



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



Universidad Autónoma de Sinaloa

Facultad de Biología

Doctorado en Ciencias Biológicas

Evaluación del potencial vasculogénico de hidrogeles de Matriz
Extracelular biofuncionalizados con el péptido LL37

TESIS

QUE PRESENTA

MC. JORGE ARMANDO LÓPEZ GUTIÉRREZ

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTORAS

DRA. ELSA MARIBEL AGUILAR MEDINA

DRA. MERCEDES BERMÚDEZ CORTÉS

Culiacán, Sinaloa. México

Enero 2024



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional





Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



DEDICATORIA

A mis hijos Diana Camila y Leonardo les dedico este trabajo con todo mi corazón, por ustedes estoy aquí, mis logros son suyos.

A mi esposa Rosa Isela, sin ti esto no hubiera sido posible, gracias por comprensión, cariño y respeto hacia mí, valoro mucho su esfuerzo, GRACIAS por todo su amor y su paciencia.



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis, la Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina y la Dra. Mercedes Bermúdez Cortés, por aceptarme como su alumno y trabajar de la mano siempre, les agradezco infinitamente sus enseñanzas, dedicación y paciencia, sin cada una de sus estrictas correcciones no me fuese posible llegar al lugar donde estoy ahora, cada uno de sus comentarios retumban en mi mente como una enseñanza de vida, los cuales serán bien aplicadas en mi futuro académico.

Al Dr. Rosalío Ramos Payán, por brindarme las herramientas necesarias y un laboratorio a mi disposición para realizar los experimentos tan costosos y largos, le estoy muy agradecido por su apoyo incondicional y sus innumerables consejos durante la realización de este trabajo.

A mis asesores, la Dra. Erika de Lourdes Silva Benites, el Dr. Hipólito Castillo Ureta y el Dr. José Geovanni Romero Quintana, por sus asesorías y consejos, su apoyo enriqueció de manera sustancial los resultados de este lindo proyecto.

Al Dr. Julio Basurto Flores por su compromiso y entusiasmo al realizar los análisis histológicos de nuestra investigación.

A mi esposa y mis hijos por su cariño y su apoyo incondicional para seguir preparándome.



A mis compañeros de los Laboratorios de Inmunología y Microbiología la Dra. Mariana y a los Doctores Germán, Alfredo, Erik, Juan Luis y Carlos por todo el apoyo, compañerismo y sincera amistad, y a los jóvenes que siempre me apoyaron con cada una de las fases de este lindo proyecto, Lizbeth, Mayra y Abraham, sin todos ustedes y su ayuda este trabajo no se habría logrado, gracias a todos por su apoyo.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por ser mi Alma mater, Máxima Casa de estudios de Sinaloa.

Al Posgrados en Ciencias Biológicas por aceptarme en su programa regional de Doctorado en Ciencias Biológicas y a su cuerpo docente, por brindarme las herramientas necesarias para ser un profesionalista de alto nivel.

A Fapsa y Asociados S.A de C.V por la donación de 4 lotes de materia prima para la realización de nuestros estudios, Gracias por ser una empresa socialmente responsable.

A CONAHCYT por el apoyo que da a través de sus becas a los jóvenes que buscan mediante la investigación colaborar con el desarrollo científico de nuestro país.



ÍNDICE

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|------|
| INDICE DE CUADROS..... | xiii |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRAC | 4 |
| 1 INTRODUCCIÓN | 7 |
| 2 MARCO TEÓRICO | 9 |
| 2.1 Ingeniería de tejidos..... | 9 |
| 2.2 Andamios tridimensionales en regeneración tisular | 10 |
| 2.3 Propiedades de los andamios a base de hidrogel..... | 10 |
| 2.4 Pulpa dental | 12 |
| 2.5 Tratamientos de reparación del tejido pulpar | 14 |
| 2.6 Matriz Extracelular | 15 |
| 2.7 Células troncales mesenquimales..... | 19 |
| 2.8 Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Ad-MSCs) | 19 |
| 2.9 Procesos de Vasculogénesis y Angiogénesis..... | 20 |
| 2.9.1 Vasculogénesis..... | 20 |
| 2.9.2 Angiogénesis..... | 20 |
| 2.10 Péptidos..... | 23 |
| 2.10.1 Uso terapéutico de los péptidos..... | 23 |
| 2.10.2 Péptido LL-37 | 25 |
| 3 ANTECEDENTES | 27 |
| 4 JUSTIFICACIÓN..... | 30 |
| 5 HIPÓTESIS | 31 |



| | | |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6 | OBJETIVOS | 32 |
| 6.1 | GENERAL:..... | 32 |
| 6.2 | ESPECÍFICOS: | 32 |
| 7 | METODOLOGÍA..... | 33 |
| 7.1 | Obtención de hidrogel..... | 33 |
| 7.1.1 | Preparación de las vejigas | 33 |
| 7.1.2 | Descelularización y obtención del pregel..... | 33 |
| 7.2 | Determinación de la biocompatibilidad <i>in vitro</i> | 33 |
| 7.2.1 | Medio condicionado | 33 |
| 7.3 | Cultivo celular..... | 33 |
| 7.3.1 | Macrófagos murinos..... | 33 |
| 7.3.2 | Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo..... | 34 |
| 7.3.3 | Células epiteliales de mama MDA-MB-231..... | 34 |
| 7.3.4 | Condiciones de crecimiento celular | 34 |
| 7.4 | Visualización de morfología celular | 34 |
| 7.5 | Determinación de lactato deshidrogenasa | 35 |
| 7.6 | Evaluación de actividad metabólica..... | 35 |
| 7.7 | Ensayo de muerte y viabilidad celular | 36 |
| 7.8 | Expresión de interleucinas por matrices de perlas citométricas (CBAs) | 36 |
| 7.8.1 | Adquisición de las muestras y análisis de CBAs | 36 |
| 7.9 | Formulación de Geles Biofuncionalizados | 37 |
| 7.10 | Mimetismo vasculogénico <i>in vitro</i> | 37 |
| 7.11 | Grupos de estudio | 40 |
| 7.12 | Evaluación de la vasculogénesis <i>in vitro</i> usando hUBM-Ad-MSCs-LL37..... | 42 |



| | | |
|--------|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.13 | Determinación de la biocompatibilidad <i>in vivo</i> | 42 |
| 7.13.1 | Protocolo de sedación del modelo animal | 42 |
| 7.13.2 | Protocolo de Infiltrado de biomateriales | 42 |
| 7.14 | Eutanasia animal y obtención de la biopsia | 45 |
| 7.15 | Análisis histológico de la biocompatibilidad <i>in vivo</i> | 45 |
| 7.16 | Angioreactores | 45 |
| 7.17 | Evaluación de la vasculogénesis <i>in vivo</i> usando hUBM+LL37 | 46 |
| 7.18 | Determinación histológica | 46 |
| 7.19 | Cuantificación de lúmenes | 46 |
| 7.20 | Análisis estadístico | 47 |
| 7.21 | Lugar de realización..... | 47 |
| 7.22 | Cuidado y manejo de los animales..... | 47 |
| 8 | Resultados | 48 |
| 8.1 | El hidrogel obtenido es óptimo para su uso | 48 |
| 8.2 | Los andamios de hUBM y hUBM+LL37 son biocompatibles..... | 51 |
| 8.3 | Mimetismo vasculogénico | 63 |
| 8.4 | Los Hidrogeles son biocompatibles <i>in vivo</i> | 69 |
| 8.4.1 | Descripción macroscópica | 69 |
| 8.4.2 | Descripción histológica | 71 |
| 8.5 | Los Hidrogeles estimulan la vasculogénesis <i>in vivo</i> | 76 |
| 8.5.1 | Evaluación de la vasculogénesis <i>in vivo</i> 7 días. | 76 |
| 8.5.2 | Evaluación de la vasculogénesis <i>in vivo</i> 21 días. | 82 |
| 9 | Discusión..... | 95 |
| 10 | Conclusión | 100 |



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



| | | |
|----|--------------------|-----|
| 11 | BIBLIOGRAFÍA | 101 |
| 12 | ABREVIATURAS | 111 |
| 13 | ANEXOS..... | 113 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Órgano dental. | 13 |
| Figura 2. Matriz extracelular | 18 |
| Figura 3. Representación de la angiogénesis en condiciones fisiológicas. | 22 |
| Figura 4. Esquema de infiltrado de Biomateriales. | 44 |
| Figura 5. Descelularización. | 49 |
| Figura 6. Gelificación. | 50 |
| Figura 7. Morfología celular. | 52 |
| Figura 8. Citotoxicidad. | 54 |
| Figura 9. Liberación de lactato deshidrogenasa. | 55 |
| Figura 10. Proliferación celular. | 57 |
| Figura 11. Actividad metabólica. | 58 |
| Figura 12. Viabilidad y morfología celular. | 60 |
| Figura 13. Ensayo de matrices citométricas. | 62 |
| Figura 14. Monitoreo celular en MDA-MB-231. | 64 |
| Figura 15. Normoxia e hipoxia en MDA-MB-231. | 66 |
| Figura 16. Mimetismo vasculogénico en MDA-MB-231 <i>in vitro</i> . | 68 |
| Figura 17. Recuperación de los injertos de biomateriales. | 70 |
| Figura 18. Histología del Infiltrado de hUBM <i>in vivo</i> . | 72 |
| Figura 19. Histología del Infiltrado de hUBM+LL37 <i>in vivo</i> . | 73 |
| Figura 20. Histología del Infiltrado de cloroformo <i>in vivo</i> . | 74 |
| Figura 21. Respuesta inflamatoria y activación celular <i>in vivo</i> . | 75 |
| Figura 22. Neovascularización <i>in vivo</i> 7 días de inducción. | 77 |
| Figura 23. Infiltrado celular <i>In vivo</i> 7 días de inducción. | 79 |
| Figura 24. Neovascularización <i>in vivo</i> 14 días de inducción. | 80 |
| Figura 25. Microscopia de Neovascularización <i>in vivo</i> a 14 días. | 81 |
| Figura 26. Neovascularización <i>in vivo</i> 21 días de inducción.. | 83 |
| Figura 27. Neovascularización <i>in vivo</i> 21 días hUBM. | 85 |



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



| | |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| Figura 28. Neovascularización <i>in vivo</i> 21 días hUBM+LL37. | 87 |
| Figura 29. Neovascularización <i>in vivo</i> 21 días hUBM+VEGF. | 89 |
| Figura 30. Neovascularización <i>in vivo</i> 21 días Gelatina. | 91 |
| Figura 31. Colonización celular de andamios a 21 días. | 93 |
| Figura 32. Colonización celular y formación de túbulos 21 días. | 94 |



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



INDICE DE CUADROS

| | |
|------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Inductores vasculogénicos. | 39 |
| Tabla 2. Grupos de estudio para evaluación de la vasculogenesis. | 41 |



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



Financiamiento

Este proyecto fue realizado gracias al financiamiento otorgado por la Universidad Autónoma de Sinaloa y la dirección general de investigación y posgrados de Sinaloa con numero de registro PRO_A2_012 a nombre del Doctor José Geovanni Romero Quintana.



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



RESUMEN

La regeneración tisular implica mecanismos celulares y moleculares específicos para la reparación del tejido dañado, sustituyéndolo con células completamente idénticas a las pérdidas y lesionadas, para lograrlo es necesario la conjugación armónica de células y tejidos continuos, lo que implica proliferación celular promovida por factores de crecimiento, estrechamente dependiente de la matriz extracelular y el desarrollo y expresión de moléculas específicas, donde el paso más importante para restablecer la forma y función de cualquier tejido es la revascularización, la cual aportará oxígeno, nutrientes y diversas moléculas de señalización que sirven de comunicación.

La ingeniería tisular es la ciencia encargada de obtener, caracterizar y formular, andamios como biomateriales que al ser implantados tengan la capacidad de no provocar rechazo inmunológico, ser biocompatibles y que se autodegraden mientras permitan la colonización de células hospederas, mientras se forma un tejido nuevo y funcional. Estos bioandamios al ser obtenidos de fuentes naturales como la matriz extracelular de vejiga porcina tienen gran atractivo debido a que poseen un alto potencial para reemplazar tejidos lesionados, aún expanden su uso cuando son manufacturados en hidrogeles, debido a que estos pueden cubrir defectos críticos reduciendo la cantidad de intervenciones quirúrgicas, además, al ser biofuncionalizados con moléculas inductoras como el péptido LL37 tiene la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria controlada así como su respuesta proliferativa de células de carácter endotelial y mesenquimal. **OBJETIVO:** Evaluar el potencial vasculogénico de



hUBM biofuncionalizado con el péptido LL37. **METODOLOGIA:** Nuestros estudios se realizaron en dos partidas, *In vitro* e *In vivo*. *In vitro* se evaluó la biocompatibilidad del hidrogel biofuncionalizado con el péptido LL37 (hUBM+LL37). Realizamos ensayos colorimétricos para evaluar la liberación de enzimas oxido reductasas como lactato deshidrogenasa (LDH) a 24 horas y Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT) a 24, 48 y 72 horas. Se realizo el ensayo diferencial de viabilidad celular a 24 horas por microscopia de fluorescencia, mientras que se determinó la expresión de citocinas proinflamatorias de IL6, IL10, IL12p70, MCP-1, IFN- γ y TNF- α , en Ad-MSCs, RAW 264.7 y NHI 3T3. *In vivo*; se evaluó la biocompatibilidad de hUBM+LL37 en el dorso de ratas wistar durante 1, 3 y 7 días, mientras que la angiogenesis se evaluó injertando angioreactores en el dorso de ratas wistar durante 7, 14 y 21 días. **RESULTADOS:** en el ensayo de citotoxicidad el LDH en la lectura a 590 nm no es significativa entre los grupos experimentales Raw 264.7, NHI 3T3 y Ad-MSCs ($P > 0.005$), pero sí respecto al control de citotoxicidad máxima. Las tres líneas celulares mostraron una mayor viabilidad celular de 24 a 72 h cuando se estimularon con pUBMh+LL37. La viabilidad celular se mantuvo en cada línea celular ($p > 0,5$), lo que demuestra que hUBM+LL37 es biocompatible. Además, las interlucinas MCP-1, TNF- α y IL-12p70 se expresaron incluso más que el control de LPS. *In vivo*, al evaluar la biocompatibilidad se demostró que hUBM+LL37 induce el reclutamiento de células polimorfonucleares y células de tipo fibroblastoide mostrando un tejido libre de lesión tisular. Mientras que en los angioreactores se observó presencia de primordios vasculares desde el día 14 de injertados los angioreactores. **Conclusiones:** El andamio de hUBM+LL37 es



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



biocompatible tanto *In vitro* como *In vivo*, mientras que es un inductor de angiogénesis *In vivo* en un modelo murino a los 14 y 21 días, convirtiéndolo en una posible alternativa de biomaterial con potencial en regeneración tisular vascular.

Palabras clave: Andamios, Matriz extracelular, LL37, Biocompatibilidad, Angiogénesis.



ABSTRAC

Tissue regeneration involves specific cellular and molecular mechanisms for the repair of damaged tissue, replacing it with cells completely identical to the lost and injured ones. To achieve this, the harmonious conjugation of continuous cells and tissues is necessary, which involves cell proliferation promoted by growth factors. closely dependent on the extracellular matrix and the development and expression of specific molecules, where the most important step to restore the form and function of any tissue is revascularization, which will provide oxygen, nutrients and various signaling molecules that serve as communication. Tissue engineering is the science in charge of obtaining, characterizing and formulating scaffolds such as biomaterials that, when implanted, have the ability not to cause immunological rejection, are biocompatible and that self-degrade while allowing the colonization of host cells, while new tissue is formed. and functional. These bioscaffolds, when obtained from natural sources such as the extracellular matrix of porcine bladder, have great appeal because they have a high potential to replace injured tissues. They still expand their use when they are manufactured in hydrogels, because these can cover critical defects, reducing the number of surgical interventions, in addition, when biofunctionalized with inducing molecules such as the LL37 peptide, it has the capacity to induce a controlled inflammatory response as well as its proliferative response of endothelial and mesenchymal cells. **OBJECTIVE:** To evaluate the vasculogenic potential of hUBM biofunctionalized with the LL37 peptide (hUBM+LL37). **METHODOLOGY:** Our studies



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



were carried out in two batches, *In vitro* and *In vivo*. *In vitro*, the biocompatibility of the hydrogel biofunctionalized with the LL37 peptide was evaluated. We performed colorimetric assays to evaluate the release of oxido reductase enzymes such as lactate dehydrogenase (LDH) at 24 hours and 3-(4,5-dimethylthiazol 2-yl)-2,5-diphenyltetrazole bromide (MTT) at 24, 48 and 72 hours. The differential assay of cell viability was performed at 24 hours by fluorescence microscopy, while the expression of proinflammatory cytokines IL6, IL10, IL12p70, MCP-1, IFN- γ and TNF- α was determined in Ad-MSCs, RAW. 264.7 and NHI 3T3. *In vivo*; The biocompatibility of hUBM+LL37 was evaluated on the back of Wistar rats for 1, 3 and 7 days, while angiogenesis was evaluated by grafting angioreactors on the back of Wistar rats for 7, 14 and 21 days.

RESULTS: In the cytotoxicity assay, LDH reading at 590 nm is not significant between the experimental groups Raw 264.7, NHI 3T3 and Ad-MSCs ($P > 0.005$), but it is with respect to the control of maximum cytotoxicity. All three cell lines showed increased cell viability from 24 to 72 h when stimulated with pUBMh+LL37. Cell viability was maintained in each cell line ($p > 0.5$), demonstrating that hUBM+LL37 is biocompatible. Furthermore, the interleukins MCP-1, TNF- α , and IL-12p70 were expressed even more than the LPS control. *In vivo*, when evaluating biocompatibility, it was shown that hUBM+LL37 induces the recruitment of polymorphonuclear cells and fibroblastoid-like cells, showing a tissue free of tissue injury. While in the angioreactors, the presence of vascular primordia was observed from day 14 after the angioreactors were grafted. **Conclusions:** The hUBM+LL37 scaffold is biocompatible both *In vitro* and *In vivo*, while it is an inducer



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



of angiogenesis *In vivo* a murine model at 14 and 21 days, making it a possible biomaterial alternative with potential in vascular tissue regeneration.

Keywords: Scaffolds, Extracellular matrix, LL37, Biocompatibility, Angiogenesis.



1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad la ingeniería de tejidos aplica conocimientos de las ciencias biomédicas y diversos materiales *in vitro* e *in vivo* que permiten el diseño de nichos adecuados para lograr tejidos funcionales. Diversos investigadores han analizado estos materiales utilizados como andamios, los cuales pueden ser producidos de matriz extracelular (MEC), ya que permiten la adherencia y supervivencia de diversos tipos celulares, pues están constituidos por proteínas como colágeno, proteoglicanos y ácido hialurónico, implicados en la captación de agua, nutrientes y diversas moléculas de señalización. Sin embargo, el primer proceso indispensable para lograr la regeneración correcta y ordenada es que exista vascularización, ya que esto permitirá el intercambio de gases y aportar los nutrientes necesarios. En la creciente demanda del uso de nuevos biomateriales *in vivo* surgen como una gran promesa, los Hidrogeles (HG), que han sido un tema de gran interés en los últimos años, ya que son ampliamente estudiados debido a su gran potencial del campo en la biomedicina. Los HG son biomateriales que han demostrado tener una excelente actividad física, mecánica, química y biológica, además, los podemos obtener de diversos orígenes como son sintéticos, biológicos o híbridos (1). Los HG naturales se pueden aislar de tejidos, siendo los de origen bovino, porcino y humano los de mayor uso (2, 3), y por su versatilidad se pueden utilizar en ensayos *in vitro* para la proliferación, diferenciación celular y estimulación de la formación de tejidos (4, 5), así como *in vivo*, aplicados como biomateriales que tienen el objetivo de restaurar las funciones de los tejidos u órganos dañados o para rellenar defectos críticos (6-10). El gran éxito de este tipo de biomateriales es que siguen los preceptos de la tríada en regeneración tisular (11), que se rige por la composición de andamio tridimensional, moléculas bioactivas que permiten la modulación en el desarrollo y proliferación celular y el componente celular, logrando una conjugación idónea para la neoformación tisular (12). Por lo tanto, se logrará una regeneración completa si se proporciona un andamiaje estructural que le confiera propiedades mecánicas, al mismo tiempo que induce la migración de las poblaciones celulares y presenta una degradación progresiva (13). Los



biomateriales formulados en HG, tienen la gran capacidad de formar redes tridimensionales que permiten una gran captación de líquidos y fluidos, permitiendo la posibilidad de difusión de moléculas y células, que inducen la modulación del comportamiento celular e influyen en los resultados de la remodelación biológica, física y química (14-16). Hoy en día existe una gran demanda de biomateriales que permitan una fácil aplicación clínica por inyección *in vivo*. Estos requisitos se cumplen ampliamente con las formulaciones de HG que dan como resultado un andamio hidrofílico reticulado físico y químico que se puede funcionalizar con moléculas biológicas, proporcionando un entorno tridimensional (3D) similar a la MEC nativa (17). Por las razones antes mencionadas, los hidrogeles se consideran actualmente el biomaterial de elección para aplicaciones de ingeniería de tejidos (18). En este sentido, el uso de biomateriales a base de HG, enfocados en tratamientos de revascularización pueden ser utilizados como una terapia eficaz para reparación de diversas lesiones como el aneurisma cerebral, la estenosis coronaria, los injertos óseos, los injertos epiteliales, los injertos capilares y en odontología enfocados en órganos dentales (OD) que han sufrido lesiones por caries o traumatismos donde la pulpa dental ha perdido su función y vitalidad. A pesar de que se han desarrollado técnicas y tratamientos para la preservación de los órganos dañados, aún están lejos de lograr la regeneración del tejido perdido, por lo que es importante aplicar los conocimientos interdisciplinarios con los que cuenta la ingeniería tisular, utilizando materiales, células y moléculas bioactivas capaces de estimular la respuesta celular y molecular de forma controlada para lograr una revascularización, pues a partir de ésta, se logrará formar un nicho apto que sea capaz de proveer las señales necesarias para la regeneración.



2 MARCO TEÓRICO

2.1 Ingeniería de tejidos

Durante las últimas décadas en el campo de la biomedicina se han realizado enormes esfuerzos para lograr terapias enfocadas a restaurar la función de tejidos que han sufrido daño crítico, reconstrucción quirúrgica, dispositivos mecánicos o en pacientes tratados con trasplantes que están esperando un trasplante que les proporcionará una mejor calidad de vida (19-21). Sin embargo, la falta de donantes y la falta de biomateriales biocompatibles impulsó la formación de una nueva rama especializada basada en los principios de la biología, biología celular, ciencia de materiales, química, biología molecular, medicina e ingeniería, cuya misión es encontrar las mejores estrategias enfocadas en realizar terapias adecuadas y personalizadas, restaurando la función del tejido y órgano lesionado, el cual debe tener la capacidad de imitar casi en su totalidad a la matriz extracelular, además, de poder permitir el paso de nutrientes y oxígeno, la liberación de desechos y metabolitos propios de los productos de reabsorción de los materiales utilizados (22, 23). Implementar la ingeniería de tejidos *in vitro* nos permite evaluar las condiciones celulares y moleculares de la fisiología humana (24-26), como ensayos 3D, que integran señales físicas, químicas y mecánicas, desarrollando un ambiente similar al nicho a estudiar, resultando en la comprensión del sistema integral, es decir, las interacciones celulares y moleculares que permiten la invasión, proliferación, diferenciación y apoptosis (27, 28). El fin último de la ingeniería tisular es evaluar las mejores estrategias que logren la restauración tisular, ya sea manteniendo y mejorando la función del tejido dañado y, en casos muy específicos, incluso reemplazando órganos completos (29, 30). En este sentido se ha logrado la generación de andamios tridimensionales, los cuales son diversos dependiendo del propósito requerido, es decir, se implementan en cosmetología, biomedicina, farmacología y regeneración de tejidos.



2.2 Andamios tridimensionales en regeneración tisular

Distintos son los andamios tridimensionales utilizados para la regeneración tisular, actualmente se mencionan diferentes tipos que logran devolver la función al tejido dañado, aquí abordaremos los más utilizados hasta el momento (31). El uso de andamios 3D permite el desarrollo de nuevas estrategias para aplicaciones biomédicas, que logran la reparación de tejidos dañados (32). Estos andamios son sustancias naturales, sintéticas o híbridas o combinaciones de sustancias que tienen la cualidad de interactuar con sistemas biológicos (33). En la práctica clínica se suele utilizar el lisado autólogo de plaquetas, con el fin de lograr una rápida integración de un implante o injerto, que minimice las intervenciones quirúrgicas, ya que por su naturaleza estaría libre de rechazo inmunológico (34, 35). Además, varios autores han estudiado el uso de biomateriales de acuerdo con su interés, por ejemplo, se menciona que los podemos obtener a partir de electrohilado, entrecruzamiento, hidrogelificación, autoensamblaje de péptidos y aerogeles, entre otros (36-41). Un futuro prometedor son los andamios fabricados en HG ya que se consideran los mejores candidatos en nuevas terapias enfocadas a la regeneración tisular debido a que mimetizan la estructura nativa de la MEC, permitiendo la migración, proliferación y diferenciación celular. Los HG más utilizados en biomedicina, en el orden de los HG biológicos, son los siguientes, principalmente agarosa, alginato, quitosano, hialuronano, fibrina, colágeno y matriz extracelular (MEC) (42-44), también existen HG sintéticos, entre los que destacan ácido poliláctico (PLA), polietilenglicol (PEG), poli (2 hidroxietilmetacrilato) (PHEMA), y alcohol polivinílico (vinyl alcohol) (PVA) (45, 46).

2.3 Propiedades de los andamios a base de hidrogel

Los HG se pueden obtener de diversas fuentes, como polisacáridos, proteínas y tejidos descularizados. Los HG han mostrado ventajas como andamios, ya que son redes 3D



blandas y elásticas formadas a partir de homopolímeros, copolímeros o macrómeros hidrofílicos. Además de simples o híbridos, los HG muestran actividades químicas, mecánicas y biológicas, como la incorporación de células en sus estructuras, la retención de un alto contenido de agua que mejora el transporte de nutrientes y desechos celulares, y características elásticas y flexibles que emulan la MEC. Los HG puede inducir cambios en los procesos celulares como la quimiotaxis, la proliferación, la angiogénesis, la biomineralización y la expresión de biomarcadores de tejidos específicos, mejorando el proceso de regeneración (11, 47). Entender las propiedades físicas de estos biomateriales es de vital importancia, ya que podríamos enfocar los tratamientos en función de su resistencia, comprensión y elasticidad (48). El tipo de materia prima y el procedimiento de fabricación influyen en las propiedades del HG ya que pueden obtenerse mediante reticulación por regulación de temperatura o pH (49). Por esta razón, es necesario comprender sus propiedades, como la absorción de agua, la capacidad de hinchamiento, la estabilidad térmica y la tasa de degradación (50-53). Como es el caso de los HG a base de fibroína de seda, ya que pueden ser utilizados para la liberación de fármacos por la transición de solución a gel, logrando gelificar en condiciones *in situ*, favoreciendo su autoensamblaje a una temperatura de 37° C (53). Los HG nanoestructurados inteligentes brindan un rendimiento mejorado al expandir sus aplicaciones biomédicas, debido a su rápida respuesta y alta elasticidad, capaces de soportar deformaciones de alto nivel como torsión, flexión, anudado y estiramiento extenso (54). Los HG formulados con lignina combinada con hemicelulosa y almidón mediante una reacción de extrusión reactiva utilizando ácido cítrico como catalizador permiten la reticulación del biomaterial, lo que admite una mayor absorción de agua y, por lo tanto, un hinchamiento del medio dependiente del pH (55).

En el área odontológica, las lesiones pulpares en órganos dentales inmaduros, resultado de caries o trauma dental, son frecuentes entre la población infantil y juvenil (56, 57). En muchos casos, dichas lesiones interrumpen el desarrollo de estos órganos dejando un ápice incompleto con paredes dentinarias debilitadas (58).



2.4 Pulpa dental

La pulpa dental es un tejido conjuntivo, laxo y especializado que contiene 75% de agua y 25% de materia orgánica, se compone de MEC, vasos sanguíneos de pared delgada y terminaciones nerviosas. El tejido pulpar se encuentra rodeado por paredes de dentina y ocupa la cámara pulpar y los conductos radiculares (59). Además, brinda el soporte a estructuras vasculares, nerviosas y celulares del órgano dentario (OD) como son los odontoblastos, fibroblastos y células troncales mesenquimales (MSCs por sus siglas en inglés) indiferenciadas, además de células inmunológicas y factores de crecimiento (60). El órgano dental está conformado por la pulpa dental y tres tipos de tejidos duros conocidos como esmalte, dentina y cemento (Figura1).

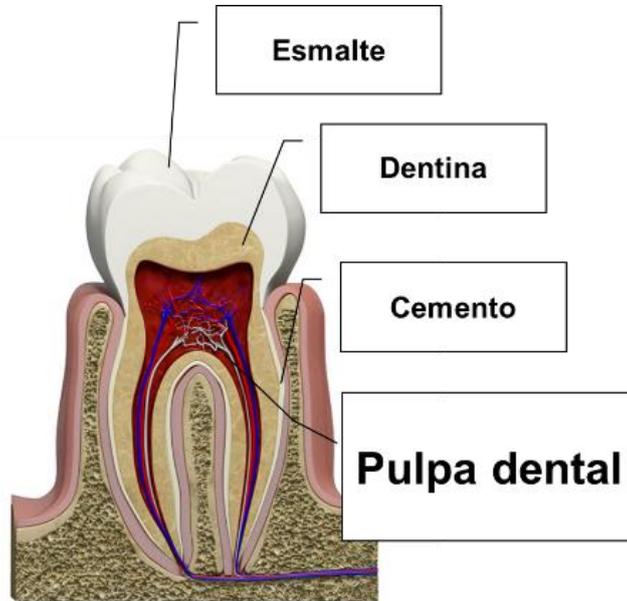


Figura 1. Órgano dental. Imagen representativa del órgano dental, donde se muestran los tejidos que lo conforman (61).



2.5 Tratamientos de reparación del tejido pulpar

La regeneración pulpar se puede definir como la sustitución del tejido dañado por células idénticas al tejido perdido, lo que lleva al restablecimiento completo de la función biológica y no a un tejido similar que genere una fibrosis o cicatriz (62). Su finalidad es continuar con el desarrollo radicular y lograr el espesor de la pared dentinaria junto con el cierre apical, además permitirá que el OD continúe dentro de la cavidad oral (63).

Los tratamientos más exitosos que permiten que los OD inmaduros y dañados sean mantenidos en su sitio y logren completar su desarrollo son: apicogénesis, apexificación y revascularización. La apicogénesis y apexificación ayudan a completar el cierre apical en los OD inmaduros, mientras que la revascularización también se ha utilizado para la formación de tejido vital dentro del conducto radicular (64). Sin embargo, el tejido pulpar posee características histológicas y funcionales muy específicas que el tejido invaginado de origen periapical, no puede originar. Además, la revitalización del tejido podría formar tejido necrótico residual (65). Para alcanzar el éxito, diversos investigadores han concluido que los niveles de desinfección que se deben de lograr en este tipo de tratamientos son muy altos, teniendo como método de irrigación al hipoclorito de sodio al 1.5% (NaOCL) o clorhexidina 0.12%, para usar posteriormente agentes químicos como el hidróxido de calcio y mezcla de antibióticos (66). En este sentido se aplica una pasta triantibiótica que contiene partes iguales de ciprofloxacino, metronidazol y minociclina (67). La amoxicilina, cefaclor, cefroxadina también se han utilizado en combinación con ciprofloxacina y metronidazol mostrando resultados prometedores (68). Sin embargo, algunos investigadores mencionan que el uso de estos medicamentos produce reacción alérgica en altas dosis, además son letales en contacto directo con células mesenquimales de pulpa dental (DPSCs, por sus siglas en inglés), células troncales mesenquimales de la papila apical (SCAPs, por sus siglas en inglés) y fibroblastos que se encuentran en la zona perivascular radicular (69, 70).



La revascularización pulpar se basa en un nicho libre de bacterias, empleando un andamiaje 3D apropiado, conjugado con factores de crecimiento y MSCs (71). Colocar un andamio permitirá una comunicación directa entre él mismo y las SCAPs, lo cual, promoverá la homeostasis y a su vez suministro de sangre y moléculas específicas para su revitalización (72). De este modo, en la actualidad se están utilizando andamios de matrices de fibrina tales como el plasma y la fibrina ricos en plaquetas (73). Esta última se utiliza para contención de otros materias de relleno y su presentación es en malla no trombolizada donde el efecto es liberar prolongadamente los factores de crecimiento (74). Mientras que el plasma rico en plaquetas es necesario combinarlo con trombina y cloruro de calcio para su coagulación (75).

En muchas investigaciones y casos clínicos se plantea que estos dos últimos son una opción adecuada para el tratamiento de revascularización, por ser un material similar a un andamio tridimensional, sin embargo, al ser evaluado mediante histología e inmunohistoquímica los hallazgos son poco favorecedores, ya que no muestran evidencia de la formación de tejido vascular, por el contrario, se observa un tejido fibroso pobremente vascularizado (76).

Debido a esto se siguen buscando alternativas de tratamiento donde se conjunten los elementos necesarios para lograr la regeneración del tejido pulpar. La regeneración tisular parte de la premisa de una triada que sea capaz de brindar un material que forme un andamio apto que permita la proliferación, migración y hasta la diferenciación de células, así como la absorción y reclutamiento de proteínas, factores de crecimiento y señales específicas que puedan inducir y mantener un nicho adecuado. La matriz extracelular resulta ser un material prometedor ya que es de origen biológico y puede ser obtenido de diversas fuentes.

2.6 Matriz Extracelular

La MEC es una red tridimensional (3D) que está involucrada en diversas funciones como la supervivencia y desarrollo celular, proporciona sostén mecánico a los tejidos y es



parte del remodelado de órganos, además de que permite la nutrición y la inervación celular, la fibrosis, la respuesta inmunológica y por último la regeneración de tejidos mediante la participación de procesos bioquímicos vitales como: migración, proliferación, preservación y señalización celular (77). Eso es debido a la complejidad única de proteínas funcionales y estructurales como glucoproteínas y proteoglicanos específicas en cada localización anatómica (78). Además, la MEC provee soporte, adhesión, es un reservorio de proteínas de señalización que estimulan procesos de vasculogénesis, proliferación y migración celular (79).

La composición y organización de la MEC cambia debido a adaptaciones metabólicas de las células, es decir, realiza funciones más específicas debido a las propiedades mecánicas, ausencia de oxígeno o cambio de pH (80). Esto es ocasionado porque tiene la capacidad de adaptar el microambiente en un estado de reciprocidad dinámica con las células que la componen (81). Además, promueve la proliferación pues permite una adaptación completa en relación a la estructura del tejido y vecindad celular (81). Esto es debido a las proteínas que componen a la MEC que pueden dividirse en estructurales como el colágeno, laminina y fibronectina y no estructurales como los proteoglicanos (Figura 2), también se encuentran las metaloproteinasas de la matriz (MMPs por sus siglas en inglés) y factores de crecimiento reguladores (82).

El colágeno es la proteína más abundante del cuerpo, es sintetizada por células llamadas fibroblastos, brinda resistencia a la fricción y a la tensión y está presente en grandes concentraciones en zonas de articulación, además es ligando de muchas células del organismo (83). También se sabe que existen por lo menos veintidós tipos de colágeno, los más estudiados son los de tipo I y IV pues están presentes en piel, hígado, tendones y huesos (84).

Las MMPs son proteasas que se encargan de la desintegración de la MEC, permitiendo su propia remodelación. La regulación de las mismas en este proceso es fundamental ya que da paso a la transformación iniciando por la neovascularización y la remodelación del proceso crítico para muchos tejidos (83).



Factores de crecimiento han sido encontrados en la MEC en grandes cantidades, por ejemplo el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), éstos activan y promueven la cicatrización de heridas y la remodelación tisular (85).

En la actualidad, distintos tipos de MEC pueden solubilizarse y manipularse para formar HG expandiendo su uso, tanto *in vitro* como *in vivo*, así como materiales que rellenan defectos críticos. Los mecanismos por los cuales los HG de la MEC dirigen el comportamiento de las células e influyen en los resultados de la remodelación solo se comprenden parcialmente, pero incluyen señales estructurales, físicas y biológicas que aún permanecen del tejido de origen (86).

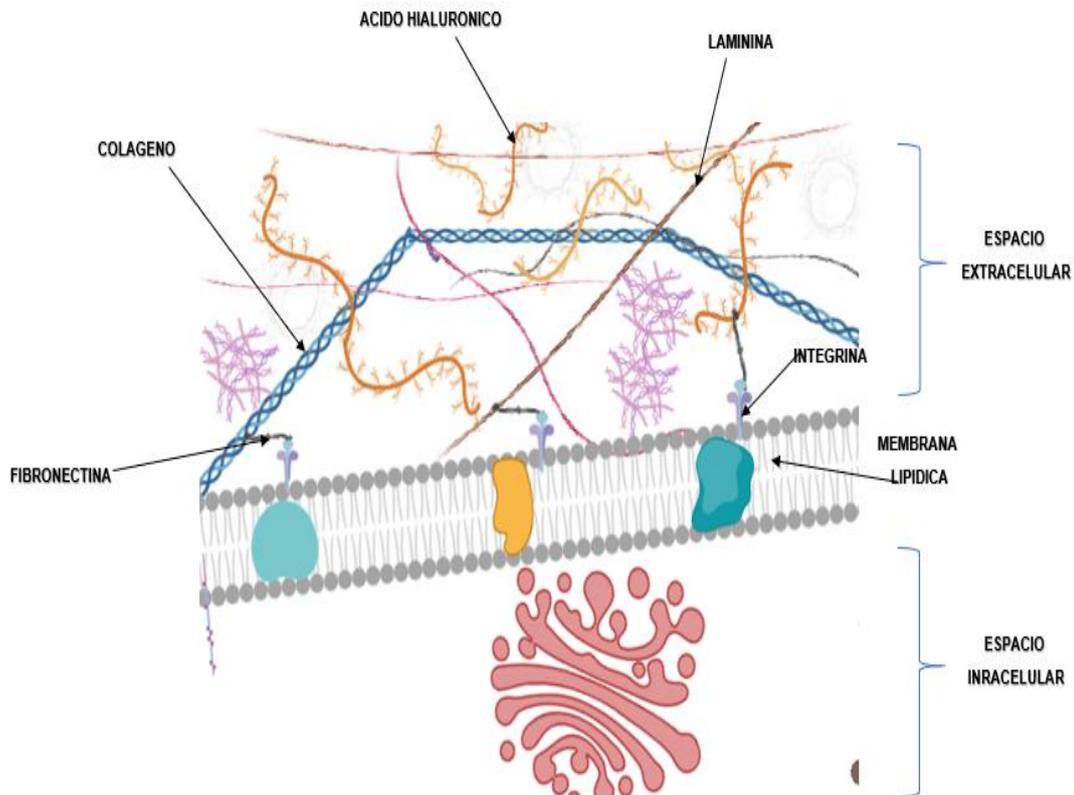


Figura 2. Matriz extracelular, se muestran las diversas proteínas estructurales que la conforman, así como si interacción de fibronectina de la MEC con integrinas de la membrana bilipídica de la célula.



2.7 Células troncales mesenquimales

Las MSCs son multipotentes e indiferenciadas y tienen capacidad de autorrenovación (87). La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés) ha descrito los criterios mínimos para la identificación de las MSCs humanas *in vitro*; el primero es que sean adherentes al sustrato, el segundo es la expresión positiva de marcadores de troncalidad de células mesenquimales CD90, CD73, CD105 y CD44 y por último que tengan capacidad de diferenciación a células de linaje mesodérmico con medios morfógenos específicos en cultivos *in vitro* (88). Las fuentes de obtención pueden ser de OD deciduos (SHEDs, por sus siglas en inglés) y DPSCs; también pueden obtenerse de tejido adiposo (Ad-MSCs, por sus siglas en inglés), entre otras (89). Estas últimas son las mayormente utilizadas ya que son de fácil acceso, presentan alta tasa de proliferación *in vitro* y tiene la capacidad de diferenciarse por lo menos a tres linajes de origen mesodérmico.

2.8 Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Ad-MSCs)

El tejido adiposo es una de las mejores fuentes de obtención de MSCs ya que ofrece mayores ventajas en comparación con otras fuentes existentes. Las células se obtienen por procedimientos poco invasivos, ya que son obtenidas de tejido de desecho de liposucciones y muestran características inmunosupresoras, como baja expresión de moléculas MHC clase I y ausencia de las de clase II, secreción de una amplia variedad de citocinas inmunoprotectoras y factores de crecimiento y están siendo usados para la cicatrización de heridas, regeneración de nervios, reconstrucción craneofacial, reparación de tejidos blandos, tratamientos contra infecciones en piel, entre otras (90). Las Ad-MSCs, muestran un patrón de expresión de marcadores celulares específicos de multipotencia y una frecuente expresión de la molécula de adhesión CD44 que contribuye al asentamiento de éstas en diferentes tejidos y su diferenciación celular



especializada. Todo esto las hace potencialmente factibles para la utilización en terapia regenerativa (91).

Las Ad-MSCs pueden sintetizar vesículas extracelulares de comunicación autócrina y parácrina (92), también poseen receptores transmembrana tipo *Toll*, presentes comúnmente sólo en las células del sistema inmunológico y cuya estimulación por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) inducen la síntesis y secreción de vesículas extracelulares que contienen factores bioactivos, los cuales poseen funciones inmunomoduladoras, proangiogénicas, antiapoptóticas y péptidos antimicrobianos (93).

2.9 Procesos de Vasculogénesis y Angiogénesis

2.9.1 Vasculogénesis

La vasculogénesis es el proceso de formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de nichos de células endoteliales indiferenciadas que se presenta en la formación del embrión. A diferencia de la angiogénesis este proceso no estará inducido por vasos preexistentes, por el contrario, será una formación de nuevos vasos a partir de células progenitoras endoteliales comúnmente llamadas angioblastomas, por lo general esto ocurre en el desarrollo embriológico del sistema circulatorio, ya que de los nichos de sangre iniciales del mesodermo del saco vitelino surgen estas células para el desarrollo del producto (94, 95). En la actualidad diversos estudios revelan que este proceso también puede ocurrir en un organismo adulto a partir de angioblastomas circundantes. En este sentido diversos investigadores han dado el nombre de revascularización a este proceso (96).

2.9.2 Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso fisiológico que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente. Incluye la migración y proliferación de células endoteliales, la formación y organización de células en estructuras tubulares que posteriormente madurarán en vasos sanguíneos estables. En la actualidad se sabe que para que este proceso se lleve a cabo, es necesario que participen diversas



moléculas como el VEGF y bFGF que promueven la proliferación de células endoteliales (97). Además, es conocido que el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF/SF) estimula la proliferación de células endoteliales y su migración. El PDGF promueve la proliferación de células musculares que dan estabilidad al vaso sanguíneo recién formado por células endoteliales. La combinación del factor de crecimiento fibroblastoide 2 (FGF-2) y PDGF estimula sinérgicamente la angiogénesis y estabiliza las redes vasculares, todos sincronizan los principales reguladores de la formación de vasos sanguíneos (98).

Los pasos para que se genere el proceso de angiogénesis son los siguientes (Figura 3) (99):

1. Degradación proteolítica de la membrana basal, intervienen diversas MMPs inducidas por la activación de pericitos y células endoteliales vasculares.
2. Activación, inducida por pericitos aumentando la síntesis de bFGF y por PDGF.
3. Migración y proliferación celular, proceso dinámico de reclutamiento de pericitos, células endoteliales vasculares, macrófagos y MSCs por aumento de la expresión de VEGF, CD34, PECAM-1/CD31 y MMPs.
4. Maduración del nuevo vaso sanguíneo, por aumento la expresión de VEGF y el receptor peptídico formil-1 (RPF-1, por sus siglas en inglés).

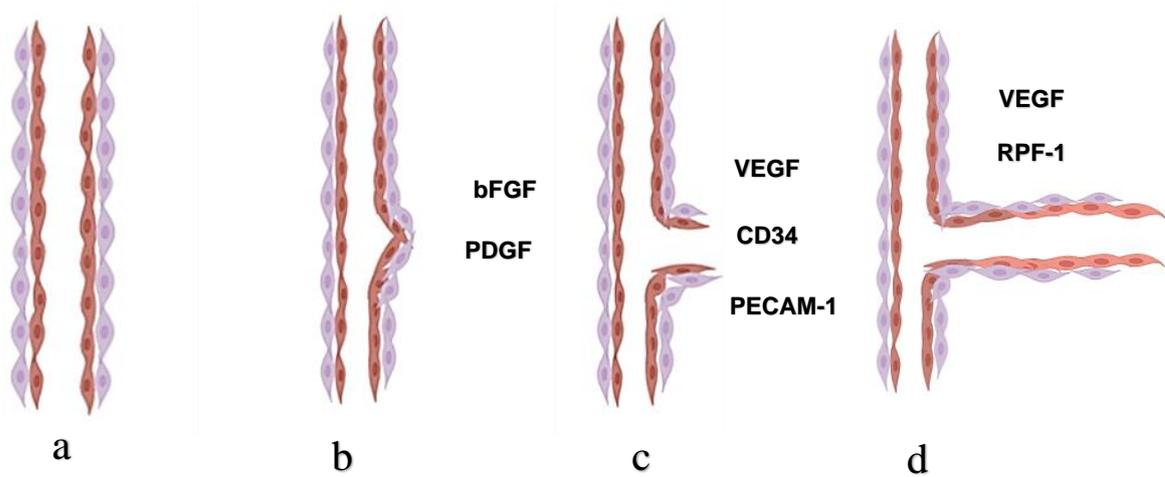


Figura 3. Representación de la angiogénesis en condiciones fisiológicas. (a) Vaso sanguíneo normal, (b) activación de células endoteliales y perivasculares, la cual está inducida por bFGF y por PDGF, (c) activación, migración y proliferación celular, aumentando la expresión de VEGF, CD34 y PACAM-1/CD31, (d) maduración del vaso sanguíneo, donde la expresión es más elevada de VEGF y RPF-1 Modificado de Rodríguez-Núñez, Romero (100).



2.10 Péptidos

Los péptidos son moléculas formadas por la unión de un bajo número de aminoácidos mediante enlaces peptídicos, están presentes en la naturaleza y son responsables de un gran número de funciones intra y extracelularmente, muchas de las cuales aún se desconocen (101). En la actualidad existe una nomenclatura particular para estudiarlos, según sea el número que lo integran:

1. Oligopéptido: 2 a 10 aminoácidos.
2. Polipéptido: 10 y 50 aminoácidos.
3. Proteína: 50 aminoácidos en adelante.

Estas moléculas pueden añadir aminoácidos en su extremo COOH terminal gracias a la formación de un enlace covalente CO-NH implicando la pérdida de una molécula de agua, generando un enlace tipo amida (102).

Los péptidos, al igual que los aminoácidos y proteínas son biomoléculas con un carácter anfótero que permiten la regulación homeostática de los organismos. Es importante destacar este comportamiento en las enzimas, péptidos que funcionan como catalizadores biológicos de las reacciones metabólicas, ya que tienen una capacidad de funcionamiento dentro de ciertos niveles de pH (102).

2.10.1 Uso terapéutico de los péptidos

En la actualidad existe mucho interés por parte de los investigadores en el uso de péptidos en industrias terapéuticas y farmacéuticas por su gran versatilidad, su síntesis práctica y un costo de producción muy bajo (103, 104). La industria farmacéutica está innovando terapias contra tumores neuroendocrinos, tal es el caso de Herrera Malo quien enfoca su investigación en el manejo de terapia con péptidos marcados con radionúclidos teniendo como blanco a los receptores de la somatostatina, conocidos como radioisótopos, esto ya que podría tener una respuesta más específica contra el tumor, supervivencia libre de progresión y aumento de la calidad de vida en los pacientes (105).



La Angiogenesis está inducida por diversos factores moleculares, gobernados principalmente por factores de crecimiento. Sin embargo, existen moléculas más pequeñas que brindan una señal específica conocida como péptido señal, la cual, permite desencadenar una cascada de señalización tanto autócrina como parácrina en las células con las que interactúa (106). En este sentido se han logrado identificar péptidos proangiogénicos ya que inducen un comportamiento similar por la señal mimética, inclusive pueden interactuar directamente con los receptores de membrana que inducen en las células murales y endoteliales la formación de nuevos vasos sanguíneos (107). Muchos han sido los péptidos que son estudiados desde un enfoque regenerativo, donde lo primordial es que induzcan angiogénesis *in vitro* e *in vivo*. Entre estos están los péptidos derivados de la Osteonectina conocidos como SPARC113 y SPARC118 y el derivado de Osteopontina conocido como OPD, otros péptidos de origen sintético son QK, RoY, PBA2-1c, Exendina-4. También están siendo estudiados en la actualidad péptidos derivados de la Angiopoyetina-1, los cuales han demostrado modular los procesos vasculogénicos *in vivo*. Entre ellos encontramos a vasculotido y el péptido derivado del dominio de unión a integrina de Ang1 (comp-Ang 1) (108).

El péptido QK derivado de VEGF, fue diseñado para imitar la estructura de la región helicoidal 17-25 del factor proangiogénico (109). Se sabe que este péptido interactúa con los receptores, Kdr y Flt-1, sobre andamios de Matrigel *in vitro* teniendo la capacidad de inducir la tubulogénesis de células endoteliales de cordón umbilical humanas (HUVEC) e *in vivo* en biomodelos murinos en ensayos de isquemia y herida abierta de miembros posteriores (110). PAB2-1 y VEGFR1D2 poseen capacidad proangiogénica ya que ambos son reconocidos por la integrina $\alpha 5\beta 1$ la cual induce procesos de diferenciación vascular en células endoteliales (111) (112).

Se ha demostrado que péptidos con actividad antimicrobiana pueden ser encontrados en componentes de la MEC, derivados del colágeno, ácido hialurónico, factores de crecimiento como PDGF, HGF, FGF, péptidos catiónicos derivados de laminina y fibronectina (113). La actividad antimicrobiana es mediada por la acción de una serie de péptidos catiónicos como β -defensina, hepcidina y catelicidinas (CATHL) (114).



2.10.2 Péptido LL-37

El péptido LL-37 es una molécula cargada positivamente (+6 a pH ~ 7.4 catiónica) de 37 aminoácidos, (NH₂ –LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRN LVPRTES-COOH) con un alto contenido de aminoácidos básicos e hidrófobos (115). Perteneciente a la familia de las catelicidinas, que es capaz de formar agregados en solución y bicapas lipídicas y, por lo tanto, a diferencia de otros péptidos antimicrobianos, está protegido de la degradación proteolítica (116). Esto permite la penetración de la membrana, la formación de poros que provocan la lisis bacteriana. Se conoció principalmente por su actividad de defensa en las respuestas inmunológicas contra infecciones y lesión tisular (117). Su actividad como un potente antimicrobiano ante diferentes microorganismos, brinda efectos inmunoestimuladores de los lipopolisacáridos donde controla la lisis bacteriana y previene los efectos de la endotoxemia (118). Además, posee otras funciones como inhibición de la apoptosis en neutrófilos y ejerce un gran poder quimioatrayente puesto que induce en diferentes estirpes celulares, la liberación de diversas citocinas como IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e IFN- γ , así como también se ha observado una gran actividad en regeneración tisular, específicamente estimulando la angiogénesis (116). Al estar en contacto con otras células como MSCs o leucocitos, este péptido permite la activación de los pericitos quienes dan el soporte a las células endoteliales y de este modo permiten la inducción de la vasculogénesis (119).

La expresión y secreción de LL-37 se eleva en los sitios de inflamación y cicatrización de heridas, donde el péptido funciona como una señal proliferativa y un factor proangiogénico (120). El péptido también actúa como un potente quimioatrayente para varias células a través de la activación del receptor péptido formilo 1 (FPRL1), el cual fosforila a través de ERK1/2 a diversas moléculas que les permiten a diversos factores de transcripción sintetizar angiopoyetina, una molécula que se expresa en procesos vasculogénicos (121).

Sabiendo que para la regeneración es necesario un andamio enriquecido con señales que permitan la angiogénesis y células que ayuden a devolver forma y función, este trabajo pretende demostrar si el uso de hidrogeles de matriz extracelular de vejiga de



Universidad Autónoma de Sinaloa



CONACYT

Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



cerdo (hUBM por sus siglas en inglés) con el péptido LL37 en presencia de Ad-MSCs inducen vascularización, ya que es el primer paso necesario para que el tejido sane y se regenere.



3 ANTECEDENTES

Estokmann y cols., compararon el potencial osteogénico *in vivo* de MSCs autólogas de diversas fuentes, Ad-MSCs, MSCs derivadas del periostio (MSCs-PD) y MSCs de la médula ósea (MSC-BM), el estudio mostró curación ósea completa después de 90 días en los injertos de Ad-MSCs, en comparación con otros grupos como MSCs-PD, MSCs-BM (122).

Krawuiec y cols., demostraron que los andamios de fibrina sembrados con Ad-MSC pueden remodelar injertos vasculares nativos después de 8 semanas de implantación, encontrando evidencia microscópica de que todos los injertos pudieron convertirse en tejido vascular bien definido, comprobándolo con modulaciones de la vía fibrinolítica, que contienen células endoteliales que expresan colágeno, elastina, calponina y elastina (123).

Cavalcanti y cols., estudiaron un andamio 3D, el cual fue combinado con DPSCs para formar un tejido similar a pulpa dental, éste fue evaluado *in vitro* durante 21 días con discos dentales. Las células conservaron características morfológicas normales y algunas mostraron elongaciones citoplásmicas, las DPSC expresaron proteína de matriz dentinaria 1 (DMP-1) y sialoproteína dentinaria (DSP por sus siglas en inglés), marcadores indicativos de diferenciación odontoblástica (6).

Pecci Lloret, analizó un andamio 3D de fibroína de seda donde se estudió la supervivencia, morfología y proliferación celular mediante la técnica de azul de Alamar. Los resultados obtenidos demostraron que los andamios resultan biocompatibles para las SHEDs ya que éstas mantienen su morfología, se adhieren al mismo con facilidad y son capaces de proliferar sobre él (124).



Estudios realizados por Huang y cols., emplearon porciones radiculares limpias de premolares humanos añadiéndoles DPSCs en ratones, comprobando que el espacio se logró rellenar con tejido similar a pulpa dental, además, de presentar una capa continua de tejido similar a dentina. Estas células expresaron DSP, sialoproteína ósea (BSP por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina (ALP por sus siglas en inglés), y la proteína CD105. Sin embargo, en estos estudios no evaluaron angiogénesis y vasculogénesis (125).

Yang Xu y cols., estudiaron un HG de quitosano encapsulado con péptido LL-37 para evaluar la cicatrización de lesiones en un modelo de ratón, demostrando que el andamio induce la síntesis de citocinas antiinflamatorias y proangiogénicas como el factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α) y el VEGF-A en lesiones de tejidos profundos a 21 días de implantación, permitiendo la microcirculación y la regeneración del tejido dañado (126), este hallazgo se respalda por lo reportado por Yanagisawa, Takahiro y cols., ya que comprobaron que el péptido LL-37 promueve la linfangiogénesis en las células endoteliales linfáticas a través de las vías de señalización ERK y Akt (127). También por lo reportado por Tovar-Castillo y cols., ya que demostraron que LL37 se expresa en queratinocitos humanos en lesiones cutáneas, promoviendo la inducción de VEGF-A (128).

Koczulla y cols., realizaron un ensayo de angiogénesis *in vitro* añadiendo el péptido LL-37 en un cultivo de HUVEC. Analizaron diferentes modelos de angiogénesis y aterogénesis utilizando el ensayo en cámara CAM, aplicando una dosis de 5 μ g / pellet. Como resultado el péptido LL-37 indujo el crecimiento de vasos dentro de la cámara CAM, el cual fue similar al control positivo, en el cual se aplicó bFGF-VEGF. Además, realizaron ensayos de angiogénesis fisiológica *in vivo* en un modelo de conejo donde añadieron diversos grupos de investigación, 7 días posquirúrgico, se inyectaron 200 μ g de LL-37, 200 μ g de sLL-37, 50 μ g de bFGF / 20 μ g de VEGF (control positivo) y PBS (control negativo) en los músculos de la pantorrilla. Los resultados arrojaron que



después de 35 días de inoculación, el grupo de péptido LL-37 mostró una mayor capacidad de flujo sanguíneo y formación de vasos los cuales fueron evaluados mediante cinedensitometría. Además, se detectaron capilares mediante la tinción con ALP con indócil-tetrazolio (129).

Nuestro grupo de trabajo se ha dedicado en los últimos años al estudio de regeneración tisular empleando HG de hUBM, sobre un modelo murino, realizando un defecto de tamaño crítico en la calvaria. Después de 3 meses, se encontró un cierre total de la herida, dado por tejido de reparación blando, fibroso y altamente vascularizado (datos no publicados).

Esto nos lleva a plantear que la hUBM puede ser un buen andamio para lograr la revascularización cuando se biofuncionaliza con el péptido LL37 en presencia de Ad-MSCs.



4 JUSTIFICACIÓN

La pulpa dental es un tejido de suma importancia ya que participa en el mantenimiento de la homeostasis, provee sensibilidad, aporta nutrientes y color de aspecto natural. Cuando este tejido sufre una lesión a causa de contaminación bacteriana o traumatismos, se utilizan tratamientos que buscan únicamente el cierre apical sacrificando al tejido mismo, por lo que hasta el momento no existe una terapéutica basada en restaurar la vitalidad del órgano dental. Por esta razón, consideramos que el desarrollo de opciones terapéuticas basadas en ingeniería tisular podría ser una herramienta novedosa para devolver la vascularización a este tejido devolviendo la vitalidad y capacidades fisiológicas que los órganos dentales aportan al organismo, entre las más destacadas están la masticación y fonación.

En la actualidad la regeneración tisular está empleando diversos materiales de origen biológico, lo más utilizados son los de MEC, estos son diseñados en diferentes presentaciones como son aerogeles, membranas, HG o híbridos. Estos pueden poseer una mejor capacidad de regeneración si se funcionalizan con materiales inertes como nanopartículas y minerales o si se biofuncionaliza con células o productos de estas como citocinas, factores de crecimiento o péptidos específicos. En este sentido, se ha reportado que las MSCs e HG pueden proveer un tejido biológico funcional equivalente y de comportamiento dinámico, que induzca regeneración y reemplace el tejido dañado. Hasta el momento, de acuerdo con la bibliografía consultada, no existen reportes del uso de Ad-MSCs en HG de MEC biofuncionalizados con péptidos antimicrobianos que induzcan vasculogénesis del tejido pulpar *in vitro* o *in vivo*. La conjunción de estos elementos resultaría favorable, ya que el nuevo tejido se desarrollaría en un entorno favorable con un alto potencial de diferenciación, en un ambiente no contaminado y con capacidad vasculogénica.



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



5 HIPÓTESIS

El hUBM biofuncionalizado con el péptido LL37 (hUBM+LL37) estimula la vasculogénesis.



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



6 OBJETIVOS

6.1 GENERAL:

Evaluar el potencial vasculogénico de hUBM biofuncionalizado con el péptido LL37.

6.2 ESPECÍFICOS:

1. Evaluar la biocompatibilidad de hUBM+LL37 *in vitro*.
2. Evaluar la biocompatibilidad de hUBM+LL37 *in vivo*.
3. Evaluar el potencial vasculogénico *in vitro* de hUBM+LL37.
4. Evaluar la potencial vasculogénico *in vivo* de hUBM+LL37.



7 METODOLOGÍA

7.1 Obtención de hidrogel

7.1.1 Preparación de las vejigas

Se utilizaron vejigas porcinas frescas y fueron delaminadas del epitelio interno (urotelio), el cual fue cortado en fragmentos pequeños y se limpiaron con agua destilada estéril y tres inmersiones en 500ml de PBS 1X con 1% Antibiótico/Antimicótico (Sigma).

7.1.2 Descelularización y obtención del pregel

El tejido se lavó con abundante agua destilada, las células de la matriz fueron retiradas con una solución de tripsina-EDTA incubadas a 37 °C bajo agitación continua durante 24 horas (130). Luego la matriz se colocó en un liofilizador (LabConco) durante 72 horas, después se cortó en fragmentos pequeños (131).

Posteriormente, se disgregaron 200 mg de matriz con 10 ml de pepsina en HCl 0.01 N bajo agitación constante durante 96 horas a temperatura ambiente. La concentración final del pregel fue de 10 mg/ml.

7.2 Determinación de la biocompatibilidad *in vitro*

7.2.1 Medio condicionado

Se prepararon medios de cultivo condicionados colocando 1 ml del material (hUBM, LL37 o hUBM+LL37) en 9 ml de medio estándar DMEM con antibiótico al 1%. Se llevaron a la incubadora (environment shaker) para permanecer toda la noche a 37°C a 250 rpm, después de este tiempo se llevaron a centrifugación a 13 000 rpm por 5 minutos y se rescatará el sobrenadante, para ser filtrado con una membrana de 0.22 µm.

7.3 Cultivo celular

7.3.1 Macrófagos murinos



Para los ensayos de biocompatibilidad utilizamos macrófagos murinos normales de la cepa Raw 264.7 (ATCC® TIB-71™) ya caracterizadas.

7.3.2 Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo

Para nuestros ensayos biológicos utilizamos Ad-MSCs normales, humanas (ATCC® PCS500011™) ya caracterizadas.

7.3.3 Células epiteliales de mama MDA-MB-231

Para la estandarización de los ensayos de mimetismo vasculogénico utilizamos la línea celular MDA-MB-231 normales humanas (ATCC® HTB26™) ya caracterizadas.

7.3.4 Condiciones de crecimiento celular

Todas las células fueron utilizadas al alcanzar la confluencia celular de 95%. Las Ad-MSC fueron utilizadas en los pases 3-6, MDA-MB-231 fueron utilizadas en el pase 4 y Raw 264.7 en el pase 3. Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) complementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS; GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, EE. UU.) y 30 mg mL⁻¹ de penicilina y 200 mg mL⁻¹ estreptomina (ambos de Thermo Fisher Scientific). Las células se mantuvieron en una incubadora con una atmosfera humidificada con 95% de oxígeno y 5 % de CO₂, a una temperatura autorregulada de 37 °C.

7.4 Visualización de morfología celular

Para evaluar la morfología celular de los macrófagos, se preparó una caja de cultivo de 24 pozos depositando cubreobjetos redondo 12 mm, previamente desinfectados con alcohol al 70% y esterilizados 15 minutos en luz UV, agregamos 1 ml de medio de cultivo estándar (DMEM, 10% suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico). Se cultivaron macrófagos a una concentración celular 10X10⁴ por pozo. Llegado al 80% de confluencia se colocó el estímulo de los medios condicionados de hUBM y hUBM+LL37 por 24 horas, se colocó DMEM como control negativo y lipopolisacáridos (LPS) como control positivo de activación celular. Posteriormente retiramos todo el sobrenadante, los cubre objetos fueron extraídos del fondo de la placa, posteriormente fueron teñidos con Hemocolorante rápido (Hycel, México) siguiendo las indicaciones del fabricante,



posteriormente fueron fijadas en portaobjetos y fijadas con Entellan 1079610500 (Merck, Alemania). Las imágenes fueron obtenidas en microscopio de campo claro en objetivo 10X.

7.5 Determinación de lactato deshidrogenasa

Para determinar la citotoxicidad del hidrogel se agregaron 200 μL de suspensión celular la cual contenía 25×10^4 células por pocillo en una placa de cultivo estéril de 96 pozos. Se incubaron las células durante la noche a 37°C , 5% de CO_2 , 90% de humedad relativa para permitir la adherencia firme. Posteriormente retiramos el medio y se colocó el medio condicionado durante 24 horas. Dado el tiempo indicado, se tomaron 50 μL de sobrenadante y se colocaron en pozo nuevo dentro de la misma placa, utilizamos el kit comercial CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Estados Unidos), añadimos 50 μL de mix de tinción (sustrato, cofactor, sal) al nuevo pozo e incubamos 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se agregaron 10 μL de la solución de paro (HCL 1N) y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se leyeron en el lector de placas a 490 nm con sustracción de 630 nm.

7.6 Evaluación de actividad metabólica

Para evaluar la actividad metabólica del hidrogel sobre los macrófagos añadimos 200 μL de suspensión celular la cual contenía 15×10^4 células por pocillo en una placa de cultivo estéril de 96. Las células se incubaron durante la noche a una temperatura de 37°C , 5% de CO_2 y 90% de humedad relativa, para permitir la adherencia firme. Después de la adherencia, se retiró todo el sobrenadante y se colocó el medio condicionado, esto se realizó por tres tiempos 24, 48 y 72 horas. Utilizamos el kit comercial Cell Proliferation Kit I (Sigma Aldrich, Estados Unidos). Dado el tiempo indicado de interacción con el estímulo, se retiraron 100 μL de sobrenadante y se añadieron 15 μL de la solución de tinción (sustrato, cofactor, sal) y se llevó a incubación durante 2 horas a 37°C . Se agregaron 100 μL solución de paro y se incubó durante 1 hora a 4°C . Finalmente fueron leídas en el lector de placas a 570 nm con sustracción de 630 nm.



7.7 Ensayo de muerte y viabilidad celular

Con la finalidad de evaluar la capacidad de supervivencia de las células al estar en contacto con el HG se preparó una caja de cultivo de 24 pozos depositando cubreobjetos redondos 12 mm, previamente desinfectados con alcohol al 70 % y esterilizados 15 minutos en luz UV, y agregando 1 ml de medio de cultivo estándar (DMEM, 10% suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico). Se cultivaron macrófagos a una concentración celular 10×10^4 por pocillo en cajas de 24 pozos. Llegado al 80% de confluencia se colocó el estímulo por 24 horas con los medios condicionados de los siguientes grupos HUBM, HUBM + LL37, DMEM y como control de muerte se utilizó H_2O_2 a una concentración de $50 \mu\text{g}/\text{mL}$. Se utilizaron dos colorantes, ioduro de propidio y naranja de tiazol y fueron leídos a una longitud de onda de 488 nm en el microscopio confocal de la marca Leica Biosystem.

7.8 Expresión de interleucinas por matrices de perlas citométricas (CBAs)

Para evaluar la expresión de citocinas mediante el ensayo de CBAs colocamos 50×10^4 células por pocillo en cajas de cultivo de 6 pozos, tras 24 horas de la colocación del estímulo se recuperaron los sobrenadantes del cultivo y se procedió al procesamiento de la muestra utilizando el Kit Cytometric Bead Array CBA Mouse Inflammation (BD, Estados Unidos). Los sobrenadantes de los cultivos fueron leídos en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosystem, Estados Unidos) y se realizó el análisis. Se Adquirió la muestra en el citómetro de flujo. Para ficoeritrina (PE) se empleó una longitud de onda de excitación de 488 nm y se recolecto la emisión a una la longitud de onda de 585 nm. Para la clorofila de peridinina (PerCP) se empleó una longitud de onda de excitación de 600 nm y se recolecto la emisión a una la longitud de onda de 675 nm. Se usaron LPS para tratar las células como control positivo $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Lipopolisacárido de *Salmonella entérica* serotipo *Typhimurium*, Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

7.8.1 Adquisición de las muestras y análisis de CBAs



Seguimos las instrucciones del fabricante. Brevemente describimos el procedimiento: etiquetamos ocho tubos de 1.5 ml y colocados en el siguiente orden: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256. Colocamos 300 μ L de diluyente de ensayo en cada uno de los tubos restantes. Realizamos una dilución en serie: Transferimos 300 μ L del estándar superior al tubo de dilución 1:2 sin agitar, posteriormente realizamos diluciones seriadas 1:2 al tubo 1:4 y así sucesivamente al tubo 1:256, para realizar la curva estándar. Preparamos un tubo de 12 x 75-mm que contenía como diluyente de ensayo como control negativo de 0-pg/ml. Agregamos una alícuota de 10 μ L de cada perla, para cada tubo de ensayo que analizamos, en un solo tubo etiquetado como "mix de captura". El análisis de muestras se realizó utilizando el FCAP Array Software de matriz (BD, Estados Unidos), es decir los datos adquiridos en el citómetro fueron vaciados al programa FCAP Array. Se adquirieron estándares desde el más bajo (0 pg/ml) hasta el más alto (Estándar superior), seguida de la prueba de muestras, comenzando con la muestra más concentrada.

7.9 Formulación de Geles Biofuncionalizados

Los pregeles fueron biofuncionalizados agregando péptido LL37 (10 mg/ml). Posteriormente, se ajustó el pH a 7.2 y se incubaron a 37°C por 60 minutos para su gelificación (131).

7.10 Mimetismo vasculogénico *in vitro*

Los experimentos se realizaron con cultivos celulares confluentes al 70-80%. Los cultivos 2D se realizaron de la siguiente manera: se colocó a una concentración celular de 20×10^3 en placas de cultivo de 24 pocillos (Termo Scientific, Estados Unidos). Los cultivos celulares se despegaron con tripsina-EDTA, se contaron y fueron resuspendidos en 500 μ L de medio de cultivo. Las células se incubaron a 37 ° C durante 24 horas para permitir su adhesión y luego se retiró el medio consumido y se colocó 1 ml de medio de cultivo, el cual contiene factores de crecimiento e inductores vasculogénicos. Se añadió medio



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



fresco cada 2 días. A continuación, se muestra una tabla de los inductores de vasculogénesis con las dosis utilizadas para dichos ensayos (Tabla 1).



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



Tabla 1. Inductores vasculogénicos.

| Condiciones del medio de cultivo |
|---------------------------------------|
| DMEM F-12 |
| DMEMF12+VEGF 50 ng/mL |
| DMEM F-12+CoCL ₂ 100 mM/mL |
| DMEM F-12+CoCL ₂ -VEGF |



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



7.11 Grupos de estudio

Se determinaron los siguientes grupos de experimentación para los ensayos de vasculogénesis, utilizaremos para los estudios *in vitro* el hidrogel biofuncionalizado anteriormente mencionado, para los ensayos *in vivo* utilizaremos angioreactores previamente cargados del mismo hidrogel.



Tabla 2. Grupos de estudio para evaluación de la vasculogenesis.

| <i>In vitro</i> | <i>In vivo</i> |
|----------------------------------------|--------------------------------|
| hUBM-Ad-MSCs-LL37 (grupo experimental) | hUBM+LL37 (grupo experimental) |
| hUBM-Ad-MSCs-VEGF (control positivo) | hUBM+VEGF (control positivo) |
| hUBM-Ad-MSCs (control negativo) | hUBM (control negativo) |



7.12 Evaluación de la vasculogénesis *in vitro* usando hUBM-Ad-MSCs-LL37

Para la evaluación de la vasculogénesis *in vitro* utilizamos HG biofuncionalizados colocados en una caja de 24 pozos, los cuales fueron evaluados a 7, 14, 21 y 28 días después del estímulo, cada grupo fue evaluado por triplicado para su validación, los HG fueron extraídos con sacabocado de 5 mm para ser procesadas por histología e inmunofluorescencia, para determinar la formación temprana de vasos sanguíneos.

7.13 Determinación de la biocompatibilidad *in vivo*

Se utilizaron 3 ratas Wistar adultas, hembras de tres meses, con un peso promedio de 300 g. Se distribuyeron en 3 grupos, para un total de 2 biomodelos por grupo como indica la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999.

7.13.1 Protocolo de sedación del modelo animal

La sedación de los especímenes se realizó con una mezcla de barbitúricos infiltrados vía intramuscular en el glúteo izquierdo de cada animal, infiltrando 1 μ L de cóctel sedante en las siguientes proporciones 70% de ketamina (Anesket® Pisa® México), 15% de Xilacina (Procin® Pisa® México), 15% de agua inyectable como vehículo (Pisa®) por mg de peso.

7.13.2 Protocolo de Infiltrado de biomateriales

Se realizó sedación previamente descrita, seguida de tricotomía y desinfección con solución de Isodine® y etanol al 70% en la región dorsal. El dorso se dividió en cuatro cuadrantes a través de la línea media corporal, dos superiores y dos inferiores en el orden de lado izquierdo y derecho para ambas secciones. Posteriormente con una jeringa de tuberculina (Tuberculin Syringe 1M1 BD™ Estados Unidos) fueron infiltrados de manera subdérmica 100 μ l de cada material para su evaluación 48 horas después de su inoculación. En el cuadrante A (superior izquierdo) se infiltraron 100 μ l de hUBM, en el cuadrante B (superior derecho) se infiltraron 100 μ l de hUBM+LL37, en el cuadrante



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



C se infiltraron 100 ml de Cloroformo (sigma-aldrich® Estados Unidos) como control positivo de inflamación y en el cuadrante D como control negativo se infiltraron 100 ml de agua inyectable (Pisa® México).

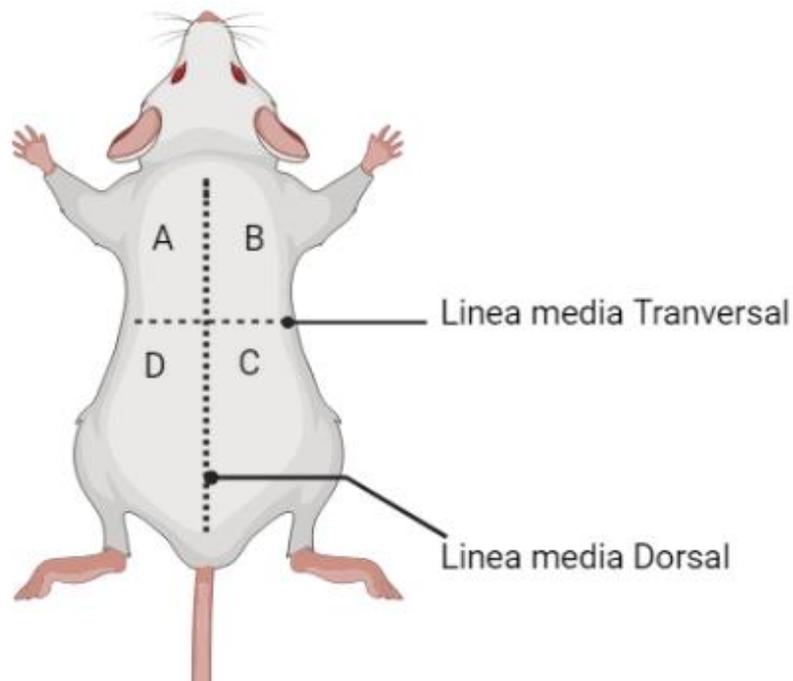


Figura 4. Esquema de infiltrado de Biomateriales. Se realizo una división de el dorso de biomodelos divididos por las líneas imaginarias media transversal y dorsal para la infiltración de los materiales a evaluar.



7.14 Eutanasia animal y obtención de la biopsia

Posterior a las 48 horas de experimentación, se realizó el sacrificio de los animales a través de una estación de Analgesia/Eutanasia V100 (RWD Life Science® Estados Unidos) utilizando Cloroformo como vehículo, introduciendo a los especímenes durante 5 minutos o hasta que el animal presente ausencia del latido cardiaco. Luego se realizó una incisión de toda la zona de infiltración de los biomateriales con mango de bisturí #3 y hoja #15 hasta llegar al tejido subcutáneo sujeta por medio de pinzas romas. Fueron obtenidas biopsias de 2 cm de diámetro en la circunferencia total del área de inoculación, para ser colocados en paraformaldehído al 4% para su posterior evaluación histológica.

7.15 Análisis histológico de la biocompatibilidad *in vivo*

Se determinaron la deformación o degradación del tejido y vasos sanguíneos, así como los tipos celulares en cada grupo. Para determinar si el material era biocompatible o no, se evaluó la respuesta inflamatoria por medio del recuento de células en términos de porcentaje: ninguna (0 %), baja (< 30 %), moderada (30-50 %) y alta (> 50 %).

7.16 Angioreactores

En dispositivo de látex natural de 1mm de diámetro, cada angioreactor recibió dos cortes transversales paralelos de 1 mm de espesor. Fueron Desinfectados sumergiéndolos 5 minutos con etanol al 70%, luego, los fragmentos se enjuagaron con PBS 1X, posteriormente se realizó la esterilización física en autoclave (Bioclave GNATUS 12 Lt. Inox) realizando 3 ciclos de 135°C. Finalmente, se cargaron 50µL de los diferentes hidrogeles por angioreactor, se llevaron a incubación durante 30 minutos a 37°C para inducir la hidrogelificación.



7.17 Evaluación de la vasculogénesis *in vivo* usando HUBM+LL37

Los angioreactores de los diferentes grupos se implantaron bilateralmente en el espacio subcutáneo del dorso de ratas de la cepa Wistar de entre 5 a 7 semanas de edad, con un rango de peso de 250-300 g. Se aplicó un coctel sedante por vía intraperitoneal (Ketamina 75%, Xilacina 5% y 15% de Agua inyectable como vehículo). Después de 1 y 4 semanas, se sacrificaron con la cámara de gases, los implantes se retiraron del dorso y fueron procesados para histología. Se usarán un total de 15 ratas, 3 ratas para cada grupo.

7.18 Determinación histológica

Los hidrogeles obtenidos tanto de los ensayos *in vitro* e *in vivo* fueron colocados en moldes metálicos y sumergidos en PolyFreeze (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para ser congelados con nitrógeno líquido, posteriormente se realizaron cortes de 7 μ M de diámetro en criostato (CM1520 Leica Biosystems, Alemania para ser llevadas a cubreobjetos cargados con Poly-L-lisina.

Realizamos la tinción de hematoxilina y eosina (HyE) siguiendo las instrucciones del fabricante, para examinar las estructuras formadas en el caso de los ensayos *in vitro* y estructuras regeneradas en el caso de los estudios *in vivo*.

7.19 Cuantificación de lúmenes

Para cuantificar los vasos sanguíneos, se analizaron tres secciones por corte del angioreactor que fueron teñidas con HyE. Las imágenes microscópicas fueron tomadas en un aumento de 20X en tres áreas aleatorias por sección. Los lúmenes revestidos fueron contados como lúmenes vasculares totales. Para determinar la densidad de los microvasos (número medio de capilares por milímetro cuadrado), el número de estructuras con lúmenes rodeados por células murales se contaron manualmente en el programa Image J (NIH, Estados Unidos). Los vasos revestidos (*in vivo*) que contengan



glóbulos rojos dentro del lumen fueron considerados lúmenes perfundidos, mientras que los lúmenes sin glóbulos rojos se consideraron lúmenes no perfundidos.

7.20 Análisis estadístico

Realizamos pruebas de comparación múltiple entre los grupos utilizando ANOVA de 2 vías. Los resultados se evaluaron con el software GraphPad Prism V8 (GraphPad Software, Estados Unidos), los valores se tomarán como significativos cuando exista una $p < 0.05$.

7.21 Lugar de realización

Laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa.

7.22 Cuidado y manejo de los animales

El manejo cotidiano y durante los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud-2014 y a las normas de salud NOM-062-ZOO-1999, en un bioterio con condiciones de temperatura de 21°C y ventilación adecuada, alimentadas con dieta normal estéril (LabDiet 5012, USA) y agua *ad libitum* con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, también fueron sexados y agrupados de acuerdo a las condiciones y necesidades que se requerían.

Además, la limpieza de las jaulas se realizó de manera periódica y los desechos, el manejo de cadáveres y residuos patológicos se desecharon apegándonos a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 para los Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos.



8 Resultados

8.1 El hidrogel obtenido es óptimo para su uso

Se obtuvo un hUBM a partir de la delaminación del urotelio de la vejiga de cerdo, el cual mostró ausencia de células y sus derivados, lo que demuestra que el proceso para descelularización se realizó de manera correcta ya que es un paso primordial para ser utilizado como andamio al ser un material libre de antígenos que reduce el rechazo inmunológico. Esto se verificó realizando cortes histológicos y tinciones de los tejidos antes y después de ser procesados (Figura 5). Por otro lado, la obtención del HG se realizó a partir de 30 minutos, ya que el material mostró una rápida gelificación demostrando gran capacidad de reestructurar las fibras de colágeno, lo cual optimiza la manera de sintetizarlo, además mantiene su estructura para los ensayos necesarios (Figura 6).

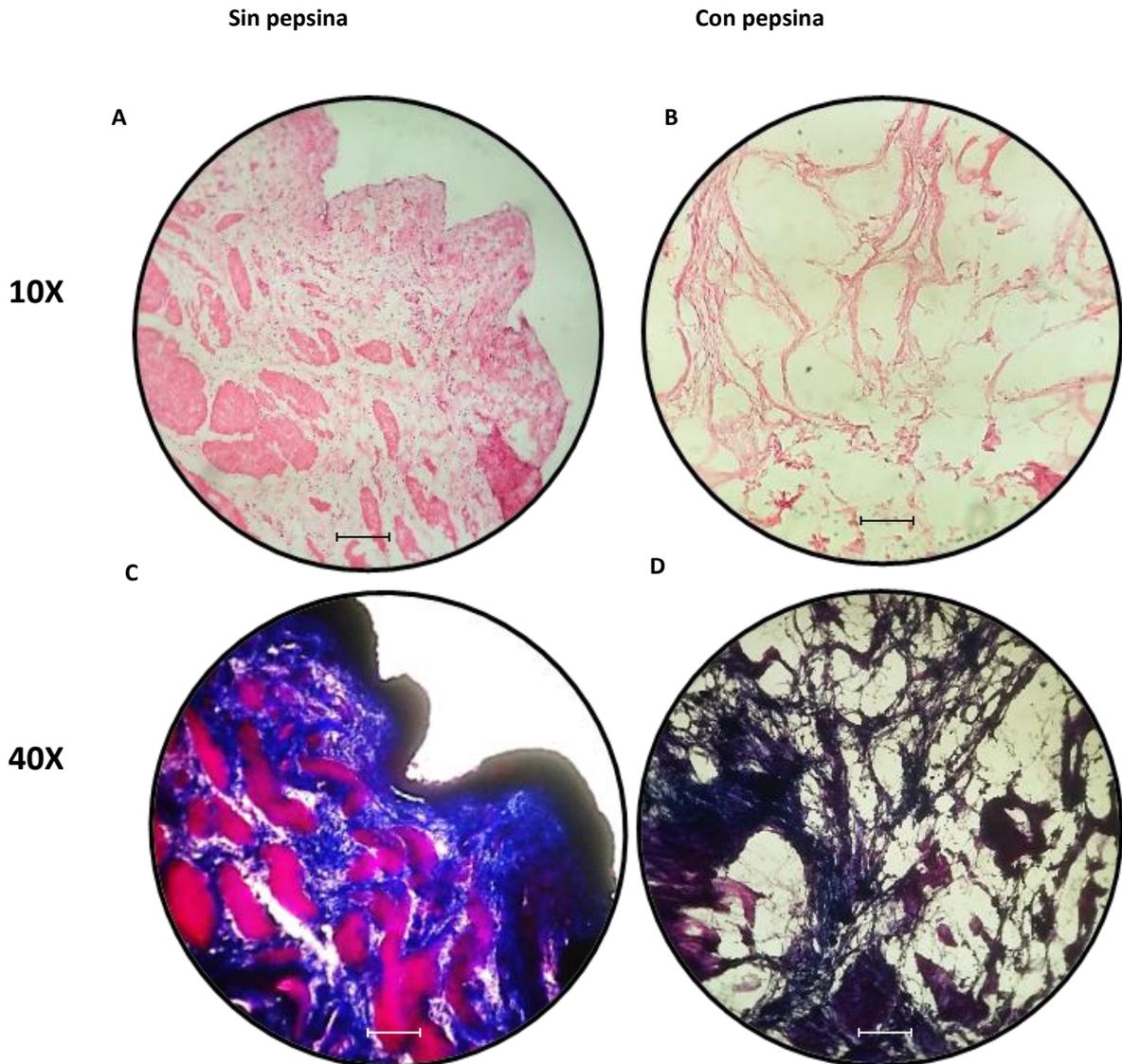
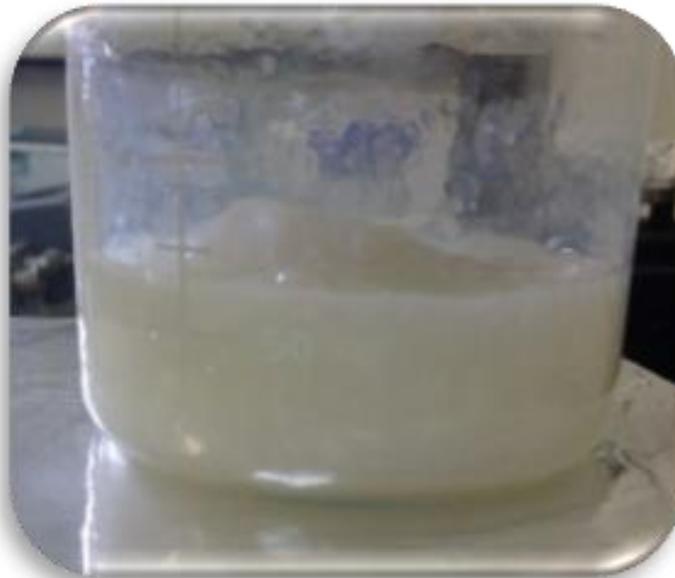


Figura 5. Descelularización. Imágenes de la obtención de matriz de vejiga antes y después del tratamiento enzimático, A y B fueron teñidas con HyE, (A) se observa el contenido celular y los tejidos conservando su estructura original, (B) se observa pérdida de la cohesión y gran cantidad de fibras con ausencia de células y vasos sanguíneos, C y D fueron teñidas con tricrómica de Masson, (C) se observa gran cantidad de colágeno con tejido muscular, (D) se observa la disposición de fibras de colágeno y los grandes espacios celulares. Barra de escala 200 μ m.



A



B



Figura 6. Gelificación. Obtención del pregel de matriz de vejiga de cerdo, se observa la degradación enzimática del material liofilizado después de 48 horas de activación (A), correcta obtención y gelificación de hUBM, después de la incubación a 37°C (B).



8.2 Los andamios de hUBM y hUBM+LL37 son biocompatibles

Al realizar la técnica de hemocolorante rápido para evaluar la morfología celular encontramos confluencia celular y formación de colonias por parte de los macrófagos, se observa que con DMEM existe un mayor agregado celular respecto a hUBM y a hUBM+LL37 (Figura 7). También observamos un cambio de morfología en los macrófagos que fueron contaminados con LPS donde se muestra un núcleo más basófilo y prominente, además se observan un mayor número de prolongaciones citoplasmáticas e internalización de nanopartículas.

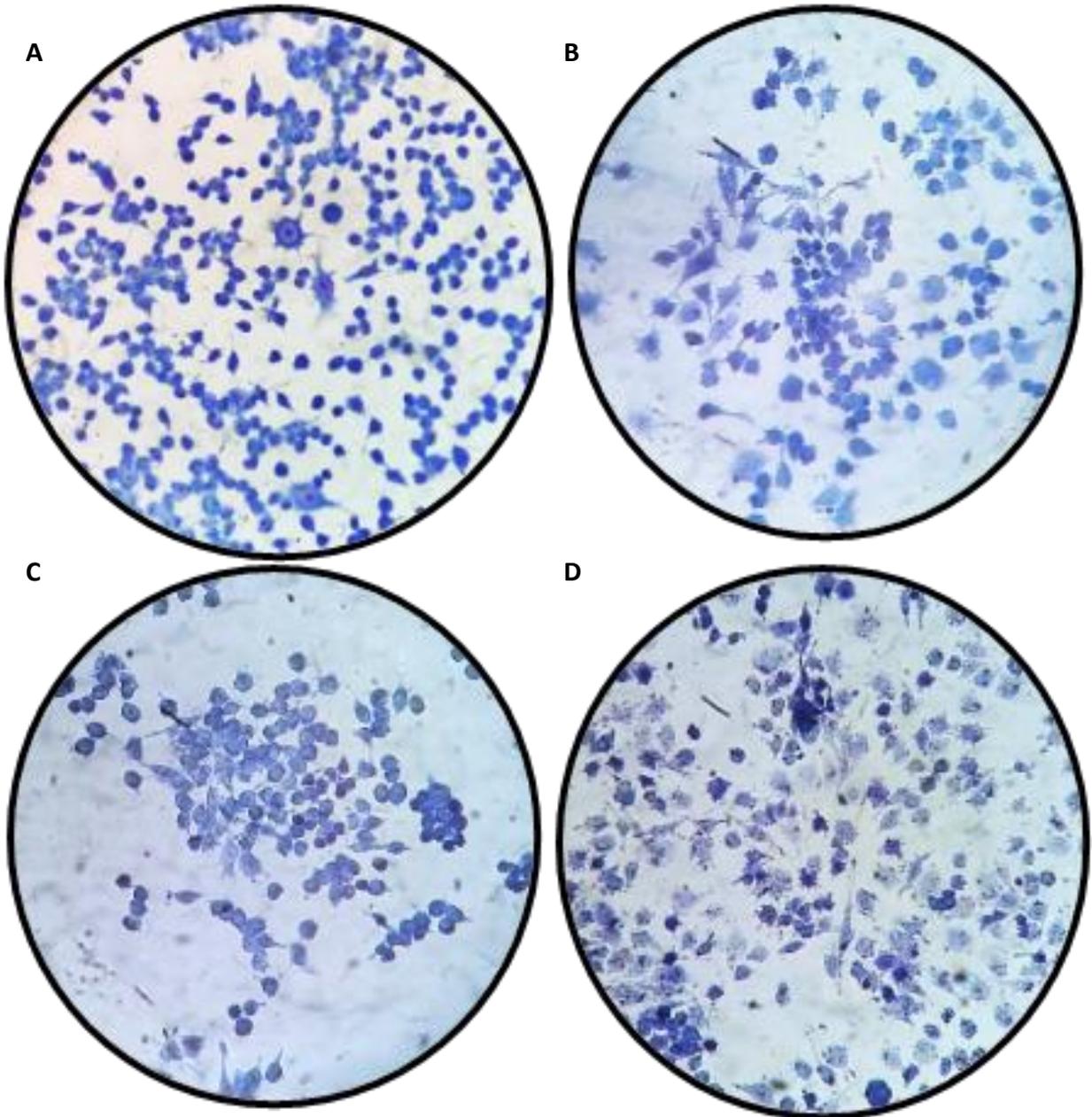


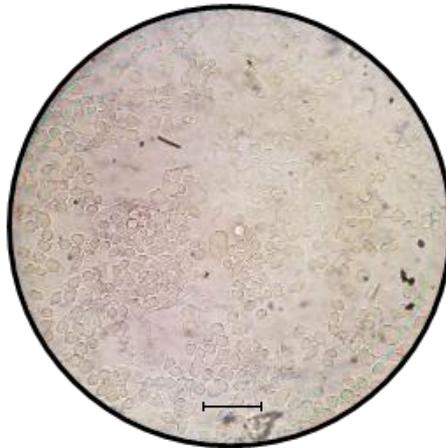
Figura 7. Morfología celular. Imágenes tomadas a 10X en campo claro, se realizó la tinción de Hemocolorante rápido después del estímulo con los medios condicionados, teniendo como control positivo de inflamación a LPS, se observa una buena adherencia en DMEM, hUBM y hUBM-LL37, sin embargo, en el grupo LPS se observa activación y fagocitosis de las partículas extrañas por parte de los macrófagos. Barra de escala 50 μ m.



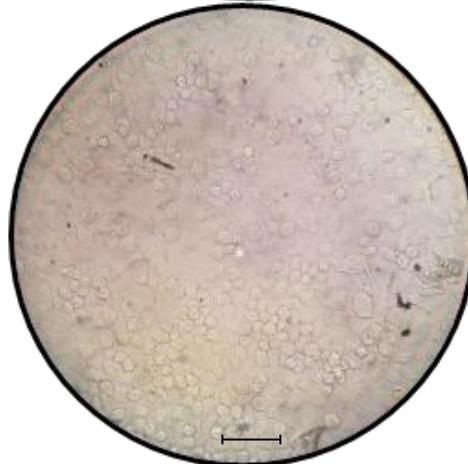
Evaluamos si el medio condicionado de hUBM+LL3 era capaz de producir citotoxicidad a 24 horas mediante el ensayo de LDH o detener la proliferación a 24, 48 y 72 horas mediante el ensayo de MTT. Colocamos en contacto a las células con los medios condicionados durante los tiempos indicados, antes de cada procedimiento observamos el cultivo en el microscopio óptico invertido, utilizando el contraste de fase en un objetivo de 10X. Los macrófagos se encontraban bien adheridos, presentando morfología habitual, indicando que aun en contacto con los medios condicionados estos nos perdían su capacidad de adherencia y proliferación (Figura 8). Posteriormente del ensayo fueron llevadas al espectrofotómetro para ser leídas las absorbancias. El medio condicionado de hUBM-LL37 promueve la proliferación celular ya que se arrojó una lectura similar al del grupo control (Figura 9).



A



B



C

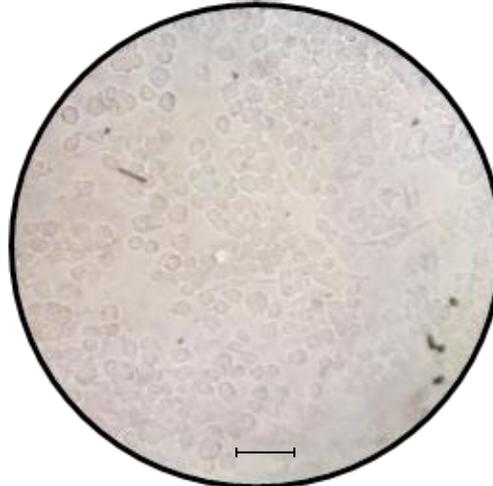


Figura 8. Citotoxicidad. Se tomaron fotografías representativas del triplicado a las 24 horas de estímulo, donde se observa en los grupos experimentales una buena adherencia y morfología celular (A), además las gráficas (B) muestran el resultado del LDH en la lectura a 590 nm no es significativa entre los grupos experimentales ($P > 0.005$), pero si respecto al control de citotoxicidad máxima. Barra de escala 50 μm .

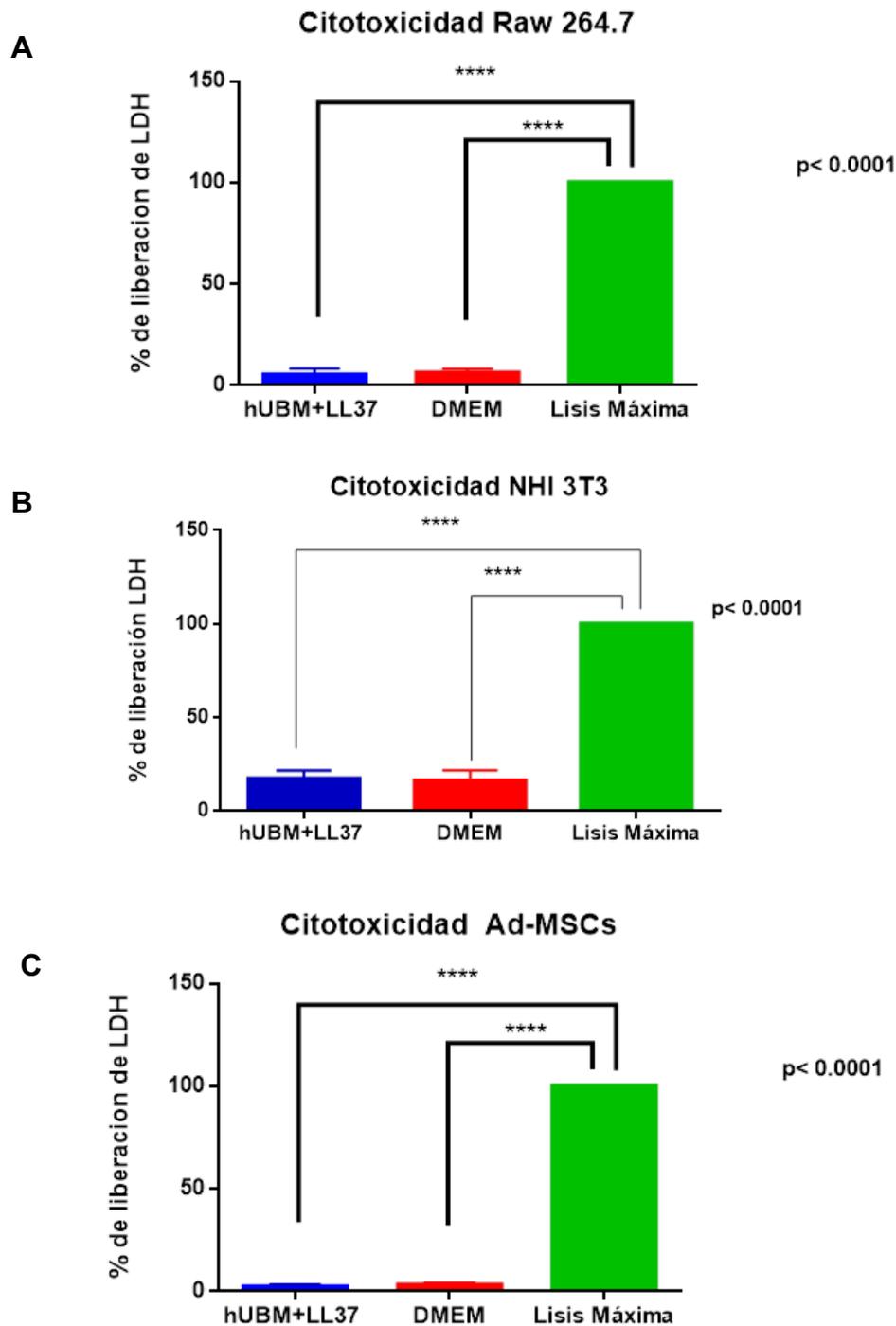


Figura 9. Liberación de lactato deshidrogenasa. Las gráficas muestran el resultado del LDH en la lectura a 590 nm no es significativa entre los grupos experimentales (A) Raw 264.7, (B) NHI 3T3 y (C) Ad-MSCs ($P > 0.005$), pero sí respecto al control de citotoxicidad máxima.



Al realizar el ensayo de MTT se capturaron imágenes en el microscopio, mostrando actividad metabólica y formación de cristales de formazán en el grupo experimental donde se observó claramente que la mayor actividad metabólica se muestra a las 48 horas de estímulo notándose que el pozo estaba completamente lleno de células, mientras que a las 72 se observa una disminución significativa (Figura 10), esto podría deberse a que baja la tasa de crecimiento y proliferación, ya que no existen los nutrientes ni el espacio adecuado para la sobrevivencia de las células, esto se confirmó al momento de la lectura ya que el ensayo a las 72 horas mostró una baja significativa cuando fue comparó a las 24 y 48 horas (Figura 11).

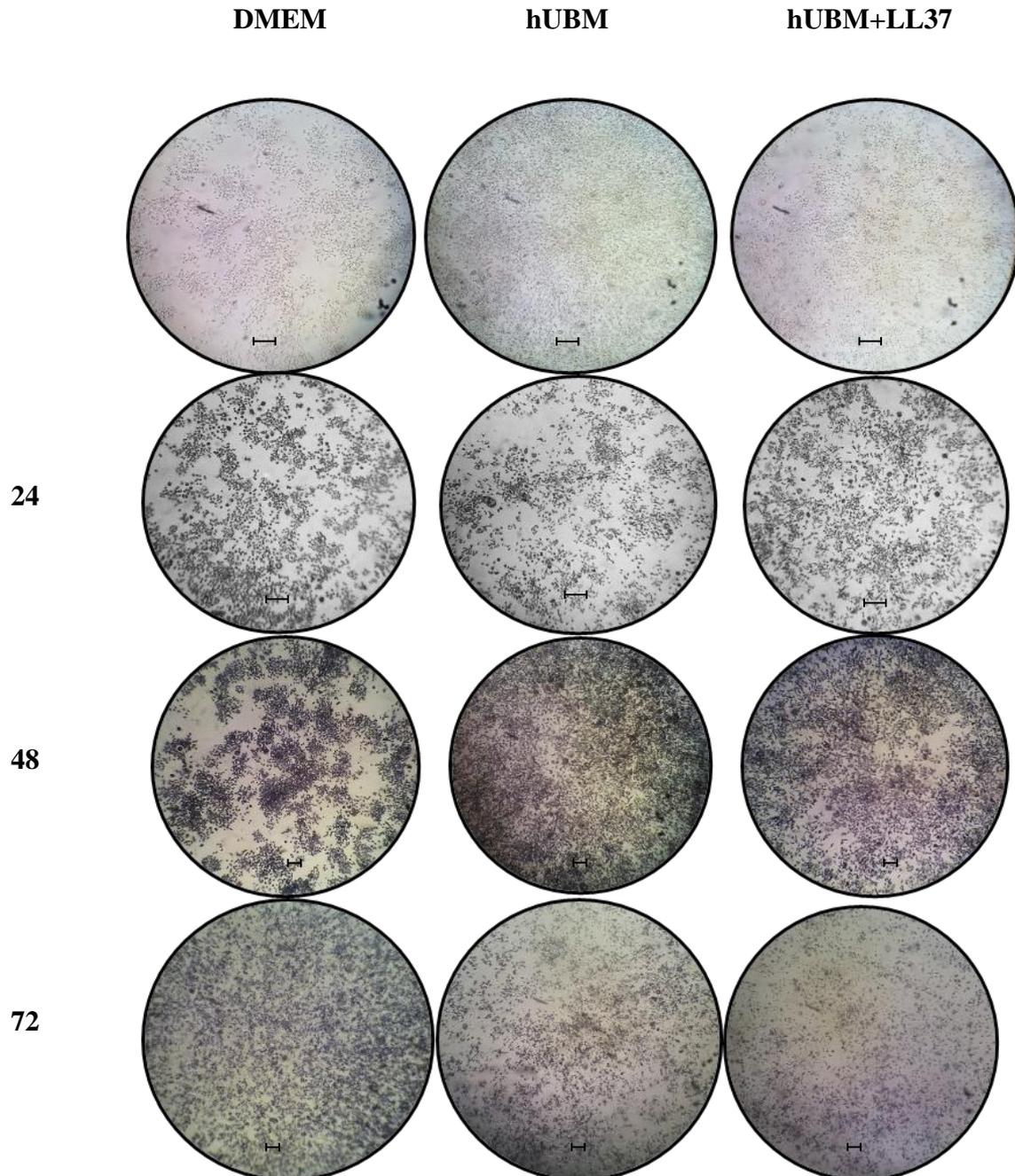


Figura 10. Proliferación celular. Se tomaron fotografías representativas a las 24 horas de cultivo en microscopio óptico de campo claro en un objetivo 10X, los grupos muestran una buena adherencia y formología celular, después de la incubación con MTT se observa formación abundante de cristales de formazán, observándose a las 48 horas de exposición una gran presencia de cristales mientras que se observa una disminución a las 72 horas, siendo el grupo de DMEM quien permitió mayor actividad en los macrófagos. Barra de escala 200 μ m.

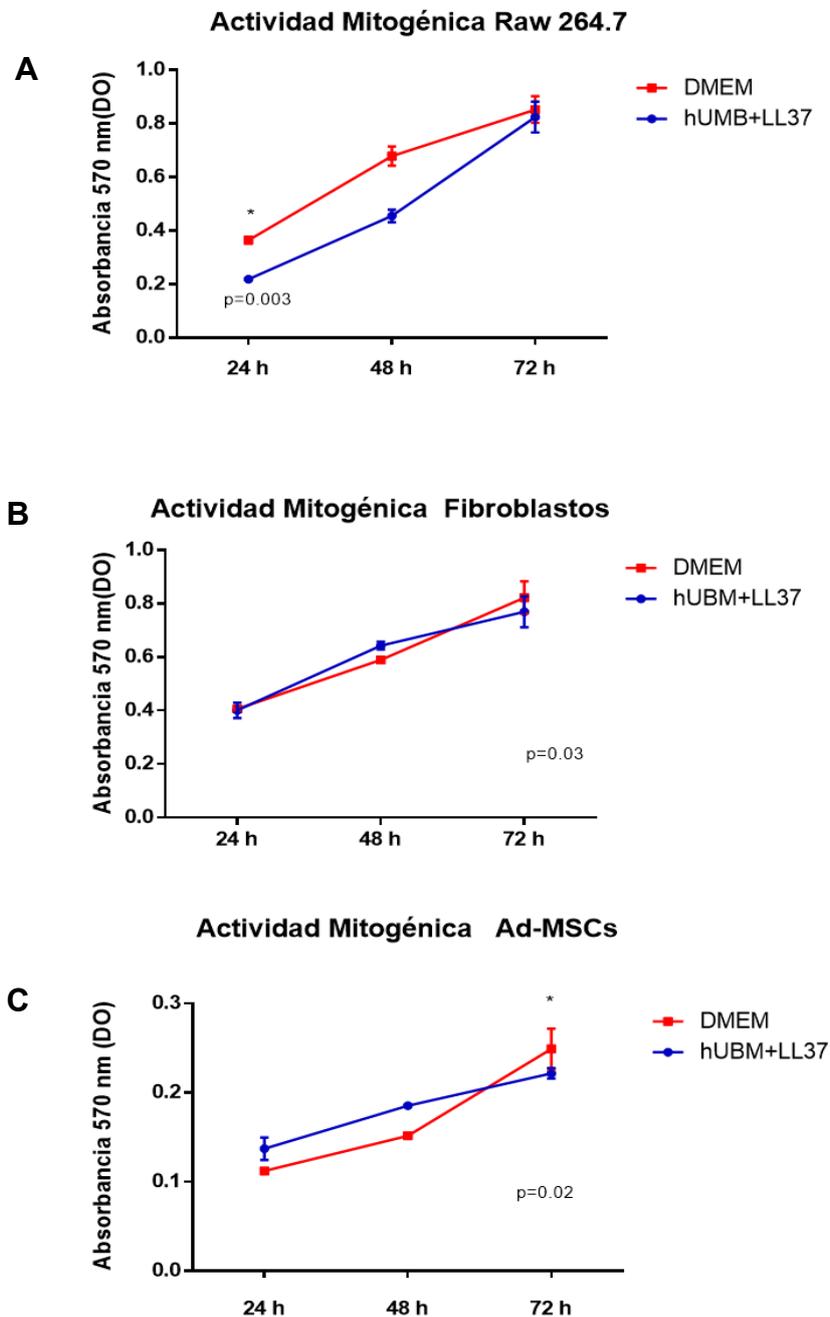


Figura 11. Actividad metabólica. Para analizar la proliferación inducida por el extracto pUBMh/LL37, se realizó el ensayo MTT en macrófagos (A), fibroblastos (B) y Ad-MCS (C). Las tres líneas celulares mostraron una mayor viabilidad celular de 24 a 72 h cuando se estimularon con pUBMh/LL37 y DMEM. Para evaluar la proliferación celular, se incubó un total de 4 mg/ml en contacto con macrófagos (D), fibroblastos (E) y Ad-MCS (F).



El comportamiento celular en términos de viabilidad y muerte de los macrófagos se investigó mediante microscopía de fluorescencia y confocal tras 24 horas de cultivo, basado en la tinción simultánea de células vivas (marcados en verde) y muertas (células marcadas en rojo). Se reveló una alta viabilidad celular. Esta observación fue confirmada por la baja cantidad de células muertas encontradas en el grupo experimental pues se observa poca o nula pérdida de material celular. Sin embargo, la densidad celular en la superficie del grupo hUBM fue visiblemente más alta después de la siembra que la de nuestro grupo experimental pero no del control DMEM, lo que tal vez sugiere una mayor tasa de proliferación (Figura 12). También se observó que la distribución celular no es homogénea entre los grupos de medio condicionado. Lo cual es muy notable en el grupo control ya que la distribución celular en la superficie era homogénea, lo que sugiere que brinda una estructura ordenada que fue capaz de permitir que las células adherirse. Como control positivo de muerte colocamos H_2O_2 el cual mostró el cien por ciento de células muertas.

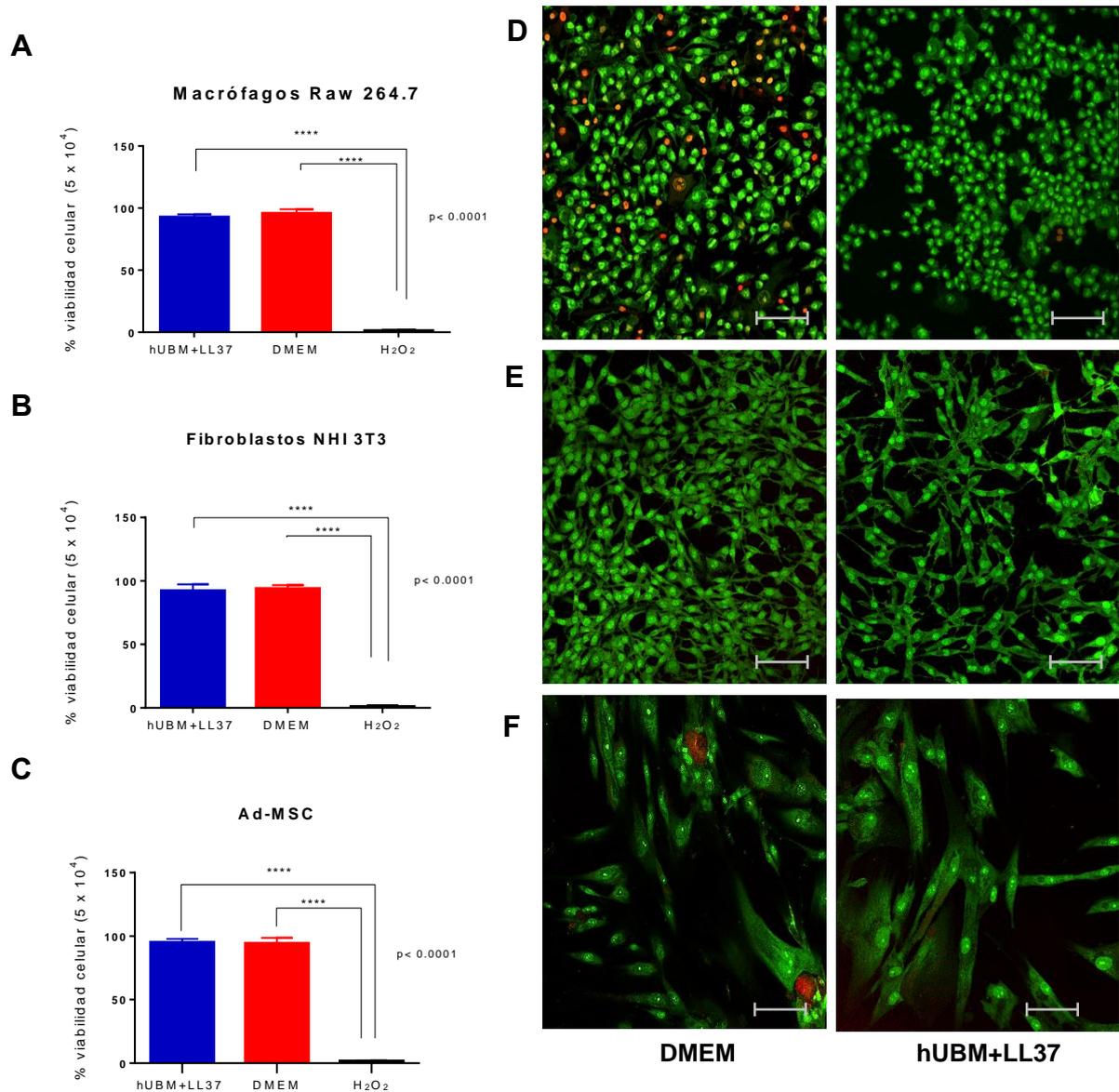


Figura 12. Viabilidad y morfología celular. Macrófagos (A, D), fibroblastos (B, E) y AD-MSC (C, F) expuestos a extractos solubles de pUBMh/LL37 durante 48 horas y evaluados mediante el ensayo Live/Death y microscopía confocal. La viabilidad celular se mantuvo en cada línea celular (A, B y C) ($p > 0,5$), lo que demuestra que hUBM-LL37 es biocompatible. Además, la morfología celular conservó su integridad (D, E y F). En verde: células vivas y en rojo: células muertas/moribundas. Tratamiento H₂O₂ positivo. Barra de escala de 50 μ m.



También analizamos el perfil de expresión de citocinas de los macrófagos al entrar en contacto con extractos solubles de hUBM+LL37 durante 48 horas. Se evaluó el perfil de citocinas proinflamatorias, TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-10, IL-12p70 e IFN- γ . Observamos que la expresión de algunas citocinas aumentó significativamente en el grupo expuesto respecto al control (DMEM), para TNF- α ($1283,22 \pm 96,35$ vs $247,37 \pm 18,91$ pg/ml, $p = 0,0001$) y MCP-1 ($493,96 \pm 49,25$ vs $51,67 \pm 24,21$ pg/ml, $p = 0,01$). No se observaron cambios de consideración para IL-6 ($84,85 \pm 25,97$ vs $106,10 \pm 6,45$), IL-10 ($43,22 \pm 2,76$ vs $40,39 \pm 4,55$), IL-12p70 ($7,74 \pm 1,35$ frente a $16,74 \pm 2,57$) e IFN- γ ($0,00 \pm 0,00$ frente a $1,51 \pm 0,31$) entre los grupos (Figura 13). La expresión de TNF- α en hUBM indica una modulación autócrina de citocinas reguladoras, por otro lado, la expresión de MCP-1 en el grupo de DMEM indica la activación quimioatrayente de monocitos.

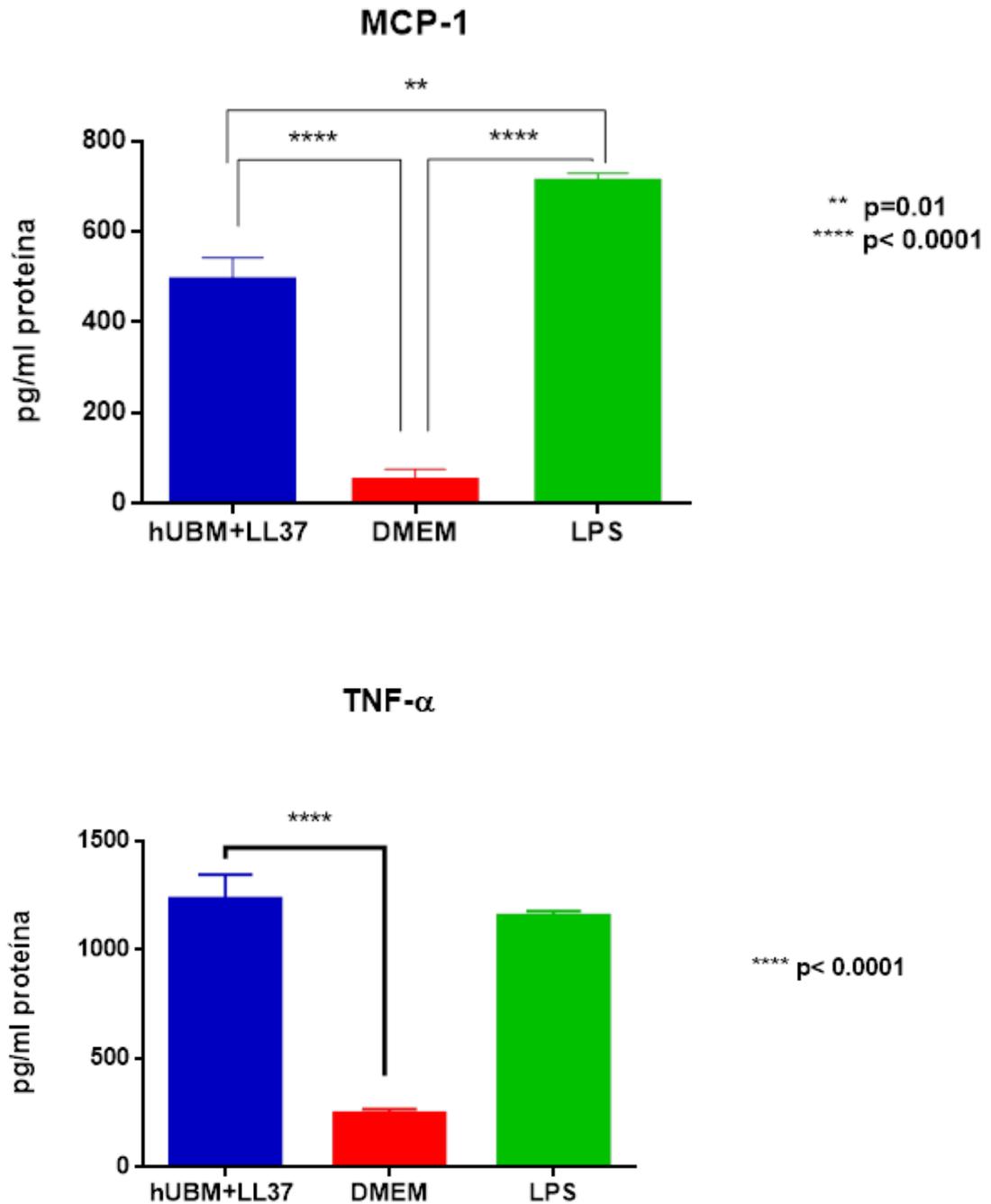


Figura 13. Ensayo de matrices citométricas. Utilizando el ensayo de matriz de cuentas citométricas, encontramos un aumento en las citocinas proinflamatorias TNF- α (A) y la citocina quimiotáctica MCP-1 (B) en macrófagos expuestos a extractos solubles de hUBM/LL37 durante 48 horas.



8.3 Mimetismo vasculogénico

Para la estandarización del mimetismo vasculogénico se utilizaron células MDA-MB-231 (ATCC HTB26) pase 3, se ha demostrado que estas células aisladas de derrame pleural, son capaces de proliferar en condiciones de crecimiento basal y libres de medios enriquecidos, además son una de las mejores opciones para realizar mimetismo vasculogénico puesto que se autorregulan a partir de diversos factores y moléculas que secretan al medio para su mantenimiento. Estas células fueron expandidas hasta alcanzar una concentración celular del 90 %, mostrando un 99% de viabilidad celular con la técnica del hemocitómetro y azul de tripano como detector de muerte celular, además se monitoreó el crecimiento celular desde el tiempo cero y posteriormente a las 6, 18 y 24 h (figura 14), a partir de ahí se observó el crecimiento celular cada 24 horas.

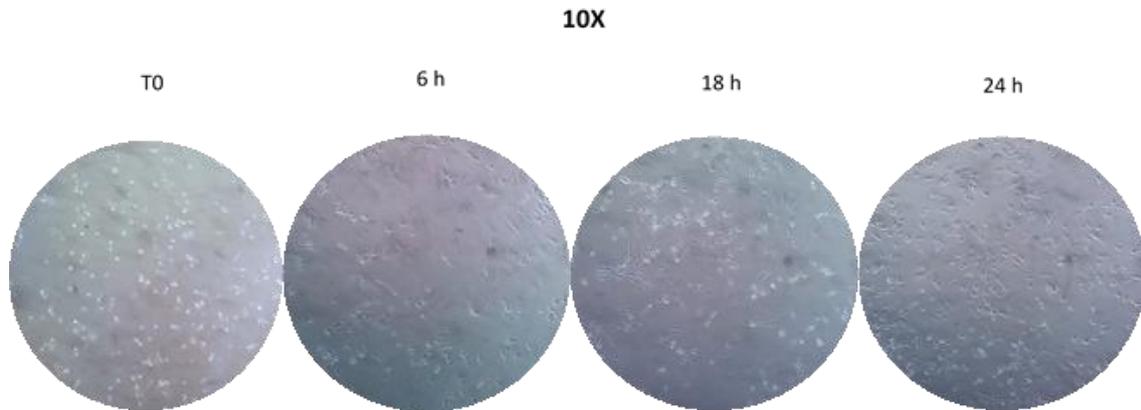


Figura 14. Monitoreo celular en MDA-MB-231. El crecimiento celular se monitoreó inicialmente en tiempos tempranos del cultivo en microscopio óptico de campo claro a 10X, para confirmar la adherencia y expansión celular a partir del criovial madre, mostrando la adherencia celular a partir de las 6 horas.



Partimos de una concentración celular de 40×10^3 para su expansión, colocamos dos cajas de 75 cm² para la realización de los ensayos, una caja para células en normoxia en condiciones de incubación a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y otra para hipoxia en condiciones de incubación a 37°C en una atmósfera libre de humedad y oxígeno. En condiciones de hipoxia relacionados con el comportamiento de las células MDA-MB-231, se observaron cambios significativos en la proliferación celular con una confluencia del 80 % sobre la placa (figura 15B), mostrando la inducción de una mayor tasa de división que las células que fueron colocadas en normoxia (figura 15A).

Los ensayos de mimetismo vasculogénico fueron realizados en cultivos 2D, inicialmente colocamos 20×10^3 de concentración celular y permitimos la adherencia durante 24 horas, nutriendo a las células con DMEM F-12 adicionado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico y antimicótico. Proseguimos retirando todo el medio e inmediatamente colocamos los medios con los inductores, los cuales se muestran a continuación.

Se utilizó DMEM F-12 como medio basal para mantenimiento y crecimiento celular, DMEM- VEGF como control positivo de vasculogénesis, DMEM F12-CoCL₂ como inductor de vasculogénesis *in vitro* ya que activa genes específicos en estas células, mostrando mimetismo vasculogénico a partir del día 3 y por último la conjugación de todos los componentes para evaluar cuál de estos medios es la mejor opción para realizar el ensayo.

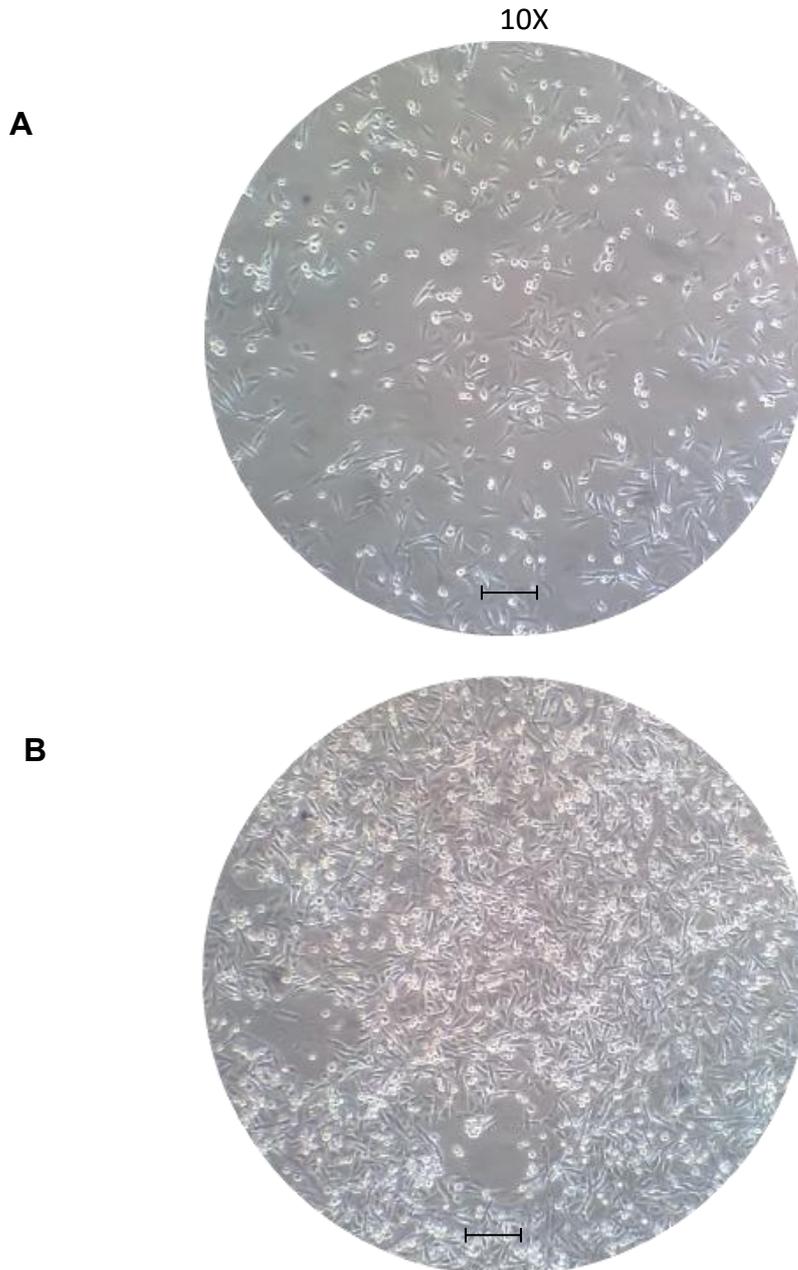


Figura 15. Normoxia e hipoxia en MDA-MB-231. Imágenes de microscopio de campo claro a 10X del ensayo de hipoxia donde se observa que después de 48 horas las células están en un 80% de confluencia celular (B) y unidades formadoras de colonias de mayor tamaño respecto a la caja colocada en condiciones de normoxia (A) ya que muestran 35% de confluencia celular. Barra de escala 50 µm.



Realizamos capturas aleatorias de imágenes de los cultivos en microscopio óptico de campo claro con objetivos de 10 x, los días 1 y 10 (figura 16) donde se observa que al día 1, las células se encuentran esféricas pero adheridas a la superficie del hUBM. Mientras que al día 10 se observa una morfología de tipo fibroblastoide alargada con un arreglo no particular de células MDA-MB 231 en los grupos DMEM F12 y DMEM F12-VEGF. Mientras que en los grupos que contenían DMEM F12-VEGF-CoCL₂ y DMEM F12-CoCL₂ se observó que las células fueron capaces de adherirse, sin embargo, no existió crecimiento ni desarrollo de colonias como se observó en los dos grupos anteriores.

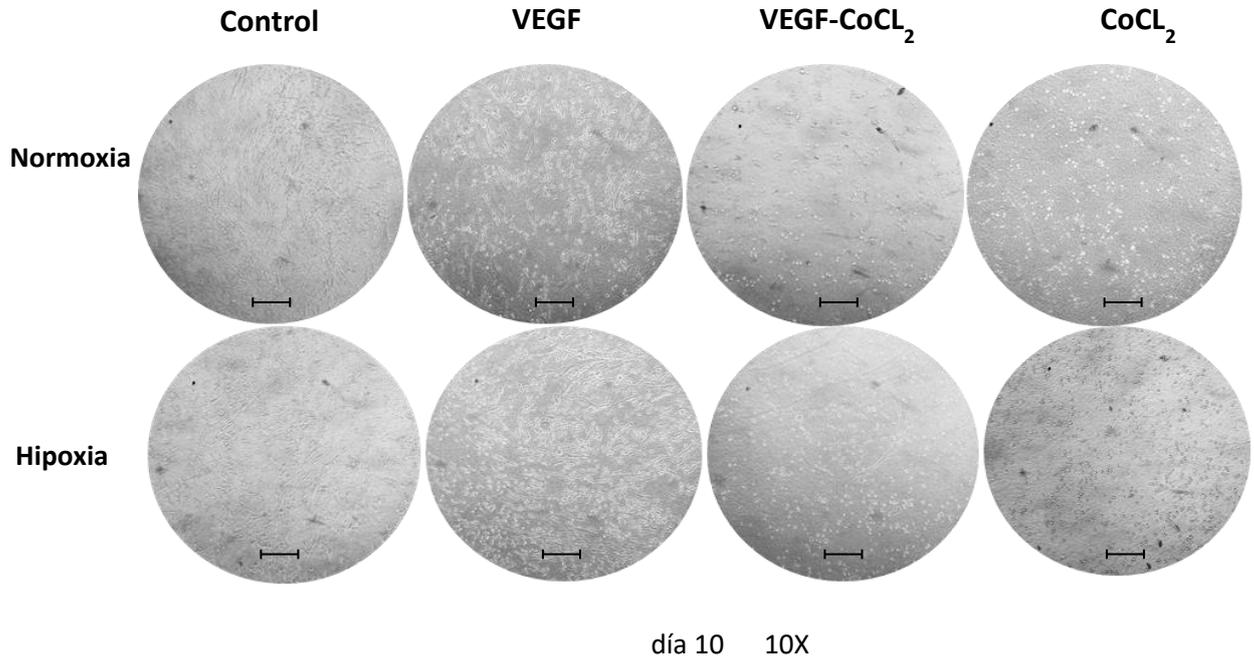


Figura 16. Mimetismo vasculogénico en MDA-MB-231 *in vitro*. El comportamiento celular en cultivo 2D utilizando los inductores de vasculogénesis, no demostró la formación de un mimetismo vascular en ninguno de los grupos en condiciones de normoxia e hipoxia, se muestra crecimiento celular en los controles que fueron nutridos solo con DMEM, mientras que las células que fueron nutridas con DMEM-VEGF se observa un comportamiento similar, donde en condiciones de hipoxia este grupo mostró un ordenamiento celular y una confluencia mayor respecto al resto de los grupos. En los grupos DMEM-VEGF-CoCl₂ y DMEM-CoCl₂, las células no fueron capaces de adherirse ya que al día 10 de exposición se observaron flotando sobre la superficie. Barra de escala 50 μ m.



8.4 Los Hidrogeles son biocompatibles *in vivo*

Realizamos la evaluación experimental en una población de 3 ratas Wistar, divididas en 2 grupos de investigación con sus respectivos controles.

8.4.1 Descripción macroscópica

Macroscópicamente se observó una cicatrización óptima y completa. Es decir, en todos los grupos se observó una cicatrización bien definida. Durante la descripción macroscópica del tejido epitelial, se observó nula inflamación, ausencia de edemas y hematomas, alrededor de los sitios de injerto y control sin signos de exudado inflamatorio ni purulento (Figura 17). La zona interna de la biopsia se observa en hUBM y hUBM/LL37 el biomaterial fácilmente identificable de superficie irregular lo cual es evidencia de biointegración, sin embargo, falta de absorción del mismo. En el caso de la zona del infiltrado de agua inyectable hay ausencia de inflamación o edema. Por otro lado, en la zona de infiltración de cloroformo se observa un ligero cambio de coloración es decir hematoma dentro de tejido conectivo (Figura 17C).

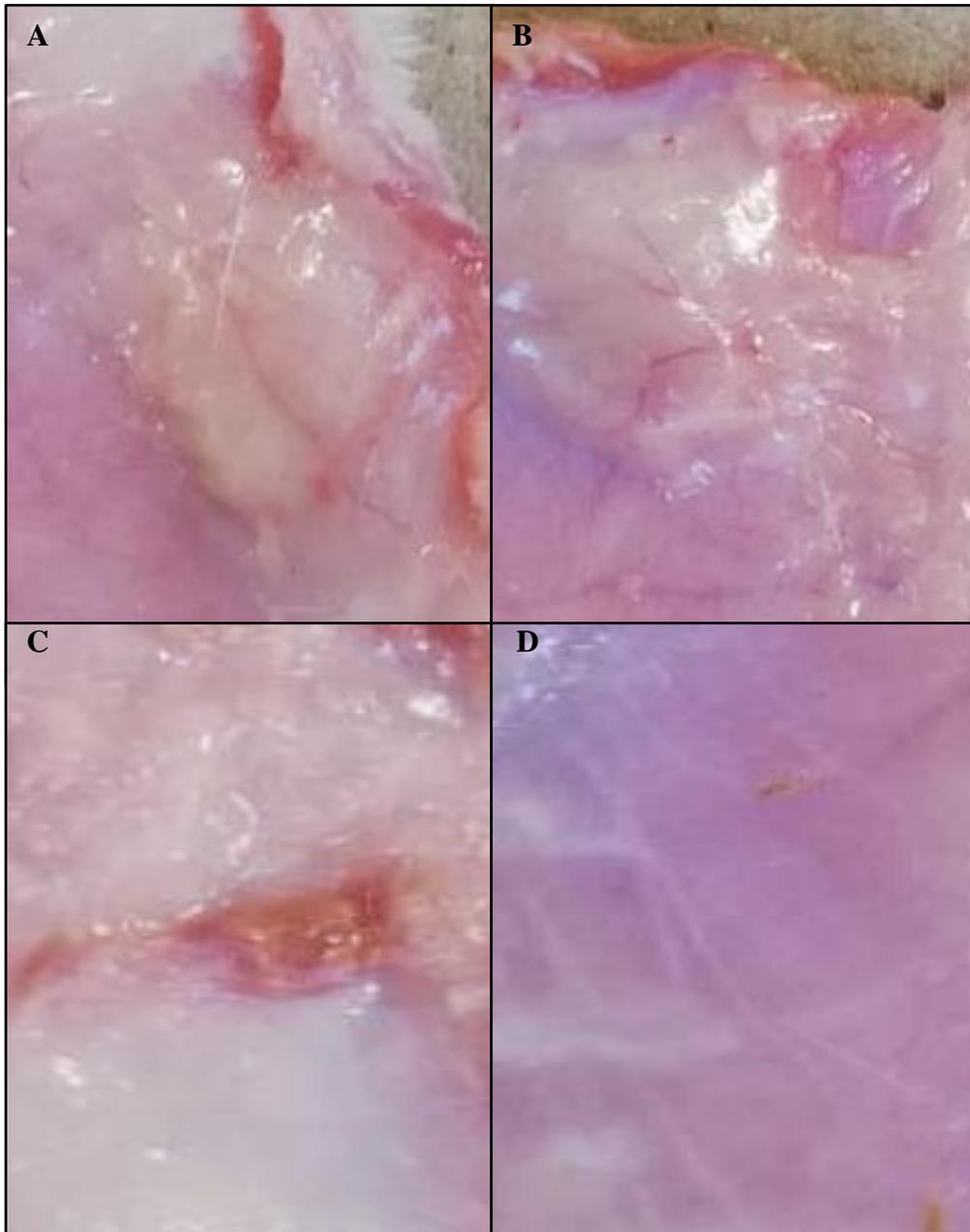


Figura 17. Recuperación de los injertos de biomateriales. En los grupos experimentales de hUBM (A) y hUBM+LL37 (B) se recuperaron cada uno de los implantes de manera exitosa en todos los especímenes; la arquitectura se conservó sin aparente absorción clínica, además se mantuvo el color inicial del material, así como del tejido del hospedero. En el grupo control negativo de infiltrado con agua inyectable se evidenció un tejido de apariencia nativa, libre de edema y abultamientos (D), mientras que el grupo control positivo (C) se evidenció una superficie irregular de coloración amarillenta y manchas marrones fácilmente visibles dentro del tejido conectivo circundante. Vista macroscópica.



8.4.2 Descripción histológica

La descripción histológica en el grupo hUBM mostró dermis e hipodermis de aspecto normal con presencia de un cuerpo extraño amorfo. Este se hallaba en estado de disolución con infiltrado inflamatorio mixto granular de tejido tipo conectivo denso constituido por células mononucleadas principalmente por linfocitos, macrófagos y granulocitos (Figura 18). Los sitios que recibieron el infiltrado con hUBM+LL37 se observaba una cantidad abundante (> 50 %) de linfocitos y de macrófagos, neutrófilos, granulocitos y fibroblastos, lo que representa una respuesta inflamatoria alta. Es decir; las imágenes histológicas en tejido epitelial, después de sacrificar los especímenes, revelaron una cantidad moderada (50 %) de linfocitos y macrófagos (Figura 19). También se observó una cantidad moderada de vasos sanguíneos, lo cual indica funciones fisiológicas de angiogénesis. A su vez, el material del control positivo infiltrados con cloroformo mostraba invasión por células gigantes multinucleadas. De hecho, ambos tejidos, tanto piel como músculo, presentaban pérdida de la cohesión tisular y abundante cantidad de macrófagos (> 50 %) lo que indica etapas primarias de necrosis (Figura 20). Se evaluó la respuesta inflamatoria a través del número de células encontradas, se visualizó presencia mayor de células mononucleares respecto a las multinucleares en los biomateriales estudiados representando una diferencia significativa de $p < 0,0001$ (Figura 21-A). Posteriormente se evaluó la activación celular por parte de células mononucleares, encontrándose presencia mayor de linfocitos respecto a macrófagos, la dispersión de datos mostró un valor de $P < 0,0001$ (Figura 21-B).

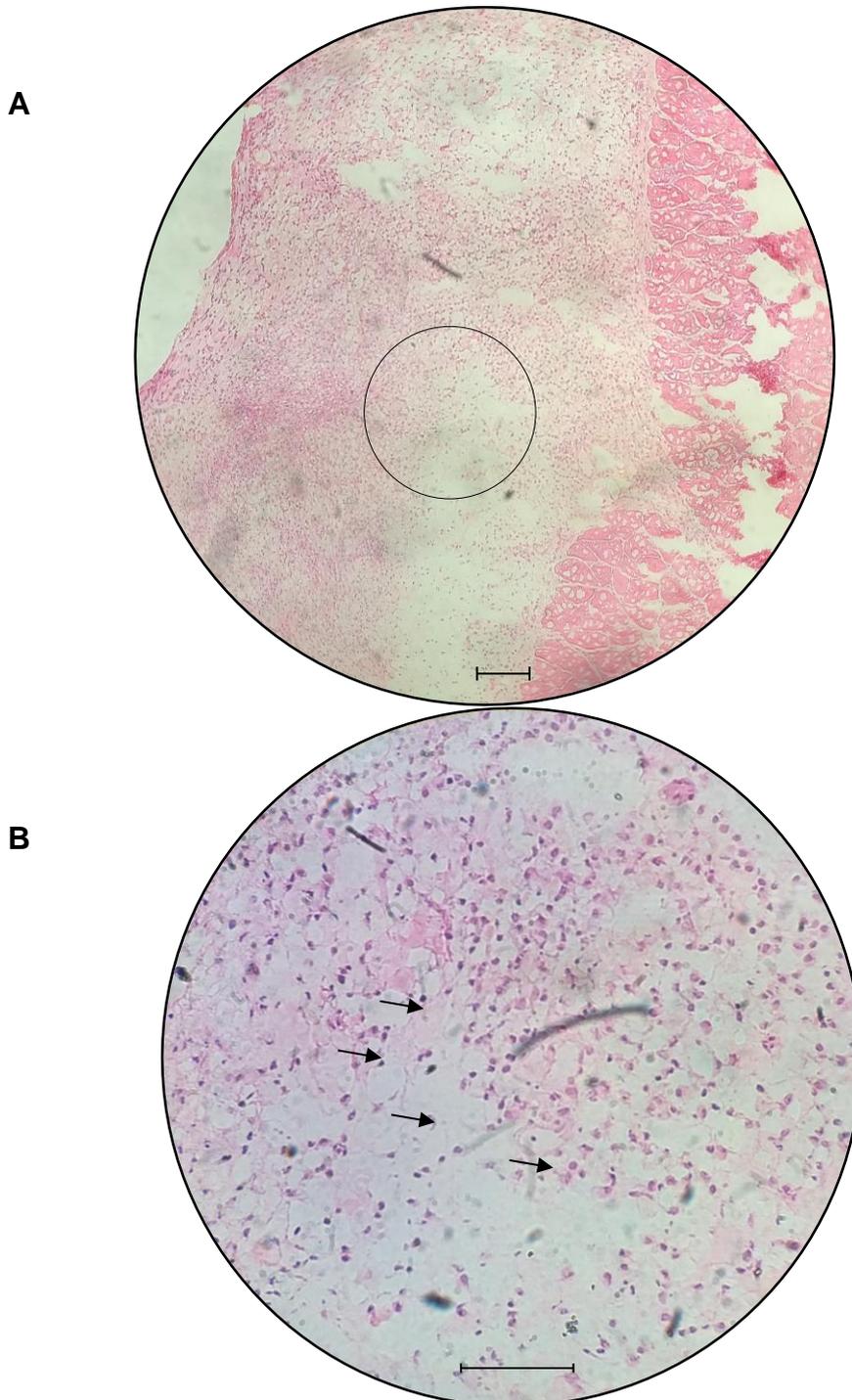
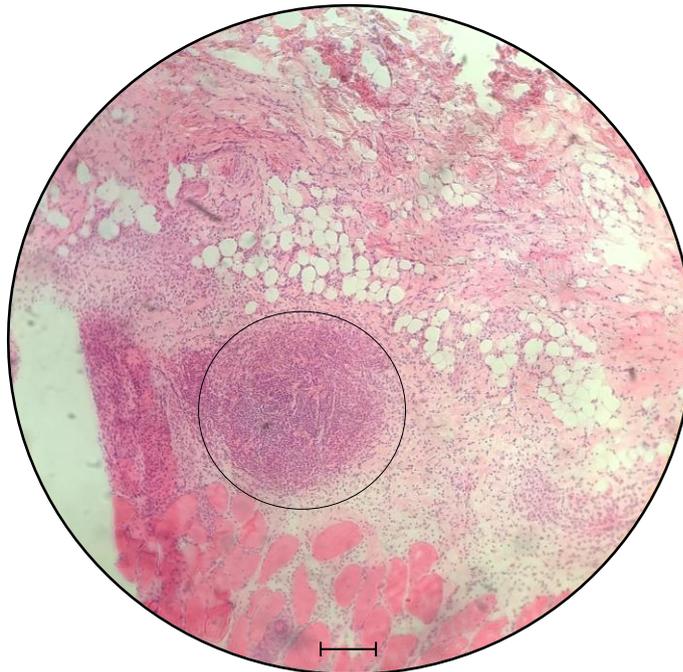


Figura 18. Histología del Infiltrado de hUBM *in vivo*. (A) microfotografía en magnificación 10X teñida con HYE después de 48 horas de exposición, se observa en hipodermis material amorfo, de gran distribución y disolución con infiltrado inflamatorio mixto (circulo negro), (B) microfotografía en magnificación 40X, se observan de forma generalizada células consistentes con linfocitos (flechas negras). Barra de escala 100 μm .

A



B

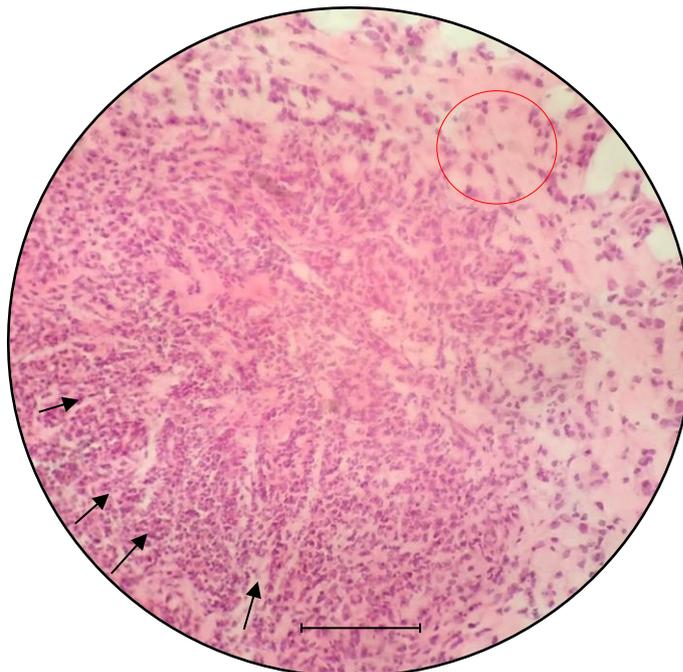
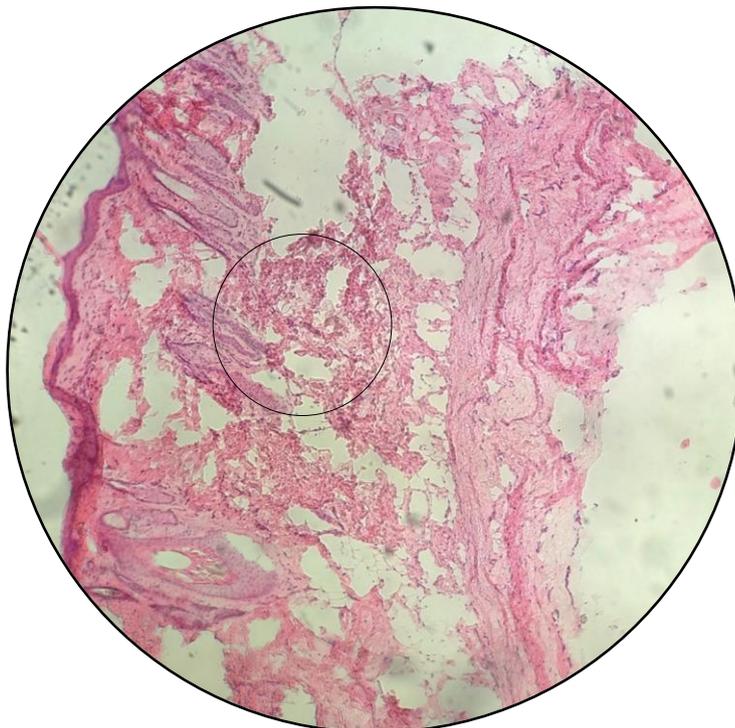


Figura 19. Histología del Infiltrado de hUBM+LL37 *in vivo*. (A) microfotografía en magnificación 10X, teñidas con HYE después de 48 horas de exposición, se observa la formación de un granuloma bien definido de material amorfo en hipodermis (círculo negro), disolución extensa tanto en epidermis como en tejido muscular con presencia de células inflamatorias mixtas, (B) microfotografía en magnificación 40X, se observan cúmulos de células conformado principalmente por linfocitos, también se aprecia colonización de fibroblastos (círculo rojo) sobre el biomaterial. Barra de escala 100 μ m.

A



B

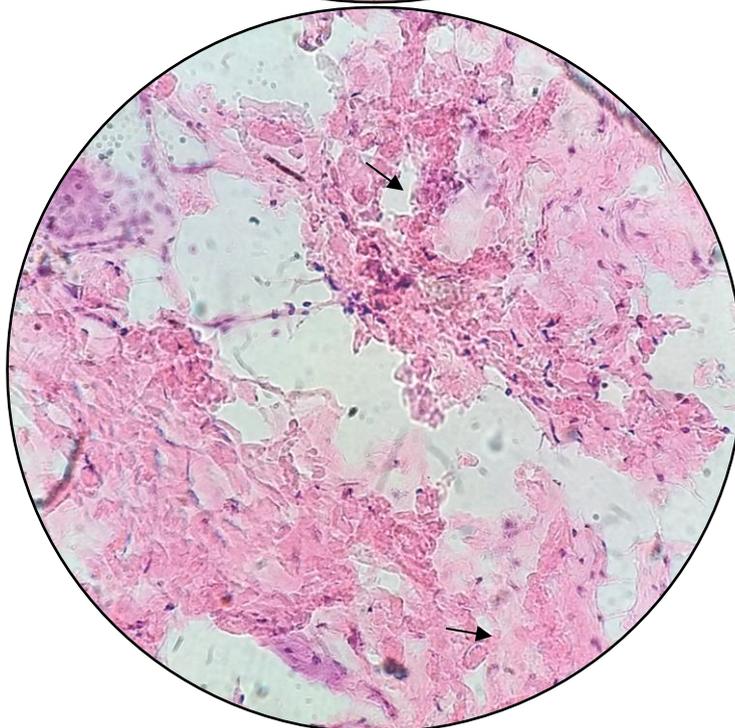
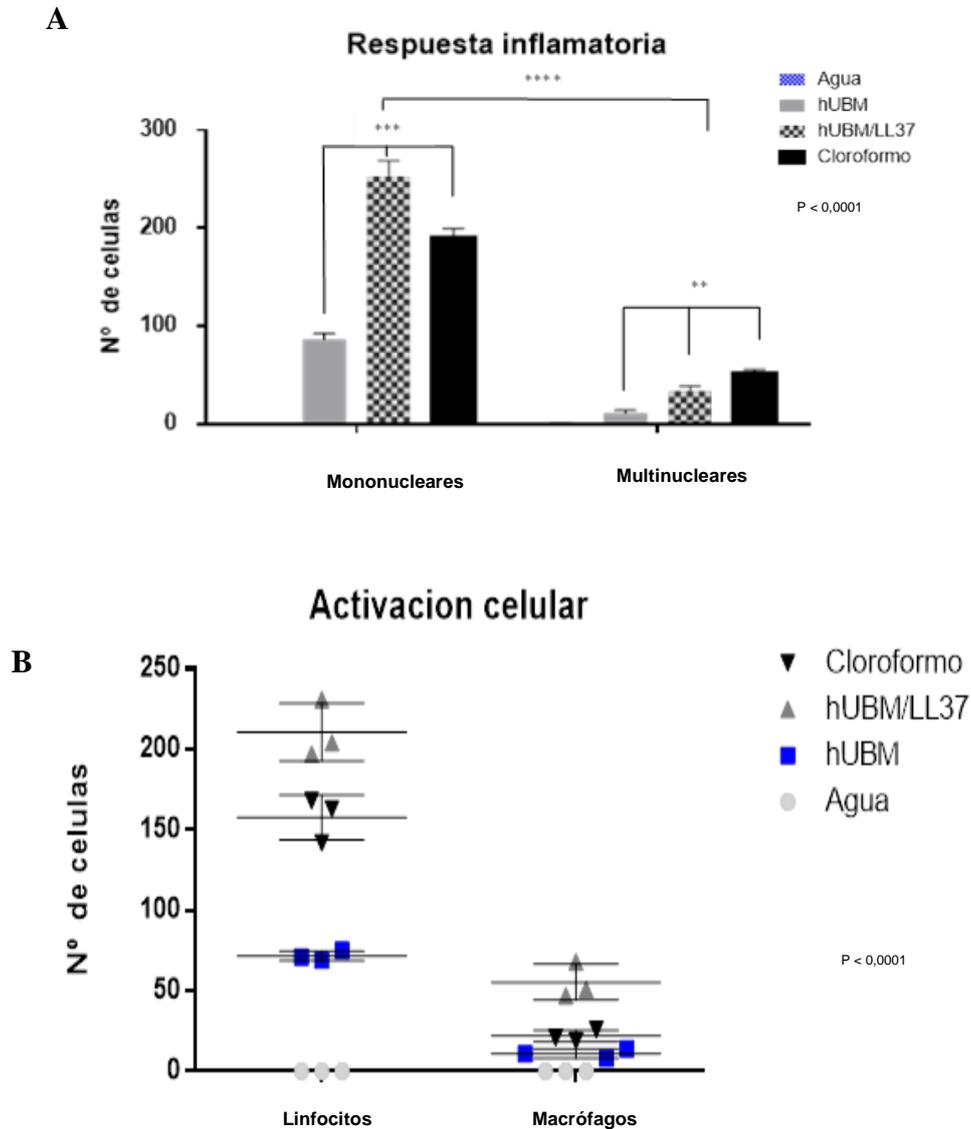


Figura 20. Histología del Infiltrado de cloroformo *in vivo*. (A) microfotografía en magnificación 10X teñidas con HyE después de 48 horas de exposición, se observan fibras de colágena discohesivas (circulo negro), entremezclados folículos pilosos cubiertos parcialmente por un epitelio estratificado de 3 a 5 capas. (B) microfotografía en magnificación 40X, se observan algunas células de tipo inflamatorio crónico (flechas negras). Barra de escala 100 μ m.





8.5 Los Hidrogeles estimulan la vasculogénesis *in vivo*

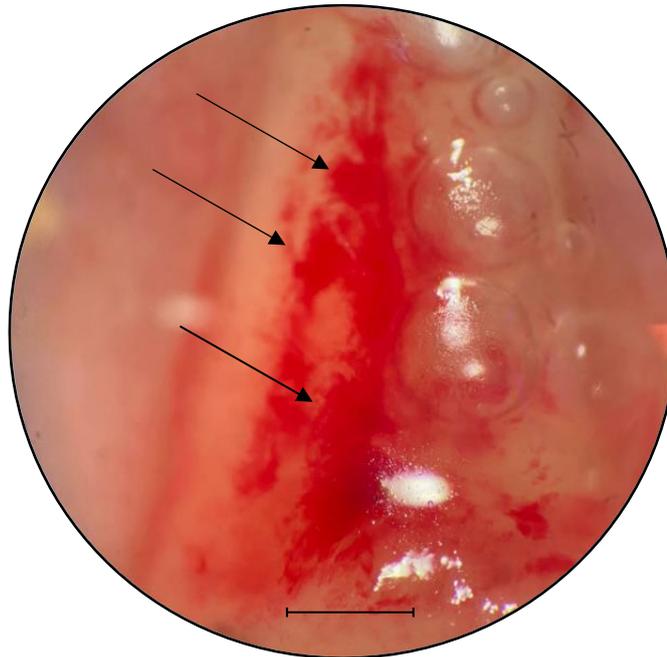
Realizamos la evaluación experimental en una población de 12 ratas Wistar por cada tiempo de evaluación, es decir; a 7, 14 y 21 días, divididas en 2 grupos de investigación con sus respectivos controles.

8.5.1 Evaluación de la vasculogénesis *in vivo* 7 días.

8.5.1.1 Descripción macroscópica

Macroscópicamente en el dorso de los especímenes se observó una cicatrización óptima y completa. Es decir, en todos los grupos se observó una cicatrización bien definida. Un resultado diferente se encontró donde se colocó el injerto de hUBM+LL37, ya que mostró abundante pelaje en toda el área circundante. Durante la descripción macroscópica del tejido epitelial, se observó libre de inflamación, ausencia de edemas y hematomas, alrededor de los sitios de injerto y control sin signos de exudado inflamatorio ni purulento (Figura 22). En la zona interna de la biopsia se observan los angioreactores fácilmente identificables de superficie irregular, sin embargo, gran adaptación por el material del implante, con abundante integración por parte de la membrana basal transepitelial.

A



B

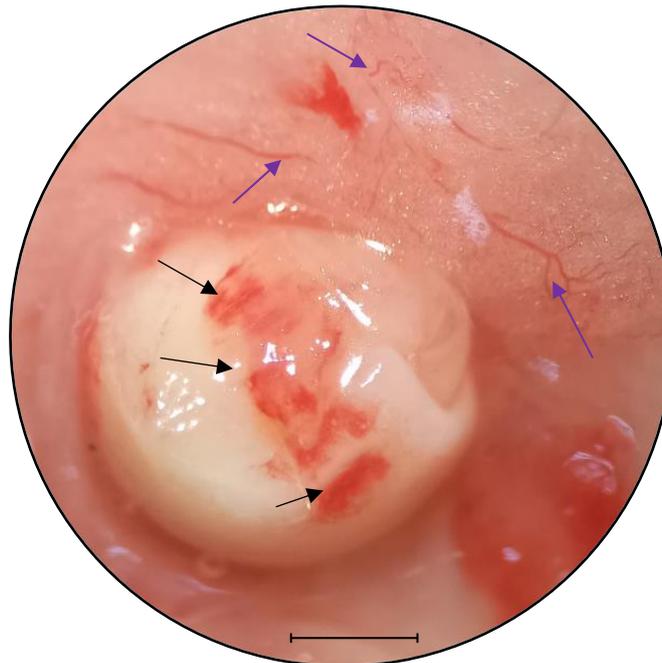


Figura 22. Neovascularización *in vivo* 7 días de inducción. Vista estereoscópica a 4X de la parte superior del implante de angioreactores cargado con hUBM. (A) en la imagen se observa gran vascularidad producto de una posible hemorragia temprana dentro del angioreactor indicada con flechas negras. (B) corte transversal del angioreactor, muestra hemorragia en la zona media del andamio indicado con flechas negras, además excelente vascularidad por parte de los tejidos adyacentes indicado con flechas azules. Barra de paralaje 250 μ m.



8.5.1.2 Descripción histológica

La descripción histológica mostró dermis e hipodermis de aspecto normal con presencia de un cuerpo extraño amorfo. Los resultados de la tinción con HyE indicaron que el interior de los angioreactores vacíos injertados permaneció libre de tejido, mientras que se detectó una notable infiltración celular y formación de vascularidad en los implantes de angioreactores que contenían el andamio tridimensional de hUBM (Figura 23). Es importante destacar que el infiltrado celular es abundante dentro de los andamios colocados, además se observó formación de vasos capilares con abundantes eritrocitos, demostrando la neoformación de vasos sanguíneos. Éste se encontraba en estado de disolución con infiltrado inflamatorio mixto granular de tejido tipo conectivo denso constituido por células mononucleadas principalmente por linfocitos, macrófagos y granulocitos. Los sitios que recibieron el infiltrado con hUBM+LL37 mostraron una cantidad abundante (> 50 %) de macrófagos y fibroblastos, lo que representa una respuesta inflamatoria. Se evaluaron cinco campos al azar de cada uno de los grupos de estudio, a través de tinciones con HyE evaluamos la morfología y la integración tisular. En el grupo de hUBM se observa formación de estructuras tubulares con gran infiltrado celular, que permiten el entrecruzamiento y reorganización de las fibras nativas del biomaterial y presencia de vasos sanguíneos de tipo arterial, con abundantes eritrocitos (Figura 24 A), mientras que en el grupo hUBM+LL37 se observó un material amorfo, con poca reabsorción e infiltrado celular, sin embargo, se apreció un vaso de mayor calibre (Figura 24B).

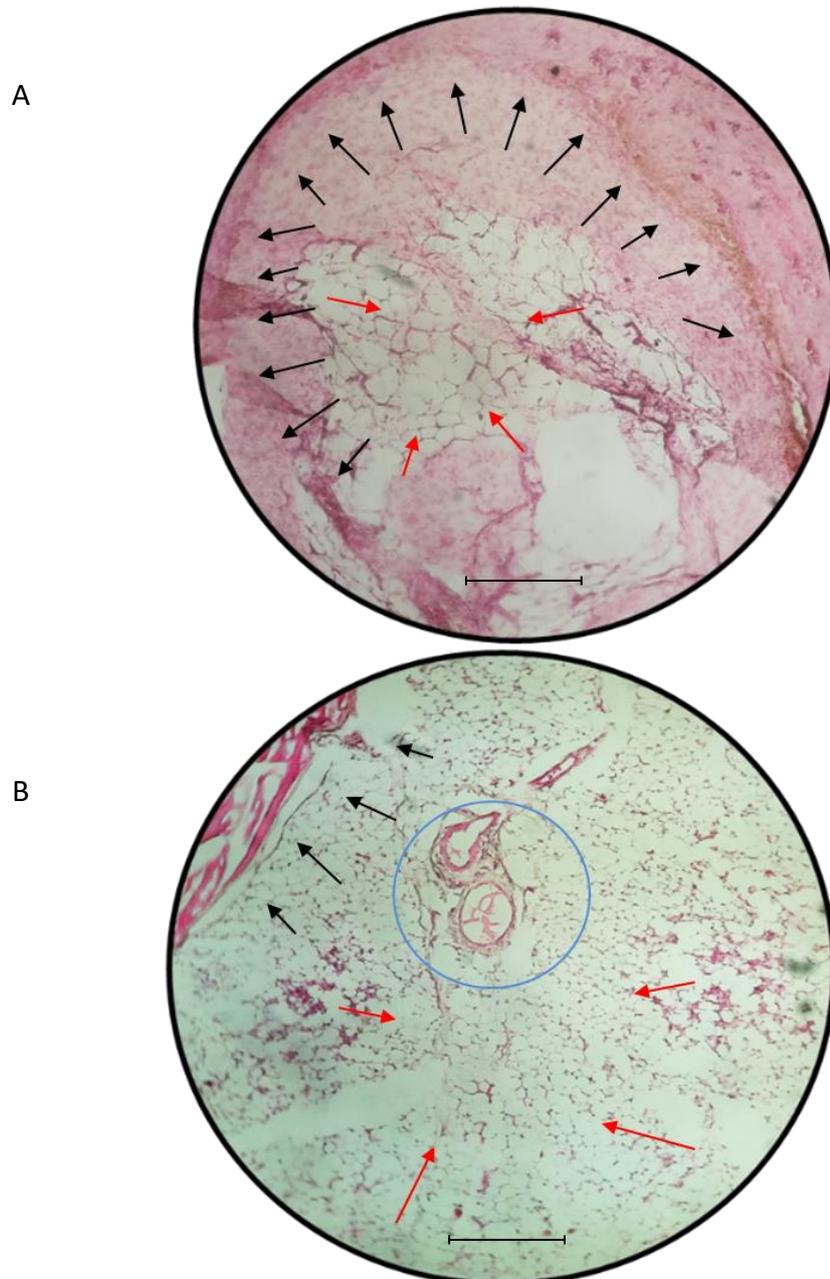


Figura 23. Infiltrado celular *In vivo* 7 días de inducción. Vista microscópica en un aumento de 10X, microscopio de campo claro. En la imagen A corresponde a hUBM, donde se aprecia el límite del biomaterial que esta colonizado por gran infiltrado celular (flechas negras), así como lagunas cohesivas francas, aparentando estructuras tubulares similares a la neoformación de capilares (flechas rojas), mientras que en la imagen B que corresponde a hUBM+LL37 se observa el límite del biomaterial con poco infiltrado celular (flechas negras), así como fibras discohesivas dispersas (flechas rojas) y una estructura de apariencia vascular, que presenta una túnica adventicia franca, pero sin infiltrado de eritrocitos (circulo azul). Barra de escala 100 μ m.

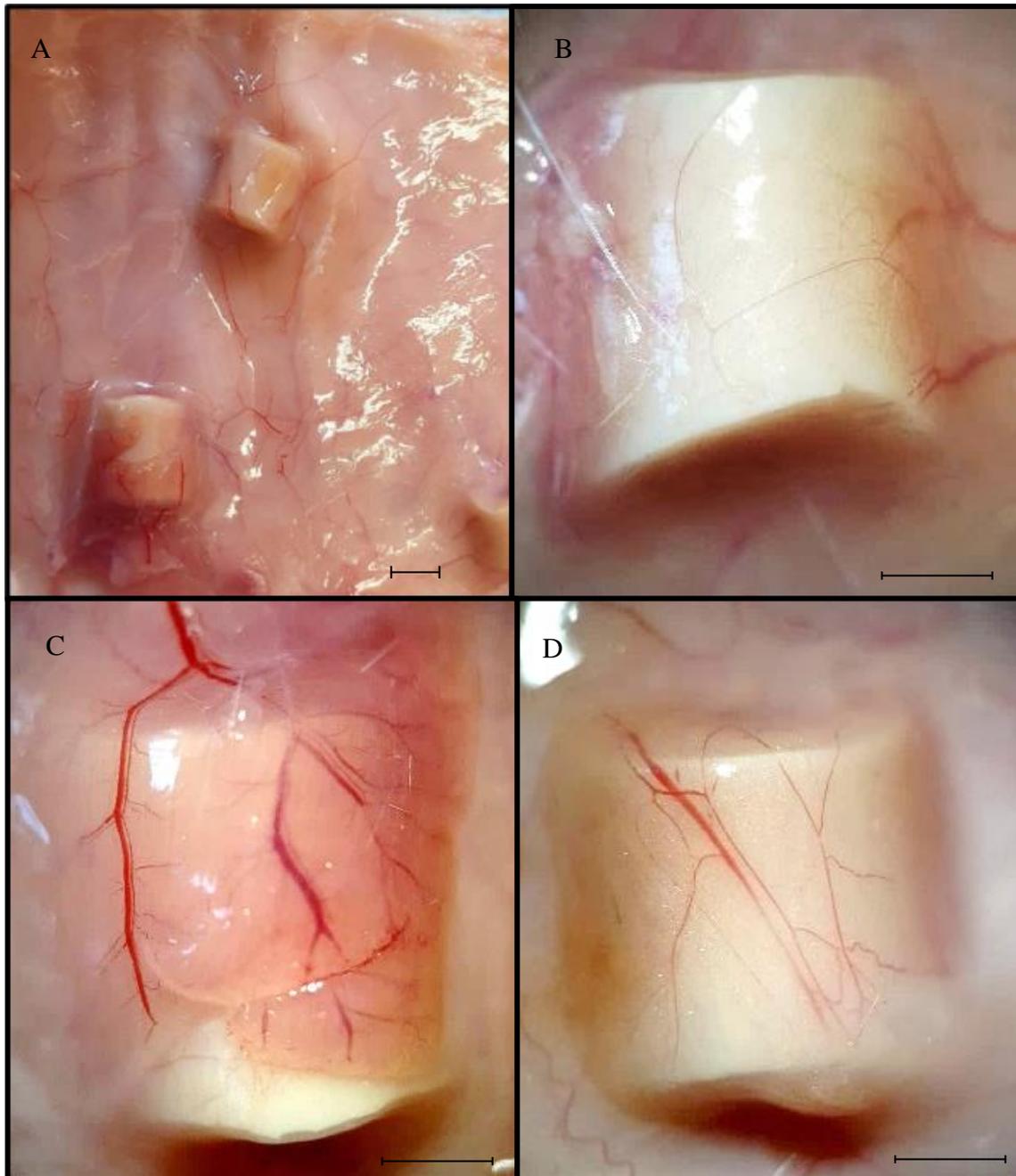
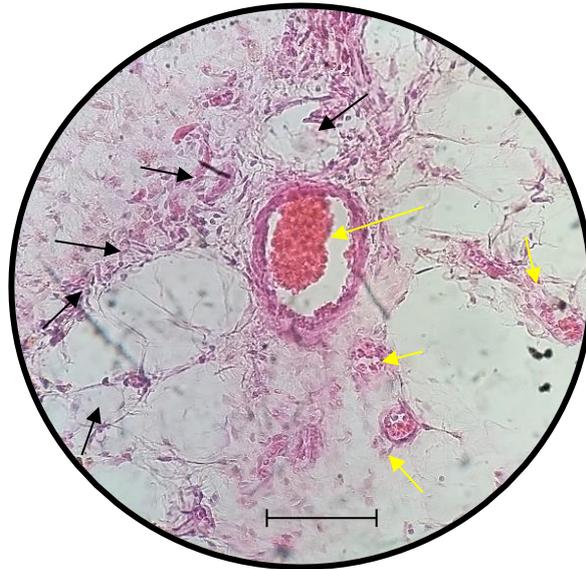


Figura 24. Neovascularización *in vivo* 14 días de inducción. Vista macroscópica de biopsia del dorso del espécimen, donde se aprecia la integración transepitelial de los angioreactores de cada grupo de estudio. Los implantes se recuperaron de manera exitosa en todos los especímenes; la arquitectura tisular se conservó sin aparente alteración por parte del tejido del hospedero. Los paneles B, C y D se aprecia en una magnificación de 4X en estereoscopio. En el grupo control negativo de angioreactor hueco (A), se evidenció un tejido de apariencia nativa, libre de edema y abultamientos. En los grupos experimentales de HUBM (C) y HUBM+LL37 (D) se observa gran interacción del injerto, mostrando gran vasculatura. Vista macroscópica. Barra de paralaje 250 mm.

A



B



Figura 25. Microscopia de Neovascularización *in vivo* a 14 días. Vista microscópica del interior del implante de angioreactores en una magnificación de 40X en microscopio de campo claro. Imágenes histológicas representativas obtenidas de andamios implantados libres contaminación bacteriana 14 días después de la implantación. Se utilizaron tinciones con HyE para evaluar la morfología y la integración tisular. En la imagen A (hUBM) se observa formación de estructuras tubulares con gran infiltrado celular, que permiten el entrecruzamiento y reorganización de las fibras nativas del biomaterial (Flechas negras), así como un vaso sanguíneo de tipo arterial, en el cual se observan abundantes eritrocitos (flecha amarilla), mientras que en la imagen B (hUBM+LL37) se observa un material amorfo, con poca reabsorción e infiltrado celular (flechas negras), sin embargo, se aprecia un vaso de mayor calibre y francamente perfundido (flecha amarilla). Barra de escala 100 μ m.



8.5.2 Evaluación de la vasculogénesis *in vivo* 21 días.

8.5.2.1 Descripción macroscópica

Macroscópicamente en el dorso de los especímenes se observó una cicatrización óptima y completa. Es decir, en todos los grupos se observó una cicatrización bien definida. Durante la descripción macroscópica del tejido epitelial, se observó libre de inflamación, ausencia de edemas y hematomas, alrededor de los sitios de los injertos y control sin signos de exudado inflamatorio ni purulento. La zona interna de la biopsia se observa los angioreactores fácilmente identificables de superficie irregular, sin embargo, gran adaptación por el material del implante, un hallazgo interesante es la formación de una cúpula derivada de la membrana basal transepitelial, la cual se observa en una vista estereoscópica que es donde nace el nuevo tejido en forma de cordón, además en los grupos con hUBM, hUBM+LL37 y Gelatina aún se puede observar que el material no ha sido reabsorbido por completo (Figura 26).

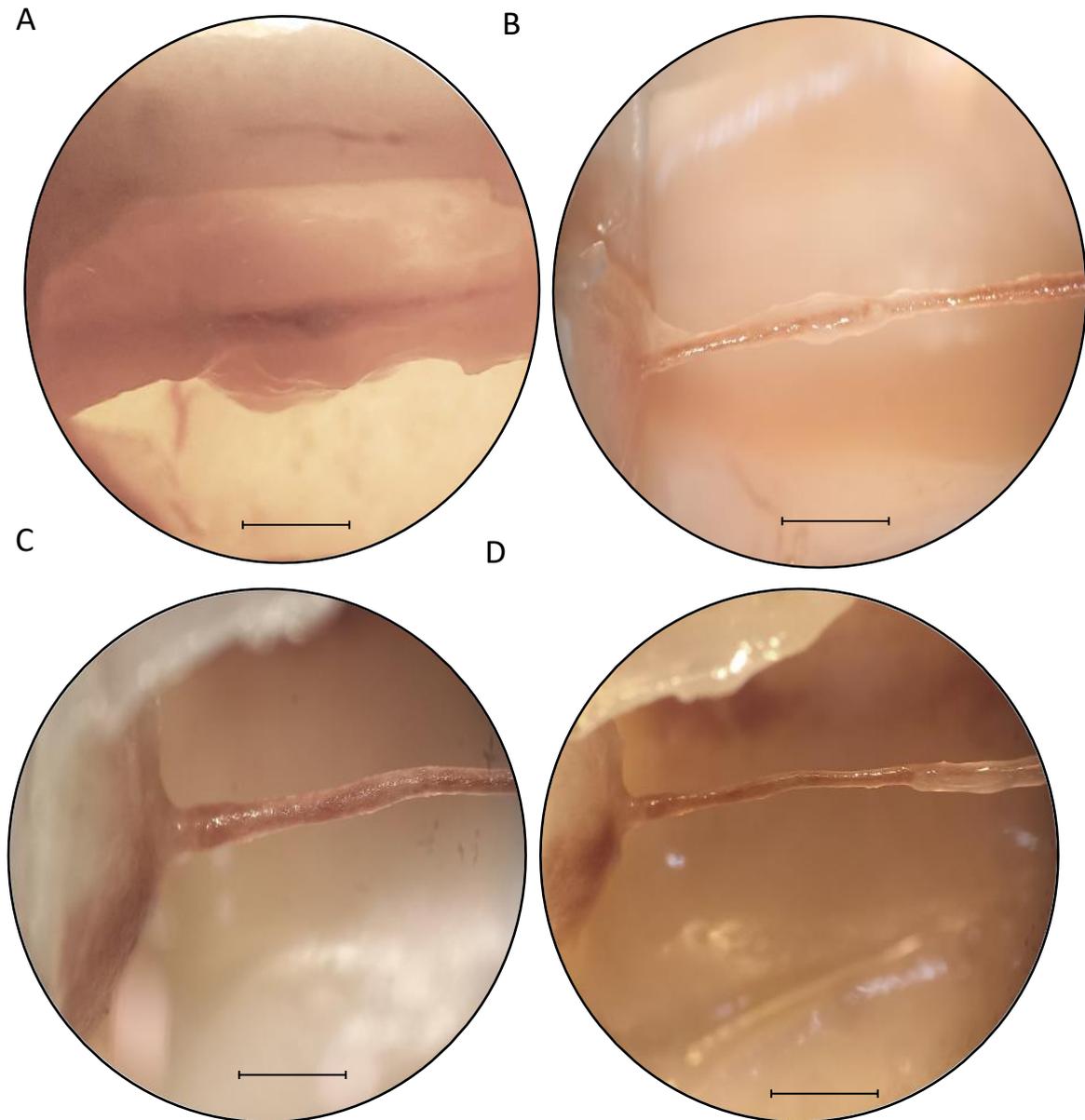


Figura 26. Neovascularización *in vivo* 21 días de inducción. Fotografías de vista estereoscópica a 4X del interior del implante de angioreactores cargado con hUBM(A), hUBM+LL37 (B), hUBM+VEGF(C) y Gelatina (D). (A) en las imágenes se observa un tejido con apariencia de cordón, mostrando en hUBM(A), hUBM+LL37 (B) y Gelatina (D) presencia de hidrogel en el extremo. Barra de paralaje 250 mm.

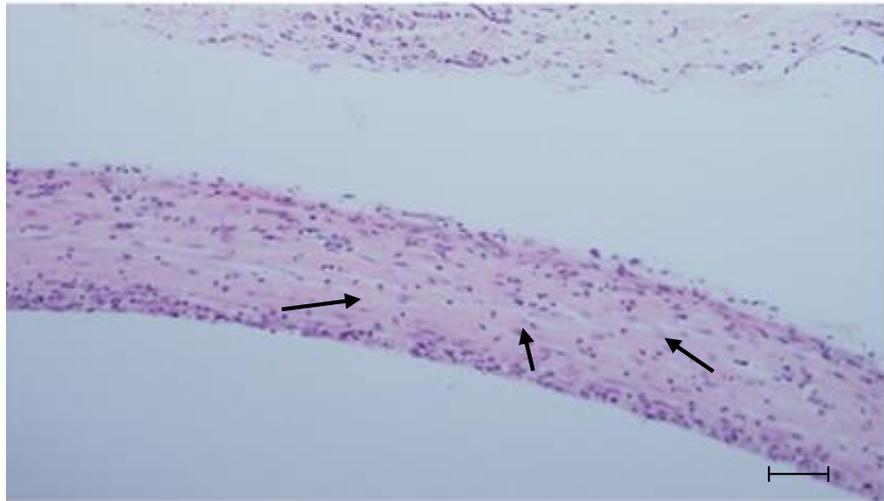


8.5.2.2 Descripción histológica

La descripción histológica en el grupo hUBM mostró dermis e hipodermis de aspecto normal con presencia de un cuerpo extraño amorfo. Éste se encontraba en estado de reabsorción con infiltrado inflamatorio mixto granular de tejido tipo conectivo denso constituido por células tipo linfocitos, macrófagos y granulocitos. Todas las biopsias fueron tratadas de la misma manera, es decir se realizó tinción de HyE con cortes histológicos de 5 μ M, para obtener imágenes en microscopio óptico de campo claro modelo CxL Labomed a una resolución de 15 megapíxeles. Para el caso de la vascularización *in vivo* realizamos evaluaciones desde el día 7, donde encontramos en todos los grupos un material con abundante sangre debido a hemorragias incluidas en él. En un corte transversal del angioreactor se observa que el biomaterial tiene incluida gran cantidad de sangre en su interior. También fue posible observar a los 21 días de colocados los implantes, la formación de un tejido conectivo denso de tipo cúpula en el borde del implante que permitía la interacción de un cordón de nuevo tejido presuntamente vascularizado que se extiende de un extremo a otro. A los 21 días post-implantación, el grupo que contenía angioreactor cargado de hUBM mostró un tejido de tipo conjuntivo bien definido con colonización de células de tipo fibroblastoide (Figura 27-A), mientras en una magnificación a 40X se observó un arreglo espacial de tipo tubular con presencia de células de tipo epitelioide a su alrededor indicado con flechas rojas y objetos invaginados ricos en colágeno de tipo elástico, los cuales se encuentran con abundante infiltrado (Figura 27-B).



A



B

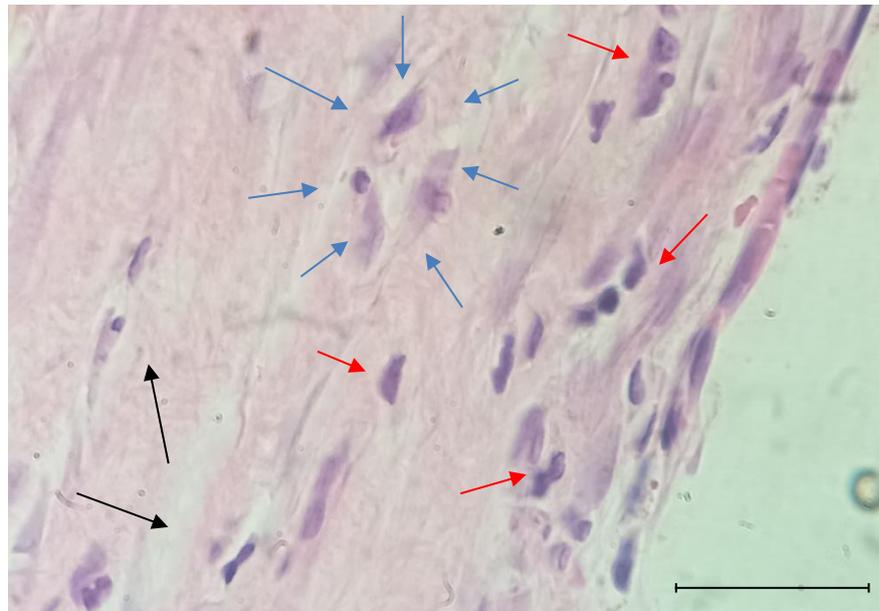


Figura 27. Neovascularización *in vivo* 21 días hUBM. Vista microscópica a 10X de la parte superior del implante de angioreactores cargado con hUBM(A) se observa un tejido de tipo conjuntivo bien definido con colonización de células de tipo fibroblastoide indicado con flechas negras. La imagen B magnificación 40X (cuadro negro), muestra un arreglo espacial de tipo tubular con presencia de células de tipo epitelioide a su alrededor indicado con flechas rojas y objetos invaginados ricos en colágeno de tipo elástico, los cuales se encuentran con abundante infiltrado de linfocitos, fibroblastos y posibles macrófagos indicados en flechas azules. Tinción HyE, cortes histológicos de 5 μ M, imágenes obtenidas en microscopio óptico de campo claro modelo CxL Labomed a una resolución de 15 megapíxeles. Barra de escala 100 μ m.



Universidad Autónoma de Sinaloa

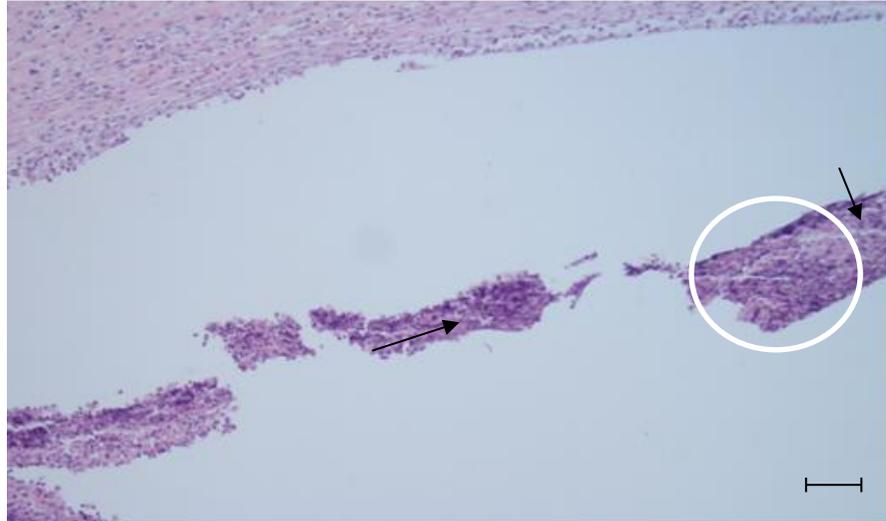


Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



En los angioreactores cargados con hUBM+LL37 se observa un tejido de tipo conjuntivo bien definido con colonización de células de tipo fibroblastoide, las cuales se encuentran colonizando un arreglo espacial rico en colágeno y abundante infiltrado de linfocitos y macrófagos (Figura 28).

A



B

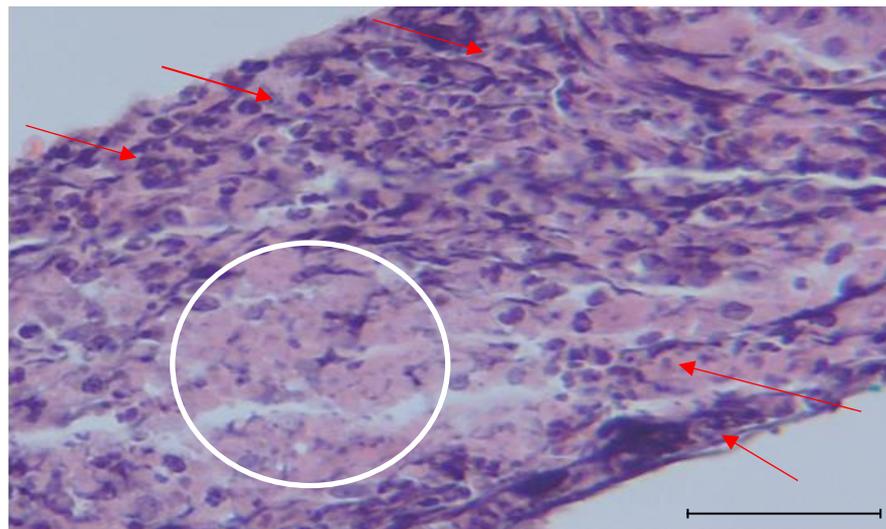


Figura 28. Neovascularización *in vivo* 21 días hUBM+LL37. Vista microscópica a 10X de la parte superior del implante de angioreactores cargado con hUBM+LL37(A), se observa un tejido de tipo conjuntivo bien definido con colonización de células de tipo fibroblastoide indicado con flechas negras. La imagen B magnificación 40X, se observa un arreglo rico en colágeno circulo blanco, los cuales se encuentran con abundante infiltrado de linfocitos y macrófagos indicado en flechas rojas, Tinción HyE, cortes histológicos de 5 μ M, imágenes obtenidas en microscopio óptico de campo claro modelo CxL Labomed a una resolución de 15 megapíxeles. Barra de escala 100 μ m.



Universidad Autónoma de Sinaloa

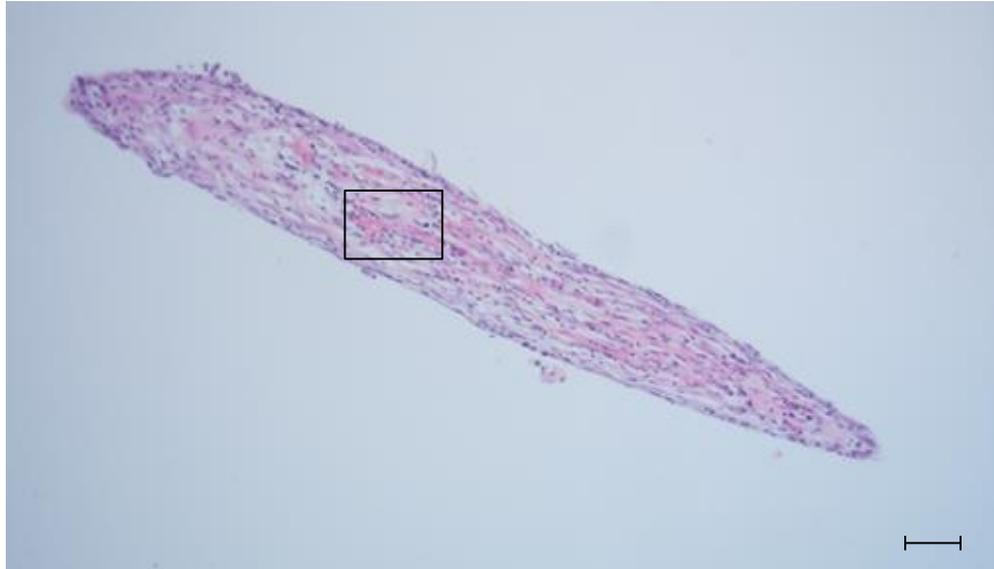


Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



En el caso de los implantes de angioreactores cargado con hUBM+VEGF se observa un tejido de tipo conjuntivo bien definido con colonización de células de tipo fibroblastoide y epitelioide que se encontraban sobre tejido rico en colágeno (fibras eosinofilas irregulares característica singular de las mismas) con abundante infiltrado de linfocitos, macrófagos y células de tipo endotelial, además se muestra un corte longitudinal de un vaso sanguíneo perfundido de gran calibre, ya que se observan a simple vista eritrocitos (Figura 29).

A



B

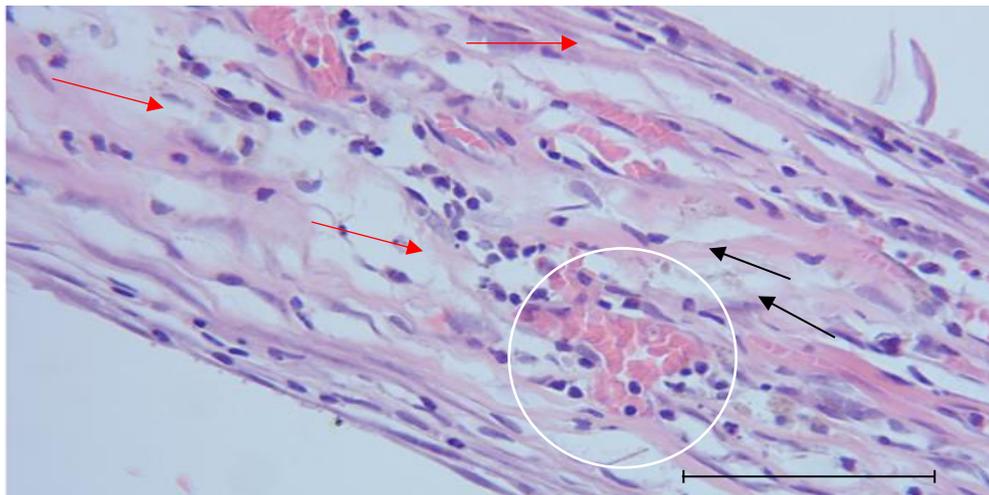


Figura 29. Neovascularización *in vivo* 21 días hUBM+VEGF. Vista microscópica a 10X de la parte superior del implante de angioreactores cargado con hUBM+VEGF(A), se observa un tejido de tipo conjuntivo bien definido (cuadro negro) con colonización de células de tipo fibroblastoide y epitelioides. La imagen B magnificación 40X (cuadro negro), se observa un tejido rico en colágeno ya que se aprecia fibras eosinofílicas irregulares indicadas en flechas negras, los cuales se encuentran con abundante infiltrado de linfocitos, macrófagos y células de tipo endotelial, indicadas en flechas rojas, en círculo blanco se observa un corte longitudinal de un vaso sanguíneo perfundido, el cual liberó eritrocitos. Tinción HYE, cortes histológicos de 5 μ M, imágenes obtenidas en microscopio óptico de campo claro modelo CxL Labomed a una resolución de 15 megapíxeles. Barra de escala 100 μ m.



Universidad Autónoma de Sinaloa

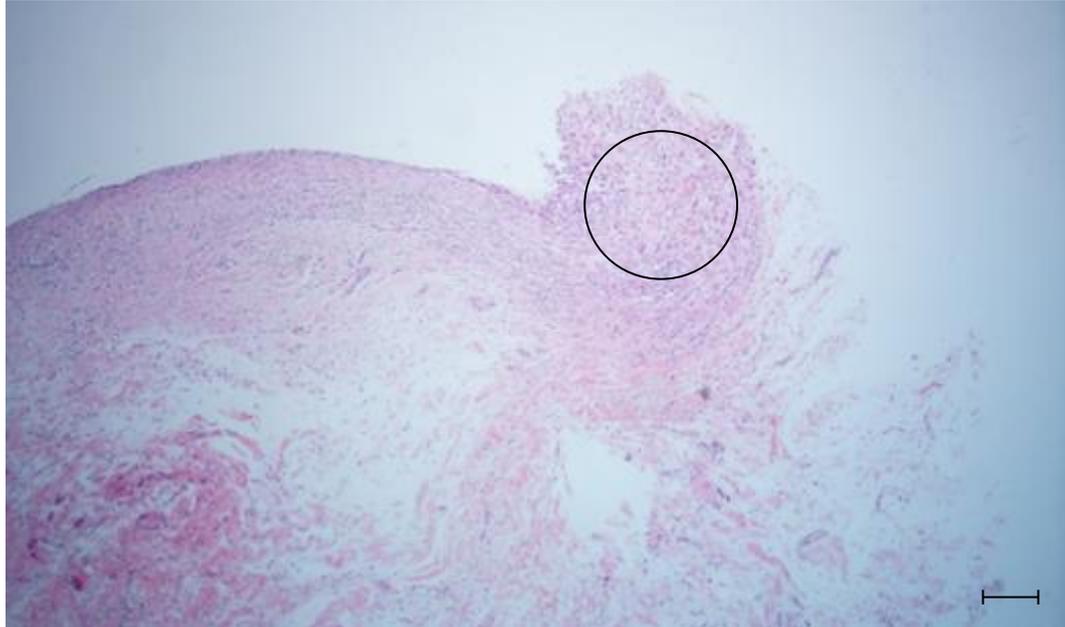


Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



Como control utilizamos un angioreactor cargado con Gelatina al 5%, ya que es de los materiales inertes que más se utilizan para la formulación de hidrogeles. En ese caso de los implantes con este material se observó un tejido de tipo conjuntivo bien definido con colonización de células de tipo epitelioides. En una magnificación se observó un tejido rico en colágeno ya que se apreciaron fibras eosinófilas irregulares dispersas por toda la superficie, los cuales se encuentran con abundante infiltrado linfocitario y células de tipo fibroblastoide (Figura 30).

A



B

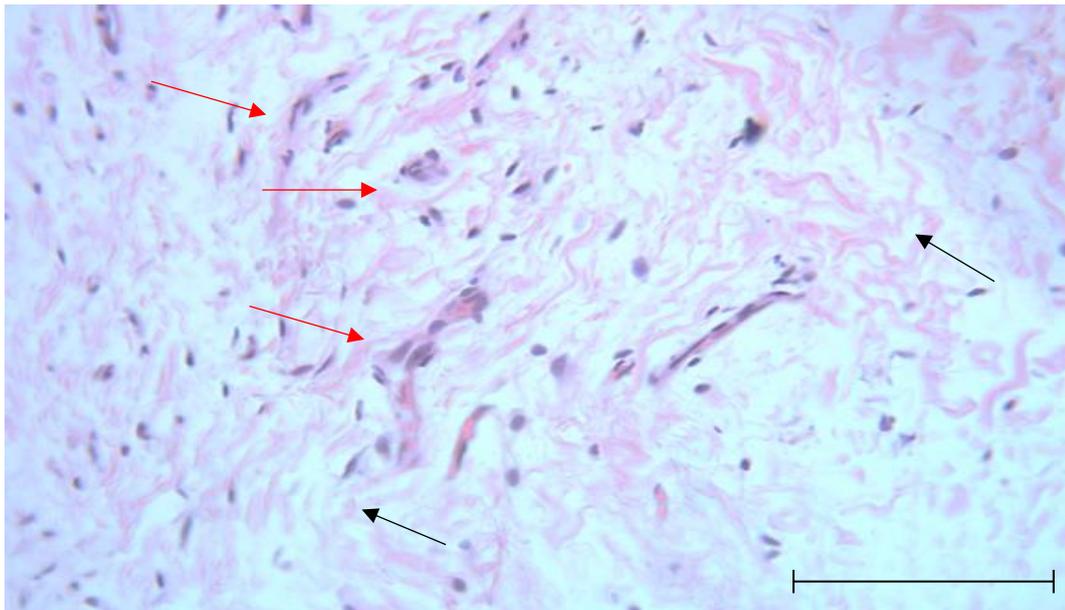


Figura 30. Neovascularización *in vivo* 21 días Gelatina. Vista microscópica a 10X de la parte superior del implante de angioreactores cargado con Gelatina (A), se observa un tejido de tipo conjuntivo bien definido con colonización de células de tipo epitelioide en el círculo negro. La imagen B magnificación 40X (cuadro negro), se observa un tejido rico en colágeno ya que se aprecian fibras eosinofilas irregulares dispersas por toda la superficie indicado en flechas negras, los cuales se encuentran con abundante infiltrado linfocitario y células de tipo fibroblastoide, mostrado en flechas rojas. Tinción HYE, cortes histológicos de 5 μ M, imágenes obtenidas en microscopio óptico de campo claro modelo CxL Labomed a una resolución de 15 megapíxeles. Barra de escala 100 μ m.



De las imágenes obtenidas a magnificación 40X (Figura 31 A-D), se tomaron 5 campos al azar, las cuales fueron exportadas al programa ImageJ, los datos obtenidos en píxeles se digitalizaron y arrojaron información que posteriormente fue exportada al programa estadístico GraphPad Prism 8. Se realizó una gráfica para evaluar la colonización celular dentro de los andamios, los grupos de hUBM, hUBM+VEGF y Gelatina permitieron un infiltrado celular de aproximadamente 50 a 60 células por campo, mientras que el angioreactor cargado con hUBM+LL37 induce gran infiltrado de hasta tres veces más que los anteriores, siendo estadísticamente significativo con el resto de los grupos ya que la dispersión de los datos arrojó un valor $p < 0.0001$. (Figura 30A). Por otra parte, se evaluó la cohesión del material o el tejido para evaluar la formación de túbulos, mostrando que entre los grupos hUBM y hUBM+VEGF la formación de redes tubulares no fue estadísticamente significativa, mientras que en los grupos de hUBM y hUBM+VEGF con respecto a hUBM+LL37 y Gelatina, la dispersión de los datos arrojó una $p < 0.0001$ (Figura 32B).

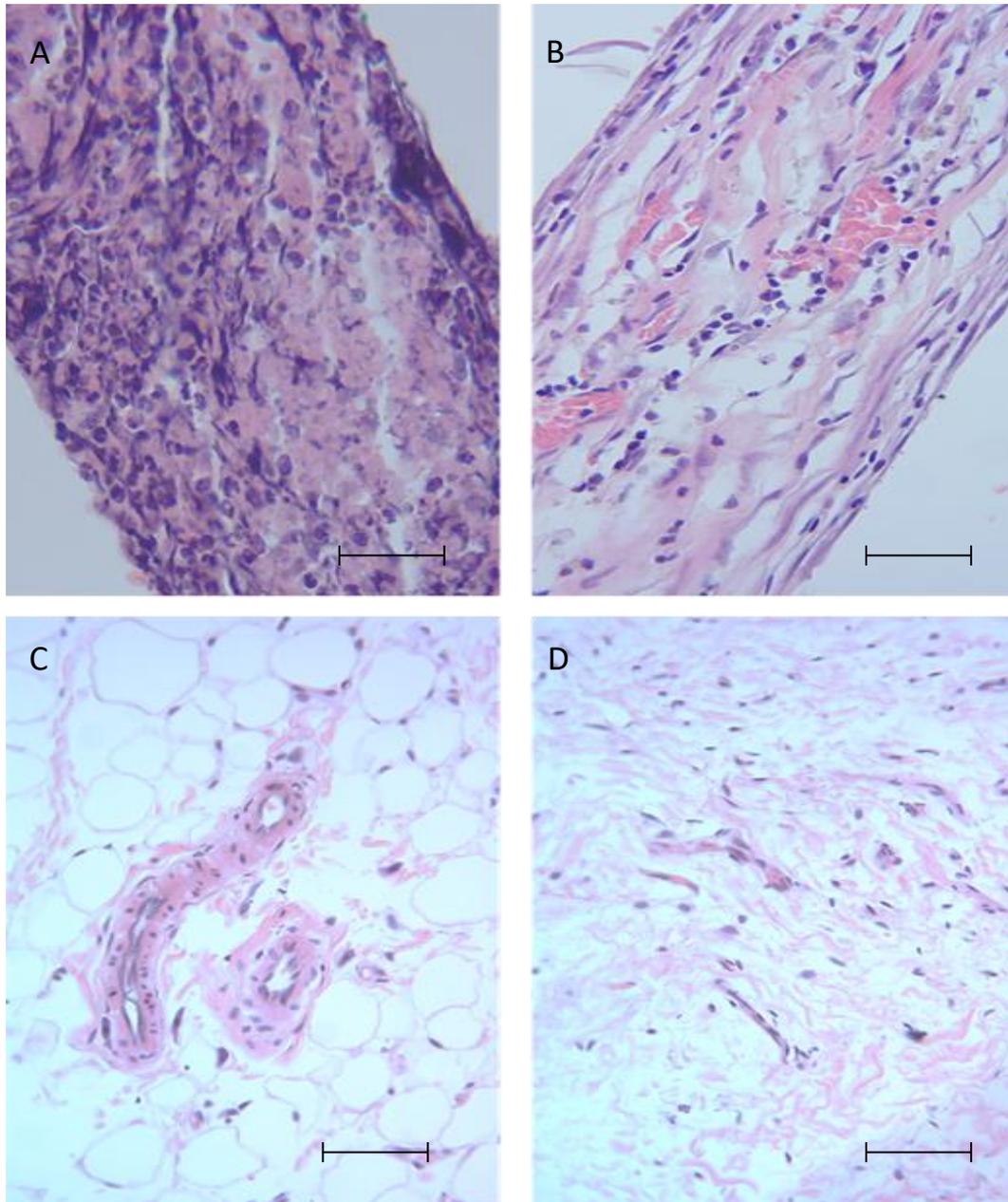


Figura 31. Colonización celular de andamios a 21 días. Vista microscópica a 40X de los angioreactores recuperados. Se observa en imagen A el andamio de hUBM+LL37 muy celularizado con aspecto basófilo con células de tipo inflamatorio, en B se puede observar el andamio de hUBM+VEGF con gran celularidad pero de aspecto fibroblastoide y vasos sanguíneos perfundidos, en C se observa el andamio de hUBM el cual permitió la formación de estructuras de tipo panal similar a primordios vasculares los cuales se encuentran rodeando estructuras muy similares a vasos sanguíneos de tipo arterial y en D se observa un andamio a base de gelatina el cual se observa amorfo pero con células de tipo epiteloide. Barra de escala 100 μm .

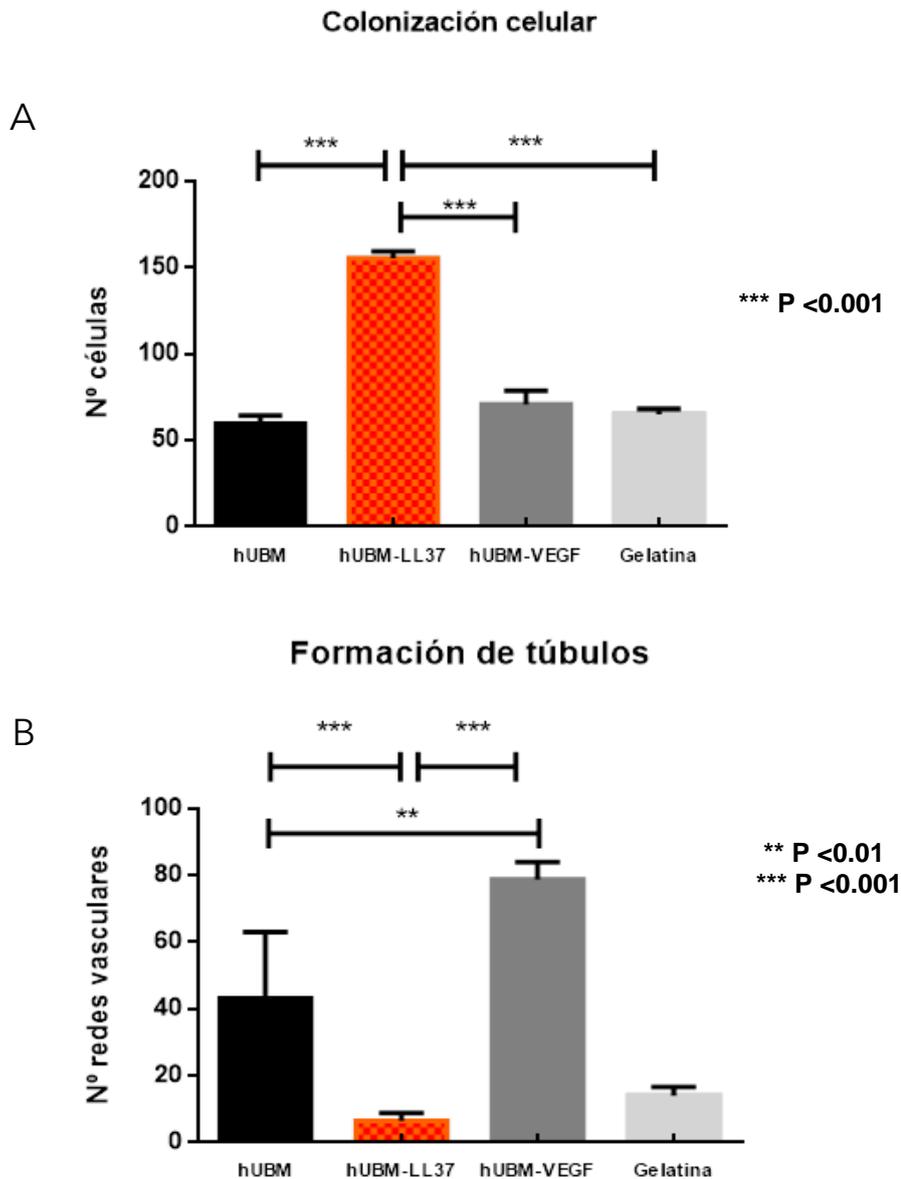


Figura 32. Colonización celular y formación de túbulos 21 días. La imagen A se observa la gráfica de la colonización celular en cada uno de los andamios, los grupos de hUBM, hUBM+VEGF y Gelatina permiten infiltrado celular de aproximadamente 50 a 60 células por campo, mientras que el angioreactor cargado con hUBM+LL37 induce gran infiltrado, siendo estadísticamente significativo con el resto de los grupos. (***) $p < 0.0001$). en la imagen B se graficaron los grupos respecto a la formación de túbulos, mostrando que entre los grupos hUBM y hUBM+VEGF la formación de redes tubulares no es estadísticamente significativa, mientras que en los grupos de hUBM y hUBM+VEGF respecto a hUBM+LL37 y Gelatina sí es estadísticamente significativo (***) $p < 0.0001$). Los datos mostrados representan la media de los ensayos por triplicado de muestras biológicas \pm DE. Los valores estadísticamente significativos se evaluaron usando la prueba estadística t-student de una vía.



9 Discusión

Los resultados obtenidos de las determinaciones cuantitativas realizadas durante las pruebas de reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y síntesis de Lactato deshidrogenasa (LDH), revelaron que hUBM-LL37 no ejerce citotoxicidad sobre macrófagos, fibroblastos y Ad-MSCs, ya que permite su correcta proliferación, lo que sugiere que el biomaterial es un andamio biocompatible, puesto a que la formulación es equilibrada en términos de comportamiento celular, ya que el andamio usado sería idóneo y promovería la proliferación o diferenciación celular. Al evaluar la actividad mitogénica, no hubo cambios significativos ($p > 0,05$) en la proliferación de ninguna línea celular durante la exposición en comparación con el control (DMEM). Por lo tanto, este material puede promover la proliferación celular normal, posiblemente debido a la presencia de componentes residuales de la ECM. Según otros informes, se sabe que la fibronectina, el colágeno, el ácido hialurónico y los proteoglicanos promueven una mayor proliferación celular (132-134), mientras que el péptido LL-37 también puede estimular las funciones migratorias y proliferativas de la Ad-MSCs en de la respuesta de crecimiento temprano 1 y la vía MAPK (135, 136). Nuestros resultados también son consistentes con los informados por Ayala Ham y cols., ya que el comportamiento proliferativo y la actividad metabólica en RAW 264.7 expuestas al hidrogel de ECM de hueso bovino aumentaron a las 48 y 72 h (137). Al evaluar la liberación de LDH a las 24 horas de estímulos en cada uno de los grupos, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p > 0,05$), al ser colocado en contacto con macrófagos, fibroblastos y Ad-MSCs. Curiosamente, encontramos patrones similares de liberación de LDH entre las diferentes líneas celulares en comparación con el grupo DMEM (hUBM+LL37 contra DMEM) y una diferencia estadísticamente significativa solo cuando se comparó con la liberación de LDH de control positivo de toxicidad (células lisadas, $p < 0,0001$). Estos datos concuerdan con lo reportado por G. Jiménez-Gastélum y cols., ya que demostraron un comportamiento no citotóxico al evaluar un andamio *in vitro* en



macrófagos, fibroblastos y Ad-MSCs durante 48 horas de estímulo (138). Además, para evaluar la integridad y morfología de la membrana celular, se utilizó el ensayo diferencial de vida y muerte. Encontramos porcentajes similares de células vivas para macrófagos ($92,8 \pm 2,17$), fibroblastos ($92,3 \pm 4,93$) y Ad-MSC ($96,9 \pm 1,86$). La morfología celular permaneció intacta en las tres líneas celulares después de la exposición a extractos solubles en todos los grupos. Este resultado concuerda con Hussey y cols., que demostraron que los hidrogeles de ECM preparados a partir de la dermis (dECM), la vejiga (UBM) o la submucosa del intestino delgado (SIS) no fueron citotóxicos cuando se probaron *in vitro* mediante ensayos de biocompatibilidad y metabolismo de fibroblastos NHI-3T3 y células mesenquimales equinas primarias, las cuales mostraron casi un 100% de viabilidad a las 24 h (139). Esto también es similar a lo informado por Crum y cols., pues demostraron que la UBM funcionalizada con nanovesículas extracelulares adheridas a la matriz no era citotóxica y no interfiere en la proliferación celular *in vitro* (140).

Comprender el efecto inflamatorio y la síntesis de interleucinas es de vital importancia para el efecto de regeneración tisular y la neoformación de vasos sanguíneos. El daño o lesión induce inflamación y aumenta el flujo sanguíneo en condiciones fisiológicas, lo que lleva a la acumulación de líquido intersticial, regulación positiva de citocinas proinflamatorias, acumulación de leucocitos y reclutamiento de mediadores inflamatorios (141). Los informes sobre la regeneración del tejido hepático mencionan un aumento dependiente de la dosis en la tasa mitótica después de la exposición al TNF- α (142). Además, el TNF- α es necesario para la producción óptima de VEGF y la angiogénesis en cultivos aórticos, siendo esta vía de inducción angiogénica dependiente de los macrófagos que producen TNF- α y median su efecto proangiogénico (143). Por otro lado, se ha demostrado que MCP-1 es una citoquina quimiotáctica que estimula activamente la angiogénesis activando el factor de transcripción ETS-1 (144) para regular positivamente VEGF y HIF- α , moléculas clave en el proceso angiogénico (145). Además, MCP-1 media la angiogénesis estimulada por TGF- β al mejorar la migración de células murales hacia células endoteliales y promover así la maduración de nuevos vasos



sanguíneos (146). Nuestro hallazgo está de acuerdo con el informe de Jiménez-Gastelum y cols., y sugiere que estas citocinas sobreexpresadas están involucradas en la etapa inicial de la inflamación que conduce a la regeneración y revascularización del tejido (138).

Estudiamos tres líneas celulares que están encargadas de la regeneración y reparación tisular para comprender los mecanismos fisiológicos, celulares y moleculares de estas estirpes celulares conjugadas con andamios; poder predecir el efecto de este andamio y conjugar todos los elementos necesarios para crear un nicho ideal, dada su íntima interacción que minimiza los efectos indeseados de la curación del tejido dañado y promoviendo condiciones óptimas (147). Nuestros resultados indican que cada una de las citoquinas expresadas en este estudio está involucrada en las primeras etapas de la inflamación, influyendo en una adecuada vía de regeneración tisular. Sin embargo, se requieren más experimentos para confirmar estos posibles mecanismos.

Para determinar el mimetismo vasculogénico *in vitro* utilizamos MDA-MB-231 humanas, teniendo a DMEM como grupo control y lo realizamos en condiciones de normoxia e hipoxia. Los resultados de este estudio sugieren que en condiciones de hipoxia puede estar implicada una mayor capacidad en la adhesión, migración y proliferación celular. Además, con tratamiento de VEGF, las células mostraron en ambas condiciones un crecimiento ordenando comparando los controles de DMEM. Sin embargo, los tratamientos con los miméticos de VEGF-CoCl₂ y CoCl₂ tanto en normoxia e hipoxia exhiben una franca inhibición al crecimiento ya que las células no fueron capaces de sobrevivir, pues desde el día cero de cultivo se mostraron sin adherencia al sustrato. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ardyanto y cols., ya que ellos reportaron un índice apoptótico aumentado dependiente del tiempo en células MKN-1, es decir; el tratamiento con CoCl₂ inhibió la expresión de HIF-1 α y la fosforilación de Akt, es decir que afecta la proliferación celular e induce la apoptosis vía caspasa -9, PI3K/Akt (148).

Los HG utilizados en estos estudios al ser infiltrados subcutáneamente, no presentan edemas, hematomas e inflamación y alrededor de los sitios de injerto se observa libre



de signos de exudado inflamatorio y purulento. Además, se obtuvo evidencia de biointegración ya que microscópicamente se observó infiltrado celular de tipo epitelioide y abundantes células polimorfonucleares lo que concuerda con Jiménez-Gastelum y cols., ya que demostraron que en andamio de hUBM permite el reclutamiento de células polimorfonucleares y fibroblastoides del propio huésped (138). También concuerda por lo reportado por Matthew T. y cols., ya que los andamios infiltrados fueron rápidamente colonizados por células huésped, principalmente macrófagos, cuando se implantaron en un defecto de la pared abdominal de rata, además, mencionaron que su andamio fue reabsorbido a los 35 días de ser implantado sin causar reacciones adversas (5). Si bien nuestros resultados fueron similares a los autores anteriores, nuestros resultados mostraron una reabsorción del andamio después de 45 días de ser implantado. La formulación de los andamios usados es idónea ya que hUBM+LL37 mostró excelente activación y respuesta por parte de células polimorfonucleares, involucradas en la respuesta inflamatoria aguda, lo que indica fases iniciales en procesos de cicatrización, sugiriendo que inducirá la proliferación y reclutamiento de células involucradas en la regeneración tisular.

Los andamios 3D de hUBM+LL37 inducen angiogénesis *in vivo*, ya que a los 21 días fueron capaces de permitir la neoformación de vasos sanguíneos francos con gran cantidad de eritrocitos en su interior, además, se observó que presentan alta tasa de biodegradación, lo que permite la regeneración tisular sin perder la estructura fundamental del tejido, proporcionando los nutrientes necesarios para la regeneración tisular, aun cuando estamos utilizando una dosis más baja para este tipo de ensayos en condiciones *in vitro*. Sin embargo, al ser comparado con el grupo de hUBM y hUBM+VEGF se observó un mejor comportamiento respecto a la formación de vasos sanguíneos, ya que los vasos formación son de apariencia arterial y son un mayor número por campo y claramente se encuentran perfundidos.

Los hallazgos encontrados nos permiten confirmar que el andamio de hUBM+LL37 tiene capacidad quimiotáctica y angiogénica. Esto coincide con lo informado por Yang, Xu, y cols., ya que evaluaron el comportamiento de un HG de quitosano cargado con LL-37 en



tratamientos para úlceras colocándolas directamente en la herida por presión, encontrando aumento del espesor epitelial y gran densidad capilar tan solo 11 días después de la implantación, así como un aumento de VEGF-A y HIF-1 α (149). También concuerda con lo reportado por Pike. y cols., ya que demostraron una respuesta angiogénica eficaz y prolongada de HG de hialuronano funcionalizados con VEGF y bFGF (150). Del mismo modo, corresponde a lo mencionado por Dissanaca y cols., puesto a que demostraron la formación de vasos sanguíneos *in vivo* usando un modelo murino implantando un andamio de PURAMATRIX/VEGF biofuncionalizado con HUVECS y DPSCs (151).

Este hallazgo nos motiva a realizar más comparaciones con otras moléculas, proteínas factores de crecimiento o péptidos proangiogénicos para evaluar la inducción de nuevos vasos sanguíneos ya que con nuestros resultados hemos demostrado hasta el momento que nuestro biomaterial es biocompatible, bioinerte, bioactivo y vasculogénico.



10 Conclusión

Nuestros resultados *in vitro* muestran que el hUBM biofuncionalizado con el péptido LL-37 (hUBM+LL37) es citocompatible y permite la proliferación de macrófagos, fibroblastos y Ad-MSCs, e induce la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF- α y MCP-1 en macrófagos, claves en la inflamación no patológica, así como reclutamiento y la diferenciación celular durante la reparación de tejidos. Además, en estudios *in vivo* el andamio a base de hidrogel ECM es biocompatible e induce la angiogénesis tan solo después de 21 días de implantación. Todas estas propiedades tienen potencial en medicina regenerativa ya que esta construcción funcional podría usarse para restaurar, mantener o mejorar tejidos dañados o incluso órganos completos.

Los hUBM, ya sean solos o biofuncionalizados con LL37 son viables para ser utilizados como biomateriales *in vivo* en un modelo animal de rata Wistar.



11 BIBLIOGRAFÍA

1. Moussa DG, Aparicio C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2019;13(1):58-75.
2. Keane TJ, DeWard A, Londono R, Saldin LT, Castleton AA, Carey L, et al. Tissue-specific effects of esophageal extracellular matrix. *Tissue Engineering Part A*. 2015;21(17-18):2293-300.
3. Sawkins MJ, Bowen W, Dhadda P, Markides H, Sidney LE, Taylor AJ, et al. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. *Acta biomaterialia*. 2013;9(8):7865-73.
4. Medberry CJ, Crapo PM, Siu BF, Carruthers CA, Wolf MT, Nagarkar SP, et al. Hydrogels derived from central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials*. 2013;34(4):1033-40.
5. Wolf MT, Daly KA, Brennan-Pierce EP, Johnson SA, Carruthers CA, D'Amore A, et al. A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. *Biomaterials*. 2012;33(29):7028-38.
6. Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dental Materials*. 2013;29(1):97-102.
7. Fukushima K, Marques M, Tedesco T, Carvalho G, Gonçalves F, Caballero-Flores H, et al. Screening of hydrogel-based scaffolds for dental pulp regeneration—a systematic review. *Archives of oral biology*. 2019;98:182-94.
8. Ge Z, Li C, Heng BC, Cao G, Yang Z. Functional biomaterials for cartilage regeneration. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2012;100(9):2526-36.
9. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*. 2012;37(1):106-26.
10. Wang L, Wang C, Wu S, Fan Y, Li X. Influence of the mechanical properties of biomaterials on degradability, cell behaviors and signaling pathways: current progress and challenges. *Biomaterials Science*. 2020;8(10):2714-33.
11. Ayala-Ham A, Lopez-Gutierrez J, Bermúdez M, Aguilar-Medina M, Sarmiento-Sánchez JI, López-Camarillo C, et al. Hydrogel-Based Scaffolds in Oral Tissue Engineering. *Frontiers in Materials*. 2021:294.
12. Sakata R, Iwakura T, Reddi AH. Regeneration of articular cartilage surface: morphogens, cells, and extracellular matrix scaffolds. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2015;21(5):461-73.
13. Goker F, Larsson L, Del Fabbro M, Asa'ad F. Gene delivery therapeutics in the treatment of periodontitis and peri-implantitis: a state of the art review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(14):3551.
14. Bashari A, Rouhani Shirvan A, Shakeri M. Cellulose-based hydrogels for personal care products. *Polymers for Advanced Technologies*. 2018;29(12):2853-67.
15. Caldas BS, Nunes CS, Panice MR, Scariot DB, Nakamura CV, Muniz EC. Manufacturing micro/nano chitosan/chondroitin sulfate curcumin-loaded hydrogel in ionic liquid: A new biomaterial effective against cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;180:88-96.



16. Chai Q, Jiao Y, Yu X. Hydrogels for biomedical applications: their characteristics and the mechanisms behind them. *Gels*. 2017;3(1):6.
17. Xu B, Li Y, Deng B, Liu X, Wang L, Zhu QL. Chitosan hydrogel improves mesenchymal stem cell transplant survival and cardiac function following myocardial infarction in rats. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017;13(2):588-94.
18. Fan C, Wang D-A. Macroporous hydrogel scaffolds for three-dimensional cell culture and tissue engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2017;23(5):451-61.
19. Klar AS, Zimoch J, Biedermann T. Skin tissue engineering: application of adipose-derived stem cells. *BioMed research international*. 2017;2017.
20. Lalan B, Pomerantseva M, Vacanti M, Joseph P. Tissue engineering and its potential impact on surgery. *World Journal of Surgery*. 2001;25(11):1458-66.
21. Polykandriotis E, Arkudas A, Horch R, Stürzl M, Kneser U. Autonomously vascularized cellular constructs in tissue engineering: opening a new perspective for biomedical science. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2007;11(1):6-20.
22. Ali MM, Li F, Zhang Z, Zhang K, Kang D-K, Ankrum JA, et al. Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chemical Society Reviews*. 2014;43(10):3324-41.
23. Lanza R, Langer R, Vacanti JP, Atala A. Principles of tissue engineering: Academic press; 2020.
24. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(3):211-24.
25. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(10):839-45.
26. Shieh S-J, Vacanti JP. State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. *Surgery*. 2005;137(1):1-7.
27. Chen G, Zhou D, Li X-Z, Jiang Z, Tan C, Wei X-Y, et al. A natural chalcone induces apoptosis in lung cancer cells: 3D-QSAR, docking and an in vivo/vitro assay. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-10.
28. Härmä V, Schukov H-P, Happonen A, Ahonen I, Virtanen J, Siitari H, et al. Quantification of dynamic morphological drug responses in 3D organotypic cell cultures by automated image analysis. *PloS one*. 2014;9(5):e96426.
29. Capuana E, Lopresti F, Carfi Pavia F, Brucato V, La Carrubba V. Solution-Based Processing for Scaffold Fabrication in Tissue Engineering Applications: A Brief Review. *Polymers*. 2021;13(13):2041.
30. Manzini BM, Machado LMR, Noritomi PY, da Silva JVL. Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review. *Journal of biosciences*. 2021;46(1):1-18.
31. Huang Y, Zhang XF, Gao G, Yonezawa T, Cui X. 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. *Biotechnology journal*. 2017;12(8):1600734.
32. Rahmani Del Bakhsayesh A, Annabi N, Khalilov R, Akbarzadeh A, Samiei M, Alizadeh E, et al. Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2018;46(4):691-705.
33. Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert review of medical devices*. 2011;8(5):607-26.



34. Chakar C, Soffer E, Cohen N, Petite H, Naaman N, Anagnostou F. Vertical bone regeneration with deproteinised bovine bone mineral or biphasic calcium phosphate in the rabbit calvarium: effect of autologous platelet lysate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2015;26(1):1-9.
35. Davies RL, Kuiper NJ. Regenerative medicine: a review of the evolution of autologous chondrocyte implantation (ACI) therapy. *Bioengineering*. 2019;6(1):22.
36. Carrow JK, Kerativitayanan P, Jaiswal MK, Lokhande G, Gaharwar AK. Polymers for bioprinting. *Essentials of 3D biofabrication and translation*: Elsevier; 2015. p. 229-48.
37. Ding J, Zhang J, Li J, Li D, Xiao C, Xiao H, et al. Electrospun polymer biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2019;90:1-34.
38. Ferreira FV, Otoni CG, Kevin J, Barud HS, Lona LM, Cranston ED, et al. Porous nanocellulose gels and foams: Breakthrough status in the development of scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2020;37:126-41.
39. He B, Yuan X, Jiang D. Molecular self-assembly guides the fabrication of peptide nanofiber scaffolds for nerve repair. *RSC Advances*. 2014;4(45):23610-21.
40. Ma B, Wang X, Wu C, Chang J. Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds. *Regenerative biomaterials*. 2014;1(1):81-9.
41. Yang Y, Ritchie AC, Everitt NM. Recombinant human collagen/chitosan-based soft hydrogels as biomaterials for soft tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2021;121:111846.
42. Hunt NC, Grover LM. Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine. *Biotechnology letters*. 2010;32(6):733-42.
43. Silva TH, Alves A, Ferreira B, Oliveira JM, Reys L, Ferreira R, et al. Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest. *International Materials Reviews*. 2012;57(5):276-306.
44. Varghese SA, Rangappa SM, Siengchin S, Parameswaranpillai J. Natural polymers and the hydrogels prepared from them. *Hydrogels Based on Natural Polymers*: Elsevier; 2020. p. 17-47.
45. Bakshi A, Fisher O, Dagci T, Himes BT, Fischer I, Lowman A. Mechanically engineered hydrogel scaffolds for axonal growth and angiogenesis after transplantation in spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery: Spine*. 2004;1(3):322-9.
46. Munim SA, Raza ZA. Poly (lactic acid) based hydrogels: Formation, characteristics and biomedical applications. *Journal of Porous Materials*. 2019;26(3):881-901.
47. Ayala-Ham A, Aguilar-Medina M, León-Félix J, Romero-Quintana JG, Bermúdez M, López-Gutierrez J, et al. Extracellular matrix hydrogel derived from bovine bone is biocompatible in vitro and in vivo. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2022(Preprint):1-14.
48. Yang F, Tadepalli V, Wiley BJ. 3D printing of a double network hydrogel with a compression strength and elastic modulus greater than those of cartilage. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2017;3(5):863-9.
49. Singh NK, Lee DS. In situ gelling pH- and temperature-sensitive biodegradable block copolymer hydrogels for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2014;193:214-27.



50. Kabiri K, Mirzadeh H, Zohuriaan-Mehr M. Undesirable effects of heating on hydrogels. *Journal of applied polymer science*. 2008;110(6):3420-30.
51. Kaczmarek B, Nadolna K, Owczarek A. The physical and chemical properties of hydrogels based on natural polymers. *Hydrogels based on natural polymers*. 2020:151-72.
52. Omidian H, Park K, Rocca JG. Recent developments in superporous hydrogels. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2007;59(3):317-27.
53. Pooresmaeil M, Namazi H. Hydrogels based on natural polymers. Application of polysaccharide-based hydrogels for water treatments Elsevier Inc [http://dx doi org/https://doi org/101016/B978-0-12-816421-100014-8](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-100014-8). 2020.
54. Xia L-W, Xie R, Ju X-J, Wang W, Chen Q, Chu L-Y. Nano-structured smart hydrogels with rapid response and high elasticity. *Nature communications*. 2013;4(1):1-11.
55. Farhat W, Venditti R, Mignard N, Taha M, Becquart F, Ayoub A. Polysaccharides and lignin based hydrogels with potential pharmaceutical use as a drug delivery system produced by a reactive extrusion process. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;104:564-75.
56. Kallel I, Douki N, Amaidi S, Ben Amor F. The incidence of complications of dental trauma and associated factors: a retrospective study. *International journal of dentistry*. 2020;2020.
57. Cameron AC, Widmer RP. *Handbook of pediatric dentistry*: Elsevier Health Sciences; 2013.
58. Harlamb S. Management of incompletely developed teeth requiring root canal treatment. *Australian dental journal*. 2016;61:95-106.
59. Estrela C. *Endodontic Science*: Artes Medicas; 2009. 1-22 p.
60. Liu H, Gronthos S, Shi S. Dental pulp stem cells. *Methods in enzymology*. 419: Elsevier; 2006. p. 99-113.
61. Navarrete ES. Células pluripotenciales de la pulpa dental humana. *Odontología actual*. 2014;3.
62. Rosales Ibáñez R, Alvarado-Estrada KN, Ojeda-Gutiérrez F. Ingeniería tisular en Odontología. *Revista ADM Julio-agosto*. 2012;69(4):164-67.
63. Geisler TM. Clinical considerations for regenerative endodontic procedures. *Dental Clinics*. 2012;56(3):603-26.
64. Namour M, Theys S. Pulp revascularization of immature permanent teeth: a review of the literature and a proposal of a new clinical protocol. *The Scientific World Journal*. 2014;2014.
65. González VM, Aispuro KCM, Lizardi EAA, Silva-Herzog Flores D, Rodríguez RO. Revascularización en dientes permanentes con ápice inmaduro y necrosis pulpar: Revisión bibliográfica. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*. 2014;71(3):110-4.
66. Fouad AF, Nosrat A. Pulp regeneration in previously infected root canal space. *Endodontic Topics*. 2013;28(1):24-37.
67. Nosrat A, Li KL, Vir K, Hicks ML, Fouad AF. Is pulp regeneration necessary for root maturation? *Journal of endodontics*. 2013;39(10):1291-5.
68. Cohenca N, Heilborn C, Johnson JD, Flores DSH, Ito IY, da Silva LAB. Apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal



- dressings on root canal disinfection in dog teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2010;109(1):e42-e6.
69. Yadlapati M, Souza L, Dorn S, Garlet GP, Letra A, Silva R. Deleterious effect of triple antibiotic paste on human periodontal ligament fibroblasts. *International endodontic journal*. 2014;47(8):769-75.
70. Phumpatrakom P, Srisuwan T. Regenerative capacity of human dental pulp and apical papilla cells after treatment with a 3-antibiotic mixture. *Journal of endodontics*. 2014;40(3):399-405.
71. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *Journal of endodontics*. 2004;30(4):196-200.
72. Nagy MM, Tawfik HE, Hashem AAR, Abu-Seida AM. Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocols. *Journal of endodontics*. 2014;40(2):192-8.
73. Bezgin T, Yilmaz AD, Celik BN, Kolsuz ME, Sonmez H. Efficacy of platelet-rich plasma as a scaffold in regenerative endodontic treatment. *Journal of endodontics*. 2015;41(1):36-44.
74. Tozum TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *Journal-Canadian Dental Association*. 2003;69(10):664-5.
75. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):e37-e44.
76. Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *Journal of endodontics*. 2013;39(1):138-44.
77. Torres JSS, Cerón LFZ, López JAV, Amézquita CAN, Sánchez LPM, Bernal SIF. La matriz extracelular: un ecosistema influyente en la forma y comportamiento de las células. *Morfología*. 2015;7(1).
78. Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z, Manou D, Passi A, Skandalis SS, et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *The FEBS journal*. 2021;288(24):6850-912.
79. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta biomaterialia*. 2009;5(1):1-13.
80. Acosta S, Quintanilla-Sierra L, Mbundi L, Rebotto V, Rodríguez-Cabello JC. Elastin-Like Recombinamers: Deconstructing and Recapitulating the Functionality of Extracellular Matrix Proteins Using Recombinant Protein Polymers. *Advanced Functional Materials*. 2020;30(44):1909050.
81. Brown BN, Badylak SF. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. *Translational Research*. 2014;163(4):268-85.
82. Brown B, Lindberg K, Reing J, Stolz DB, Badylak SF. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue engineering*. 2006;12(3):519-26.
83. Kular JK, Basu S, Sharma RI. The extracellular matrix: structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of tissue engineering*. 2014;5:2041731414557112.



84. Freytes DO, Martin J, Velankar SS, Lee AS, Badylak SF. Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. *Biomaterials*. 2008;29(11):1630-7.
85. Kim S-H, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *The Journal of endocrinology*. 2011;209(2):139.
86. Beltrán C, Steven B. Estudio del modelo cinético de liberación de piroxicam a partir de hidrogeles de quitosano y las propiedades mecánicas de la matriz. 2017.
87. Maqsood M, Kang M, Wu X, Chen J, Teng L, Qiu L. Adult mesenchymal stem cells and their exosomes: Sources, characteristics, and application in regenerative medicine. *Life sciences*. 2020;256:118002.
88. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
89. Petrenko Y, Vackova I, Kekulova K, Chudickova M, Koci Z, Turnovcova K, et al. A comparative analysis of multipotent mesenchymal stromal cells derived from different sources, with a focus on neuroregenerative potential. *Scientific reports*. 2020;10(1):4290.
90. Semenova E, Chroscinska-Krawczyk M, Grudniak MP, Oldak T, Machaj EK. Clinical application of AD-MSCs—A review. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2018;12(3):100-5.
91. Macías-Abraham C, del Valle-Pérez LO, Galván Cabrera JA, de la Cuétara Bernal K, Socarras Ferrer BB, Hernández Ramírez P, et al. Phenotypic characterization of mesenchymal human stem cell from bone marrow and adipose tissue preliminary results. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2014;30(2):162-70.
92. Marote A, Teixeira FG, Mendes-Pinheiro B, Salgado AJ. MSCs-derived exosomes: cell-secreted nanovesicles with regenerative potential. *Frontiers in pharmacology*. 2016;7:231.
93. Marquez-Curtis LA, Gul-Uludag H, Xu P, Chen J, Janowska-Wieczorek A. CXCR4 transfection of cord blood mesenchymal stromal cells with the use of cationic liposome enhances their migration toward stromal cell-derived factor-1. *Cytotherapy*. 2013;15(7):840-9.
94. Czirok A, Little CD. Pattern formation during vasculogenesis. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 2012;96(2):153-62.
95. Gritz E, Hirschi KK. Specification and function of hemogenic endothelium during embryogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73:1547-67.
96. Laschke M, Giebels C, Menger M. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. *Human reproduction update*. 2011;17(5):628-36.
97. Grossman JD, Grossman W. Angiogenesis. *Reviews in cardiovascular medicine*. 2019;3(3):138-44.
98. Cao Y. Therapeutic angiogenesis for ischemic disorders: what is missing for clinical benefits? *Discovery medicine*. 2010;9(46):179-84.
99. Torres JSS, Cerón LFZ, Bernal SIF, Ordoñez GWM, Salguero C. El rol de VEGF en la angiogénesis fisiológica y tumoral. *Medicina*. 2017;39(3):190-209.



100. Rodríguez-Núñez I, Romero F, González M, Campos RR. Biología del Desarrollo Vascular: Mecanismos en Condiciones Fisiológicas y Estrés Flujo. *International Journal of Morphology*. 2015;33(4):1348-54.
101. Dietzen DJ. Amino acids, peptides, and proteins. *Principles and Applications of Molecular Diagnostics*: Elsevier; 2018. p. 345-80.
102. Silberman RPS. Coordinador del curso.
103. Rafferty J, Nagaraj H, P McCloskey A, Huwaitat R, Porter S, Albadr A, et al. Peptide therapeutics and the pharmaceutical industry: barriers encountered translating from the laboratory to patients. *Current medicinal chemistry*. 2016;23(37):4231-59.
104. Martin V, Egelund PH, Johansson H, Le Qument ST, Wojcik F, Pedersen DS. Greening the synthesis of peptide therapeutics: an industrial perspective. *RSC advances*. 2020;10(69):42457-92.
105. Herrera Malo YE, Leal A, Sinay J, Mejía-López A. [177Lu–DOTA–Tyr3]–OCTREOTATE para el tratamiento de tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos. Revisión sistemática de la literatura: Universidad del Rosario.
106. Segers VF, De Keulenaer GW. Autocrine signaling in cardiac remodeling: a rich source of therapeutic targets. *Journal of the American Heart Association*. 2021;10(3):e019169.
107. D'Andrea LD, Del Gatto A, De Rosa L, Romanelli A, Pedone C. Peptides targeting angiogenesis related growth factor receptors. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(21):2414-29.
108. Cho C-H, Kammerer RA, Lee HJ, Steinmetz MO, Ryu YS, Lee SH, et al. COMP-Ang1: a designed angiopoietin-1 variant with nonleaky angiogenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(15):5547-52.
109. D'Andrea LD, Iaccarino G, Fattorusso R, Sorriento D, Carannante C, Capasso D, et al. Targeting angiogenesis: structural characterization and biological properties of a de novo engineered VEGF mimicking peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(40):14215-20.
110. Santulli G, Ciccarelli M, Palumbo G, Campanile A, Galasso G, Ziaco B, et al. In vivo properties of the proangiogenic peptide QK. *Journal of translational medicine*. 2009;7(1):1-10.
111. Lin X, Takahashi K, Liu Y, Derrien A, Zamora PO. A synthetic, bioactive PDGF mimetic with binding to both α -PDGF and β -PDGF receptors. *Growth Factors*. 2007;25(2):87-93.
112. Soro S, Orecchia A, Morbidelli L, Lacal PM, Morea V, Ballmer-Hofer K, et al. A proangiogenic peptide derived from vascular endothelial growth factor receptor-1 acts through $\alpha 5 \beta 1$ integrin. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2008;111(7):3479-88.
113. Sarikaya A, Record R, Wu C-C, Tullius B, Badylak S, Ladisch M. Antimicrobial activity associated with extracellular matrices. *Tissue engineering*. 2002;8(1):63-71.
114. Jiménez-Gastélum GR, Aguilar-Medina EM, Soto-Sainz E, Ramos-Payán R, Silva-Benítez EL. Antimicrobial Properties of Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering. *BioMed Research International*. 2019;2019.
115. Wang G, Epand RF, Mishra B, Lushnikova T, Thomas VC, Bayles KW, et al. Decoding the functional roles of cationic side chains of the major antimicrobial region of human cathelicidin LL-37. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(2):845-56.



116. Bucki R, Leszczyńska K, Namiot A, Sokołowski W. Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2010;58(1):15-25.
117. Rivas L, Andreu D. Péptidos antibióticos eucarióticos: ¿ una nueva alternativa en clínica? *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2003;21(7):358-65.
118. HU Z, NAGAOKA I. Modulation of macrophage cell death, pyroptosis by host defense peptide LL-37. *Juntendo Medical Journal*. 2016;62(2):98-104.
119. Coffelt SB, Marini FC, Watson K, Zvezdaryk KJ, Dembinski JL, LaMarca HL, et al. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(10):3806-11.
120. Chieosilapatham P, Ikeda S, Ogawa H, Niyonsaba F. Tissue-specific regulation of innate immune responses by human cathelicidin LL-37. *Current Pharmaceutical Design*. 2018;24(10):1079-91.
121. Zuyderduyn S, Ninaber DK, Hiemstra PS, Rabe KF. The antimicrobial peptide LL-37 enhances IL-8 release by human airway smooth muscle cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117(6):1328-35.
122. Stockmann P, Park J, Von Wilmowsky C, Nkenke E, Felszeghy E, Dehner J-F, et al. Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells—a comparison of different tissue sources. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2012;40(4):310-20.
123. Krawiec JT, Weinbaum JS, Liao H-T, Ramaswamy AK, Pezzone DJ, Josowitz AD, et al. In vivo functional evaluation of tissue-engineered vascular grafts fabricated using human adipose-derived stem cells from high cardiovascular risk populations. *Tissue Engineering Part A*. 2016;22(9-10):765-75.
124. Pecci Lloret MP. Potencialidad de la Fibroína de Seda como Scaffold para reparación y regeneración pulpar. Proyecto de investigación:. 2018.
125. Huang GT-J, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Engineering Part A*. 2009;16(2):605-15.
126. Carrejo NC, Moore AN, Lopez Silva TL, Leach DG, Li I-C, Walker DR, et al. Multidomain peptide hydrogel accelerates healing of full-thickness wounds in diabetic mice. *ACS biomaterials science & engineering*. 2018;4(4):1386-96.
127. Yanagisawa T, Ishii M, Takahashi M, Fujishima K, Nishimura M. Human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 promotes lymphangiogenesis in lymphatic endothelial cells through the ERK and Akt signaling pathways. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(9):6841-54.
128. Tovar-Castillo LE, Cancino-Díaz JC, García-Vázquez F, Cancino-Gómez FG, León-Dorantes G, Blancas-González F, et al. Under-expression of VHL and over-expression of HDAC-1, HIF-1 α , LL-37, and IAP-2 in affected skin biopsies of patients with psoriasis. *International journal of dermatology*. 2007;46(3):239-46.
129. Koczulla R, Von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(11):1665-72.



130. Silva-Benitez E, Soto-Sainz E, Pozos-Guillen A, Romero-Quintana JG, Aguilar-Medina M, Ayala-Ham A, et al. Quantification of DNA in urinary porcine bladder matrix using the ACTB gene. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2015;51(10):1040-6.
131. Sawkins MJ, Bowen W, Dhadda P, Markides H, Sidney LE, Taylor AJ, et al. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. *Acta biomaterialia*. 2013;9(8):7865-73.
132. Singh P, Schwarzbauer JE. Fibronectin and stem cell differentiation—lessons from chondrogenesis. *Journal of cell science*. 2012;125(16):3703-12.
133. Christy BA, Herzig MC, Delavan CP, Abaasah I, Cantu C, Salgado C, et al. Use of multiple potency assays to evaluate human mesenchymal stromal cells. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2020;89(2S):S109-S17.
134. Murphy C, Kolan KC, Long M, Leu M-C, Semon JA, Day D. 3D printing of a polymer bioactive glass composite for bone repair. 2016.
135. Lazennec G, Lam PY. Recent discoveries concerning the tumor-mesenchymal stem cell interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2016;1866(2):290-9.
136. Zhuang W-Z, Lin Y-H, Su L-J, Wu M-S, Jeng H-Y, Chang H-C, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-based therapy: Mechanism, systemic safety and biodistribution for precision clinical applications. *Journal of biomedical science*. 2021;28(1):1-38.
137. Ayala-Ham A, Aguilar-Medina M, León-Félix J, Romero-Quintana JG, Bermúdez M, López-Gutierrez J, et al. Extracellular matrix hydrogel derived from bovine bone is biocompatible in vitro and in vivo. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2022;33(6):491-504.
138. Jiménez-Gastélum G, Ramos-Payán R, López-Gutierrez J, Ayala-Ham A, Silva-Benítez E, Bermúdez M, et al. An extracellular matrix hydrogel from porcine urinary bladder for tissue engineering: In vitro and in vivo analyses. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2022(Preprint):1-14.
139. Hussey GS, Nascari DG, Saldin LT, Kolich B, Lee YC, Crum RJ, et al. Ultrasonic cavitation to prepare ECM hydrogels. *Acta biomaterialia*. 2020;108:77-86.
140. Crum RJ, Capella-Monsonís H, Chang J, Dewey MJ, Kolich BD, Hall KT, et al. Biocompatibility and biodistribution of matrix-bound nanovesicles in vitro and in vivo. *Acta Biomaterialia*. 2023;155:113-22.
141. Pineau I, Lacroix S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *Journal of Comparative Neurology*. 2007;500(2):267-85.
142. Serrano Aullo T, Solanas Villacampa EM. Papel de progenitores de médula ósea en la regeneración hepática.
143. Martin P, Gurevich DB, editors. *Macrophage regulation of angiogenesis in health and disease*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*; 2021: Elsevier.
144. Lien M-Y, Chang A-C, Tsai H-C, Tsai M-H, Hua C-H, Cheng S-P, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 promotes VEGF-A expression in OSCC by activating ILK and MEK1/2 signaling and downregulating miR-29c. *Frontiers in oncology*. 2020;10:592415.



145. McHale C, Mohammed Z, Gomez G. Human skin-derived mast cells spontaneously secrete several angiogenesis-related factors. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1445.
146. Ma J, Wang Q, Fei T, Han J-DJ, Chen Y-G. MCP-1 mediates TGF- β -induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood*. 2007;109(3):987-94.
147. Yates CC, Rodrigues M, Nuschke A, Johnson ZI, Whaley D, Stolz D, et al. Multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells and fibroblasts combine to minimize skin hypertrophic scarring. *Stem cell research & therapy*. 2017;8:1-13.
148. Ardyanto TD, Osaki M, Tokuyasu N, Nagahama Y, Ito H. CoCl₂-induced HIF-1 α expression correlates with proliferation and apoptosis in MKN-1 cells: A possible role for the PI3K/Akt pathway. *International journal of oncology*. 2006;29(3):549-55.
149. Yang X, Guo J-L, Han J, Si R-J, Liu P-P, Zhang Z-R, et al. Chitosan hydrogel encapsulated with LL-37 peptide promotes deep tissue injury healing in a mouse model. *Military Medical Research*. 2020;7:1-10.
150. Pike DB, Cai S, Pomraning KR, Firpo MA, Fisher RJ, Shu XZ, et al. Heparin-regulated release of growth factors in vitro and angiogenic response in vivo to implanted hyaluronan hydrogels containing VEGF and bFGF. *Biomaterials*. 2006;27(30):5242-51.
151. Dissanayaka WL, Hargreaves KM, Jin L, Samaranayake LP, Zhang C. The interplay of dental pulp stem cells and endothelial cells in an injectable peptide hydrogel on angiogenesis and pulp regeneration in vivo. *Tissue Engineering Part A*. 2015;21(3-4):550-63.



12 ABREVIATURAS

BMP-2: Proteína morfogénica ósea 2

BMPs: Proteínas morfogénicas óseas

DBM: Matriz ósea desmineralizada

DMEM: Medio de Dulbelcos modificado por Eagle

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

FNT- α : Factor de necrosis tumoral alfa

MEC: Matriz extracelular

hUBM: Hidrogel de Matriz de vejiga urinaria

IL-6: Interlucina 6

IL-10: Interlucina 10

IL-12p70: Interlucina 12

INF- γ : Interferón gamma

MCP-1: Proteína quimioatrayente de macrófagos 1

OPG: Osteoprogenina

PBS: Solución buffer fosfato

RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear kb

SBF: Suero bovino fetal

SIS: Submucosa de intestino delgado

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta



Universidad Autónoma de Sinaloa



CONACYT

Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

UBM: Matriz de vejiga urinaria

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular



Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas



13 ANEXOS



OPEN ACCESS

EDITED BY
Janey Wachstein,
Francis Marion University, United States

REVIEWED BY
Samuel Eshotaqhe,
University of Benin, Nigeria
Jacoen Rouskens,
University of Twente, Netherlands
Muhammad Shafiq,
University of Central Punjab, Pakistan

*CORRESPONDENCE
Maribel Aguilar-Medina,
m.aguilar@uas.edu.mx

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to Polymeric
and Composite Materials,
a section of the journal
Frontiers in Materials

RECEIVED 07 February 2023
ACCEPTED 29 March 2023
PUBLISHED 06 April 2023

CITATION
López-Gutiérrez J, Ramos-Payán R,
Ayala-Hernández A, Romero-Quintana JG,
Castillo-Ureña H, Villegas-Mercado C,
Bermúdez M, Sánchez-Schmitz G and
Aguilar-Medina M (2023),
Biofunctionalization of hydrogel-based
scaffolds for vascular tissue regeneration,
Front. Mater. 10:1168626.
doi: 10.3389/fmats.2023.1168626

COPYRIGHT
© 2023 López-Gutiérrez, Ramos-Payán,
Ayala-Hernández, Romero-Quintana,
Castillo-Ureña, Villegas-Mercado,
Bermúdez, Sánchez-Schmitz and
Aguilar-Medina. This is an open-access
article distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License (CC BY).
The use, distribution or reproduction in
other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Biofunctionalization of hydrogel-based scaffolds for vascular tissue regeneration

Jorge López-Gutiérrez¹, Rosalio Ramos-Payán²,
Alfredo Ayala-Hernández³, José Geovanni Romero-Quintana²,
Hipólito Castillo-Ureña⁴, Carlos Villegas-Mercado⁵,
Mercedes Bermúdez⁶, Guzmán Sánchez-Schmitz⁶ and
Maribel Aguilar-Medina^{2*}

¹Faculty of Biology, Autonomous University of Sinaloa, Josefa Ortiz de Domínguez S/N y Avenida de las Américas, Culiacán, Sinaloa, Mexico, ²Faculty of Biological and Chemical Sciences, Autonomous University of Sinaloa, Josefa Ortiz de Domínguez S/N y Avenida de las Américas, Culiacán, Sinaloa, Mexico, ³Faculty of Odontology, Autonomous University of Sinaloa, Josefa Ortiz de Domínguez S/N y Avenida de las Américas, Culiacán, Sinaloa, Mexico, ⁴Faculty of Odontology, Autonomous University of Chihuahua, Circuito Universitario Campus I, Chihuahua, Mexico, ⁵Boston Children's Hospital and Harvard Medical School, Harvard University, Boston, MA, United States

Congenital and acquired tissue losses due to disease or trauma are a major world health problem. Regenerative therapy aims to fix damaged tissues by directing the natural capacity of a host organism to use biofunctionalized artificial tissue scaffolds. These three-dimensional (3D) scaffolds can be customized with cells and/or bioactive molecules to induce cellular homing and angiogenesis, essential to ensure successful tissue regeneration. Hydrogels (HGs) scaffolds are networks of hydrophilic homopolymers, copolymers, and/or macromers with chemical and biological activities that enhance their cell colonization. The use of HGs in regenerative medicine has shown to be advantageous since HGs can be prepared under clinical-grade conditions and tailored to the specific needs of the replaced tissue. They can be made to emulate native extracellular matrices (ECMs) including physical, mechanical, and chemical cues and resilience properties. These customized HGs can reproduce the natural hygroscopic capacity of the original tissue which improves cellular anchoring, nutrition, and waste disposal. They can enable host molecular and cellular modification conducive to a natural cellular microenvironment, modifying the properties of the scaffold, and improving chemotaxis, cell adhesion, migration, proliferation, differentiation, and angiogenesis; HGs can be created and biofunctionalized with linked growth factors and synthetic peptides tailored to positively influence scaffold colonization and functional biocompatibility. This review aims to collect the most relevant information regarding biofunctionalization of HGs used for vascular tissue regeneration, their biological effects, and their clinical implications. While most biofunctionalized HGs are still under investigation, some of them have been studied *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* with promising results. In this regard, *in vivo* studies have shown that biofunctionalized scaffolds with peptides such as chitosan hydrogel with LL-37 promotes angiogenesis and healing of pressure ulcers. Also, the GHK tripeptide is widely used in trials focused on guided tissue remodeling.

KEYWORDS

extracellular matrix, hydrogel, biological scaffolds, tissue engineering, biocompatibility, vasculogenesis, angiogenesis



Evaluation of biocompatibility and angiogenic potential of extracellular matrix hydrogel biofunctionalized with the LL-37 peptide

Jorge López-Gutiérrez^a, Rosalío Ramos-Payán^b, Jose Geovanni Romero-Quintana^b, Alfredo Ayala-Ham^c, Yolanda Castro-Salazar^c, Hipolito Castillo-Ureta^a, German Jiménez-Gastélum^a, Mercedes Bermúdez^a and Maribel Aguilar-Medina^{b,*}

^aFaculty of Biology, Autonomous University of Sinaloa, Josefa Ortiz de Domínguez s/n y Avenida de las Américas, Culiacán, Sinaloa, México

^bFaculty of Biological and Chemical Sciences, Autonomous University of Sinaloa, Josefa Ortiz de Domínguez s/n y Avenida de las Américas, Culiacán, Sinaloa, México

^cFaculty of Odontology, Autonomous University of Sinaloa, Josefa Ortiz de Domínguez s/n y Avenida de las Américas, Culiacán, Sinaloa, México

^dFaculty of Odontology, Autonomous University of Chihuahua, Circuito Universitario Campus I, Chihuahua, Chihuahua, México

Received 21 February 2023

Accepted 26 June 2023

Abstract.

BACKGROUND: Biomaterials promote revascularization for a successful tissue regeneration process. Biomaterials formulated from the extracellular matrix (ECM) have gained popularity in tissue engineering because of their superior biocompatibility, and due to their rheological properties, ECM-hydrogels can be easily applied in damaged areas, allowing cell colonization and integration into the host tissue. Porcine urinary bladder ECM (pUHM) retains functional signaling and structural proteins, being an excellent option in regenerative medicine. Even some small molecules, such as the antimicrobial cathelicidin-derived LL-37 peptide have proven angiogenic properties.

OBJECTIVE: The objective of this study was to evaluate the biocompatibility and angiogenic potential of an ECM-hydrogel derived from the porcine urinary bladder (pUHM) biofunctionalized with the LL-37 peptide (pUHM/LL37).

METHODS: Macrophages, fibroblasts, and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSC) were exposed pUHM/LL37, and the effect on cell proliferation was evaluated by MTT assay, cytotoxicity by quantification of lactate dehydrogenase release and the Live/Dead Cell Imaging assays. Moreover, macrophage production of IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, INF- γ , and TNF- α cytokines was quantified using a bead-based cytometric array. pUHM/LL37 was implanted directly by dorsal

*Corresponding author: Maribel Aguilar-Medina, Faculty of Chemical and Biological Sciences, Autonomous University of Sinaloa, Josefa Ortiz de Domínguez s/n y Avenida de las Américas, 80010 Culiacán, Sinaloa, México. Tel.: +52 667 713 7880; E-mail: maribelaguilar@uas.edu.mx.



La Sociedad Nacional de Investigadores en Odontología A.C. y la Universidad Autónoma del Estado de México

A través de la
Facultad de Odontología

OTORGA EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO A

Jorge Armando López Gutiérrez, Mercedes Bermúdez Cortes, Rosalío Ramos Payán, Geovanni Romero Quintana, Maribel Aguilar Medina.

por su **presentación oral** del tema:
"BIOCOMPATIBILIDAD DE UN HIDROGEL DE MATRIZ EXTRACELULAR DE VEJIGA PORCINABIOFUNCIONALIZADO CON EL PÉPTIDO LL-37"

Durante el marco del XXVIII Encuentro Nacional y XIX Iberoamericano de Investigación en Odontología.

Celebrado los días 18, 19 y 20 de noviembre de 2020.

ENIO
2020
XXXVIII Encuentro Nacional y XIX Iberoamericano
de Investigación en Odontología

DRA. EN C.S. EDITH LARA CARRILLO
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CDR. AMAURY DE JESÚS POZOS GUILLEN
PRESIDENTE DE SNIO









LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
A TRAVÉS DE LA **UNIDAD ACADÉMICA**
FACULTAD DE BIOLOGÍA



OTORGA LA PRESENTE

Constancia

A: **M.C. Jorge Armando López Gutiérrez, Dr. Rosalío Ramos Payan, M.C. Alfredo Ayala Ham, Yolanda Castro Salazar, M.C. German Jiménez Gastélum, Mercedes Bermúdez Cortes, Maryelv Parra-Niebla, Dr. Geovanni Romero Quintana, Dra. Erika de Lourdes Silva Benitez, Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina.**

Por su participación como **Ponente Modalidad Oral** en el marco de la **Jornada Sinaloense del Conocimiento 2019** " Bienestar y valores éticos para un cambio social" realizada del 07 al 30 del año en curso en las instalaciones de la Facultad de Biología, con el tema:

"Evaluación de la vasculogénesis estimulada por la presencia de MSC-AD en un hidrogel de MEC-V biofuncionalizado con el péptido LLS7"

ATENTAMENTE.-

"Vida Ciencia y Conciencia"

Culiacán Rosales, Sinaloa; octubre de 2019

DR. VICENTE OLIMÓN ANDALÓN
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA



M.C. JUANA CAZAREZ MARTÍNEZ
COORDINADORA ACADÉMICA







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
A través de
Facultad de Odontología

JORNADA UNIVERSITARIA DEL CONOCIMIENTO UAS - 2021

RECONOCIMIENTO

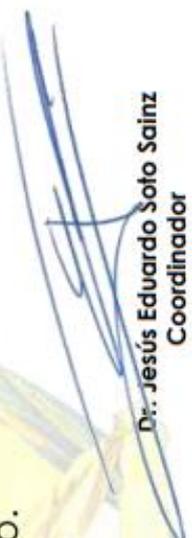
Otorga el presente:

A JORGE ARMANDO LOPEZ GUTIERREZ

Por su **PONENCIA VIRTUAL** titulada "Odontología y la Ciencia" durante la **Jornada Universitaria del Conocimiento UAS**, celebrada la semana del 8 al 12 de Noviembre de 2021, en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México.



Dra. Mirela Ramírez Álvarez
Directora



Dr. Jesús Eduardo Soto Sainz
Coordinador










Universidad Autónoma de Sinaloa



Facultad de Biología
Posgrado en Ciencias Biológicas




UANL
 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Facultad de Ciencias Químicas
 Subdirección Académica de Químico Farmacéutico Biólogo

OTORGAN EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A

Jorge Armando López Gutiérrez, Jose Geovanni Romero Quintana, Mercedes Bermúdez Cortés, Rosalio Ramos Payan , Elsa Maribel Aguilar Medina

por su participación como ponente(s) en la modalidad cartel del trabajo titulado:
Biocompatibilidad de hidrogel de MHV biofuncionalizado con el péptido LL.37 en macrófagos murinos

IMPARTIDO DENTRO DEL
**“VII Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina
 y V Simposio Nacional de Microbiología Aplicada”**
 WEBINAR LLEVADO A CABO LOS DÍAS 1 Y 2 DE OCTUBRE DE 2020

Alere Flamman Veritatis


 Dra. Argelia Vargas Moreno
 DIRECTORA FQO


 Dr. Isaias Banderas Rentería
 SUBDIRECTOR ACADÉMICO DE QFB


 VISION UANL 2030
 Múltiples de calidad para la transformación y el bienestar


 UNIVERSIDAD DE NUEVO LEÓN • SECRETARÍA DE CIENCIAS • FARMACIA Y QUÍMICA


 Advancing - UANL



JORNADA UNIVERSITARIA DEL CONOCIMIENTO UAS - 2021

SALUD Y BIENESTAR

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
A TRAVÉS DE LA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
Otorga el presente
Reconocimiento

Al M. en C. Jorge Armando López Gutiérrez

Por su valiosa participación en la presentación del cartel "Evaluación in vitro e in vivo de un hidrogel de matriz extracelular de vejiga porcina".

ATENTAMENTE
"Sursum Versus"
Coloquio Rosales, Sinaloa, a 04 de noviembre de 2021.

Vicente Olimón Andalcón
Dr. Vicente Olimón Andalcón
Director



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Odontología

Otorga la presente

CONSTANCIA

Dr. Jorge Armando López Gutiérrez

Por su participación con como **evaluador** en el concurso de carteles realizado por motivo de la **Jornada Universitaria del Conocimiento** celebrado el día 27 de octubre en Culiacán, Sinaloa.

Dra. Maricela Ramírez Álvarez
Directora de la FO-UAS

Dra. Mariana Melisa Avendaño Félix
Coordinadora de Investigación y
Posgrados FO-UAS