropiado debido a la similitud anatómica y fisiológica con la especie humana (56,123).

Se sabe que la piel del cerdo posee poco pelo, presenta folículos pilosos dérmicos, una capa de tejido subcutáneo fija, así como, contenidos de colágeno y elastina, y espesores epidérmicos y dérmicos semejantes a la piel humana. También se reconoce que son todas

estas características las que permiten una alta correlación con el proceso de curación de heridas cutáneas en humanos (56). Sin embargo, el empleo de cerdos tiene desventajas como: dificultades en la manipulación debido a su tamaño, necesidades específicas de alojamiento, requerimientos quirúrgicos y de anestesia especiales, mayor riesgo de infección de las heridas, ausencia de reactivos validados y un costo elevado, lo cual limita su uso (56,123).

Estas desventajas de los cerdos, explican el uso común de ratones y ratas, cuyo alojamiento, mantenimiento y manipulación son fáciles, más económicos y porque existe una amplia variedad de reactivos específicos validados para estas especies. Sin embargo, debe reconocerse que estos modelos no están exentos de desventajas como la curación por contracción (no por reepitelización y formación de tejido de granulación como los grandes mamíferos de piel delgada y los humanos) y discrepancias en el sistema inmune y la respuesta inflamatoria a la lesión tisular en comparación con los humanos (76).

Para contrarrestar el efecto de la contracción de la piel de las ratas y ratones, se ha empleado el modelo de herida de tipo "splinted", el cual consiste en colocar unos anillos adhesivos de silicona alrededor de las heridas, para después fijarlos a la piel mediante sutura de nylon. Este anillo de silicona evita la contracción y permite la formación del tejido de granulación y la reepitelización de manera similar al proceso humano (76).

Masson-Meyers D et al (56) recomiendan el uso de ratas debido a las diferencias en la piel (los ratones tienen la piel más delgada y menos capas de queratinocitos), el mayor tamaño del dorso y el tiempo de curación de las heridas: los ratones sanan sus heridas en 7 días mientras que las ratas permiten evaluar el proceso durante un lapso de tiempo más extenso (porque sanan entre 12 a 14 días) (56).

Así mismo, durante el desarrollo del piloto, pudimos evidenciar que las ratas no manipulaban el material de cubrimiento, eran más dóciles, técnicamente el espesor de su piel permitía aplicar con más precisión los MC en la dermis y sus heridas eran más regulares debido a la presencia del panículo carnoso y una dermis más gruesa. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, se efectuó el modelo de heridas cutáneas excisionales en ratas.

También se tuvo en cuenta dentro del diseño del protocolo, el tipo, vía de administración y el tiempo de la analgesia con tramadol. La literatura refiere que las células cutáneas

(queratinocitos, fibroblastos y melanocitos) poseen diferentes tipos de receptores para opioides y que la administración de estas sustancias en la fase proliferativa puede tener efectos proangiogénicos; sin embargo, modelos de curación de heridas cutáneas en ratas Wistar con infiltración local en el sitio quirúrgico de tramadol (1mL al 2,5% y 3ml al 5%), no evidenciaron alteraciones del proceso de curación (183). Por estas razones, la administración del analgésico en los animales de experimentación se efectuó mediante infiltración (no aplicación tópica) exclusivamente durante las primeras 72 horas del ensayo y mediante inyección subcutánea en un sitio distante a las heridas dorsales.

Los resultados de la evaluación histológica de las láminas coloreadas con H&E no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los scores histológicos de las heridas tratadas con los MC de A-MSC obtenidos en cultivos 2D estáticos (independiente del nivel de O₂) en comparación con sus controles, y por el contrario, se evidenció una diferencia estadísticamente significativa en los scores de las heridas tratadas con MC de A-MSC obtenidos en el sistema 3D dinámico (independiente del nivel de O₂) en comparación con sus controles. Esto permite afirmar que los MC obtenidos en el cultivo 3D en hipoxia tendría un efecto terapéutico en el tratamiento de las heridas cutáneas.

Cuando se intenta comparar nuestros resultados con los referidos previamente por Sánchez (2) no es posible efectuar este análisis porque este investigador empleó otra especie (ratones), el tamaño de las heridas fue menor (5mm), el control correspondió a OptiMem®, el estudio histológico empleó otro score y se efectuó eutanasia de un animal de cada grupo experimental el día 7 y el día 14. Lo único que podemos afirmar en este sentido, es que observamos la misma tendencia con un mayor porcentaje de cierre al día 7 en las heridas tratadas con los MC obtenidos en cultivos en el sistema 2D estático en comparación con los controles.

La búsqueda de estudios similares en la literatura internacional muestra los resultados de Sun et al (184), quienes utilizaron MC liofilizados de A-MSC obtenidas de ratas Sprague-Dawley cultivadas en sistema 2D estático en hipoxia para tratar heridas cutáneas de 30 mm de diámetro en la misma especie. En este caso, los resultados tampoco son comparables debido a la liofilización de los MC y el tamaño de la herida; sin embargo, estos autores encuentran un mayor porcentaje de cierre en el día 7 al comparar el grupo control con los dos tratamientos que corresponden a MC concentrado y no concentrado

(sin diferencias estadísticamente significativas entre el MC concentrado y el no concentrado).

Cuando se realizó la búsqueda de literatura en la base de datos PubMed empleando los términos “spinner flask and conditioned medium” y “conditioned medium and dynamic culture” no se encuentran estudios que refieran el uso de MC de A-MSC obtenidos en un sistema 3D dinámico (tanto en normoxia como en hipoxia) en modelos de curación de heridas cutáneas agudas.

El trabajo de investigación más parecido al nuestro fue desarrollado por Santos J et al (42), el cual emplea MC obtenidos en cultivos 2D y 3D (cultivo dinámico empleando spinner flasks en normoxia) de esferoides de MSC de gelatina de Wharton para el tratamiento de heridas cutáneas excisionales en ratas Wistar. Los resultados obtenidos por este grupo de investigadores al día 9 de seguimiento, informan mejores scores histológicos en el proceso de curación de heridas cutáneas tratadas con los MC de MSC en comparación con los controles y el grupo sham (con resultados estadísticamente significativos en los parámetros distancia entre los márgenes, reepitelización y vascularización. Ver tabla 5) sin observar diferencias entre el grupo 2D y 3D. No es posible comparar los hallazgos histológicos de Sánchez (2) ni Santos et al (42) al día 14 ni 21 de seguimiento porque nuestro ensayo se extendió solo hasta el día 9 (sin llegar al cierre completo de las heridas cutáneas).

Por último, los patólogos que evaluaron la densidad vascular en este trabajo, son claros en mencionar que hay una menor densidad vascular correlacionada con una etapa más avanzada del proceso de curación (fase de remodelación) en las biopsias cutáneas de las heridas tratadas con los MC de A-MSC, lo cual probablemente no es evidente estadísticamente debido al pequeño tamaño de la muestra, pero que es significativo biológicamente y es similar a lo descrito por los patólogos veterinarios que intervinieron en el trabajo de Sánchez (2).

En conclusión, el cultivo de las A-MSC en un sistema 3D dinámico no afecta su inmunofenotipo ni su capacidad de diferenciación y los MC obtenidos en este sistema mantienen su perfil regenerativo-reparativo. Si adicionamos la hipoxia, el perfil de estos MC se potencia, gracias al efecto sinérgico de los dos cambios introducidos al sistema, y

se explica por el enriquecimiento del perfil proteico. Este MC potenciado exhibe capacidad angiogénica (demostrada por los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*) y capacidad funcional (demostrada por los resultados del ensayo *in vivo*) para la curación de heridas cutáneas agudas.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- El cultivo en el sistema 3D dinámico permite obtener mayor número de células y mayor cantidad de MC en comparación con el sistema 2D estático.
- Algunos lotes de A-MSc pueden incrementar su proliferación celular en condiciones de hipoxia. Un factor que afecta la proliferación celular es la variabilidad dependiente del donante y por tanto, es importante investigar las características de estos donantes (edad, sexo, área corporal de donde se obtuvo el tejido adiposo) para determinar quiénes serían los mejores candidatos para obtener MC de A-MSc en cultivos 3D dinámicos en hipoxia.
- Se conserva el perfil de inmunofenotificación de las A-MSc cuando estas se cultivan en el sistema 3D dinámico tanto en normoxia como en hipoxia.
- Las A-MSc mantienen su capacidad de diferenciación celular adipogénica, osteogénica ni condrogénica, es decir, de la capacidad de diferenciación multilínea, cuando se cultivan en el sistema 3D dinámico.
- Los ensayos *in vitro* de angiogénesis demostraron que los MC de A-MSc promueven la migración de las células endoteliales y la formación de los brotes angiogénicos independiente de las condiciones de cultivo en que se obtienen los MC. Por el contrario, la tubulogénesis se incrementa cuando las células endoteliales son tratadas con MC obtenidos en condiciones de hipoxia.
- El ensayo *in vivo* (modelo de curación de heridas cutáneas agudas en ratas) demuestra una disminución progresiva del diámetro de las heridas tratadas con los MC de

A-MSc, lo cual se acentúa a partir del séptimo día de seguimiento en los cultivos 2D estáticos y se evidencia claramente en el noveno día en los cultivos 3D dinámicos. Estos resultados permiten afirmar que existe una tendencia al incremento de la velocidad de cierre de las heridas independiente de las condiciones del cultivo celular.

- Los MC de A-MSc obtenidos en el sistema 3D dinámico, independiente de los niveles de oxigenación, poseen mayor capacidad funcional evidenciada por mejores scores histológicos durante la evaluación del proceso de cicatrización de heridas cutáneas.
- La variabilidad dependiente del donante podría explicar las diferencias en los perfiles proteicos de los MC.
- Las variaciones en los niveles de oxígeno y el sistema de cultivo impactan la composición del secretoma y por tanto la composición de los MC de las A-MSc. El perfil proteico de los MC se enriquece cuando se efectúan los cultivos en hipoxia y en el sistema 3D dinámico (spinner flasks acoplados a microtransportadores) con efecto sinérgico.
- Las proteínas incrementadas o detectadas *de novo* presentes en los MC obtenidos en los cultivos 3D dinámicos en hipoxia participan en múltiples procesos celulares (adhesión, comunicación, proliferación, migración, metabolismo, señalización, respuesta a estímulos endógenos y exógenos, inflamación, e inmunomodulación).
- Las citocinas incrementadas o detectadas *de novo* presentes en los MC obtenidos en los cultivos 3D dinámicos en hipoxia, están involucradas en procesos celulares que forman parte de las diferentes fases del proceso de curación cutánea. Figura 78.
- El cultivo de las A-MSc en un sistema 3D dinámico que emplea spinners flasks acoplados a microtransportadores en condiciones de hipoxia sería el más adecuado para obtener MC para el tratamiento de heridas cutáneas agudas.

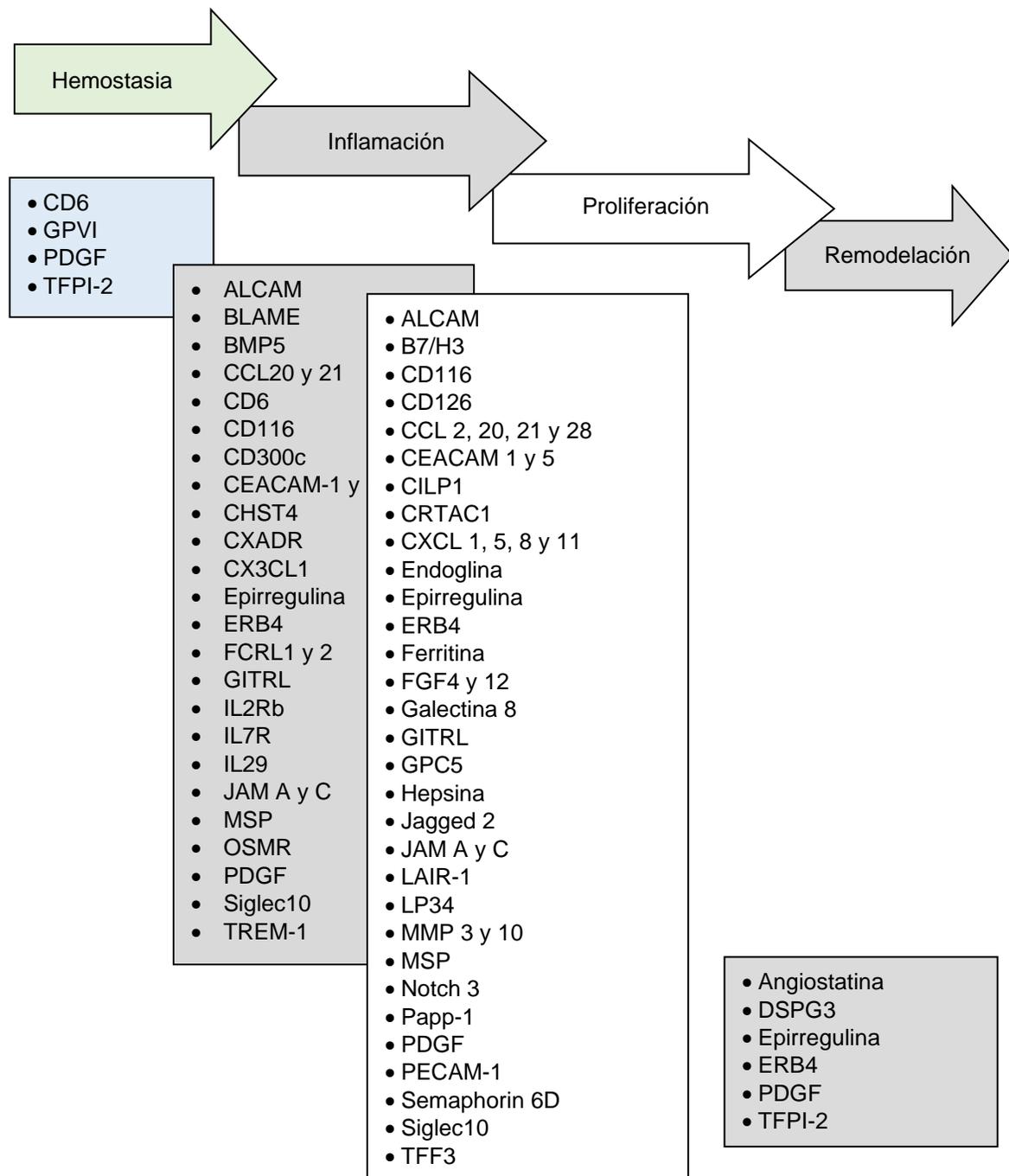


Figura 78. Citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en los lotes 1 y 3 en los cultivos 3D dinámicos en hipoxia que participan en el proceso de curación de heridas

6.2 Recomendaciones

- Se recomienda efectuar unos ajustes al protocolo de cultivo en el sistema 3D dinámico: el inicio del proceso de obtención de los MC de A-MSC debe iniciarse el séptimo día y los MC deben recolectarse a las 24 horas e idealmente liofilizarse. También es recomendable incluir el protocolo el análisis de metabolitos diario (medición de los niveles de lactato y amonio) para determinar la necesidad de suplementación de glucosa y glutamina, debido al mayor consumo de estos nutrientes cuando se efectúan cultivos en sistemas dinámicos.
- Se sugiere continuar el proceso de escalamiento de la producción de los MC de A-MSC en biorreactores de tipo stirred-tank en hipoxia bajo condiciones de buenas prácticas de manufactura para contar con el insumo necesario para iniciar pruebas clínicas de tratamiento de heridas cutáneas debidas a insuficiencia vascular.
- Es necesario continuar con la exploración de variables de cultivo que puedan promover el enriquecimiento de los MC con fines terapéuticos particulares.

A Anexo: Microtransportadores usualmente empleados en el cultivo dinámico de las MSC

Los microtransportadores se agruparon en tres categorías: las casillas con fondo de color gris corresponden a microtransportadores xenofree, con fondo blanco los compuestos o revestidos por proteínas animales, y en la casilla de fondo celeste, se refiere un microtransportador revestido por proteínas recombinantes

NOMBRE (MARCA)	COMPOSICIÓN	TAMAÑO	CARACTERÍSTICAS
Cytodex 1 (GE Healthcare)	Matriz de dextrán No porosa	147-248 µm	Carga positiva. Recubrimiento DEAE
Plastic (SoloHill)	Poliestireno No porosa	125-212 µm	Sin carga. Sin recubrimientos
Plastic P102L (SoloHill)	Poliestireno No porosa	160-200 µm	Carga positiva. Sin recubrimientos
Plastic Plus 102L (SoloHill)	Poliestireno No porosa	125-212 µm	Carga positiva. Sin recubrimientos.
Hillex (SoloHill)	Dextrán No porosa	160-180 µm	Carga positiva. Recubierta con trietilamonio
Hillex II-170 (SoloHill)	Poliestireno No porosa	160-180 µm	Carga positiva. Recubierta con trietilamonio
Glass (SoloHill)	Poliestireno No porosa	125-212 µm	Sin carga.

			Recubiertas por vidrio de sílice
Enhanced Attachment (Corning)	Poliestireno No porosa	125-212 µm	Sin carga. Recubierta por CellBIND®
Synthemax II (Corning)	Poliestireno No porosa	125-212 µm	Sin carga. Recubierta con SynthemaxII®
Cultispher-G (PerCell-Biolytica)	Matriz de gelatina porcina tipo I Macroporosa	130-180 µm	Sin carga. Sin recubrimientos.
FACT-102-L (SoloHill)	Poliestireno No porosa	125-212 µm	Carga positiva. Recubierta con colágeno porcino
Collagen 102L (SoloHill)	Poliestireno No porosa	125-212 µm	Sin carga. Recubierta con colágeno porcino
Cytodex 3 (GE Healthcare)	Matriz de dextrán No porosa	141-211 µm	Sin carga. Recubierta con colágeno porcino
Pro Nectin F 102L (Solo Hill)	Poliestireno No porosa	125-212 µm	Sin carga. Recubierta con fibronectina recombinante.

B Anexo: Protocolo de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica del SCERG - IST

ASSESSMENT OF THE MULTILINEAGE DIFFERENTIATION CAPACITY OF MSC

OSTEOGENIC AND ADIPOGENIC DIFFERENTIATION:

1. Plate 100.000 cell/well in 24 well-plates (with duplicates), in culture media (e.g., DMEM 5% + HPL) (500 μ L/well). The goal is to prevent cells from further dividing, so plate them close to 100% confluence.
2. After some hours, or in the following day (at 100% confluence) change to StemPro differentiation medium (1 mL/well) and leave in culture for 14 days, changing the media every 3-4 days.
3. At the end of the 14 days perform the corresponding staining assay.
4. Reuse the well-plates: mark the used wells; close the plate with parafilm.

CHONDROGENIC DIFFERENTIATION - HANGING-DROP ASSAY:

1. Centrifuge the cells (1250 rpm for 7min) - 100k cells are enough.
2. Remove part of the supernatant - get c.a. 200 μ L/condition.
3. Make 5-7 droplets of c.a. 30 μ L each on the inner side of a petri dish lid.
4. Incubate the closed petri dishes at 37°C overnight, with hanging-droplets.
5. Incubate the cells in ultra-low attachment 24 well-plates (with duplicates) with StemPro differentiation medium (1mL/well) and leave in culture for 14 days, changing the media every 3-4 days. Be careful, not to aspirate the aggregates.
6. At the end of the 14 days perform the corresponding staining assay.

CHONDROGENIC DIFFERENTIATION - LOW ATTACHMENT WELL PLATES (ALTERNATIVE TO HANGING - DROP):

1. Centrifuge the cells (1250 rpm for 7min).
2. Discard supernatant and re-suspend the pellet in the remaining volume.
3. With a micropipette, place droplets of around 5-10 μ L in low attachment 24 well-plates (with duplicates). Assure droplets remain intact and separated. Place as many droplets as possible.
4. Without disturbing the droplets, place the plate inside the incubator for 30 min (without culture medium).
5. Add StemPro chondrogenic differentiation medium. Fill the well slowly and carefully. Leave in culture for 14 days, changing the media every 3-4 days. Be careful not to aspirate the aggregates.
6. At the end of the 14 days perform the corresponding staining assay (Alcian blue).

PREPARATION OF DIFFERENTIATION MEDIA:

- 4,5mL basal media (4°C Lab 3) (it's the same for osteogenic and chondrogenic)
- 0.5mL supplement (-20°C Lab 3, 3rd shelf): O - Osteogenic supplement, A - Adipogenic supplement y C - Chondrogenic supplement
- 1% Anti-anti (0.05mL)

STAINING PROTOCOL (ideally perform all the protocol in the same day):

1. Remove differentiation medium.
2. Wash cells with PBS 1X.
3. Add PFA 4% (300 μ L/well) and leave at RT for 30min.
4. Remove PFA and wash cells with PBS 1X.
5. Prepare Oil Red O staining solution by diluting Oil Red O stock solution in miliQ water (3 parts of stock in 2 parts of water) and filter with a syringe filter (use within 30min).
6. In wells for adipogenic differentiation: Add a 60% isopropanol solution (in miliQ water) and incubate for 5 min at room temperature (RT).
7. Add staining solutions (300 μ L/well):
 - a. Adipogenic differentiation: Oil Red O solution for 1 hour, RT.
 - b. Osteogenic differentiation: ALP solution for 40 min, RT.

- c. Chondrogenic differentiation: Alcian Blue solution for 1hour, RT.
8. Wash all wells with distilled water (wash 3 times x 300 μ L/well) - remove very well all ALP and water (use yellow tips).
9. Leave chondrogenic and adipogenic differentiations with PBS 1X. Don't use water.
10. In wells for osteogenic differentiation: Add silver nitrate (300 μ L/well) for 30min, RT (Do not use PBS because this element reacts with silver nitrate). Then, wash with distilled water and leave in PBS 1X.
11. Take microscopy pictures: 2 pictures per replicate, 100 x magnification.
 - a. Adipogenic differentiation: capture lipid vesicles.
 - b. Osteogenic differentiation: capture calcium deposits (black stains) and osteogenic progenitor cells (red staining of ALP).
 - c. Chondrogenic differentiation: capture GAGs (in blue); eventually 200x magnification will be required; push light to very high levels, to obtain contrast and observe blue staining at the border of the aggregates.

Solutions for stains

- **Oil Red O stock solution - Adipogenic differentiation:**
 - Weight 0.15 g of Oil Red O.
 - Dilute in 50 mL of isopropanol (propan-2-ol) (Oil Red O at 0.3% w/v). The solution is stable for one year.
- **ALP solution - Osteogenic differentiation:**
 - Thaw fast violet (FV) aliquots (1.5mL), from -20°C. They cannot be frozen again.
 - Add 60 μ L naphthol (at door shelves from 4°C) to each FV aliquot.
 - Protect from light after mixing.
- **Alcian Blue solution - Chondrogenic differentiation:**
 - Weight Alcian blue powder to make a 10% w/v solution.
 - Dilute in 0.1N HCl solution (0.1M HCl).
 - Agitate very well the solution (magnetic agitation in a glass bottle)
 - Carefully filter with a syringe filter, to remove particles. Clogging will occur multiple filter cartridges and performing backwash may be required.

C. Anexo: Concentraciones de las citocinas detectadas en los MC de dos lotes de células A-MSC.

Concentraciones (pg/mL) de las proteínas evaluadas en el MC del lote 1 (140326)

N°	Proteína	Cultivo 2D estático		Cultivo 3D dinámico	
		Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia
1	6Ckine	753,5	0,0	0,0	266,8
2	Axl	0,0	0,0	0,0	7,9
3	BTC	22,5	35,6	87,2	53,3
4	CCL28	213,2	118,3	352,3	870,7
5	CTACK	0,0	0,0	215,5	166,5
6	CXCL16	0,0	0,0	25,7	0,6
7	ENA-78	64,2	24,8	11,7	28,6
8	Eotaxin-3	457,2	479,9	773,6	377,8
9	GCP-2	40,0	0,6	3,7	23,1
10	GRO	0,0	0,0	0,0	0,8
11	HCC-1	12,6	0,0	0,0	24,4
12	HCC-4	0,0	0,0	0,0	0,0
13	IL-9	0,0	0,0	0,0	0,0
14	IL-17F	0,0	77,3	0,0	0,0
15	IL-18 BPa	149,7	0,0	0,0	0,0
16	IL-28A	19,1	0,0	18,7	5,8
17	IL-29	1.546,5	836,5	1.856,7	848,9
18	IL-31	14,4	0,0	4,5	0,0
19	IP-10	0,0	0,0	0,0	0,0
20	I-TAC	56,2	13,6	179,9	115,0
21	LIF	147,5	24,9	118,7	76,8
22	LIGHT	0,2	0,0	0,0	24,1
23	Lymphotactin	502,9	400,4	735,8	680,8

24	MCP-2	0,0	0,0	5,9	0,0
25	MCP-3	15,6	19,6	42,2	41,4
26	MCP-4	0,0	0,0	0,0	0,0
27	MDC	18,2	0,0	0,0	0,0
28	MIF	25.169,5	18.750,1	19.267,0	23.333,2
29	MIP-3a	5,4	1,0	6,8	7,9
30	MIP-3b	9,7	0,0	0,0	0,0
31	MPIF-1	0,0	0,0	0,0	0,0
32	MSP	40,6	175,9	288,8	151,1
33	NAP-2	62,3	49,6	63,2	58,2
34	OPN	55,6	0,0	460,0	265,9
35	PARC	8,2	0,0	16,4	8,5
36	PF4	9.291,9	6.460,5	5.203,9	7.743,7
37	SDF-1a	19,5	19,1	39,0	55,9
38	TARC	3,2	0,0	0,1	22,6
39	TECK	0,0	126,5	0,0	670,8
40	TSLP	0,0	0,0	0,0	0,0
41	Activin A	873,9	471,4	1.813,4	3.121,3
42	AgRP	0,0	0,9	0,3	0,0
43	Angiogenin	329,4	303,0	478,1	614,4
44	ANG-1	199,7	64,6	235,5	330,0
45	Angiostatin	0,0	0,0	1.151,4	2.383,0
46	Cathepsin S	123,1	59,7	63,8	45,1
47	CD40	10,9	6,6	2,2	0,0
48	Cripto-1	0,2	0,0	0,0	0,0
49	DAN	5,8	34,2	15,0	4,2
50	DKK-1	906,3	403,4	33,3	289,4
51	E-Cadherin	15,7	0,0	8,6	0,0
52	EpCAM	0,0	0,0	0,0	0,0
53	FAS L	0,0	0,0	0,0	0,0
54	Fcg RIIBC	0,0	1,7	0,0	2,1
55	Follistatin	1.208,8	647,1	32,0	14,7
56	Galectin-7	0,0	0,0	0,0	0,0
57	ICAM-2	120,4	58,6	172,4	386,1
58	IL-13 R1	135,9	84,3	175,6	5,0
59	IL-13 R2	25,3	21,7	15,8	18,5
60	IL-17B	65,5	17,3	60,4	30,7
61	IL-2 Ra	0,7	0,0	0,0	0,0
62	IL-2 Rb	26,4	43,5	71,4	0,0
63	IL-23	7,1	2,9	0,0	0,0
64	LAP(TGFb1)	70,8	27,1	121,9	201,0

65	NrCAM	2,6	7,3	9,5	15,4
66	PAI-1	2.543,4	2.093,4	2.437,6	2.091,8
67	PDGF-AB	4,7	0,0	7,7	12,2
68	Resistin	0,0	0,9	0,3	2,0
69	SDF-1b	0,0	0,0	0,5	0,0
70	gp130	977,9	283,9	634,7	818,2
71	Shh-N	14,5	9,8	0,1	0,1
72	Siglec-5	29,0	11,0	97,5	162,4
73	IL-1 R4	0,0	5,5	0,0	0,0
74	TGFb2	6,6	30,2	0,0	0,0
75	Tie-2	4,1	9,7	5,8	61,2
76	TPO	0,0	0,0	0,0	0,0
77	TRAIL R4	0,8	0,0	0,0	0,0
78	TREM-1	0,0	9,0	3,3	3,8
79	VEGF-C	4,1	0,0	25,5	15,5
80	VEGF R1	0,0	81,1	0,0	0,0
81	Adiponectin	12.863,8	5.931,8	46.069,8	104.699,3
82	Adipsin	331,0	237,7	290,9	291,5
83	AFP	2,7	0,0	1,3	0,0
84	ANGPTL4	877,9	544,0	2.038,8	2.729,4
85	B2M	230,2	187,0	193,3	195,9
86	BCAM	16,3	0,0	11,3	101,3
87	CA125	29,2	25,0	77,1	94,3
88	CA15-3	55,3	0,0	0,0	0,0
89	CEA	4,0	0,0	3,8	3,8
90	CRP	66,4	47,1	85,0	116,0
91	ErbB2	0,0	0,0	0,0	0,0
92	Ferritin	36.798,6	122.589,1	35.155,7	91.304,5
93	FSH	0,0	0,0	0,0	0,0
94	GROa	68.706,5	37.706,3	21.408,3	17.422,4
95	hCGb	0,0	0,0	6,9	0,0
96	IGF-1R	0,0	0,0	0,0	0,0
97	IL-1 RII	0,0	0,0	0,5	0,0
98	IL-3	12,9	9,7	16,9	25,7
99	IL-18 Rb	0,0	1,3	0,0	0,0
100	IL-21	49,8	104,9	108,3	65,3
101	Leptin	0,2	0,0	0,6	0,1
102	MMP-1	14.018,0	12.095,5	10.837,9	12.088,1
103	MMP-2	461,2	322,5	438,0	569,3
104	MMP-3	2.111,5	608,4	979,8	1.092,9
105	MMP-8	8,6	0,0	5,3	1,7

106	MMP-9	89,1	16,3	275,3	295,2
107	MMP-10	4,6	1,3	1,9	5,2
108	MMP-13	0,0	0,7	0,0	0,0
109	NCAM-1	0,0	0,0	3,7	52,9
110	Nidogen-1	4.512,6	3.012,5	3.790,5	3.458,7
111	NSE	99,5	330,4	30,7	175,1
112	OSM	70,4	15,4	70,8	39,9
113	Procalcitonin	0,7	0,0	1,4	0,0
114	Prolactin	0,0	0,0	0,0	0,0
115	PSA-free	0,0	0,0	0,2	0,0
116	Siglec-9	45,7	0,0	56,4	33,0
117	TACE	0,0	0,0	0,0	0,0
118	Thyroglobulin	196,9	0,0	44,7	43,8
119	TIMP-4	99,7	53,2	64,9	56,8
120	TSH	0,0	3,8	18,9	1,5
121	2B4	0,0	0,0	0,0	0,0
122	ADAM9	15,5	13,9	14,1	26,2
123	ANG-2	14,4	8,8	0,0	4,6
124	APRIL	0,0	0,0	0,0	0,0
125	BMP-2	0,0	0,0	19,2	0,0
126	BMP-9	0,0	0,0	0,0	0,0
127	C5a	7,4	0,0	30,7	87,4
128	Cathepsin L	1.692,4	1.119,6	798,8	938,6
129	CD200	41,7	0,0	92,4	0,0
130	CD97	1.318,0	637,7	2.618,0	3.368,4
131	Chemerin	0,0	0,0	1.817,1	2.273,0
132	DcR3	0,0	0,0	178,5	132,0
133	FABP2	0,0	0,0	3,2	0,0
134	FAP	1.006,7	488,9	901,7	672,5
135	FGF-19	3,4	0,0	1,3	0,0
136	Galectin-3	108,6	121,1	109,1	147,2
137	HGF R	27,6	9,9	23,3	48,5
138	IFNab R2	0,0	0,0	0,0	24,5
139	IGF-2	883,7	0,0	1.006,1	0,0
140	IGF-2R	51,2	0,0	0,0	0,0
141	IL-1 R6	0,0	0,0	0,0	0,0
142	IL-24	118,6	0,0	128,2	0,0
143	IL-33	6,8	9,4	3,5	5,0
144	Kallikrein 14	5,0	4,5	2,2	2,6
145	Legumain	3.478,8	1.755,8	2.056,5	1.951,8
146	LOX-1	0,3	0,4	0,0	0,3

147	MBL	125,6	43,3	368,3	623,2
148	Neprilysin	213,3	26,3	616,4	195,1
149	Notch-1	0,0	0,0	24,5	11,6
150	NOV	102,1	81,7	29,2	55,2
151	Osteoactivin	177,4	56,0	172,8	141,2
152	PD-1	7,4	6,8	4,0	12,8
153	PGRP-S	10,7	23,8	57,7	116,5
154	Serpin A4	1.728,8	678,4	3.448,4	3.040,6
155	sFRP-3	235,6	325,6	168,3	315,0
156	Thrombomodulin	1.029,6	1.142,3	1.628,8	1.682,6
157	TLR2	66,7	30,2	118,2	43,3
158	TRAIL R1	1.252,1	752,1	3.188,8	1.598,9
159	Transferrin	13.701,9	7.771,1	12.995,6	13.507,2
160	WIF-1	12,3	11,9	2,4	7,0
161	ACE-2	0,0	0,0	0,0	19.969,2
162	Albumin	284,6	412,4	462,2	682,6
163	AMICA	0,0	0,0	0,0	0,0
164	ANG-4	5,4	13,4	0,0	4,5
165	BAFF	0,0	0,0	0,0	0,6
166	CA19-9	0,0	0,0	0,0	0,0
167	CD163	0,0	0,0	0,0	66,4
168	Clusterin	298,2	269,2	463,5	841,3
169	CRTAM	0,0	0,0	0,0	0,0
170	CXCL14	87,0	98,6	147,1	215,5
171	Cystatin C	3.006,0	1.986,5	3.507,0	3.686,9
172	Decorin	2.484,3	2.459,6	2.317,9	2.063,0
173	Dkk-3	6.583,4	5.701,5	4.615,3	9.001,1
174	DLL1	0,0	2,9	0,0	1,0
175	Fetuin A	6.015,1	1.511,5	1.742,3	8.573,4
176	aFGF	0,0	2.559,4	0,0	1.105,7
177	FOLR1	0,0	5,2	0,0	0,3
178	Furin	4.521,0	3.930,2	4.486,6	4.335,8
179	GASP-1	1,7	0,0	2,9	1,1
180	GASP-2	0,0	5,8	0,0	0,0
181	G-CSF R	0,0	0,0	0,0	0,0
182	HAI-2	0,0	0,0	0,0	0,2
183	IL-17B R	28,1	70,4	29,6	71,7
184	IL-27	1,2	0,0	0,0	9,9
185	LAG-3	0,0	0,0	0,0	0,0
186	LDL R	178,8	58,6	102,0	147,5
187	Pepsinogen I	14,6	10,9	5,3	8,6

188	RANK	79,8	55,6	70,3	76,3
189	RBP4	6.771,3	2.821,3	17.181,0	25.022,8
190	SOST	0,0	0,0	0,0	0,0
191	Syndecan-1	47,0	10,7	10,3	17,5
192	TACI	0,0	0,0	0,0	0,0
193	TFPI	7.451,8	1.883,2	977,9	762,3
194	TSP-1	29.275,5	31.168,2	32.117,5	45.477,3
195	TRAIL R2	0,0	0,0	0,0	0,0
196	TRANCE	0,0	96,7	0,0	0,0
197	Troponin I	0,0	0,0	11,2	0,0
198	uPA	253,9	131,4	390,3	338,8
199	VE-Cadherin	0,0	0,0	0,0	0,0
200	WISP-1	0,0	0,0	41,2	0,0
201	ANGPTL3	0,0	0,0	0,0	9,0
202	biG-H3	10.748,2	9.490,5	8.457,0	11.073,9
203	CA9	0,0	0,0	0,0	28,1
204	Cathepsin B	1.833,5	1.319,9	1.233,2	1.263,9
205	CD23	0,0	0,0	0,0	0,0
206	CHI3L1	1.954,3	1.060,4	1.955,4	2.163,9
207	CTLA4	22,7	0,0	3,8	177,8
208	Dkk-4	0,0	0,0	0,0	0,0
209	DPPIV	1.241,2	547,9	736,3	1.109,7
210	EDA-A2	58,6	0,0	0,0	321,7
211	Epo R	0,0	0,0	0,0	0,0
212	FGF-6	0,0	0,0	0,0	0,0
213	FGF-9	0,0	0,0	0,0	0,0
214	Gas 1	0,0	0,0	0,0	0,0
215	IGFBP-5	0,0	0,0	0,0	0,0
216	IL-1 F5	0,0	0,0	51,0	0,0
217	IL-1 F6	111,0	54,5	38,1	0,0
218	IL-1 F7	0,0	0,0	0,0	0,0
219	IL-1 F8	0,0	0,4	0,1	3,4
220	IL-1 F9	0,0	0,0	179,6	0,0
221	IL-1 F10	0,0	0,0	0,0	0,0
222	IL-1 R5	0,0	0,0	0,0	0,0
223	IL-17C	0,0	0,0	3,4	40,7
224	IL-18	172,1	69,1	119,6	0,0
225	IL-20	0,0	0,0	0,0	0,0
226	IL-34	8,7	0,0	0,0	4,0
227	IL-5 Ra	1.300,0	0,0	4.864,5	274,3
228	IL-10 Ra	0,0	0,0	0,0	0,0

229	Layilin	25,8	73,2	11,2	0,0
230	Leptin R	0,0	0,0	0,0	0,0
231	Marapsin	0,0	0,0	0,0	0,0
232	Mer	0,0	0,0	0,0	0,0
233	MMP-7	0,0	0,0	0,0	7,0
234	P-Cadherin	0,0	0,0	0,0	0,0
235	Prostasin	0,0	0,0	9,7	0,0
236	PSMA	0,0	0,0	0,0	0,0
237	SIGIRR	232,8	0,0	0,0	0,0
238	TGFb RIII	48,2	0,0	14,2	45,1
239	TF	0,0	9,1	0,0	2,8
240	TWEAK	0,0	92,5	0,0	0,0
241	ADAMTS13	0,0	0,0	0,0	0,0
242	Aggrecan	11,3	0,0	0,0	0,0
243	Angiotensinogen	0,0	0,0	285,8	191,6
244	B7-H1	0,0	0,0	0,0	0,0
245	BMPR-IA	85,3	54,3	0,0	59,5
246	BMPR-II	4,1	0,0	0,0	0,0
247	Cadherin-11	0,0	0,0	0,0	0,0
248	CD27	6,0	0,1	0,0	0,0
249	CD6	581,3	450,1	367,1	129,1
250	Ck beta 8-1	0,0	0,0	0,0	0,0
251	CNTF	0,0	941,3	0,0	0,0
252	DNAM-1	131,0	83,3	0,0	0,0
253	EMMPRIN	113,7	74,7	94,3	153,2
254	FLRG	353,3	141,5	228,8	150,3
255	Follistatin-like 1	4.292,2	2.592,7	3.083,5	4.004,6
256	Fractalkine	40,6	0,0	37,1	0,0
257	Galectin-1	3.945,1	3.093,7	2.933,2	3.061,5
258	GITR L	11,3	8,1	14,0	9,7
259	Granulysin	19,1	10,1	9,5	25,2
260	IL-1 R3	75,1	8,4	62,8	96,9
261	IL-15 R	9,9	4,3	8,4	0,0
262	IL-17E	0,0	0,0	0,0	2,0
263	IL-32 alpha	3,9	0,0	0,0	0,0
264	L1CAM-2	48,1	0,0	0,0	0,0
265	LRIG3	33,7	49,8	14,5	0,0
266	LRP-6	0,0	0,0	0,0	0,0
267	MEPE	0,0	0,0	73,4	0,0
268	Nectin-4	0,9	0,0	0,0	0,0
269	Periostin	2.738,2	1.266,1	3.896,3	3.523,5

270	Persephin	0,0	7,6	0,0	0,0
271	Renin	8,6	2,6	7,8	0,0
272	RGM-B	89,6	0,0	21,9	22,0
273	ROBO3	2,6	0,0	0,6	0,7
274	S100A8	0,0	0,0	0,0	0,0
275	Siglec-7	18,5	0,0	0,0	5,7
276	Syndecan-3	0,0	0,0	0,0	0,0
277	Thrombospondin-2	916,5	558,4	664,0	402,1
278	Thrombospondin-5	452,0	605,0	489,8	741,7
279	Tie-1	38,4	25,2	43,1	9,8
280	ULBP-2	0,0	0,0	0,0	0,0
281	ADAM8	0,0	0,0	111,6	0,0
282	ADAM12	16,2	0,0	13,5	13,8
283	B7-H3	39,9	8,4	18,7	67,6
284	BMPRII	0,0	0,0	1,4	1,1
285	Cadherin-4	1,6	1,1	0,0	0,2
286	Cadherin-13	0,0	0,0	26,2	35,7
287	CD48	0,0	0,0	46,0	55,8
288	CD58	5,2	0,0	3,7	0,0
289	CD84	1.443,9	1.020,9	1.031,9	769,3
290	CD99	839,0	787,7	764,6	778,5
291	CD155	13,2	0,0	0,4	0,9
292	CD229	0,0	0,0	0,0	0,0
293	CEACAM-5	64,7	0,0	0,0	0,0
294	CF XIV	14,5	0,0	56,6	0,0
295	Cystatin A	0,0	0,0	0,0	0,0
296	Cystatin B	462,1	391,8	382,4	380,3
297	Cystatin E M	0,0	0,0	0,0	0,0
298	Desmoglein 2	0,0	0,0	0,0	0,0
299	DR3	0,0	0,0	0,0	0,0
300	ErbB4	3,4	10,2	3,0	0,0
301	ESAM	7,9	0,0	20,2	17,1
302	FGF-21	1,9	0,9	5,2	0,0
303	Galectin-2	1,0	0,0	0,0	17,2
304	Galectin-9	29,1	11,0	36,1	28,5
305	ICOS	98,9	16,1	4,3	0,0
306	JAM-A	4,9	16,6	6,7	3,5
307	JAM-B	0,4	0,0	0,0	0,0
308	Kallikrein 5	11,5	6,1	0,8	0,0
309	Midkine	32,2	1,9	16,3	7,6
310	Pentraxin 3	687,4	561,7	412,6	237,5

311	Pref-1	0,0	3,2	0,0	0,0
312	Siglec-10	1.883,6	838,0	715,9	717,7
313	SLAM	0,0	0,0	10,4	0,0
314	SP-D	13,2	22,4	4,1	0,0
315	Syndecan-4	0,6	0,2	0,2	0,5
316	Testican 2	104,2	0,0	46,6	75,3
317	TIM-3	8,2	6,4	5,4	2,4
318	TLR4	0,0	0,0	1,8	0,6
319	TRAIL	1,9	0,0	0,4	0,0
320	ULBP-1	0,0	0,0	0,0	16,4
321	ALK-1	0,0	0,0	0,0	0,0
322	B7-H2	2,2	0,0	0,7	0,0
323	BLAME	0,0	0,0	0,0	0,0
324	BMP-8	0,0	0,0	16,1	0,0
325	CD28	7,4	0,0	52,8	73,9
326	Common beta Chain	53,0	0,0	129,4	29,2
327	Contactin-1	1,1	0,0	3,5	13,5
328	Desmoglein-1	4,1	0,0	3,3	0,0
329	Desmoglein-3	0,0	1,3	0,0	0,0
330	EDAR	0,0	0,0	7,2	6,7
331	EphA1	0,0	0,0	11,2	35,8
332	EphB6	0,0	0,0	35,5	75,8
333	Ephrin-B3	0,0	0,0	0,0	0,0
334	Epiregulin	129,9	0,0	57,4	39,3
335	FGF-12	5,8	0,0	10,8	26,2
336	FGF-17	0,0	0,0	0,0	0,0
337	FOLR2	1,5	0,0	0,9	0,0
338	Galectin-8	14,1	3,8	5,1	6,9
339	GHR	4,9	0,0	19,9	44,9
340	Glypican 1	409,9	68,9	375,4	434,4
341	Glypican 5	0,0	0,0	0,0	8,7
342	IFN-gamma R1	1,4	0,5	1,1	2,1
343	IL-22 R alpha 1	1,8	0,0	1,1	0,0
344	IL-22BP	0,0	0,0	81,9	128,4
345	IL-23 R	0,0	0,0	0,0	0,0
346	IL-31 RA	0,0	0,0	8,1	0,0
347	IL-7 R alpha	59,8	11,8	80,5	88,6
348	Integrin alpha 5	0,0	0,0	152,2	462,7
349	MDM2	0,0	0,0	0,0	0,0
350	Nectin-1	0,0	0,0	63,9	0,0
351	NKp30	0,0	0,0	0,0	0,0

352	Nogo Receptor	0,0	0,0	0,0	0,0
353	Notch-3	26,4	0,0	42,4	52,7
354	OSM R beta	225,0	0,0	249,6	858,2
355	Prolactin R	72,6	0,0	75,7	49,6
356	RELT	28,8	1,7	41,6	75,5
357	Ryk	0,0	0,0	0,0	19,8
358	Semaphorin 6D	43,0	0,0	1,1	6,4
359	Semaphorin 7A	15.514,3	11.157,1	12.802,8	11.273,8
360	Siglec-11	0,0	0,0	0,0	159,6
361	B7-2	0,0	0,0	0,0	0,0
362	BAFF R	0,0	0,0	0,0	0,0
363	Calcitonin	0,0	0,0	0,0	0,0
364	Calsyntenin-1	12,9	33,7	11,1	27,1
365	Cathepsin E	0,0	0,0	0,0	0,0
366	ciAP-2	2,1	0,0	0,0	0,0
367	CF VII	0,0	24,1	0,0	0,0
368	cMASP3	153,1	0,0	21,3	88,9
369	Endocan	14,3	9,4	6,2	12,8
370	EphA2	10,2	12,1	2,7	23,3
371	EphB4	28,6	0,0	28,7	43,4
372	Ephrin-A4	0,0	0,0	0,0	0,0
373	FGF-23	186,5	285,4	0,0	2,4
374	FGF-5	203,6	38,1	13,4	27,2
375	Flt-3	0,0	0,0	0,0	2,5
376	GLP-1	0,0	0,0	0,0	0,0
377	Glypican 2	0,0	0,0	0,0	0,0
378	GM-CSF Ra	0,0	0,0	0,0	0,0
379	GP73	2.772,5	1.086,8	1.533,8	1.953,6
380	HTRA2	277,2	10,3	64,2	68,2
381	IL-20 Ra	1.447,5	0,0	1.960,6	0,0
382	IL-4 Ra	0,0	0,0	1,9	0,3
383	JAM-C	43,3	4,9	14,0	27,8
384	LH	46,0	0,0	7,8	62,8
385	Matrilin-3	4,1	20,1	7,2	16,8
386	MeprinA	0,0	0,0	0,0	0,0
387	MSP R	0,0	0,0	0,0	0,0
388	N-Cadherin	117,9	162,2	73,2	122,6
389	Neprilysin-2	220,6	0,0	186,8	266,7
390	NKp44	0,0	0,0	0,0	0,0
391	PAPP-A	0,0	0,0	0,0	0,0
392	Pepsinogen II	2,1	0,0	10,4	3,2

393	Presenilin 1	0,0	0,9	0,8	0,0
394	PTH	0,0	1,5	1,5	3,0
395	PYY	0,0	0,0	0,0	0,0
396	SOX2	0,0	0,0	0,0	0,0
397	TFF3	0,0	42,0	14,6	139,8
398	TFPI-2	4.816,6	412,8	3.229,6	1.401,7
399	TRACP	182,6	122,2	118,6	238,4
400	Ubiquitin+1	37,6	13,4	6,0	26,5
401	ACE	936,4	484,5	1.208,5	1.131,0
402	Activin RIB	0,0	0,0	0,0	0,0
403	ADAM23	20,5	0,0	59,5	6,6
404	Artemin	0,0	0,0	73,4	0,0
405	Cardiotrophin-1	0,0	0,0	0,0	0,0
406	Cathepsin V	0,0	0,0	0,0	0,0
407	FABP1	0,0	0,0	0,0	0,0
408	FGF-20	0,0	0,0	0,0	0,0
409	GDF-8	0,0	0,0	0,0	0,0
410	HAI-1	0,0	0,0	0,0	0,0
411	IL-27 Ra	0,0	0,0	0,0	0,0
412	Insulin R	6,3	0,0	56,3	0,0
413	Kallikrein 7	0,0	0,0	0,0	0,0
414	LIF R alpha	0,0	0,0	0,0	0,0
415	Lipocalin-1	0,0	5,5	6,3	0,0
416	LTbR	5,5	0,0	0,0	5,5
417	Mesothelin	5,1	6,1	8,9	20,7
418	MFRP	0,0	0,0	0,0	0,0
419	Neuropilin-2	0,0	0,0	0,0	0,0
420	Neurturin	0,0	48,1	0,0	41,2
421	Nidogen-2	1.093,5	617,1	1.407,3	2.232,8
422	Olfactomedin-2	4,0	0,0	8,2	69,0
423	p53	57,9	0,0	1,3	24,6
424	PD-ECGF	0,0	0,0	8,9	0,0
425	PDGF-CC	346,3	0,0	0,0	0,0
426	Progranulin	5.422,9	2.711,2	4.191,7	4.276,1
427	Ret	47,2	0,0	0,0	0,0
428	ROBO4	0,0	0,0	0,0	0,0
429	Semaphorin 6B	0,0	0,0	0,0	0,0
430	Serpín F1	114,3	125,9	56,8	69,1
431	SREC-I	4,2	2,1	41,8	104,2
432	SREC-II	127,1	70,9	175,8	203,8
433	TLR1	0,0	0,0	0,0	0,0

434	TLR3	0,0	0,0	5,9	0,0
435	TPP1	2.818,5	1.455,6	1.886,3	1.892,7
436	TREM-2	0,0	0,0	0,0	0,0
437	TrkC	0,0	0,0	1,9	0,0
438	TROY	0,0	0,0	79,7	0,0
439	Uromodulin	29,1	4,8	49,9	110,3
440	XIAP	81,7	0,0	0,0	0,0
441	4-1BB Ligand	0,0	0,0	8,6	0,0
442	Activin RIIb	0,0	0,0	0,0	0,0
443	Aminopeptidase P2	0,0	0,0	196,0	45,2
444	BAMBI	0,0	0,0	0,0	0,0
445	BOC	0,1	0,0	0,0	0,0
446	Brevican	0,0	0,1	1,0	0,0
447	Carbonic Anhydrase XII	569,7	0,0	0,0	0,0
448	Carboxypeptidase A2	5,9	0,0	6,3	0,0
449	CD300c	0,0	0,0	0,0	0,0
450	CD320	119,8	0,0	160,3	0,0
451	CDNF	0,0	0,0	1,3	0,0
452	CDO	83,7	24,3	37,0	21,9
453	CHST1	0,0	0,0	0,0	0,0
454	CHST4	0,0	0,0	0,0	0,0
455	CILP-1	37,9	5,6	51,1	143,0
456	CNTF R alpha	0,0	0,0	0,0	0,0
457	CRIM1	105,8	77,8	74,7	170,3
458	CRTAC1	0,0	0,0	0,0	0,0
459	CXADR	3,9	0,0	0,0	0,0
460	Dopa Decarboxylase	0,1	0,0	0,0	0,0
461	DPPII	1.815,2	390,1	1.541,0	1.165,0
462	DSPG3	0,0	2,5	0,0	0,0
463	EMR2	1,6	0,0	0,0	0,0
464	FCAR	196,3	0,0	100,3	0,0
465	FCRL1	104,6	0,0	120,9	114,7
466	FCRL2	7,7	0,0	0,0	0,0
467	Gas6	0,0	0,0	0,0	0,0
468	GPR56	9,9	0,0	5,3	0,0
469	GPVI	3,4	0,0	24,7	41,4
470	Hepsin	4,0	8,4	2,0	29,7
471	ILT2	0,0	0,0	0,9	0,0
472	Jagged 2	0,5	0,0	0,0	0,0
473	Kirrel3	2,5	0,0	5,0	0,0
474	KLF4	0,0	0,0	0,0	0,0

475	LAIR1	0,0	0,0	18,7	0,0
476	LAMP	29,3	0,0	64,3	6,4
477	LAMP1	184,0	15,2	141,3	127,2
478	MDGA1	14,0	0,0	14,9	0,0
479	MIS RII	13,2	2,5	35,9	0,0
480	Neurexin 3 beta	4,0	11,3	0,0	22,6
481	AMIGO	23,8	321,0	26,9	101,5
482	Aminopeptidase LRAP	4.743,8	0,0	0,0	0,0
483	Amnionless	0,0	0,0	0,0	0,0
484	Arylsulfatase A	4.056,7	652,4	0,0	0,0
485	Bcl-w	0,0	0,0	0,0	0,0
486	CD109	0,0	0,0	0,0	0,0
487	CD157	2,7	1,4	2,5	3,7
488	CD34	0,0	0,0	0,0	0,0
489	CD83	0,0	0,0	0,0	0,0
490	CLEC-1	0,0	62,9	0,0	0,0
491	CLEC10A	0,0	0,0	0,0	0,0
492	CMG-2	39,1	0,0	57,2	0,0
493	CREG	0,0	41,0	0,0	0,0
494	Cystatin SN	20,7	0,0	31,7	0,0
495	Cytokeratin-8	0,0	0,0	0,0	0,0
496	Dectin-1	0,0	9,1	0,0	0,0
497	Desmocollin-3	0,0	0,0	0,0	0,0
498	Endoglycan	0,0	0,0	0,0	0,0
499	Galectin-4	0,0	0,0	0,0	0,0
500	HAPLN1	0,0	0,0	0,0	0,0
501	Jagged 1	0,0	0,0	0,0	0,0
502	Langerin	0,0	0,0	0,0	0,0
503	Lumican	1.593,6	1.529,9	1.726,4	1.702,4
504	Matriptase	103,6	6,6	0,0	43,9
505	MEP1B	0,0	0,0	0,0	0,0
506	Nectin-3	17,0	0,0	0,0	0,0
507	OX40	0,0	0,0	0,0	0,0
508	OX40 Ligand	0,0	8,9	0,0	0,0
509	p27	0,0	0,0	0,0	0,0
510	Pappalysin-2	131,1	73,8	115,2	0,0
511	Plexin B3	0,0	0,0	0,0	0,0
512	Plexin D1	1.069,9	0,0	0,0	0,0
513	proGRP	288,7	0,0	0,0	0,0
514	PSA-total	0,0	0,0	0,0	0,0
515	Reg1B	0,0	0,0	0,0	0,0

516	RGM-A	2,6	0,0	1,3	0,0
517	ROBO2	0,0	0,0	0,0	0,0
518	Spinesin	0,0	0,0	0,0	0,0
519	TWEAK R	145,6	110,2	200,8	98,0
520	ULBP-3	0,0	0,0	0,0	0,0
521	AR	9,2	1,8	6,8	11,9
522	BDNF	1,9	0,9	2,0	1,4
523	bFGF	21,8	1,5	0,4	0,8
524	BMP-4	0,0	0,0	0,0	0,0
525	BMP-5	0,0	443,6	2.295,4	1.124,4
526	BMP-7	0,0	0,0	93,5	24,9
527	b-NGF	1,0	0,7	1,8	1,9
528	EGF	0,0	0,0	0,2	0,1
529	EGF R	180,9	76,9	131,5	159,4
530	EG-VEGF	2,0	0,8	7,0	5,2
531	FGF-4	76,1	287,8	341,9	236,7
532	FGF-7	187,6	78,9	133,1	110,8
533	GDF-15	202,6	83,7	419,0	391,6
534	GDNF	14,9	24,0	13,1	18,6
535	GH	5,8	3,2	9,8	9,7
536	HB-EGF	1,1	2,1	2,3	5,1
537	HGF	1.211,6	427,1	308,2	256,1
538	IGFBP-1	28,1	13,6	21,4	15,4
539	IGFBP-2	41,2	0,0	85,3	155,3
540	IGFBP-3	4.488,6	442,7	13.877,4	0,0
541	IGFBP-4	66.335,7	32.663,3	54.412,5	52.957,5
542	IGFBP-6	16.930,8	16.829,9	13.466,8	13.413,2
543	IGF-1	0,0	0,0	0,0	0,0
544	Insulin	8,0	9,0	18,2	22,3
545	MCSF R	44,3	12,2	104,3	160,5
546	NGF R	0,0	0,8	5,8	5,7
547	NT-3	1,8	1,8	40,3	47,1
548	NT-4	16,5	9,0	44,5	42,3
549	OPG	27,3	13,6	27,2	16,0
550	PDGF-AA	11,5	4,1	13,1	19,0
551	PIGF	4,4	0,7	4,2	2,5
552	SCF	24,3	13,1	54,5	66,7
553	SCF R	16,4	3,4	36,2	56,3
554	TGFa	2,7	0,0	3,3	2,2
555	TGFb1	9.044,1	2.810,0	91,6	6.263,2
556	TGFb3	6,7	0,0	20,8	16,9

557	VEGF	205,1	142,0	165,2	331,1
558	VEGF R2	6,7	3,8	57,8	41,8
559	VEGF R3	90,5	40,4	105,9	244,6
560	VEGF-D	0,0	0,0	4,3	0,9
561	BLC	0,0	0,0	0,0	0,3
562	Eotaxin	6,0	3,5	39,8	55,1
563	Eotaxin-2	0,5	0,5	0,9	2,9
564	G-CSF	5,1	4,4	4,1	3,4
565	GM-CSF	0,6	7,3	0,0	2,6
566	I-309	0,0	4,2	0,2	0,4
567	ICAM-1	41,5	29,2	79,2	139,9
568	IFN γ	67,9	118,8	57,6	37,6
569	IL-1a	0,3	0,6	1,8	0,0
570	IL-1b	3,2	4,3	1,8	1,7
571	IL-1ra	143,9	161,1	171,5	160,3
572	IL-2	35,8	58,5	61,1	36,8
573	IL-4	1,3	0,5	5,1	2,9
574	IL-5	28,1	51,3	40,7	41,0
575	IL-6	218,7	361,6	380,2	296,9
576	IL-6R	10,1	7,3	14,9	28,4
577	IL-7	3,4	5,8	2,3	3,4
578	IL-8	10,0	15,3	3,3	1,6
579	IL-10	0,8	1,2	0,4	0,9
580	IL-11	7,4	5,7	5,6	13,9
581	IL-12p40	0,3	0,0	0,0	0,0
582	IL-12p70	0,0	0,0	0,1	0,1
583	IL-13	4,4	2,5	3,1	1,9
584	IL-15	2,5	0,6	0,8	0,9
585	IL-16	1,5	0,0	1,4	1,2
586	IL-17	1,5	0,0	0,3	0,1
587	MCP-1	85,8	68,6	98,7	111,2
588	MCSF	0,7	1,0	1,0	1,3
589	MIG	0,0	0,0	0,0	0,0
590	MIP-1a	0,3	0,0	0,0	0,0
591	MIP-1b	0,2	0,1	0,1	0,1
592	MIP-1d	0,5	0,0	1,2	1,7
593	PDGF-BB	13,7	5,2	9,0	13,3
594	RANTES	529,1	364,7	808,4	713,5
595	TIMP-1	1.556,4	1.605,6	1.551,8	1.379,2
596	TIMP-2	4.734,6	4.886,9	4.731,3	4.101,8
597	TNF α	33,5	95,2	77,3	89,0

598	TNFb	168,3	236,8	308,3	151,0
599	TNF RI	538,7	233,6	649,6	766,7
600	TNF RII	20,9	2,9	15,6	11,4
601	4-1BB	0,0	0,0	0,0	0,0
602	ALCAM	10,0	8,9	6,4	11,1
603	B7-1	0,0	0,0	1,0	1,1
604	BCMA	0,0	0,0	2,2	9,9
605	CD14	123,9	41,0	371,9	657,2
606	CD30	438,7	162,4	54,8	0,0
607	CD40L	4,9	1,5	12,5	24,1
608	CEACAM-1	16,7	22,2	36,2	69,3
609	DR6	36,9	13,7	28,5	30,5
610	Dtk	0,0	0,0	6,9	1,3
611	Endoglin	35,3	8,5	11,8	16,8
612	ErbB3	0,0	0,0	0,0	1,5
613	E-Selectin	0,0	0,0	0,0	0,0
614	Fas	10,0	5,5	7,5	7,6
615	Flt-3L	2,1	0,7	2,7	1,9
616	GITR	22,4	26,5	21,2	67,7
617	HVEM	9,1	0,0	4,2	0,0
618	ICAM-3	10,8	0,0	0,0	0,0
619	Contactin-2	0,0	0,0	0,0	0,0
620	IL-1 RI	214,5	87,3	146,6	181,9
621	IL-2 Rg	0,6	0,2	0,6	0,4
622	IL-10 Rb	0,0	0,4	0,0	0,5
623	IL-17R	49,7	1,7	21,5	28,0
624	IL-21R	0,0	0,0	0,0	0,0
625	LIMPII	30,0	11,2	20,6	43,1
626	Lipocalin-2	0,0	0,0	8,2	15,3
627	L-Selectin	11,0	0,0	132,4	0,0
628	LYVE-1	8,4	3,3	30,1	63,4
629	MICA	41,2	7,3	7,4	4,1
630	MICB	84,4	0,0	22,5	66,2
631	NRG1-b1	2,8	0,4	2,5	7,0
632	PDGF Rb	2.779,2	198,4	1.730,3	1.395,3
633	PECAM-1	0,0	2,3	13,5	33,6
634	RAGE	0,2	0,0	0,0	4,7
635	TIM-1	0,0	0,0	1,9	6,3
636	TRAIL R3	4,3	1,5	5,3	4,9
637	Trappin-2	0,0	0,0	0,0	20,0
638	uPAR	2.433,4	1.564,2	2.276,1	2.521,6

639	VCAM-1	229,3	50,2	323,8	352,5
640	XEDAR	7,0	14,3	16,4	15,0

Concentraciones (pg/mL) de las proteínas evaluadas en el MC del lote 3 (140404)

N°	Proteína	Cultivo 2D estático		Cultivo 3D dinámico	
		Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia
1	6Ckine	0,0	891,1	722,6	697,2
2	Axl	0,0	0,0	38,5	17,4
3	BTC	64,2	79,5	95,9	87,4
4	CCL28	56,8	546,3	459,6	573,3
5	CTACK	26,6	164,2	50,4	53,5
6	CXCL16	37,2	68,3	8,8	0,0
7	ENA-78	0,0	975,7	64,8	37,3
8	Eotaxin-3	441,1	1.023,7	462,2	478,6
9	GCP-2	0,0	116,9	7,9	5,6
10	GRO	0,0	22,0	0,0	0,0
11	HCC-1	0,0	0,0	0,0	0,0
12	HCC-4	0,0	0,0	0,0	0,0
13	IL-9	0,0	0,0	603,0	998,3
14	IL-17F	3,6	0,0	0,0	2,9
15	IL-18 BPa	53,1	0,0	52,5	0,0
16	IL-28A	45,6	28,0	45,3	14,3
17	IL-29	416,8	2.981,8	1.925,4	2.048,3
18	IL-31	0,0	0,0	0,0	0,0
19	IP-10	0,0	23,2	0,0	0,0
20	I-TAC	39,1	132,1	210,4	208,6
21	LIF	84,6	262,8	192,6	181,1
22	LIGHT	49,9	45,9	0,0	0,0
23	Lymphotactin	967,0	764,2	741,8	782,0
24	MCP-2	0,0	23,6	0,0	6,5
25	MCP-3	27,3	184,9	24,6	35,2
26	MCP-4	0,0	0,6	4,5	1,9
27	MDC	0,0	0,0	0,0	0,9
28	MIF	16.064,7	26.349,3	20.680,0	21.447,2
29	MIP-3a	0,7	23,2	2,2	12,2
30	MIP-3b	0,0	0,0	0,0	4,8
31	MPIF-1	0,0	0,0	0,0	0,0
32	MSP	78,5	183,5	203,5	145,2
33	NAP-2	62,4	64,2	52,4	60,9

34	OPN	10.892,7	7.712,1	0,0	0,0
35	PARC	2,7	0,0	5,1	12,1
36	PF4	8.492,6	9.574,6	3.844,0	3.930,4
37	SDF-1a	34,2	31,8	18,7	31,9
38	TARC	0,0	0,0	0,0	0,9
39	TECK	0,0	0,0	0,0	178,2
40	TSLP	0,0	0,0	0,0	0,0
41	Activin A	3.108,0	3.338,6	2.680,1	2.103,0
42	AgRP	1,3	0,0	0,2	2,0
43	Angiogenin	407,8	502,5	265,4	294,6
44	ANG-1	461,4	271,4	100,9	72,8
45	Angiostatin	0,0	245,2	58,2	384,2
46	Cathepsin S	221,9	416,7	28,5	26,9
47	CD40	6,3	4,2	4,3	0,2
48	Cripto-1	8,8	0,0	0,5	0,1
49	DAN	73,9	0,0	3,6	34,6
50	DKK-1	75,3	553,2	135,0	71,1
51	E-Cadherin	136,3	0,0	22,5	22,6
52	EpCAM	0,0	0,0	0,0	0,0
53	FAS L	0,0	0,0	0,0	0,0
54	Fcg RIIBC	4,5	3,4	2,6	3,4
55	Follistatin	1.026,5	1.039,7	2,5	16,0
56	Galectin-7	14,6	0,0	276,2	1.607,5
57	ICAM-2	90,5	50,6	93,7	110,3
58	IL-13 R1	81,4	80,8	5,7	62,3
59	IL-13 R2	33,2	23,3	6,8	121,9
60	IL-17B	20,7	82,5	0,0	25,6
61	IL-2 Ra	0,0	3,3	0,0	2,4
62	IL-2 Rb	0,3	4,5	43,6	32,1
63	IL-23	0,0	49,7	0,0	0,0
64	LAP(TGFb1)	65,1	76,8	60,0	65,0
65	NrCAM	12,0	0,0	0,0	16,4
66	PAI-1	1.851,0	2.315,1	2.039,2	2.186,2
67	PDGF-AB	0,0	5,4	6,8	8,0
68	Resistin	0,0	0,0	0,0	0,0
69	SDF-1b	0,0	10,8	0,0	0,0
70	gp130	822,8	1.872,5	530,4	257,3
71	Shh-N	10,6	10,8	3,2	3,0
72	Siglec-5	16,7	24,5	37,8	57,9
73	IL-1 R4	0,0	36,9	0,4	0,0
74	TGFb2	20,4	69,3	24,7	59,7

75	Tie-2	7,1	25,5	14,7	22,9
76	TPO	0,0	0,0	0,0	0,0
77	TRAIL R4	4,7	0,0	0,0	5,5
78	TREM-1	12,8	8,1	4,6	12,3
79	VEGF-C	6,9	4,4	0,0	11,1
80	VEGF R1	0,0	56,6	0,0	47,7
81	Adiponectin	17.267,3	6.587,1	23.208,50	17.425,90
82	Adipsin	221,4	228,3	111,6	143,1
83	AFP	0,0	1,7	0	0
84	ANGPTL4	906,3	703,8	1.734,40	2.179,50
85	B2M	169,5	201,5	210,5	221,1
86	BCAM	68,8	11,2	47,2	10,6
87	CA125	0,5	96,7	0,2	0
88	CA15-3	6,6	1,3	0	0
89	CEA	1,6	2,8	0	0
90	CRP	74,3	42,1	36,1	24,4
91	ErbB2	0,0	0,4	0	0
92	Ferritin	39.262,6	799.430,1	181.954,80	362.485,80
93	FSH	21,0	0,0	0	0
94	GROa	3.791,3	103.229,3	38.156,80	31.842,80
95	hCGb	2,1	6,0	0	0
96	IGF-1R	0,0	0,0	0	0
97	IL-1 RII	0,0	0,0	0	2,7
98	IL-3	3,0	4,9	2,9	7,5
99	IL-18 Rb	0,0	0,0	0	0
100	IL-21	270,9	304,9	5,8	0
101	Leptin	0,2	0,1	0,6	0,6
102	MMP-1	10.430,6	18.539,8	13.122,30	13.298,90
103	MMP-2	991,5	898,5	360,4	437,4
104	MMP-3	605,6	5.133,4	3.119,90	3.321,90
105	MMP-8	5,2	20,2	7,6	18,5
106	MMP-9	39,5	52,1	54,8	86,3
107	MMP-10	0,2	4,7	4	6,4
108	MMP-13	0,0	0,0	0,9	28,4
109	NCAM-1	0,0	0,0	0	0
110	Nidogen-1	3.836,5	5.555,8	1.368,50	1.525,60
111	NSE	17,0	660,7	66,5	190,4
112	OSM	63,6	133,8	47,3	76,1
113	Procalcitonin	0,0	8,9	0,5	0
114	Prolactin	0,0	0,0	0	0
115	PSA-free	0,0	0,0	0	0

116	Siglec-9	8,8	40,5	0	27,2
117	TACE	6,8	0,0	0	0
118	Thyroglobulin	0,0	110,4	0	0
119	TIMP-4	45,1	219,7	16,7	30,2
120	TSH	23,7	6,0	0	0
121	2B4	0,0	0,0	0,0	0,0
122	ADAM9	0,0	22,3	10,9	0,0
123	ANG-2	0,0	5,3	0,0	1,7
124	APRIL	0,0	0,0	483,2	0,0
125	BMP-2	0,0	0,0	0,0	0,0
126	BMP-9	0,0	0,0	0,0	0,0
127	C5a	4,1	8,1	5,0	9,2
128	Cathepsin L	1.505,1	1.789,2	925,9	640,3
129	CD200	0,0	0,0	0,0	0,0
130	CD97	314,4	1.441,1	760,7	2.593,9
131	Chemerin	346,0	2.026,1	0,0	90,6
132	DcR3	0,0	0,0	424,9	0,0
133	FABP2	0,0	0,0	0,0	3,8
134	FAP	659,7	1.447,6	1.424,3	931,2
135	FGF-19	0,0	0,0	0,0	0,0
136	Galectin-3	140,9	103,0	105,4	89,9
137	HGF R	18,5	66,2	28,6	15,4
138	IFNab R2	160,1	0,0	0,0	0,0
139	IGF-2	456,7	109,4	0,0	0,0
140	IGF-2R	0,0	699,7	0,0	0,0
141	IL-1 R6	0,0	0,0	0,0	0,0
142	IL-24	0,0	48,2	0,0	0,0
143	IL-33	5,5	7,3	0,3	0,0
144	Kallikrein 14	2,9	6,8	0,0	0,0
145	Legumain	3.522,6	3.264,4	1.162,0	927,5
146	LOX-1	0,3	0,6	0,0	0,3
147	MBL	64,0	81,6	76,3	85,3
148	Nepriylisin	106,4	409,6	104,9	187,2
149	Notch-1	18,6	39,9	0,0	0,0
150	NOV	282,8	812,1	35,4	22,1
151	Osteoactivin	117,8	251,9	95,2	75,0
152	PD-1	10,5	14,4	0,0	0,4
153	PGRP-S	14,4	9,9	10,9	15,7
154	Serpin A4	953,7	1.181,0	1.444,7	1.576,1
155	sFRP-3	145,6	415,8	0,0	61,8
156	Thrombomodulin	1.285,2	1.637,4	1.300,2	1.773,0

157	TLR2	91,8	96,4	0,0	0,0
158	TRAIL R1	933,5	349,2	0,0	809,1
159	Transferrin	14.303,5	14.628,3	13.026,5	7.159,2
160	WIF-1	2,3	10,2	0,0	15,7
161	ACE-2	0,0	0,0	0	0
162	Albumin	645,0	586,1	523,6	553,6
163	AMICA	0,0	0,0	0	0
164	ANG-4	0,0	0,0	9	0
165	BAFF	0,0	0,0	0	0
166	CA19-9	0,0	0,0	0	0
167	CD163	0,0	6,8	3	0
168	Clusterin	293,1	160,5	118,3	165,9
169	CRTAM	0,0	0,0	0	0
170	CXCL14	97,3	85,3	58	70,6
171	Cystatin C	2.850,0	4.146,7	790,2	1.258,60
172	Decorin	2.789,8	2.799,3	2.123,70	1.918,60
173	Dkk-3	6.798,1	11.308,8	2.377,00	2.842,60
174	DLL1	0,0	0,0	0	5,3
175	Fetuin A	3.183,2	3.644,8	0	0
176	aFGF	1.425,8	0,0	0	0
177	FOLR1	1,2	1,4	0,2	4,4
178	Furin	4.122,5	4.180,1	3.959,50	4.064,20
179	GASP-1	0,0	3,4	0	0
180	GASP-2	2,5	0,0	0	0
181	G-CSF R	0,0	0,6	0	0
182	HAI-2	0,1	4,7	0	1,2
183	IL-17B R	53,3	37,1	9	11,2
184	IL-27	0,0	0,0	0	0,3
185	LAG-3	0,0	0,0	0	0
186	LDL R	149,5	205,9	50,6	67,1
187	Pepsinogen I	0,9	1,2	0,3	0,9
188	RANK	55,1	71,0	55	42,8
189	RBP4	3.220,4	3.595,3	6.328,70	8.667,80
190	SOST	0,0	0,0	0	0
191	Syndecan-1	15,6	17,2	9,5	11,1
192	TACI	0,0	0,0	0	0
193	TFPI	1.658,7	7.500,3	242,9	230,6
194	TSP-1	32.259,8	34.781,9	20.695,70	22.032,30
195	TRAIL R2	0,0	0,0	0	0
196	TRANCE	0,0	0,0	0	0
197	Troponin I	0,0	24,3	0	0

198	uPA	743,7	816,4	640,3	907,6
199	VE-Cadherin	26,2	48,5	0	0
200	WISP-1	0,0	0,0	0	0
201	ANGPTL3	0,0	0,0	0	0
202	bIG-H3	9.521,8	9.915,3	9.484,60	9.941,60
203	CA9	0,0	0,0	0	0
204	Cathepsin B	1.246,9	1.639,8	962,4	977,7
205	CD23	0,0	0,0	0	0
206	CHI3L1	2.051,3	1.880,3	1.960,50	2.267,80
207	CTLA4	36,6	11,1	0	0
208	Dkk-4	0,0	0,0	0	0
209	DPPIV	458,6	961,6	1.890,40	1.904,10
210	EDA-A2	0,0	74,3	0	0
211	Epo R	0,0	0,0	0	0
212	FGF-6	0,0	0,0	0	0
213	FGF-9	0,0	0,0	0	0
214	Gas 1	0,0	0,7	0	0
215	IGFBP-5	0,0	0,0	0	0
216	IL-1 F5	0,0	0,0	0	0
217	IL-1 F6	0,0	0,0	0	22,6
218	IL-1 F7	0,0	100,8	0	0
219	IL-1 F8	0,0	4,9	0	0
220	IL-1 F9	102,9	164,4	0	0
221	IL-1 F10	0,0	1.343,8	0	0
222	IL-1 R5	0,0	0,0	0	0
223	IL-17C	0,0	2,9	0	0
224	IL-18	27,9	138,7	0	76,6
225	IL-20	0,0	0,0	0	0
226	IL-34	0,0	1,7	0	0
227	IL-5 Ra	0,0	956,6	0	0
228	IL-10 Ra	0,0	0,0	0	0
229	Layilin	0,0	40,4	0	0
230	Leptin R	0,0	0,0	0	0
231	Marapsin	0,0	0,0	0	0
232	Mer	0,0	0,0	0	0
233	MMP-7	0,0	0,0	0	0
234	P-Cadherin	0,0	0,0	0	0
235	Prostasin	0,0	151,3	0	0
236	PSMA	0,0	0,0	0	0
237	SIGIRR	495,6	461,0	151,7	0
238	TGFb RIII	16,8	66,9	0	4

239	TF	0,4	4,7	0	3,6
240	TWEAK	23,6	95,5	0	0
241	ADAMTS13	0,0	0,0	81,3	0,0
242	Aggrecan	16,4	11,7	0,0	0,0
243	Angiotensinogen	0,0	402,6	776,3	0,0
244	B7-H1	0,0	0,0	35,4	0,0
245	BMPR-IA	62,7	97,5	49,1	34,6
246	BMPR-II	0,0	0,0	0,0	0,0
247	Cadherin-11	0,0	0,0	0,0	0,0
248	CD27	0,0	0,0	2,3	0,0
249	CD6	0,0	287,4	941,8	601,1
250	Ck beta 8-1	0,0	0,0	0,0	0,0
251	CNTF	310,0	0,0	0,0	0,0
252	DNAM-1	0,0	0,0	0,0	0,0
253	EMMPRIN	73,0	278,4	181,4	143,8
254	FLRG	335,3	812,3	166,2	160,0
255	Follistatin-like 1	4.912,9	4.178,5	1.359,4	1.409,2
256	Fractalkine	2,2	26,3	153,5	15,7
257	Galectin-1	2.720,8	3.932,3	3.448,4	3.146,7
258	GITR L	1,0	5,3	17,5	13,3
259	Granulysin	26,0	23,7	19,2	0,0
260	IL-1 R3	54,5	91,3	57,5	0,8
261	IL-15 R	5,4	9,7	9,1	4,4
262	IL-17E	0,0	14,1	0,0	0,0
263	IL-32 alpha	0,5	0,0	0,3	0,0
264	L1CAM-2	0,0	0,0	0,0	0,0
265	LRIG3	71,7	5,2	59,3	0,0
266	LRP-6	0,0	0,0	0,0	0,0
267	MEPE	285,8	314,7	200,7	32,8
268	Nectin-4	27,4	6,4	0,0	0,0
269	Periostin	3.857,8	4.885,3	3.560,4	2.828,2
270	Persephin	636,7	0,0	0,0	0,0
271	Renin	29,6	29,0	17,7	0,0
272	RGM-B	56,1	21,9	0,0	0,0
273	ROBO3	1,8	2,6	0,5	0,0
274	S100A8	0,0	0,0	0,0	0,0
275	Siglec-7	0,0	5,2	0,0	0,0
276	Syndecan-3	146,8	0,0	0,0	0,0
277	Thrombospondin-2	1.387,5	1.341,5	451,5	488,1
278	Thrombospondin-5	1.391,7	1.244,8	844,9	1.259,7
279	Tie-1	84,2	0,0	0,0	13,4

280	ULBP-2	0,0	0,0	0,0	0,0
281	ADAM8	0,0	0,0	0,0	35,2
282	ADAM12	7,8	0,0	0,0	0,0
283	B7-H3	10,5	56,8	45,1	43,1
284	BMPR-IB	0,0	0,6	0,0	2,0
285	Cadherin-4	0,0	5,2	0,0	6,4
286	Cadherin-13	0,0	3,8	0,0	7,7
287	CD48	0,0	38,6	0,0	0,0
288	CD58	18,2	26,5	10,1	21,0
289	CD84	437,8	1.294,2	1.638,2	1.371,9
290	CD99	726,2	838,2	774,9	846,4
291	CD155	0,0	0,0	2,8	0,8
292	CD229	0,0	0,0	0,0	0,0
293	CEACAM-5	0,0	11,9	13,9	12,3
294	CF XIV	0,0	0,0	0,0	6,2
295	Cystatin A	0,0	0,1	0,0	0,0
296	Cystatin B	368,8	470,7	430,4	431,6
297	Cystatin E M	0,0	0,0	96,0	118,8
298	Desmoglein 2	0,0	0,0	0,0	0,0
299	DR3	0,0	291,1	0,0	0,0
300	ErbB4	0,0	14,8	8,5	10,6
301	ESAM	0,0	0,0	0,0	32,8
302	FGF-21	0,0	0,7	0,0	0,0
303	Galectin-2	0,0	0,0	0,0	0,0
304	Galectin-9	15,7	75,5	30,6	27,0
305	ICOS	0,0	1,3	9,5	0,0
306	JAM-A	0,0	9,7	4,5	4,0
307	JAM-B	0,0	0,0	0,0	6,5
308	Kallikrein 5	0,0	24,3	0,0	15,7
309	Midkine	13,2	50,2	0,0	1,3
310	Pentraxin 3	1.240,6	1.614,5	378,7	552,5
311	Pref-1	0,0	0,0	0,0	36,1
312	Siglec-10	417,1	1.863,7	1.786,5	2.135,7
313	SLAM	0,0	0,0	5,9	5,6
314	SP-D	0,0	0,0	3,3	0,0
315	Syndecan-4	0,3	1,1	0,2	0,3
316	Testican 2	0,0	0,0	0,0	0,0
317	TIM-3	0,0	0,0	3,7	0,0
318	TLR4	0,0	0,0	0,0	0,3
319	TRAIL	0,0	0,0	0,1	0,0
320	ULBP-1	0,0	0,0	0,0	0,0

321	ALK-1	0,0	0,0	0,3	0,0
322	B7-H2	0,0	1,2	4,8	0,0
323	BLAME	0,0	2,7	6,6	2,9
324	BMP-8	0,0	0,0	0,0	0,0
325	CD28	37,3	40,8	50,3	0,0
326	Common beta Chain	62,8	117,7	230,9	311,3
327	Contactin-1	10,7	4,5	0,0	0,0
328	Desmoglein-1	1,0	8,4	0,0	0,0
329	Desmoglein-3	0,0	0,0	25,5	29,7
330	EDAR	0,0	0,2	5,6	0,0
331	EphA1	0,0	0,0	0,4	28,4
332	EphB6	28,1	17,8	5,2	20,1
333	Ephrin-B3	0,0	0,0	138,9	8,1
334	Epiregulin	0,0	76,3	79,3	163,2
335	FGF-12	0,0	38,9	32,5	41,2
336	FGF-17	25,3	7,3	74,4	0,0
337	FOLR2	0,0	0,3	0,0	17,1
338	Galectin-8	0,0	31,9	9,8	13,6
339	GHR	0,0	0,0	10,1	7,4
340	Glypican 1	509,6	739,0	395,7	249,2
341	Glypican 5	0,0	40,7	24,7	26,7
342	IFN-gamma R1	0,3	0,1	1,7	0,9
343	IL-22 R alpha 1	0,0	0,0	0,0	16,1
344	IL-22BP	0,0	28,1	0,0	1.009,8
345	IL-23 R	0,0	0,0	0,0	0,0
346	IL-31 RA	0,0	0,0	0,0	14,8
347	IL-7 R alpha	15,3	75,3	53,0	76,8
348	Integrin alpha 5	188,3	362,4	355,8	525,3
349	MDM2	0,0	14,3	0,0	86,7
350	Nectin-1	0,0	0,0	0,0	0,0
351	NKp30	0,0	0,0	0,0	0,0
352	Nogo Receptor	0,0	31,4	0,0	288,9
353	Notch-3	8,4	37,8	41,8	48,5
354	OSM R beta	0,0	592,0	413,6	381,4
355	Prolactin R	2,5	74,3	0,0	167,7
356	RELT	14,8	45,1	26,6	44,4
357	Ryk	0,0	0,0	0,0	0,0
358	Semaphorin 6D	25,1	150,1	75,4	964,5
359	Semaphorin 7A	10.507,3	14.645,4	12.706,7	11.793,9
360	Siglec-11	0,0	0,0	56,7	656,6
361	B7-2	0,0	1,1	0,0	0,0

362	BAFF R	0,0	1,6	0,0	0,0
363	Calcitonin	0,0	2.520,4	0,0	0,0
364	Calsyntenin-1	0,0	35,1	0,0	0,0
365	Cathepsin E	0,0	0,0	0,0	0,0
366	cIAP-2	0,0	0,0	0,0	0,0
367	CF VII	53,3	233,2	0,0	0,0
368	cMASP3	0,0	112,7	0,0	0,0
369	Endocan	13,9	83,6	3,9	5,6
370	EphA2	17,9	48,1	0,0	0,0
371	EphB4	26,7	48,5	31,6	21,3
372	Ephrin-A4	0,0	0,0	1.085,5	1.783,4
373	FGF-23	38,0	158,3	0,0	0,0
374	FGF-5	0,0	383,9	0,0	0,0
375	Flt-3	1,6	1,1	0,0	0,0
376	GLP-1	0,0	1,2	0,0	0,0
377	Glypican 2	0,0	13,9	0,0	0,0
378	GM-CSF Ra	0,0	651,0	0,0	0,0
379	GP73	2.435,2	1.408,5	413,5	404,4
380	HTRA2	73,7	318,1	45,0	0,0
381	IL-20 Ra	721,5	1.434,8	1.183,5	0,0
382	IL-4 Ra	4,2	11,2	14,2	9,7
383	JAM-C	0,0	15,7	25,5	13,9
384	LH	32,1	86,8	0,0	0,0
385	Matrilin-3	41,6	74,6	0,0	0,0
386	MeprinA	0,0	0,0	0,0	0,0
387	MSP R	0,0	9,8	0,0	0,0
388	N-Cadherin	28,7	243,0	26,1	0,0
389	Nepriylsin-2	0,0	229,1	0,0	0,0
390	NKp44	0,0	0,0	0,0	0,0
391	PAPP-A	0,0	109,6	1.423,5	1.552,8
392	Pepsinogen II	3,3	18,3	28,4	23,1
393	Presenilin 1	0,5	20,8	0,0	0,0
394	PTH	0,0	5,3	0,0	0,0
395	PYY	0,0	51,6	70,9	0,0
396	SOX2	0,0	0,0	0,0	0,0
397	TFF3	34,1	181,0	0,0	0,0
398	TFPI-2	674,3	11.239,9	7.385,8	3.359,1
399	TRACP	116,9	285,0	0,0	0,0
400	Ubiquitin+1	0,0	74,1	0,0	0,0
401	ACE	769,2	1.063,3	500,4	476,9
402	Activin RIB	0,0	0,0	2,2	0

403	ADAM23	0,0	0,0	10,4	0
404	Artemin	20,4	0,0	0	0
405	Cardiotrophin-1	40,2	0,0	21,3	0
406	Cathepsin V	0,0	0,0	0	0
407	FABP1	0,0	0,0	0	0
408	FGF-20	0,0	0,0	0	0
409	GDF-8	0,0	0,0	0	0
410	HAI-1	0,0	0,0	0	0
411	IL-27 Ra	26,1	0,0	0	9,8
412	Insulin R	0,0	0,0	0	0
413	Kallikrein 7	0,0	6,1	0	0
414	LIF R alpha	1,6	0,0	0	0
415	Lipocalin-1	3,0	0,0	0	0
416	LTbR	0,6	9,4	0	0
417	Mesothelin	4,5	0,0	2,7	0,7
418	MFRP	0,0	0,0	0	0
419	Neuropilin-2	0,0	0,0	0	0
420	Neurturin	0,0	0,0	0	0
421	Nidogen-2	1.594,0	1.981,4	734,6	1.104,70
422	Olfactomedin-2	10,7	7,6	0	0
423	p53	67,1	0,0	0	0
424	PD-ECGF	0,0	0,0	0	15,1
425	PDGF-CC	0,0	696,3	0	0
426	Progranulin	2.881,7	7.180,7	1.161,70	1.367,60
427	Ret	0,0	0,0	730,4	0
428	ROBO4	0,0	0,0	0	0
429	Semaphorin 6B	0,0	0,0	0	0
430	Serpin F1	74,6	37,5	68,9	12
431	SREC-I	0,0	0,0	0	2,7
432	SREC-II	239,4	336,3	44	406,7
433	TLR1	0,0	0,0	0	0
434	TLR3	21,2	0,0	0,1	19,3
435	TPP1	3.692,5	4.652,6	912,1	526,2
436	TREM-2	0,0	0,0	0	0
437	TrkC	0,0	0,0	0	0
438	TROY	0,0	0,0	0	0
439	Uromodulin	0,1	0,0	2,5	27,3
440	XIAP	0,0	0,0	0	0
441	4-1BB Ligand	0,0	11,2	0	0
442	Activin RIIB	0,0	72,9	0	13,5
443	Aminopeptidase P2	0,0	1,7	85,6	0

444	BAMBI	0,0	0	0	0
445	BOC	0,0	0,6	0,5	1,8
446	Brevican	1,1	2,1	6	3,2
447	Carbonic Anhydrase XII	7,1	52,2	0	440,2
448	Carboxypeptidase A2	0,0	0	0	0
449	CD300c	0,0	12,7	24,8	48,2
450	CD320	71,4	111,6	0	603,6
451	CDNF	0,0	4	0	0,9
452	CDO	0,0	30	0	1,5
453	CHST1	15,4	27,4	3,3	38,4
454	CHST4	0,0	36,3	124,6	358,8
455	CILP-1	9,4	42,6	55,1	80
456	CNTF R alpha	0,0	0	5,7	3,2
457	CRIM1	123,3	231,2	208,4	149,2
458	CRTAC1	0,0	32,3	155	126,1
459	CXADR	0,0	10,9	13,2	20,4
460	Dopa Decarboxylase	0,0	0	1,2	1,6
461	DPPII	1.896,5	3.184,40	1.063,20	817,1
462	DSPG3	0,0	12,4	421,7	354,4
463	EMR2	0,0	0,6	0	0
464	FCAR	0,0	300,5	0	158
465	FCRL1	2,3	53,4	302,5	287,2
466	FCRL2	0,0	19,4	5,3	16,1
467	Gas6	0,0	0	0	0
468	GPR56	0,0	1,2	0	0,8
469	GPVI	0,2	2,8	4,8	10
470	Hepsin	0,0	11,9	12,1	2,4
471	ILT2	0,4	0	1,2	0,7
472	Jagged 2	0,0	407,7	45,3	138
473	Kirrel3	0,0	32,3	0	7
474	KLF4	0,0	0	0	73,1
475	LAIR1	0,0	43,2	36	32,5
476	LAMP	22,9	102,5	68,5	46,3
477	LAMP1	163,7	438,4	194,7	169,2
478	MDGA1	0,0	63,8	25,4	0
479	MIS RII	0,0	1,1	0	0
480	Neurexin 3 beta	16,6	7,8	0	9,1
481	AMIGO	0,0	0,0	501,9	301,6
482	Aminopeptidase LRAP	0,0	0,0	0,0	3.044,8
483	Amnionless	0,0	0,0	0,0	0,0
484	Arylsulfatase A	718,3	2.553,8	1.046,2	0,0

485	Bcl-w	0,0	0,0	0,0	0,0
486	CD109	0,0	0,0	0,0	0,0
487	CD157	5,1	6,7	0,8	0,0
488	CD34	0,0	20,9	27,2	30,2
489	CD83	0,0	0,0	0,0	0,0
490	CLEC-1	0,0	378,2	0,0	293,6
491	CLEC10A	0,0	5,5	0,0	0,0
492	CMG-2	0,0	11,2	0,0	0,0
493	CREG	146,1	116,9	87,9	69,6
494	Cystatin SN	0,0	0,0	0,0	0,0
495	Cytokeratin-8	0,0	0,0	74,8	115,1
496	Dectin-1	0,0	0,0	0,0	0,0
497	Desmocollin-3	0,0	0,0	0,0	0,0
498	Endoglycan	0,0	0,0	667,6	752,7
499	Galectin-4	0,0	0,0	0,0	0,0
500	HAPLN1	0,0	0,0	0,0	0,0
501	Jagged 1	0,0	0,0	51,0	582,9
502	Langerin	0,0	66,6	0,0	0,0
503	Lumican	2.101,9	1.794,4	1.455,8	1.571,8
504	Matriptase	43,2	158,2	31,9	0,0
505	MEP1B	0,0	0,0	168,7	0,0
506	Nectin-3	0,0	0,0	0,0	0,0
507	OX40	0,0	0,0	0,0	0,0
508	OX40 Ligand	0,0	0,0	85,5	37,1
509	p27	0,0	0,0	0,0	0,0
510	Pappalysin-2	312,6	294,2	151,7	71,2
511	Plexin B3	0,0	7,9	4,5	0,0
512	Plexin D1	0,0	305,6	0,0	645,4
513	proGRP	0,0	0,0	253,1	587,1
514	PSA-total	0,0	0,0	0,0	0,0
515	Reg1B	0,0	130,7	0,0	0,0
516	RGM-A	0,0	0,7	0,0	2,2
517	ROBO2	0,0	0,0	0,0	0,0
518	Spinesin	0,0	73,5	0,0	259,5
519	TWEAK R	473,8	195,0	127,1	241,7
520	ULBP-3	8,7	0,0	0,0	0,0
521	AR	0,0	6,2	1,9	0,2
522	BDNF	3,7	4,0	2,8	1,1
523	bFGF	2,3	145,3	0,3	0,0
524	BMP-4	0,0	0,0	0,0	0,0
525	BMP-5	1.743,5	519,8	0,0	0,0

526	BMP-7	38,5	0,0	0,0	0,0
527	b-NGF	0,4	0,2	0,2	0,0
528	EGF	0,0	0,0	0,0	0,0
529	EGF R	62,6	175,6	86,7	71,8
530	EG-VEGF	0,8	1,0	0,5	2,3
531	FGF-4	75,8	40,6	30,1	3,3
532	FGF-7	95,1	57,8	12,7	0,0
533	GDF-15	357,7	603,5	294,4	256,9
534	GDNF	17,1	4,8	0,0	4,9
535	GH	6,3	0,7	0,0	0,0
536	HB-EGF	2,4	0,9	0,0	0,0
537	HGF	163,5	475,3	87,9	85,2
538	IGFBP-1	15,3	12,2	4,0	0,0
539	IGFBP-2	41,6	37,2	0,0	0,0
540	IGFBP-3	7.337,1	11.928,1	0,0	1.287,8
541	IGFBP-4	46.228,0	43.108,8	26.381,1	34.762,7
542	IGFBP-6	16.304,1	17.612,3	8.359,9	11.120,5
543	IGF-1	0,0	0,0	0,0	0,0
544	Insulin	8,3	13,7	3,8	8,3
545	MCSF R	22,8	33,7	15,8	18,3
546	NGF R	0,0	3,1	0,0	3,7
547	NT-3	4,0	5,3	0,0	1,3
548	NT-4	15,1	11,4	3,6	3,7
549	OPG	15,8	38,1	15,5	22,8
550	PDGF-AA	4,8	10,0	10,9	5,4
551	PIGF	1,8	3,3	0,9	0,7
552	SCF	16,2	37,8	20,9	19,3
553	SCF R	7,4	10,2	5,8	8,6
554	TGFa	0,0	1,8	0,0	0,0
555	TGFb1	3.593,7	4.317,1	2.691,6	0,0
556	TGFb3	13,7	19,4	1,0	1,0
557	VEGF	136,1	491,5	177,6	196,3
558	VEGF R2	72,4	48,5	0,0	0,0
559	VEGF R3	177,5	126,1	93,3	26,2
560	VEGF-D	0,0	1,4	0,0	0,0
561	BLC	0,0	0,0	0,2	0,2
562	Eotaxin	8,1	31,0	24,1	48,3
563	Eotaxin-2	1,9	0,6	0,6	1,0
564	G-CSF	8,1	423,9	3,6	5,6
565	GM-CSF	3,6	2,3	0,4	6,6
566	I-309	1,1	1,2	0,0	0,0

567	ICAM-1	34,0	124,9	83,5	72,0
568	IFNg	104,0	81,6	20,5	45,6
569	IL-1a	0,5	1,2	3,1	0,0
570	IL-1b	0,9	14,3	3,8	2,5
571	IL-1ra	196,6	165,8	132,0	90,6
572	IL-2	37,6	32,3	11,8	12,8
573	IL-4	5,8	1,7	2,5	3,2
574	IL-5	45,5	53,0	23,0	23,1
575	IL-6	148,6	2.346,4	612,8	389,0
576	IL-6R	6,5	11,6	8,5	6,7
577	IL-7	3,5	3,8	1,9	1,5
578	IL-8	1,0	49,6	50,5	18,7
579	IL-10	0,6	0,5	0,8	0,7
580	IL-11	2,6	19,2	6,0	9,8
581	IL-12p40	0,0	0,0	1,6	0,1
582	IL-12p70	0,0	0,0	0,2	0,1
583	IL-13	0,7	4,1	0,4	2,9
584	IL-15	1,0	1,1	0,9	0,1
585	IL-16	0,0	0,7	2,3	1,3
586	IL-17	0,0	0,6	0,0	1,9
587	MCP-1	99,3	152,8	118,4	180,1
588	MCSF	2,0	2,3	3,8	3,7
589	MIG	0,0	0,0	0,0	0,0
590	MIP-1a	0,0	0,0	0,0	0,0
591	MIP-1b	0,0	0,1	0,0	0,0
592	MIP-1d	0,0	0,0	0,3	0,2
593	PDGF-BB	13,9	9,4	6,9	6,1
594	RANTES	611,7	687,7	495,3	668,1
595	TIMP-1	1.578,5	1.675,7	1.395,0	1.496,7
596	TIMP-2	4.791,2	4.802,1	4.193,3	4.399,9
597	TNFa	136,7	95,7	33,2	56,7
598	TNFb	559,3	490,8	428,8	217,6
599	TNF RI	567,2	988,9	539,0	526,4
600	TNF RII	7,1	50,4	4,8	1,9
601	4-1BB	0,0	0,0	0,0	0,0
602	ALCAM	5,3	18,1	20,0	21,0
603	B7-1	0,0	0,8	0,1	0,0
604	BCMA	0,0	0,0	0,0	0,0
605	CD14	62,4	84,2	131,6	138,4
606	CD30	157,4	124,1	80,8	0,0
607	CD40L	1,8	4,3	6,6	7,6

608	CEACAM-1	1,9	10,3	21,9	20,0
609	DR6	22,9	28,4	19,9	15,3
610	Dtk	0,0	8,1	0,0	0,0
611	Endoglin	3,2	13,4	68,7	38,7
612	ErbB3	0,0	0,1	0,0	0,0
613	E-Selectin	0,0	0,0	0,0	0,0
614	Fas	5,1	17,3	7,5	8,6
615	Flt-3L	2,4	3,0	2,0	0,9
616	GITR	11,2	61,1	35,2	0,0
617	HVEM	11,8	63,8	0,0	2,3
618	ICAM-3	0,0	6,3	10,6	0,0
619	Contactin-2	265,1	56,1	0,0	0,0
620	IL-1 RI	179,8	87,2	55,4	41,5
621	IL-2 Rg	0,5	0,8	0,0	0,0
622	IL-10 Rb	0,0	0,4	0,0	0,0
623	IL-17R	6,3	9,6	0,0	0,0
624	IL-21R	0,0	0,0	0,0	0,0
625	LIMPII	13,6	45,6	36,5	20,3
626	Lipocalin-2	0,0	0,0	0,3	1,3
627	L-Selectin	0,0	42,0	0,0	0,0
628	LYVE-1	4,1	2,8	6,7	7,5
629	MICA	0,0	0,9	28,5	45,4
630	MICB	77,2	83,5	42,4	21,6
631	NRG1-b1	2,6	1,4	3,9	2,2
632	PDGF Rb	1.143,1	2.961,1	1.507,0	989,3
633	PECAM-1	0,0	14,8	0,0	0,0
634	RAGE	0,0	3,3	0,0	0,0
635	TIM-1	1,3	3,4	0,0	4,2
636	TRAIL R3	2,8	7,6	6,4	4,3
637	Trappin-2	41,3	1,8	0,0	0,0
638	uPAR	670,3	1.826,3	1.641,5	1.475,4
639	VCAM-1	0,0	308,9	0,0	0,0
640	XEDAR	21,6	24,5	9,7	0,0

D. Anexo: Citocinas no detectadas en los MC de dos lotes de A-MSc

Citocinas no detectadas en los MC de las A-MSc del lote 1 (140326)

2B4	CD34	FGF-20	IL-27 Ra	PAPP-A
4-1BB	CD83	FGF-6	IL-9	P-Cadherin
Activin RIB	CHST1	FGF-9	IP-10	PD-ECGF
Activin RIIB	CHST4	FSH	Jagged 1	Plexin B3
ADAMTS13	Ck beta 8-1	Galectin-4	Kallikrein 7	Prolactin
ALK-1	CLEC10A	Galectin-7	KLF4	PSA-total
AMICA	CNTF R alpha	Gas 1	LAG-3	PSMA
Amnionless	Contactin-2	Gas6	Langerin	PYY
ANGPTL3	CRTAC1	G-CSF R	Leptin R	Reg1B
APRIL	CRTAM	GDF-8	LIF R alpha	ROBO2
B7-2	Cystatin A	GLP-1	LRP-6	ROBO4
B7-H1	Cystatin E M	Glypican 2	Marapsin	S100A8
BAFF R	Cytokeratin-8	GM-CSF Ra	MCP-4	Semaphorin 6B
BAMBI	Desmocollin-3	HAI-1	MDM2	SOST
Bcl-w	Desmoglein 2	HAPLN1	MEP1B	SOX2
BLAME	Dkk-4	HCC-4	MeprinA	Spinesin
BMP-4	DR3	IGF-1	Mer	Syndecan-3
BMP-9	Endoglycan	IGF-1R	MFRP	TACE
CA19-9	EpCAM	IGFBP-5	MIG	TACI
Cadherin-11	Ephrin-A4	IL-1 F10	MPIF-1	TLR1
Calcitonin	Ephrin-B3	IL-1 F7	MSP R	TPO
Cardiotrophin-1	Epo R	IL-1 R5	Neuropilin-2	TRAIL R2
Cathepsin E	ErbB2	IL-1 R6	NKp30	TREM-2
Cathepsin V	E-Selectina	IL-10 Ra	NKp44	TSLP
CD109	ErbB2	IL-20	Nogo Receptor	ULBP-2
CD229	FABP1	IL-21R	OX40	ULBP-3

CD23	FAS L	IL-23 R	p27	VE-Cadherin
CD300c	FGF-17			

Citocinas no detectadas en los MC de las A-MSc del lote 3 (140404)

2B4	CD229	Galectin-4	Leptin R	ROBO2
4-1BB	CD23	Gas6	LRP-6	ROBO4
ACE-2	CD83	GDF-8	Marapsin	Ryk
AMICA	clAP-2	HAI-1	MeprinA	S100A8
Amnionless	Ck beta 8-1	HAPLN1	Mer	Semaphorin 6B
ANGPTL3	CRTAM	HCC-1	MFRP	Siglec-7
BAFF	Cystatin SN	HCC-4	MIG	SOST
BAMBI	Dectin-1	IGF-1	MIP-1a	SOX2
Bcl-w	Desmocollin-3	IGF-1R	MMP-7	TACI
BCMA	Desmoglein 2	IGFBP-5	MPIF-1	Testican 2
BMP-2	Dkk-4	IL-1 F5	Nectin-1	TLR1
BMP-4	DNAM-1	IL-1 R5	Nectin-3	TPO
BMP-8	EGF	IL-1 R6	Neuropilin-2	TRAIL R2
BMP-9	EpCAM	IL-10 Ra	Neurturin	TRANCE
BMPR-II	Epo R	IL-17C	NKp30	TREM-2
CA19-9	E-Selectin	IL-18 Rb	NKp44	TrkC
CA9	FABP1	IL-20	OX40	TROY
Cadherin-11	FAS L	IL-21R	P-Cadherin	TSLP
Carboxypeptidase A2	FGF-19	IL-23 R	Prolactin	ULBP-1
Cathepsin E	FGF-20	IL-31	PSA-free	ULBP-2
Cathepsin V	FGF-6	Insulin R	PSA-total	WISP-1
CD109	FGF-9	L1CAM-2	PSMA	XIAP
CD200	Galectin-2	LAG-3	Resistin	

E. Anexo: Citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en los MC del lote 1 en las diferentes condiciones de cultivo

Citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en el MC del cultivo 2D estático en hipoxia del lote 1

CITOCINAS INCREMENTADAS O DETECTADAS <i>DE NOVO</i> EN EL MC DEL CULTIVO 2D ESTÁTICO EN HIPOXIA DEL LOTE 1				
INCREMENTO O CONCENTRACIÓN	#	Proteína	Incremento o Concentración	Condición
2 a 10 veces	1	ErbB4	2,00	aumento
	2	PECAM-1	2,30	nueva
	3	NSE	2,32	aumento
	4	Ferritin	2,33	aumento
	5	JAM-A	2,39	aumento
	6	DSPG3	2,50	nueva
	7	FGF-4	2,78	aumento
	8	DLL1	2,90	nueva
	9	Pref-1	3,20	nueva
	10	MSP	3,33	aumento
	11	TGFb2	3,58	aumento
	12	TSH	3,80	nueva
	13	Matrilin-3	3,90	aumento
	14	I-309	4,20	nueva
	15	DAN	4,90	aumento
	16	FOLR1	5,20	nueva
	17	IL-1 R4	5,50	nueva
	18	Lipocalin-1	5,50	nueva
	19	GASP-2	5,80	nueva
	20	Persephin	7,60	nueva

	21	OX40 Ligand	8,90	nueva
	22	TREM-1	9,00	nueva
	23	Dectin-1	9,10	nueva
	24	TF	9,10	nueva
11 a 100 veces	1	GM-CSF	11,17	aumento
	2	AMIGO	12,49	aumento
	3	CF VII	24,10	nueva
	4	CREG	41,00	nueva
	5	TFF3	42,00	nueva
	6	Neurturin	48,10	nueva
	7	CLEC-1	62,90	nueva
	8	IL-17F	77,30	nueva
	9	VEGF R1	81,10	nueva
	10	TWEAK	92,50	nueva
	11	TRANCE	96,70	nueva
101 a 1000 veces	1	TECK	126,50	nueva
	2	BMP-5	443,60	nueva
	3	CNTF	941,30	nueva
más de 1000 veces	1	aFGF	2559,40	nueva

- Para las proteínas aumentadas la cifra que aparece en la columna incremento o concentración muestra el número de veces que está aumentado con respecto al patrón de referencia. Si se trata de proteínas nuevas la cifra que aparece en esta columna corresponde a la concentración determinada en pg/mL.

Citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en el MC del cultivo 3D dinámico en normoxia del lote 1.

CITOCINAS INCREMENTADAS O DETECTADAS DE NOVO EN EL MC DEL CULTIVO 3D DINÁMICO EN NORMOXIA DEL LOTE 1				
INCREMENTO O CONCENTRACIÓN	#	Proteína	Incremento o Concentración	Condición
2 a 10 veces	1	Leptin	2,00	aumento
	2	CD14	2,00	aumento
	3	MMP-9	2,09	aumento
	4	IGFBP-3	2,09	aumento
	5	TGFb3	2,10	aumento
	6	Contactin-1	2,18	aumento
	7	BCMA	2,20	nueva

8	I-TAC	2,20	aumento
9	Siglec-5	2,36	aumento
10	EG-VEGF	2,50	aumento
11	Adiponectin	2,58	aumento
12	LYVE-1	2,58	aumento
13	NrCAM	2,65	aumento
14	IL-5 Ra	2,74	aumento
15	BTC	2,88	aumento
16	CF XIV	2,90	aumento
17	IL-4	2,92	aumento
18	GHR	3,06	aumento
19	C5a	3,15	aumento
20	FABP2	3,20	nueva
21	TREM-1	3,30	nueva
22	IL-17C	3,40	nueva
23	FGF-4	3,49	aumento
24	NCAM-1	3,70	nueva
25	Pepsinogen II	3,95	aumento
26	VEGF-D	4,30	nueva
27	PGRP-S	4,39	aumento
28	IL-1a	5,00	aumento
29	VEGF-C	5,22	aumento
30	Eotaxin	5,63	aumento
31	NGF R	5,80	nueva
32	MCP-2	5,90	nueva
33	TLR3	5,90	nueva
34	MSP	6,11	aumento
35	CD28	6,14	aumento
36	GPVI	6,26	aumento
37	Lipocalin-1	6,30	nueva
38	Dtk	6,90	nueva
39	hCGb	6,90	nueva
40	EDAR	7,20	nueva
41	OPN	7,27	aumento
42	VEGF R2	7,63	aumento
43	Insulin R	7,94	aumento
44	IL-31 RA	8,10	nueva
45	Lipocalin-2	8,20	nueva
46	4-1BB Ligand	8,60	nueva
47	PD-ECGF	8,90	nueva
48	SREC-I	8,95	aumento

	49	Prostasin	9,70	nueva
11 a 100 veces	1	SLAM	10,40	nueva
	2	L-Selectin	11,04	aumento
	3	EphA1	11,20	nueva
	4	Troponin I	11,20	nueva
	5	PECAM-1	13,50	nueva
	6	TFF3	14,60	nueva
	7	BMP-8	16,10	nueva
	8	LAIR1	18,70	nueva
	9	TSH	18,90	nueva
	10	BMP-2	19,20	nueva
	11	NT-3	21,39	aumento
	12	Notch-1	24,50	nueva
	13	CXCL16	25,70	nueva
	14	Cadherin-13	26,20	nueva
	15	EphB6	35,50	nueva
	16	WISP-1	41,20	nueva
	17	CD48	46,00	nueva
	18	IL-1 F5	51,00	nueva
	19	Nectin-1	63,90	nueva
	20	Artemin	73,40	nueva
	21	MEPE	73,40	nueva
	22	TROY	79,70	nueva
	23	IL-22BP	81,90	nueva
	24	BMP-7	93,50	nueva
101 a 1000 veces	1	ADAM8	111,60	nueva
	2	Integrin alpha 5	152,20	nueva
	3	DcR3	178,50	nueva
	4	IL-1 F9	179,60	nueva
	5	Aminopeptidase P2	196,00	nueva
	6	CTACK	215,50	nueva
	7	Angiotensinogen	285,80	nueva
más de 1000 veces	1	Angiostatin	1151,40	nueva
	2	Chemerin	1817,10	nueva
	3	BMP-5	2295,40	nueva

- Para las proteínas aumentadas la cifra que aparece en la columna incremento o concentración muestra el número de veces que está aumentado con respecto al patrón de referencia. Si se trata de proteínas nuevas la cifra que aparece en esta columna corresponde a la concentración determinada en pg/mL.

Citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en el MC del cultivo 3D dinámico en hipoxia del lote 1

CITOCINAS INCREMENTADAS O DETECTADAS <i>DE NOVO</i> EN EL MC DEL CULTIVO 3D DINÁMICO EN HIPOXIA DEL LOTE 1				
INCREMENTO O CONCENTRACIÓN	#	Proteína	Incremento o concentración	Condición
2 a 10 veces	1	IL-17E	2,00	nueva
	2	Resistin	2,00	nueva
	3	GITR	2,02	aumento
	4	Fcg RIIBC	2,10	nueva
	5	ANGPTL4	2,11	aumento
	6	FGF-4	2,11	aumento
	7	ICAM-2	2,21	aumento
	8	CA125	2,23	aumento
	9	MMP-9	2,31	aumento
	10	ICAM-1	2,37	aumento
	11	MIP-1d	2,40	aumento
	12	SCF R	2,43	aumento
	13	Flt-3	2,50	nueva
	14	Activin A	2,57	aumento
	15	MCSF R	2,62	aumento
	16	RBP4	2,70	aumento
	17	MSP	2,72	aumento
	18	IGFBP-2	2,77	aumento
	19	CILP-1	2,77	aumento
	20	VEGF-C	2,78	aumento
	21	Uromodulin	2,79	aumento
	22	TF	2,80	nueva
	23	OSM R beta	2,81	aumento
	24	PTH	3,00	nueva
	25	Mesothelin	3,06	aumento
	26	CCL28	3,08	aumento
	27	Matrilin-3	3,10	aumento
	28	CEACAM-1	3,15	aumento
	29	AMIGO	3,26	aumento
	30	GM-CSF	3,33	aumento
	31	IL-1 F8	3,40	nueva
	32	FGF-12	3,52	aumento

	33	HB-EGF	3,64	aumento
	34	OPN	3,78	aumento
	35	TREM-1	3,80	nueva
	36	CD40L	3,92	aumento
	37	MBL	3,96	aumento
	38	CD14	4,30	aumento
	39	EDA-A2	4,49	aumento
	40	Siglec-5	4,60	aumento
	41	Neurexin 3 beta	4,65	aumento
	42	Eotaxin-2	4,80	aumento
	43	NrCAM	4,92	aumento
	44	BCAM	5,21	aumento
	45	VEGF R2	5,24	aumento
	46	NGF R	5,70	nueva
	47	TARC	6,06	aumento
	48	TIM-1	6,30	nueva
	49	Hepsin	6,43	aumento
	50	LYVE-1	6,55	aumento
	51	EDAR	6,70	nueva
	52	CTLA4	6,83	aumento
	53	MMP-7	7,00	nueva
	54	Adiponectin	7,14	aumento
	55	IL-27	7,25	aumento
	56	Axl	7,90	nueva
	57	GHR	8,16	aumento
	58	Eotaxin	8,18	aumento
	59	Glypican 5	8,70	nueva
	60	CD28	8,99	aumento
	61	ANGPTL3	9,00	nueva
	62	PGRP-S	9,89	aumento
	63	BCMA	9,90	nueva
11 a 100 veces	1	C5a	10,81	aumento
	2	GPVI	11,18	aumento
	3	Contactin-1	11,27	aumento
	4	Notch-1	11,60	nueva
	5	Tie-2	13,93	aumento
	6	Lipocalin-2	15,30	nueva
	7	Galectin-2	16,20	aumento
	8	Olfactomedin-2	16,25	aumento
	9	ULBP-1	16,40	nueva
	10	Ryk	19,80	nueva

	11	Trappin-2	20,00	nueva
	12	RAGE	22,50	nueva
	13	SREC-I	23,81	aumento
	14	IFNab R2	24,50	nueva
	15	BMP-7	24,90	nueva
	16	NT-3	25,17	aumento
	17	CA9	28,10	nueva
	18	PECAM-1	33,60	nueva
	19	Cadherin-13	35,70	nueva
	20	EphA1	35,80	aumento
	21	IL-17C	40,70	nueva
	22	Neurturin	41,20	nueva
	23	Aminopeptidase P2	45,20	aumento
	24	NCAM-1	52,90	aumento
	25	CD48	55,80	aumento
	26	CD163	66,40	aumento
	27	EphB6	75,80	aumento
101 a 1000 veces	1	LIGHT	119,50	aumento
	2	IL-22BP	128,40	aumento
	3	DcR3	132,00	aumento
	4	TFF3	139,80	nueva
	5	Siglec-11	159,60	nueva
	6	CTACK	166,50	nueva
	7	Angiotensinogen	191,60	nueva
	8	Integrin alpha 5	462,70	nueva
	9	TECK	670,80	nueva
más de 1000 veces	1	aFGF	1105,70	nueva
	2	BMP-5	1124,40	nueva
	3	Chemerin	2273,00	nueva
	4	Angiostatin	2383,00	nueva
	5	ACE-2	19969,20	nueva

- Para las proteínas aumentadas la cifra que aparece en la columna incremento o concentración muestra el número de veces que está aumentado con respecto al patrón de referencia. Si se trata de proteínas nuevas la cifra que aparece en esta columna corresponde a la concentración determinada en pg/mL

F. Anexo: Citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en los MC del lote 3 en las diferentes condiciones de cultivo

Citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en el MC del cultivo 3D dinámico en normoxia del lote 3.

CITOCINAS INCREMENTADAS O DETECTADAS <i>DE NOVO</i> EN CULTIVO 3D DINÁMICO EN NORMOXIA DEL LOTE 3				
INCREMENTO O CONCENTRACIÓN	#	Proteína	Incremento o concentración	Condición
2 a 10 veces	1	Leptin	2,00	aumento
	2	RELT	2,00	aumento
	3	BMPR-IB	2,00	nueva
	4	IFN-gamma R1	2,00	aumento
	5	Siglec-9	2,09	aumento
	6	CD84	2,13	aumento
	7	RGM-A	2,20	nueva
	8	Tie-2	2,23	aumento
	9	TIM-1	2,23	aumento
	10	Hepsin	2,40	nueva
	11	IL-2 Ra	2,40	nueva
	12	Siglec-5	2,47	aumento
	13	MMP-8	2,56	aumento
	14	FOLR1	2,67	aumento
	15	IL-13 R2	2,67	aumento
	16	IL-1 RII	2,70	nueva
	17	SREC-I	2,70	nueva
	18	IL-11	2,77	aumento
	19	BLAME	2,90	nueva
	20	ALCAM	2,96	aumento

21	B7-H3	3,10	aumento
22	IL-13	3,14	aumento
23	DPPIV	3,15	aumento
24	CNTF R alpha	3,20	nueva
25	CD40L	3,22	aumento
26	PARC	3,48	aumento
27	NGF R	3,70	nueva
28	FABP2	3,80	nueva
29	IL-29	3,91	aumento
30	Common beta Chain	3,96	aumento
31	TFPI-2	3,98	aumento
32	JAM-A	4,00	nueva
33	IL-7 R alpha	4,02	aumento
34	Siglec-10	4,12	aumento
35	I-TAC	4,34	aumento
36	MMP-3	4,49	aumento
37	Notch-3	4,77	aumento
38	MIP-3b	4,80	nueva
39	Eotaxin	4,96	aumento
40	DLL1	5,30	nueva
41	GCP-2	5,60	nueva
42	SLAM	5,60	aumento
43	WIF-1	5,83	aumento
44	Pepsinogen II	6,00	aumento
45	Fractalkine	6,14	aumento
46	CF XIV	6,20	nueva
47	Cadherin-4	6,40	nueva
48	JAM-B	6,50	nueva
49	MCP-2	6,50	nueva
50	Kirrel3	7,00	nueva
51	CD97	7,25	aumento
52	GROa	7,40	aumento
53	GHR	7,40	nueva
54	CD320	7,45	aumento
55	CILP-1	7,51	aumento
56	Cadherin-13	7,70	nueva
57	PDGF-AB	8,00	aumento
58	TF	8,00	aumento
59	Ephrin-B3	8,10	nueva
60	Ferritin	8,23	aumento
61	CCL28	9,09	aumento

11 a 100 veces	62	CEACAM-1	9,53	aumento
	1	NSE	10,20	aumento
	2	ErbB4	10,60	nueva
	3	HAI-2	11,00	aumento
	4	Endoglin	11,09	aumento
	5	CEACAM-5	12,30	nueva
	6	GITR L	12,30	aumento
	7	Activin RIIIB	13,50	aumento
	8	Galectin-8	13,60	nueva
	9	JAM-C	13,90	nueva
	10	IL-31 RA	14,80	nueva
	11	PD-ECGF	15,10	nueva
	12	Kallikrein 5	15,70	nueva
	13	FCRL2	16,10	nueva
	14	IL-22 R alpha 1	16,10	nueva
	15	MIP-3a	16,43	aumento
	16	FOLR2	17,10	nueva
	17	Axl	17,40	nueva
	18	IL-8	17,70	aumento
	19	CXADR	20,40	nueva
	20	IL-1 F6	22,60	nueva
	21	Glypican 5	26,70	nueva
	22	EphA1	28,40	nueva
	23	MMP-13	28,40	nueva
	24	Desmoglein-3	29,70	nueva
	25	CD34	30,20	nueva
	26	MMP-10	31,00	aumento
	27	LAIR1	32,50	nueva
	28	ESAM	32,80	nueva
	29	ADAM8	35,20	nueva
	30	Pref-1	36,10	nueva
	31	OX40 Ligand	37,10	nueva
	32	ENA-78	37,30	nueva
	33	Semaphorin 6D	37,43	aumento
	34	FGF-12	41,20	nueva
	35	MICA	45,40	nueva
	36	VEGF R1	47,70	nueva
	37	CD300c	48,20	nueva
	38	GPVI	49,00	aumento
	39	Carbonic Anhydrase XII	61,00	aumento
40	Prolactin R	66,08	aumento	

	41	KLF4	73,10	nueva
	42	MDM2	86,70	nueva
101 a 1000 veces	1	IL-2 Rb	106,00	aumento
	2	Galectin-7	109,10	aumento
	3	Cytokeratin-8	115,10	nueva
	4	Cystatin E M	118,80	nueva
	5	FCRL1	123,87	aumento
	6	CRTAC1	126,10	nueva
	7	Jagged 2	138,00	nueva
	8	FCAR	158,00	nueva
	9	Epiregulin	163,20	nueva
	10	TECK	178,20	nueva
	11	Spinesin	259,50	nueva
	12	Uromodulin	272,00	aumento
	13	Nogo Receptor	288,90	nueva
	14	CLEC-1	293,60	nueva
	15	AMIGO	301,60	nueva
	16	DSPG3	354,40	nueva
	17	CHST4	358,80	nueva
	18	OSM R beta	381,40	nueva
	19	Angiostatin	384,20	nueva
	20	Jagged 1	582,90	nueva
	21	proGRP	587,10	nueva
	22	CD6	601,10	nueva
	23	Plexin D1	645,40	nueva
	24	Siglec-11	656,60	nueva
	25	6Ckine	697,20	nueva
	26	Endoglycan	752,70	nueva
	27	IL-9	998,30	nueva
más de 1000 veces	1	IL-22BP	1009,80	nueva
	2	PAPP-A	1552,80	nueva
	3	Ephrin-A4	1783,40	nueva
	4	Aminopeptidase LRAP	3044,80	nueva

- Para las proteínas aumentadas la cifra que aparece en la columna incremento o concentración muestra el número de veces que está aumentado con respecto al patrón de referencia. Si se trata de proteínas nuevas la cifra que aparece en esta columna corresponde a la concentración determinada en pg/mL

Citocinas incrementadas o detectadas *de novo* en el MC del cultivo 3D dinámico en hipoxia del lote 3.

CITOCINAS INCREMENTADAS O DETECTADAS <i>DE NOVO</i> EN CULTIVO 3D DINÁMICO EN HIPOXIA DEL LOTE 3				
INCREMENTO O CONCENTRACIÓN	#	Proteína	Incremento o concentración	Condición
2 a 10 veces	1	ILT2	2,00	aumento
	2	Leptin	2,00	aumento
	3	Semaphorin 6D	2,00	aumento
	4	GITR	2,14	aumento
	5	MIP-3a	2,14	aumento
	6	Activin RIB	2,20	nueva
	7	CD27	2,30	nueva
	8	IL-16	2,30	aumento
	9	IL-4 Ra	2,38	aumento
	10	IL-7 R alpha	2,46	aumento
	11	CD40L	2,67	aumento
	12	Common beta Chain	2,68	aumento
	13	CD84	2,74	aumento
	14	ALCAM	2,77	aumento
	15	CD155	2,80	nueva
	16	NSE	2,91	aumento
	17	CD163	3,00	nueva
	18	DPPIV	3,12	aumento
	19	IL-6	3,12	aumento
	20	IL-1b	3,22	aumento
	21	Siglec-10	3,28	aumento
	22	B7-H3	3,30	aumento
	23	SP-D	3,30	nueva
	24	IL-29	3,62	aumento
	25	Ferritin	3,63	aumento
	26	TIM-3	3,70	nueva
	27	Notch-3	3,98	aumento
	28	MMP-3	4,15	aumento
	29	I-TAC	4,38	aumento
	30	Brevican	4,45	aumento
	31	JAM-A	4,50	nueva
	32	MCP-4	4,50	nueva

	33	Plexin B3	4,50	nueva
	34	IFN-gamma R1	4,67	aumento
	35	B7-H2	4,80	nueva
	36	CILP-1	4,86	aumento
	37	IL-1a	5,20	aumento
	38	FCRL2	5,30	nueva
	39	EDAR	5,60	nueva
	40	CNTF R alpha	5,70	nueva
	41	SLAM	5,90	nueva
	42	BLAME	6,60	nueva
	43	PDGF-AB	6,80	aumento
	44	CCL28	7,09	aumento
	45	Pepsinogen II	7,61	aumento
	46	GCP-2	7,90	nueva
	47	ErbB4	8,50	nueva
	48	ANG-4	9,00	nueva
	49	GROa	9,06	aumento
	50	ICOS	9,50	nueva
	51	Galectin-8	9,80	nueva
	52	TFPI-2	9,95	aumento
11 a 100 veces	1	GHR	10,10	nueva
	2	ADAM23	10,40	nueva
	3	CEACAM-1	10,53	aumento
	4	ICAM-3	10,60	nueva
	5	ADAM9	10,90	nueva
	6	Hepsin	12,10	nueva
	7	CXADR	13,20	nueva
	8	CEACAM-5	13,90	nueva
	9	GITR L	16,50	aumento
	10	Galectin-7	17,92	aumento
	11	MMP-10	19,00	aumento
	12	Endoglin	20,47	aumento
	13	GPVI	23,00	aumento
	14	Uromodulin	24,00	aumento
	15	Glypican 5	24,70	nueva
	16	CD300c	24,80	nueva
	17	MDGA1	25,40	nueva
	18	Desmoglein-3	25,50	nueva
	19	JAM-C	25,50	nueva
	20	CD34	27,20	nueva
	21	MICA	28,50	nueva

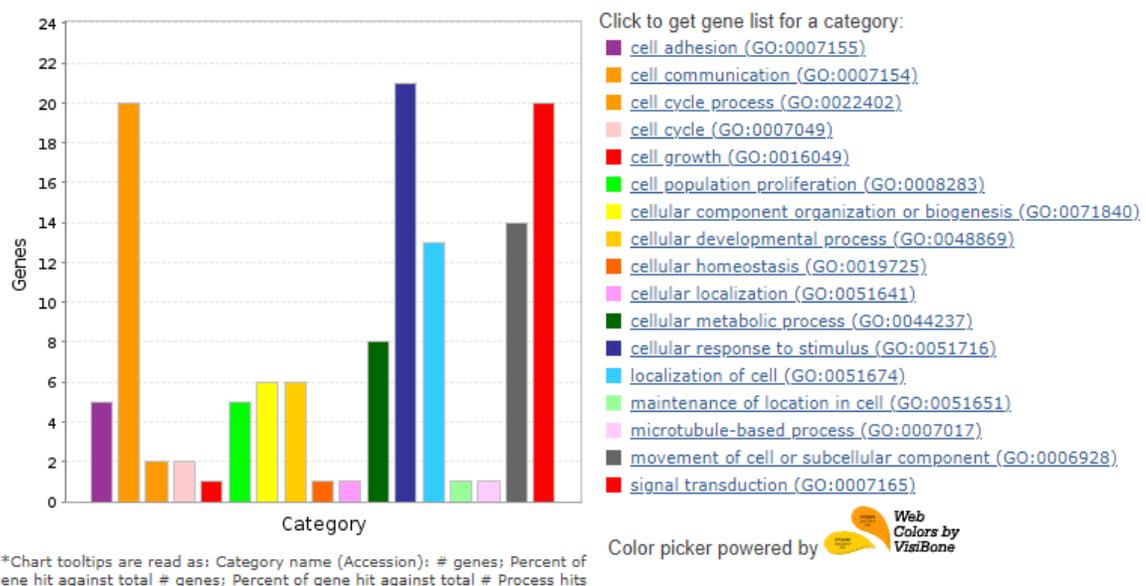
	22	FGF-12	32,50	nueva
	23	B7-H1	35,40	nueva
	24	LAIR1	36,00	nueva
	25	Axl	38,50	nueva
	26	Jagged 2	45,30	nueva
	27	IL-8	49,50	aumento
	28	Jagged 1	51,00	nueva
	29	Siglec-11	56,70	nueva
	30	Angiostatin	58,20	nueva
	31	ENA-78	64,80	nueva
	32	Fractalkine	68,77	aumento
	33	PYY	70,90	nueva
	34	Cytokeratin-8	74,80	nueva
	35	Epiregulin	79,30	nueva
	36	ADAMTS13	81,30	nueva
	37	OX40 Ligand	85,50	nueva
	38	Aminopeptidase P2	85,60	nueva
	39	Cystatin E M	96,00	nueva
101 a 1000 veces	1	CHST4	124,60	nueva
	2	FCRL1	130,52	aumento
	3	Ephrin-B3	138,90	nueva
	4	IL-2 Rb	144,33	aumento
	5	CRTAC1	155,00	nueva
	6	MEP1B	168,70	nueva
	7	proGRP	253,10	nueva
	8	OSM R beta	413,60	nueva
	9	DSPG3	421,70	nueva
	10	DcR3	424,90	nueva
	11	APRIL	483,20	nueva
	12	AMIGO	501,90	nueva
	13	IL-9	603,00	nueva
	14	Endoglycan	667,60	nueva
	15	6Ckine	722,60	nueva
	16	Ret	730,40	nueva
	17	Angiotensinogen	776,30	nueva
	18	CD6	941,80	nueva
más de 1000 veces	1	Ephrin-A4	1085,50	nueva
	2	PAPP-A	1423,50	nueva

- Para las proteínas aumentadas la cifra que aparece en la columna incremento o concentración muestra el número de veces que está aumentado con respecto al patrón de

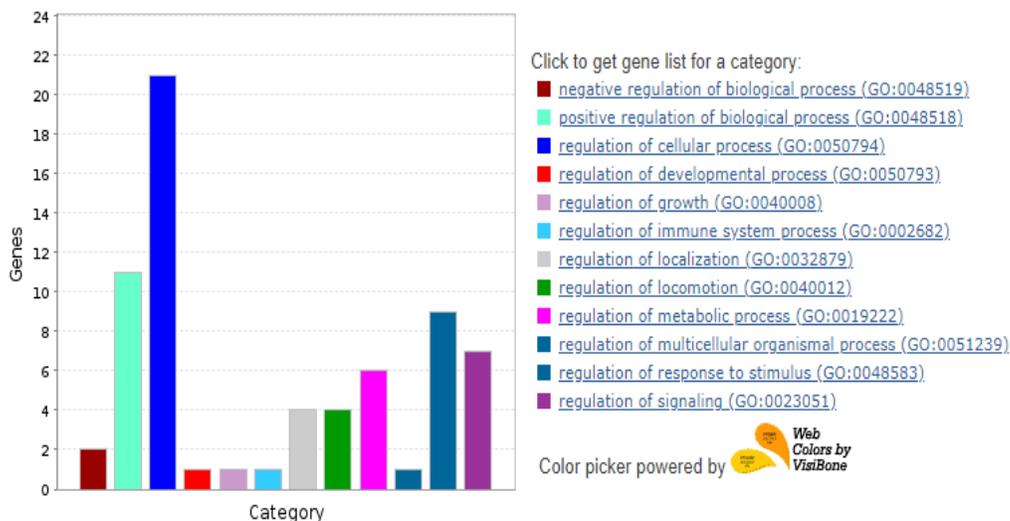
referencia. Si se trata de proteínas nuevas la cifra que aparece en esta columna corresponde a la concentración determinada en pg/mL

G. Anexo: Procesos celulares y vías de señalización relacionadas con las proteínas aumentadas o detectadas *de novo* en los MC de los cultivos 3D dinámicos en hipoxia de los lotes 1 y 3

Procesos celulares relacionados con las proteínas aumentadas o detectadas *de novo* en los MC de los cultivos 3D dinámicos en hipoxia del lote 1 y 3

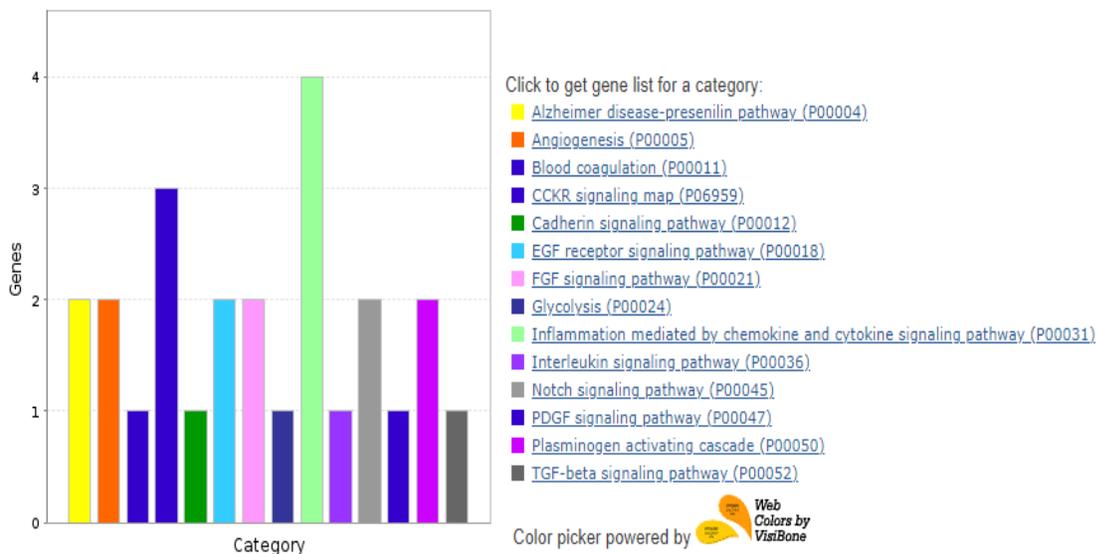


Procesos de regulación biológica relacionados con las proteínas aumentadas o detectadas *de novo* en los MC de los cultivos 3D dinámicos en hipoxia del lote 1 y 3



**Chart tooltips are read as: Category name (Accession): # genes; Percent of gene hit against total # genes; Percent of gene hit against total # Process hits

Vías de señalización relacionadas con las proteínas aumentadas o detectadas *de novo* en los MC de los cultivos 3D dinámicos en hipoxia del lote 1 y 3



**Chart tooltips are read as: Category name (Accession): # genes; Percent of gene hit against total # genes; Percent of gene hit against total # Pathway hits

Bibliografía

1. Núñez DL. Evaluación del efecto de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y de medios condicionados en la recuperación motora de ratas con lesión medular. [Tesis de maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2010. Recuperado a partir de: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/11304>
2. Sánchez R. Comparación del efecto de medios condicionados de cultivos de 2 tipos de células madre mesenquimales sobre la cicatrización de heridas en ratones. [Tesis de maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2011. Recuperado a partir de: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/7573>
3. Linero IM. Regeneración ósea por implante de células madre mesenquimales derivadas de tejido humano adiposo en un modelo animal. [Tesis doctoral]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia UNAL; 2012.
4. Linero IM, Doncel A, Chaparro O. Proliferación y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. *Biomédica*. 2014;34(1):67-78. doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1465
5. Fletscher GF. Modificación experimental de la técnica de membrana inducida (Masquelet) mediante uso de medios condicionados producidos por células madre mesenquimales. [Tesis de maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2014. Recuperado a partir de: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/50370>
6. Henao L. Evaluación de la capacidad de medios condicionados producidos por células madre mesenquimales humanas para inducir la regeneración ósea en alveolos de pacientes con exodoncia de terceros molares inferiores. [Tesis de pregrado]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2016.
7. Labusca LS. Scaffold free 3D culture of mesenchymal stem cells; implications for regenerative medicine. *J transplant Stem Cel Biol*. 2015;2(1):1–8. <https://www.avensonline.org/fulltextarticles/jtscb-2374-9326-02-0008.html>

8. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9):1859. doi: 10.3390/ijms18091852.
9. Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641–50. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
10. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A Perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):301–13. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
11. Caplan AI. All MSCs are pericytes?. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):229–30.
12. Sart S, Tsai AC, Li Y, Ma T. Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties and applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(5):365–80. doi: 10.1089/ten.TEB.2013.0537. <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2013.0537>
13. Panchalingam KM, Jung S, Rosenberg L, Behie LA. Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells: a review. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):225. doi.org/10.1186/s13287-015-0228-5.
14. Wankhade UD, Shen M, Kolhe R, Fulzele S. Advances in adipose-derived stem cells isolation, characterization, and application in regenerative tissue engineering. *Stem Cells International.* 2016:3206807. doi: 10.1155/2016/3206807.
15. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211–28. doi: 10.1089/107632701300062859.
16. Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells.* 2014;6(3):256-65. doi: 10.4252/wjsc.v6.i3.256.
17. Marfia G, Navone SE, Di Vito C, Ughi N, Tabano S, Miozzo M, et al. Mesenchymal stem cells: Potential for therapy and treatment of chronic non-healing skin wounds. *Organogenesis.* 2015;11(4):183–206. doi:10.1080/15476278.2015.1126018.
18. Johal KS, Lees VC, Reid AJ. Adipose-derived stem cells: selecting for translational success. *Regenerative Medicine.* 2015;10(1):79–96. doi: 10.2217/rme.14.72.
19. Feisst V, Meidinger S, Locke MB. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Cloning.* 2015;8:149–62. doi: 10.2147/SCCAA.S64373
20. Carceller MC, Guillen MI, Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. Paracrine in vivo inhibitory

- effects of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells in the early stages of the acute inflammatory response. *Cytotherapy*. 2015;17(9):1230–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.06.001>
21. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-derived stem cells as a tool in cell-based therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64(6):443-454. doi: 10.1007/s00005-016-0394-x.
 22. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2011;6(1):457–78. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130230.
 23. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells: When, where, and how. *Stem Cells Int*. 2015;2015:628767. doi: 10.1155/2015/628767.
 24. Caplan AI. New MSC: MSCs as pericytes are Sentinels and gatekeepers. *Journal of Orthopaedic Research*. 2017;35(6):1151-9. doi: 10.1002/jor.23560.
 25. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(6):1445–51. doi: 10.1002/sctm.17-0051.
 26. Li CY, Wu XY, Tong JB, Yang XX, Zhao JL, Zheng QF, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):55. doi: 10.1186/s13287-015-0066-5.
 27. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Jang HK, Kim BS. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther*. 2014;22(4):862–72. doi: 10.1038/mt.2013.301.
 28. Kober J, Gugerell A, Schmid M, Zeyda M, Buchberger E, Nickl S, et al. Wound healing effect of conditioned media obtained from adipose tissue on human skin cells: A comparative in vitro study. *Ann Plast Surg*. 2016;77(2):156–63. doi: 10.1097/SAP.0000000000000358.
 29. Rathinasabapathy A, Bruce E, Espejo A, Horowitz A, Sudhan DR, Nair A, et al. Therapeutic potential of adipose stem cell-derived conditioned medium against pulmonary hypertension and lung fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2016;173(19):2859–79. doi: 10.1111/bph.13562.
 30. Liang X, Ding Y, Zhang Y, Tse HF, Lian Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transpl*. 2014;23(9):1045–59. doi: 10.3727/096368913X667709.
 31. Chang W, Kim R, Park SI, Jung YJ, Ham O, Lee J, et al. Enhanced healing of rat calvarial bone defects with hypoxic conditioned medium from mesenchymal stem

- cells through increased endogenous stem cell migration via regulation of ICAM-1 targeted-microRNA-221. *Mol Cells*. 2015;38(7):643–50.
32. Lee SK, Lee SC, Kim SJ. A novel cell-free strategy for promoting mouse liver regeneration: utilization of a conditioned medium from adipose-derived stem cells. *Hepatol Int*. 2015;9(2):310–20. doi: 10.1007/s12072-014-9599-4.
 33. He J, Cai Y, Luo LM, Liu HB. Hypoxic adipose mesenchymal stem cells derived conditioned medium protects myocardial infarct in rat. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015;19(22):4397–406. PMID: 26636529.
 34. Lee SC, Jeong HJ, Lee SK, Kim S-J. Hypoxic conditioned medium from human adipose-derived stem cells promotes mouse liver regeneration through JAK/STAT3 signaling. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(6):816–25. doi: 10.5966/sctm.2015-0191.
 35. Shin H, Ryu HH, Kwon O, Park BS, Jo SJ. Clinical use of conditioned media of adipose tissue-derived stem cells in female pattern hair loss: a retrospective case series study. *Int J Dermatol*. 2015;54(6):730-5. doi: 10.1111/ijd.12650.
 36. Collawn SS, Mobley JA, Banerjee NS, Chow LT. conditioned media from adipose-derived stromal cells accelerates healing in 3-dimensional skin cultures. *Ann Plast Surg*. 2016;76(4):446–52. doi: 10.1097/SAP.0000000000000754.
 37. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Jang HK, Kim B-S. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther*. 2014;22(4):862–72. doi: 10.1038/mt.2013.301.
 38. Seo G, Oh E, Yun M, Lee JY, Bae JS, Joo K, et al. Adipose-derived stem cell conditioned medium accelerates keratinocyte differentiation via the upregulation of miR-24. *Exp Dermatol*. 2015;24(10):792–3. doi: 10.1111/exd.12754.
 39. Tamari M, Nishino Y, Yamamoto N, Ueda M. Acceleration of wound healing with stem cell-derived growth factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013;28(6):e369–75. doi: 10.11607/jomi.te17.
 40. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One*. 2014;9(9):1–12. e107001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107001>
 41. de Soure AM, Fernandes-Platzgummer A, da Silva CL, Cabral JM. Scalable microcarrier-based manufacturing of mesenchymal stem/stromal cells. *J Biotechnol*. 2016;236:88–109. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.08.007.
 42. Santos JM, Camões SP, Filipe E, Cipriano M, Barcia RN, Filipe M, et al. 3D spheroid cell culture of umbilical cord tissue-derived MSCs (UCX®) leads to enhanced

- paracrine induction of wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):90.
43. Santos Fd, Andrade PZ, Abecasis MM, Gimble JM, Chase LG, Campbell AM, et al. Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17(12):1201–10. doi: 10.1089/ten.tec.2011.0255.
 44. Rafiq QA, Coopman K, Hewitt CJ. Scale-up of human mesenchymal stem cell culture: current technologies and future challenges. *Curr Opin Chem Eng.* 2013;2(1):8–16. doi: 10.1016/j.coche.2013.01.005
 45. Rafiq QA, Brosnan KM, Coopman K, Nienow AW, Hewitt CJ. Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. *Biotechnol Lett.* 2013;35(8):1233–45. doi: 10.1007/s10529-013-1211-9.
 46. Schnitzler AC, Verma A, Kehoe DE, Jing D, Murrell JR, Der KA, et al. Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: Current technologies and challenges. *Biochem Eng J.* 2016;108:3–13.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.08.014>
 47. Tsai AC, Jeske R, Chen X, Yuan X, Li Y. Influence of Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Therapeutic Potency: From Planar Culture to Microcarriers. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:640. doi: 10.3389/fbioe.2020.00640.
 48. Schop D, Van Dijkhuizen-Radersma R, Borgart E, Janssen FW, Rozemuller H, Prins HJ, et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. 2010;4(2):131–40. doi: 10.1002/term.224.
 49. Caruso SR, Orellana MD, Mizukami A, Fernandes TR, Fontes AM, Suazo CAT, et al. Growth and functional harvesting of human mesenchymal stromal cells cultured on a microcarrier-based system. *Biotechnol Prog.* 2014;30(4):889–95. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.1886>
 50. Rafiq QA, Coopman K, Nienow AW, Hewitt CJ. Systematic microcarrier screening and agitated culture conditions improves human mesenchymal stem cell yield in bioreactors. *Biotechnol J.* 2016;11(4):473–86. doi: 10.1002/biot.201400862.
 51. Tavassoli H, Alhosseini SN, Tay A, Chan PPY, Weng Oh SK, Warkiani ME. Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: A biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products. *Biomaterials.* 2018;181:333–346. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.016.2018.
 52. Fernandes-Platzgummer A; Carmelo JG; da Silva CL; Cabral J. Clinical-grade manufacturing of therapeutic human mesenchymal stem/stromal cells in

- microcarrier-based culture systems. *Methods Mol Biol.* 2016;1416:375-88.
53. Heathman TR, Glyn VAM, Picken A, Rafiq QA, Coopman K, Nienow AW, et al. Expansion, harvest and cryopreservation of human mesenchymal stem cells in a serum-free microcarrier process. *Biotechnol Bioeng.* 2015;112(8):1696–707. doi: 10.1002/bit.25582.
 54. Merten O-W. Advances in cell culture: anchorage dependence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1661):20140040. doi: 10.1098/rstb.2014.0040.
 55. Dos Santos FF, Andrade PZ, Da Silva CL, Cabral JM. Bioreactor design for clinical-grade expansion of stem cells. *Biotechnol J.* 2013;8(6):644–54.
 56. Dos Santos F, Campbell A, Fernandes-Platzgummer A, Andrade PZ, Gimble JM, Wen Y, et al. A xenogeneic-free bioreactor system for the clinical-scale expansion of human mesenchymal stem/stromal cells. *Biotechnol Bioeng.* 2014;111(6):1116–27. <https://doi.org/10.1002/bit.25187>.
 57. de Almeida Fuzeta M, Bernardes N, Oliveira FD, Costa AC, Fernandes-Platzgummer A, Farinha JP, et al. Scalable production of human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles under serum-/xeno-free conditions in a microcarrier-based bioreactor culture system. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 3;8:553444. doi: 10.3389/fcell.2020.553444.
 57. Carmelo JG, Fernandes-Platzgummer A, Diogo MM, da Silva CL, Cabral JM. A xeno-free microcarrier-based stirred culture system for the scalable expansion of human mesenchymal stem/stromal cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnol J.* 2015;10(8):1235–47. doi: 10.1002/biot.201400586.
 59. Tan KY, Teo KL, Lim JFY, Chen AK, Choolani M, Reuveny S, et al. Serum-free media formulations are cell line-specific and require optimization for microcarrier culture. *Cytotherapy.* 2015;17(8):1152–65. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.05.001.
 60. Chen AK, Chew YK, Tan HY, Reuveny S, Weng Oh SK. Increasing efficiency of human mesenchymal stromal cell culture by optimization of microcarrier concentration and design of medium feed. *Cytotherapy.* 2015;17(2):163–73. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.08.011.
 61. Nienow AW, Hewitt CJ, Heathman TRJ, Glyn VAM, Fonte GN, Hanga MP, et al. Agitation conditions for the culture and detachment of hMSCs from microcarriers in multiple bioreactor platforms. *Biochem Eng J.* 2016;108:24–9. doi: 10.1016/j.bej.2015.08.003
 62. Estrada JC, Albo C, Benguría A, Dopazo A, López-Romero P, Carrera-Quintanar L,

- et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ.* 2012;19(5):743–55. doi: 10.1038/cdd.2011.172.
63. Mas-Bargues C, Sanz-Ros J, Román-Domínguez A, Inglés M, Gimeno-Mallench L, El Alami M, et al. Relevance of oxygen concentration in stem cell culture for regenerative medicine. *Inter J Mol Sci.* 2019; 20(5):1195. doi: 10.3390/ijms20051195.
64. Zheng W, Gu X, Sun X, Hu D. Effects of hypoxia-inducible factor-1 α on the proliferation and apoptosis of human synovial mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep.* 2019;20(5):4315–22. doi: 10.3892/mmr.2019.10656.
65. Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, Da Silva CL, Cabral JM. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: A more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol.* 2010;223(1):27–35. doi: 10.1002/jcp.21987.
66. Choi JR, Yong KW, Wan Safwani WKZ. Effect of hypoxia on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its potential clinical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2017;74(14):2587-2600. doi: 10.1007/s00018-017-2484-2.
67. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell.* 2007;6(6):745–57. doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00336.x.
68. Hung S-P, Ho JH, Shih YR, Lo T, Lee OK. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2012;30(2):260–6. doi: 10.1002/jor.21517.
69. Mathew SA, Chandravanshi B, Bhonde R. Hypoxia primed placental mesenchymal stem cells for wound healing. *Life Sci.* 2017;182:85–92.
70. Ma T, Grayson WL, Fröhlich M, Vunjak-Novakovic G. Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. *Biotechnol Prog.* 2009;25(1):32-42. doi: 10.1002/btpr.128.
71. Haque N, Rahman MT, Abu Kasim NH, Alabsi AM. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:632972. doi: 10.1155/2013/632972.
72. Liu G-S, Peshavariya HM, Higuchi M, Chan EC, Dusting GJ, Jiang F. Pharmacological priming of adipose-derived stem cells for paracrine VEGF

- production with deferoxamine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016;10(3):E167-76.
doi: 10.1002/term.1796.
73. Lee JH, Kemp DM. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341(3):882–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.038.
 74. Oliveira PH, Boura JS, Abecasis MM, Gimble JM, da Silva CL, Cabral JMS. Impact of hypoxia and long-term cultivation on the genomic stability and mitochondrial performance of ex vivo expanded human stem/stromal cells. *Stem Cell Res.* 2012;9(3):225–36. doi: 10.1016/j.scr.2012.07.001.
 75. Makrantonaki E, Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. Pathogenesis of wound healing disorders in the elderly. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2017;15(3):255–75.
doi: 10.1111/ddg.13199.
 76. Masson-Meyers DS, Andrade TAM, Caetano GF, Guimaraes FR, Leite MN, Leite SN, et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *Int Exp Pathol.* 2020;101(1-2):21-37. doi: 10.1111/iep.12346.
 77. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes: Cellular Mechanisms of Wound Repair. *Open Biology.* 2020;10(9).
<https://doi.org/10.1098/rsob.200223>
 78. Lasocka I, Jastrzebska E, Szulc-Dabrowska L, Skibniewski M, Pasternak I, Kalbacova MH, et al. The effects of graphene and mesenchymal stem cells in cutaneous wound healing and their putative action mechanism. *Inter J Nanomedicine.* 2019;14:2281–99. doi: 10.2147/IJN.S190928
 79. Yang R, Liu F, Wang J, Chen X, Xie J, Xiong K. Epidermal stem cells in wound healing and their clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* 2019;11(1):447. PMID: 31358069
 80. Stoica AE, Grumezescu AM, Hermenean AO, Andronescu E, Vasile BS. Scar-free healing: current concepts and future perspectives. *Nanomaterials.* 2020;10(11):2179. doi: 10.3390/nano10112179.
 81. Kant RJ, Coulombe KLK. Integrated approaches to spatiotemporally directing angiogenesis in host and engineered tissues. *Acta Biomater.* 2018;69:42–62.
doi: 10.1016/j.actbio.2018.01.017
 82. Traore MA, George SC. Tissue Engineering the Vascular Tree. *Tissue Eng Part B Rev.* 2017;23(6):505-14. doi: 10.1089/ten.teb.2017.0010.
 83. Qadura M, Terenzi DC, Verma S, Al-Omran M, Hess DA. Concise review: cell

- therapy for critical limb ischemia: an integrated review of preclinical and clinical studies. *Stem Cells*. 2018;36(2):161–71.
84. Bronckaers, A; Lambrichts I. The role of mesenchymal stem/stromal cells in angiogenesis. In: Atkinson K, editor. *The biology and therapeutic applications of mesenchymal cells*. 1st. New Jersey: Wiley Blackwell; 2017. p. 347–65.
 85. Shingyochi Y, Orbay H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells for wound repair and regeneration. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(9):1285–92.
 86. Motegi SI, Ishikawa O. Mesenchymal stem cells: The roles and functions in cutaneous wound healing and tumor growth. *J Dermatol Sci*. 2017;86(2):83–9.
 87. Hu MS, Borrelli MR, Lorenz HP, Longaker MT, Wan DC. Mesenchymal stromal cells and cutaneous wound healing: A comprehensive review of the background, role, and therapeutic potential. *Stem Cells Int*. 2018:6901983. doi: 10.1155/2018/6901983.
 88. Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):37. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0303-6>
 89. Hassan WU, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2014;22(3):313–25. doi: 10.1111/wrr.12173.
 90. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(2):142–9.
 91. Chen D, Hao H, Fu X, Han W. Insight into reepithelialization: How do mesenchymal stem cells perform? *Stem Cells Inter*. 2016. ID 6120173. <https://doi.org/10.1155/2016/6120173>
 92. Sorrell JM, Caplan AI. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(4):30. doi: 10.1186/scrt30.
 93. Miranda JP, Filipe E, Fernandes AS, Almeida JM, Martins JP, De la Fuente A, et al. The Human Umbilical Cord Tissue-Derived MSC Population UCX(®) promotes early motogenic effects on keratinocytes and fibroblasts and G-CSF-mediated mobilization of bm-mscs when transplanted in vivo. *Cell Transplant*. 2015;24(5):865–77.
 94. García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum*. 2005;48(7):1416–23.
 95. Rigotti G, Marchi A, Galie M, Baroni G, Benati D, Krampera M, et al. Clinical

- treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(5):1404–9.
96. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula. *Dis Colon Rectum.* 2009;52(1):79–86.
 97. Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, Colombel JF, Reinisch W, Baumgart DC, et al. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet.* 2016;388(10051):1281–90. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31203-X.
 98. Hocking A. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res.* 2010;316(14):2213–9.
 99. Chung HM, Won CH, Sung JH. Responses of adipose-derived stem cells during hypoxia: Enhanced skin-regenerative potential. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(12):1499–508.
 100. Deđim Z. Use of microparticulate systems to accelerate skin wound healing. *J Drug Target.* 2008;16(6):437–48. doi: 10.1080/10611860802088572.
 101. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev.* 2019;99(1):665-706. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30475656>
 102. Stegensek-mejía EM. Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. *Rev Enferm IMSS.* 2018;26(2):105-14. <https://www.medigraphic.com/pdfs/enfermeriaimss/eim-2018/eim182g.pdf>
 103. Lavery LA, Davis KE, Berriman SJ, Braun L, Nichols A, Kim PJ, et al. WHS guidelines update: Diabetic foot ulcer treatment guidelines. *Wound Repair Regen.* 2016;24(1):112-26.
 104. Doncel A. Comparación in vitro del efecto angiogénico de medios condicionados de células madre mesenquimales humanas obtenidas a partir de tejido adiposo y médula ósea en condiciones de normoxia e hipoxia. [Tesis de maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2010.
 105. Aranda E, Owen GI. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line.

- Biol Res. 2009;42(3):377–89.
106. Aplin A.C, Nicosia RF. The rat aortic ring model of angiogenesis. *Methods Mol Biol.* 2015;1214:255-64. doi: 10.1007/978-1-4939-1462-3_16.
 107. Heathman TRJ, Stolzing A, Fabian C, Rafiq QA, Coopman K, Nienow AW, et al. Scalability and process transfer of mesenchymal stromal cell production from monolayer to microcarrier culture using human platelet lysate. *Cytotherapy.* 2016;18(4):523–35.
 108. Rafiq QA, Hanga MP, Heathman TRJ, Coopman K, Nienow AW, Williams DJ, et al. Process development of human multipotent stromal cell microcarrier culture using an automated high-throughput microbioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 2017;114(10):2253–66.
 109. Mizukami A, Fernandes-Platzgummer A, Carmelo JG, Swiech K, Covas DT, Cabral JM, et al. Stirred tank bioreactor culture combined with serum-/xenogeneic-free culture medium enables an efficient expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Biotechnol J.* 2016;11(8):1048–59.
 110. Carmelo JG, Fernandes-Platzgummer A, Cabral J, da Silva CL. Scalable ex vivo expansion of human mesenchymal stem/stromal cells in microcarrier-based stirred culture systems. In: *Methods Mol Biol.* 2015;1283:147-59. doi: 10.1007/7651_2014_100.
 111. de Soure AM, Fernandes-Plautzgummer A, Moreira, F, Lilaia, C, Liu S-H, et al. Integrated culture platform based on a human platelet lysate supplement for the isolation and scalable manufacturing of umbilical cord matrix-derived mesenchymal stem/stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11:1630–40. doi: 10.1002/term.2200.
 112. Escobar CH, Chaparro O. Xeno-free extraction, culture, and cryopreservation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2016; 5(3):358-65. doi: 10.5966/sctm.2015-0094.
 113. de Sousa Pinto D, Bandejas C, de Almeida Fuzeta M, Rodrigues CAV, Jung S, Hashimura Y, et al. Scalable manufacturing of human mesenchymal stromal cells in the vertical-wheel bioreactor system: an experimental and economic approach. *Biotechnol J.* 2019;14(8): e1800716. doi: 10.1002/biot.201800716. Epub 2019 May 31. Erratum in: *Biotechnol J.* 2020 Aug;15(8):e2070064. PMID: 30945467.
 114. Rafiq QA, Coopman K, Nienow AW, Hewitt CJ. Systematic microcarrier screening and agitated culture conditions improves human mesenchymal stem cell yield in

- bioreactors. *Biotechnol J*. 2016 Mar;11(4):473–86.
115. Bassaneze V, Barauna VG, Lavini-Ramos C, Kalil J, Schettert IT, Miyakawa AA, et al. Shear stress induces nitric oxide-mediated vascular endothelial growth factor production in Human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2010;19(3):371–8.
 116. Yourek G, McCormick SM, Mao JJ, Reilly GC. Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Regen Med*. 2010;5(5):713–24.
 117. Lin YM, Lim JFY, Lee J, Choolani M, Chan JKY, Reuveny S, et al. Expansion in microcarrier-spinner cultures improves the chondrogenic potential of human early mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2016;18(6):740–53.
 118. Mark P, Kleinsorge M, Gaebel R, Lux CA, Toelk A, Pittermann E, et al. Human mesenchymal stem cells display reduced expression of CD105 after culture in serum-free medium. *Stem Cells Int*. 2013;2013:698076.
<https://doi.org/10.1155/2013/698076>
 119. Wang D, Liu N, Xie Y, Song B, Kong S, Sun X. Different culture method changing CD105 expression in amniotic fluid MSCs without affecting differentiation ability or immune function. *J Cell Mol Med*. 2020;24(7):4212–22.
 120. Pham LH, Vu NB, Pham P Van. The subpopulation of CD105 negative mesenchymal stem cells show strong immunomodulation capacity compared to CD105 positive mesenchymal stem cells. *Biomed Res Ther*. 2019;6(4):3131-40.
doi: 10.15419/bmrat.v6i4.538
 121. Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histol Histopatho*. 2013;28(9):1109–16.
 122. Hervy M, Weber JL, Pecheul M, Dolley-Sonneville P, Henry D, Zhou Y, et al. Long term expansion of bone marrow-derived hMSCs on novel synthetic microcarriers in xeno-free, defined conditions. *PLoS One*. 2014;9(3): e92120.
doi: 10.1371/journal.pone.0092120.
 123. Rasmussen JG, Frobert O, Pilgaard L, Kastrup J, Simonsen U, Zachar V, et al. Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*. 2011;13(3):318–28.
 124. Mehrad B, Keane MP, Strieter RM. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2007;97(5):755–62.
 125. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. Chemokines as mediators of neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(11):1928–36.

126. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol.* 2003;170(6):3369-76.
127. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol.* 2008;180(4):2581-7.
128. Watkins HR, Lapp CA, Hanes PJ, Dickinson DP, Volkmann KR, Newman CL, et al. CCL28 effects on periodontal pathogens. *J Periodontol.* 2007;78(12):2356-63.
129. Chen Z, Haus JM, Chen L, Wu SC, Urao N, Koh TJ, et al. CCL28-induced CCR10/eNOS interaction in angiogenesis and skin wound healing. *FASEB J.* 2020;34(4):5838-50.
130. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(5):409-26.
131. Cho HH, Kim YJ, Kim JT, Song JS, Shin KK, Bae YC, et al. The role of chemokines in proangiogenic action induced by human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in the murine model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem.* 2009;24(5-6):511-8.
132. Arai F, Ohneda O, Miyamoto T, Zhang XQ, Suda T. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med.* 2002;195(12):1549-63.
133. Darvishi B, Boroumandieh S, Majidzadeh-A K, Salehi M, Jafari F, Farahmand L. The role of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) in cancer progression, invasion, metastasis and recurrence: A novel cancer stem cell marker and tumor-specific prognostic marker. *Exp Mol Pathol.* 2020;115:104443.
134. Simões IT, Aranda F, Casadó-Llombart S, Velasco-de Andrés M, Català C, Álvarez P, et al. Multifaceted effects of soluble human CD6 in experimental cancer models. *J Immunother cancer.* 2020;8(1):e000172.
135. Lai H, Sun Z, Yang J, Wu P, Guo Y, Sun J. B7-H3 modulates endothelial cell angiogenesis through the VEGF cytokine. *Immunol Res.* 2019;67(2):202-11.
136. Kingsbury GA, Feeney LA, Nong Y, Calandra SA, Murphy CJ, Corcoran JM, et al. Cloning, expression, and function of BLAME, a novel member of the cd2 family. *J Immunol.* 2001;166(9):5675-80.
137. Cui C, Su M, Lin Y, Lai L. A CD300c-Fc Fusion Protein Inhibits T Cell Immunity. *Front Immunol.* 2018;9:2657. doi: 10.3389/fimmu.2018.02657.

138. Rostamzadeh D, Kazemi T, Amirghofran Z, Shabani M. Update on Fc receptor-like (FCRL) family: new immunoregulatory players in health and diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(6):487–502.
139. Murphy M, Brown G, Wallin C et al. Murphy M, Brown G, Wallin C, et al. Gene help: integrated access to genes of genomes in the reference sequence collection. 2006 Sep 13 [Updated 2021 Feb 1]. In: Gene Help [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005.
140. Carrette F, Surh CD. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. *Semin Immunol*. 2012;24(3):209–17.
141. Fan G, Li Q, Qian J. C1q contributes to post-stroke angiogenesis via LAIR1-HIF1 α -VEGF pathway. *Front Biosci*. 2019;24(6):1050–9. doi: 10.2741/4767.
142. Maheshwari RK, Srikantan V, Bhartiya D, Kleinman HK, Grant DS. Differential effects of interferon gamma and alpha on in vitro model of angiogenesis. *J Cell Physiol*. 1991;146(1):164–9.
143. Laato M, Heino J, Gerdin B, Kähäri VM, Niinikoski J. Interferon-gamma-induced inhibition of wound healing in vivo and in vitro. *Ann Chir Gynaecol*. 2001;90 Suppl 215:19–23. PMID: 12041922.
144. Wichaiyo S, Lax S, Montague SJ, Li Z, Grygielska B, Pike JA, et al. Platelet glycoprotein VI and C-type lectin-like receptor 2 deficiency accelerates wound healing by impairing vascular integrity in mice. *Haematologica*. 2019;104(8):1648–60. doi: 10.3324/haematol.2018.208363.
145. Takeuchi M, Takeuchi K, Takai T, Yamaguchi R, Furukawa T, Akagi KI, et al. Subcellular localization of glypican-5 is associated with dynamic motility of the human mesenchymal stem cell line U3DT. *PLoS One*. 2021;16(2):1–21.
146. Sedighi M, Namdari M, Mahmoudi P, Khani A, Manouchehri A, Anvari M. An overview of angiogenesis and chemical and physiological angiogenic factors : short review. *J Chemical Health Risks*. 2022. doi: 10.22034/JCHR.2022.1932834.1326.
147. Delgado VMC, Nugnes LG, Colombo LL, Troncoso MF, Fernández MM, Malchiodi EL, et al. Modulation of endothelial cell migration and angiogenesis: a novel function for the “tandem-repeat” lectin galectin-8. *FASEB J*. 2011;25(1):242–54.
148. Méndez-Huergo SP, Blidner AG, Rabinovich GA. Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis. *Curr Opin Immunol*. 2017;45:8–15.
149. Mishima M, Maesaki R, Kasa M, Watanabe T, Fukata M, Kaibuchi K, et al. Structural

- basis for tubulin recognition by cytoplasmic linker protein 170 and its autoinhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(25):10346–51.
150. Letsiou S, Félix RC, Cardoso JCR, Anjos L, Mestre AL, Gomes HL, et al. Cartilage acidic protein 1 promotes increased cell viability, cell proliferation and energy metabolism in primary human dermal fibroblasts. *Biochimie*. 2020;171–172:72–8.
 151. Félix RC, Anjos L, Costa RA, Letsiou S, Power DM. Cartilage Acidic Protein a Novel Therapeutic Factor to Improve Skin Damage Repair?. *Mar Drugs*. 2021;19(10):541. doi: 10.3390/md19100541.
 152. Verdino P, Witherden DA, Havran WL, Wilson IA. The molecular interaction of CAR and JAML recruits the central cell signal transducer PI3K. *Science*. 2010;329(5996):1210–4.
 153. Chen WJ, Chen HW, Yu SL, Huang CH, Wang TD, Chen JJW, et al. Gene expression profiles in hypoxic preconditioning using cDNA microarray analysis: Altered expression of an angiogenic factor, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *Shock*. 2005;24(2):124–31.
 154. Bramswig KH, Poettler M, Unseld M, Wrba F, Uhrin P, Zimmermann W, et al. Soluble carcinoembryonic antigen activates endothelial cells and tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 2013;73(22):6584–96.
 155. Li N, Zhang W, Wan T, Zhang J, Chen T, Yu Y, et al. Cloning and Characterization of Siglec-10, a Novel Sialic Acid Binding Member of the Ig Superfamily, from Human Dendritic Cells. *J Biol Chem*. 2001;276(30):28106–12.
 156. Chen G-Y, Tang J, Zheng P, Liu Y. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science*. 2009 Mar;323(5922):1722–5.
 157. Bandala-Sanchez E, Bediaga NG, Naselli G, Neale AM, Harrison LC. Siglec-10 expression is up-regulated in activated human CD4(+) T cells. *Hum Immunol*. 2020;81(2–3):101–4.
 158. Kummer D, Ebnet K. Junctional Adhesion Molecules (JAMs): The JAM-Integrin Connection. *Cells*. 2018;7(4):25. doi: 10.3390/cells7040025.
 159. Pang X, Dong N, Zheng Z. Small leucine-rich proteoglycans in skin wound healing. *Front Pharmacol*. 2020;1649. doi: 10.3389/fphar.2019.01649.
 160. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(1):34–40.
 161. Fu Z, Wang S, Li J, Zhang Y, Li H, Li G, et al. Biological role of GITR/GITRL in

- attributes and immune responses of macrophage. *J Leukoc Biol.* 2020;107(2):309–21.
162. Kirchhofer D, Peek M, Lipari MT, Billeci K, Fan B, Moran P. Hepsin activates pro-hepatocyte growth factor and is inhibited by hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B) and HAI-2. *FEBS Lett.* 2005;579(9):1945–50.
163. Coffman LG, Parsonage D, D'Agostino R Jr, Torti FM, Torti SV. Regulatory effects of ferritin on angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(2):570–5. doi: 10.1073/pnas.0812010106.
164. Luo Z, Shang X, Zhang H, Wang G, Massey PA, Barton SR, et al. Notch Signaling in osteogenesis, osteoclastogenesis, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 2019;189(8):1495–500.
165. Chigurupati S, Arumugam T V, Son TG, Lathia JD, Jameel S, Mughal MR, et al. Involvement of notch signaling in wound healing. *PLoS One.* 2007;2(11):e1167.
166. Zheng L, Amano K, Iohara K, Ito M, Imabayashi K, Into T, et al. Matrix metalloproteinase-3 accelerates wound healing following dental pulp injury. *Am J Pathol.* 2009;175(5):1905–14.
167. Krampert M, Bloch W, Sasaki T, Bugnon P, Rüllicke T, Wolf E, et al. Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin. *Mol Biol Cell.* 2004;15(12):5242–54.
168. Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MG, et al. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins, Database (Oxford). 2016 Jul 3;2016:baw100. doi: 10.1093/database/baw100.
169. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010. Bookshelf Copyright Notice. 2011 Mar 28 [Updated 2016 Apr 18]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/about/copyright/>.
170. Iragavarapu-Charyulu V, Wojcikiewicz E, Urdaneta A. Semaphorins in angiogenesis and autoimmune diseases: therapeutic targets?. *Front Immunol.* 2020;11:346. doi: 10.3389/fimmu.2020.00346.
171. Zygmunt T, Gay CM, Blondelle J, Singh MK, Flaherty KM, Means PC, et al. Semaphorin-PlexinD1 signaling limits angiogenic potential via the VEGF decoy receptor sFlt1. *Dev Cell.* 2011;21(2):301–14.
172. Vadivel K, Ponnuraj S-M, Kumar Y, Zaiss AK, Bunce MW, Camire RM, et al. Platelets contain tissue factor pathway inhibitor-2 derived from megakaryocytes and inhibits

- fibrinolysis. *J Biol Chem*. 2014;289(45):31647–61.
173. Riese DJ, Cullum RL. Eprex: Roles in normal physiology and cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;28:49–56.
 174. Tian H, Huang JJ, Golzio C, Gao X, Hector-Greene M, Katsanis N, et al. Endoglin interacts with VEGFR2 to promote angiogenesis. *FASEB J*. 2018;32(6):2934–49.
 175. Maddaluno L, Urwyler C, Werner S. Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair. *Development*. 2017;144(22):4047–60.
 176. Song SH, Kim K, Jo EK, Kim YW, Kwon JS, Bae SS, et al. Fibroblast Growth Factor 12 is a novel regulator of vascular smooth muscle cell plasticity and fate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(9):1928–36.
 177. Van Meeteren LA, Ten Dijke P. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF- β . *Cell Tissue Res*. 2012;347(1):177–86.
 178. Zavala G, Prieto CP, Villanueva AA, Palma V. Sonic hedgehog (SHH) signaling improves the angiogenic potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells (WJ-MSc). *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):1–17.
 179. Salybekov AA, Salybekova AK, Pola R, Asahara T. Sonic Hedgehog signaling pathway in endothelial progenitor cell biology for vascular medicine. *Inter J Mol Sci*. 2018;19, 3040. doi: 10.3390/ijms19103040
 180. Duan S, Zhang Y, Yuan F, Jiang A, Sang Y, Huang G. Corneal endothelial expansion using human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived conditioned medium. *J Cell Physiol*. 2021;236(4):2606–15.
 181. Wobma HM, Tamargo MA, Goeta S, Brown LM, Duran-Struuck R, Vunjak-Novakovic G. The influence of hypoxia and IFN- γ on the proteome and metabolome of therapeutic mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2018;167:226–34.
 182. Kim H-K, Lee S-G, Lee S-W, Oh BJ, Kim JH, Kim JA, et al. A subset of paracrine factors as efficient biomarkers for predicting vascular regenerative efficacy of mesenchymal stromal/stem cells. *Stem Cells*. 2019;37(1):77–88.
 183. Huss MK, Felt SA, Pacharinsak C. Influence of pain and analgesia on orthopedic and wound-healing models in rats and mice. *Comp Med*. 2019;69(6):535-545. doi: 10.30802/AALAS-CM-19-000013.
 184. Sun B, Guo S, Xu F, Wang B, Liu X, Zhang Y, et al. Concentrated hypoxia-preconditioned adipose mesenchymal stem cell-conditioned medium improves wounds healing in full-thickness skin defect model. *Int Sch Res Notices*. 2014: 652713. doi: 10.1155/2014/652713.