



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Aplicaciones terapéuticas de las vesículas extracelulares
derivadas de células madre mesenquimales**

**Therapeutic applications of extracellular vesicles
derived from mesenchymal stem cells**

Autor: Celia Gutiérrez Holanda

Director: Prof. José Carlos Rodríguez Rey

Santander, junio 2020

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Lista de abreviaturas | 5 |
| Resumen | 6 |
| 1. Introducción: células madre mesenquimales | 7 |
| Definición | 7 |
| Caracterización | 7 |
| Localización | 8 |
| Función | 9 |
| 2. Resumen de las aplicaciones terapéuticas de las CMM | 10 |
| • Enfermedad injerto contra huésped (EICH) | 10 |
| • Quemaduras | 10 |
| • Úlceras diabéticas | 11 |
| • Fístulas perianales en la enfermedad de Crohn | 11 |
| • Patología cerebral | 12 |
| • Patología cardíaca | 12 |
| • Patología de menisco | 13 |
| • Osteoartritis | 13 |
| 3. Factores solubles de las CMM | 15 |
| Cambio de paradigma | 15 |
| Principales acciones paracrinas de las CMM e identificación de mediadores paracrinos | 17 |
| 1. Citoprotección | 17 |
| 2. Neovascularización | 18 |
| 3. Efecto antiinflamatorio | 19 |
| 4. Estimulación de la regeneración endógena por células madre locales | 20 |
| 5. Efecto antifibrótico | 20 |
| 6. Efecto regulador del metabolismo | 21 |
| 4. Definición de secretoma | 22 |
| Ventajas del secretoma | 22 |
| Componentes del secretoma | 23 |
| Contenido del secretoma | 26 |
| 5. Efecto del secretoma sobre las patologías | 28 |
| 5.1 Efectos del secretoma en la angiogénesis y en la inflamación | 28 |
| ANGIOGÉNESIS | 28 |

| | |
|--|-----------|
| INFLAMACIÓN..... | 32 |
| 5.2 Efectos del secretoma sobre diferentes patologías | 35 |
| • Patología renal | 36 |
| • Patología hepática | 37 |
| • Patología cardiovascular | 39 |
| • Patología neurológica | 40 |
| • Patología pulmonar | 40 |
| • Curación de heridas | 42 |
| <i>Discusión</i> | 43 |
| <i>Conclusiones</i> | 45 |
| <i>Referencias</i> | 46 |

Lista de abreviaturas

BDNF – Factor neurotrófico derivado del cerebro

bFGF – Factor de crecimiento de fibroblastos básico

CD – Antígeno de diferenciación

CFU-F – Unidad formadora de colonias de fibroblastos

CMM – Célula madre mesenquimal

CMV – Cuerpo multivesicular

EGF – Factor de crecimiento epidérmico

FGF – Factor de crecimiento de fibroblastos

GDNF – Factor neurotrófico derivado de la glía

HGF – Factor de crecimiento de hepatocitos

IFN γ – Interferón gamma

IGF-1 – Factor de crecimiento insulínico 1

IL – Interleuquina

MC – Medio condicionado

MEC – Matriz extracelular

MSC – Mesenchymal stem cell

NGF – Factor de crecimiento nervioso

NK – Natural killer

RM – Resonancia magnética

TGF β – Factor de crecimiento transformante β

TLR – Receptor tipo toll

TNF – Factor de necrosis tumoral

VE – Vesícula extracelular

VEGF – Factor de crecimiento del endotelio vascular

vWF – Factor de von Willebrand

Resumen

Las vesículas extracelulares derivadas de células madre mesenquimales constituyen la base de nuevas y prometedoras terapias en medicina regenerativa. Se trata de un componente del material secretado por las células con actividad biológica demostrada, que reporta beneficios terapéuticos comparables a los observados con la terapia celular y que, incluso, mejora el perfil de efectos secundarios indeseados. A diferencia de la terapia celular, que implica un proceso técnico tedioso y permanente de extracción, aislamiento y expansión, el secretoma podría producirse masivamente a partir de líneas celulares disponibles comercialmente. Se evitaría así el procedimiento invasivo continuado de recolección de células y podría ser utilizado de inmediato para el tratamiento de afecciones agudas. A lo largo de este trabajo, se va a ir desgranando cuál es la situación vigente en la terapia con células madre mesenquimales y su producto de secreción y cuáles son los mecanismos moleculares implicados en la consecución de los efectos beneficiosos. Se hará también una pequeña revisión bibliográfica de su aplicación al tratamiento de diversos modelos de enfermedades inflamatorias y degenerativas.

Abstract

Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells are the cornerstone of a promising perspective for the development of new therapies in regenerative medicine. They are a component of its secretion material, with proven biological activity, which provide comparable therapeutic benefits to those observed in cell therapy and, even, improve the undesired profile of side effects. Unlike cell therapy, which involves a tedious and permanent technical process of extraction, isolation, and expansion, the secretome could be massively produced from commercially available cell lines, bypassing the continuous invasive procedure of cell harvesting and being immediately available for the treatment of acute conditions. The objective of this review is to present the current situation of mesenchymal stem cell therapy and its secretion product and the molecular mechanisms involved in the achievement of its beneficial effects observed in studies of the treatment of several inflammatory and degenerative disease models.

Palabras clave: células madre mesenquimales, secretoma, vesículas extracelulares, exosomas

1. Introducción: células madre mesenquimales. Definición. Caracterización. Localización. Función en el organismo.

Definición

Las células madre (o estromales) mesenquimales (CMM o, en la literatura inglesa, MSC) constituyen un conjunto heterogéneo de células adultas multipotentes con capacidad de autorrenovación y potencial para diferenciarse. Originalmente descubiertas por Friedenstein en estudios sobre la médula ósea en los años 60, en esta localización, las CMM constituyen parte de la fracción estromal –no exhiben potencial hemopoyético– y controlan la supervivencia, la proliferación y la diferenciación de las células madre hematopoyéticas. No obstante, las CMM se pueden aislar también desde otros tejidos adultos y perinatales, como el tejido adiposo, la pulpa dental, la placenta, el líquido amniótico, la sangre del cordón umbilical o la gelatina de Wharton.(1)

Caracterización

Cuando se aíslan, las CMM aparecen como una población celular heterogénea que se caracteriza por su capacidad de adherirse al plástico y de desarrollarse como unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F)(2). Cuando crecen en el cultivo, se detectan positivos ciertos marcadores de superficie (CD73, CD90 y CD105) mientras que otros son característicamente negativos (CD11b, CD14, CD34, CD45 y HLA-DR2)(1).

Las CMM en cultivo pueden diferenciarse en linajes celulares mesenquimales (osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células endoteliales y cardiomiocitos) y también en estirpes no mesenquimales (hepatocitos y células neuronales) (figura 1). Asimismo, poseen la habilidad de producir y secretar factores tróficos (factores de crecimiento, citoquinas, etc.) que promueven diferentes reacciones sobre múltiples tipos celulares.(3)

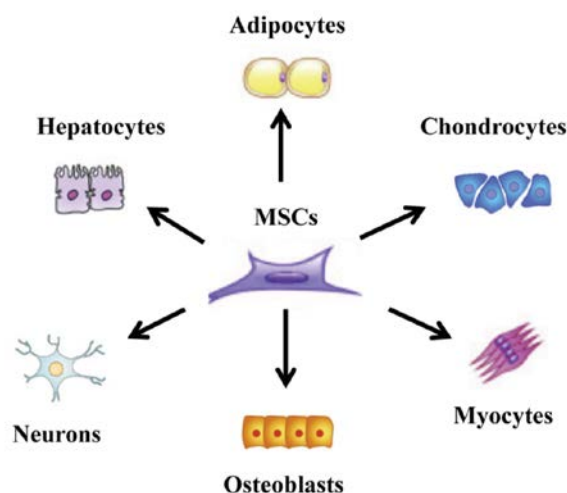


FIGURA 1. Diferenciación de CMM en diferentes linajes celulares. (4)

En esencia, las CMM pueden ser aisladas y cultivadas desde diversos tejidos y órganos conservando características biológicas y patrones de expresión de antígenos muy similares. No obstante, se han registrado diferentes matices en sus propiedades de diferenciación celular, proliferación y modulación funcional según el origen de obtención.(5)

Por ejemplo, se ha visto que las CMM del cordón umbilical exhiben una mayor capacidad proliferativa en comparación con las poblaciones de CMM obtenidas de otras fuentes y varios estudios han demostrado que las CMM derivadas de médula ósea presentan una mayor expresión de genes para el desarrollo pluripotencial, como Oct-4, Nanog y Sox-2, en comparación con las células aisladas del tejido adiposo y de la gelatina de Wharton.(5)

Del mismo modo, otros autores sugieren la existencia de diferencias a nivel proteómico, transcripcional y funcional entre las CMM de diferentes orígenes y demuestran que las CMM derivadas de tejido adiposo producen mayores niveles de factores proangiogénicos (VEGF, bFGF, HGF...) y factores neuroprotectores (BDNF, NGF, GDNF) y, por ello, podrían preferirse para las terapias dirigidas a enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas.(1)

A pesar de los hallazgos, los matices relativos a la caracterización de CMM en función de su origen siguen pendientes de más investigación y todavía está por establecer cuál debe ser la fuente de obtención de las CMM para cada aplicación terapéutica concreta, por lo que la discusión al respecto permanece abierta.

Localización

Estudios recientes muestran que las células madre mesenquimales son células pericíticas *in vivo*, en contrapunto con la creencia tradicional centrada en su potencial de diferenciación celular. Actualmente, el interés en las CMM estriba en el papel que desempeñan como moduladores celulares, pues esta característica constituye la base de un escenario terapéutico mucho más amplio.

En este sentido, se plantea que, durante una lesión local, las CMM se liberan de su localización perivascular, se activan y establecen un microambiente propicio para la regeneración tisular mediante la secreción de moléculas bioactivas y la regulación de la respuesta inmune en el lugar del daño.

La mayoría de los estudios realizados hasta ahora sobre CMM se han basado en su aislamiento, expansión y caracterización *in vitro*, mientras que su localización e identificación *in situ* permanece en desarrollo. Uno de los paradigmas más innovadores en este último aspecto es reconocer a la CMM como un pericito de modo que, para casi cualquier vaso sanguíneo (tanto venas como arterias), las células mesenquimales aparecen en una localización perivascular y están en íntimo contacto con la membrana basal y rodeadas de células endoteliales de la microcirculación (desde arteriolas precapilares hasta las pequeñas vénulas). Mediante técnicas de reconocimiento por marcadores de superficie celular, se ha comprobado que los pericitos aislados

compartían un panel idéntico al característico de las CMM “clásicas”. Este hecho es el que lleva a especular que todas las CMM son en realidad pericitos *in vivo* e implica una nueva visión en el papel tanto fisiológico como terapéutico que se supone para estas células.(6)

Función

Más allá de responder a estímulos y diferenciarse, las CMM establecen interacciones con las células del medio y proporcionan un amplio espectro de moléculas bioactivas con capacidad reguladora y reparativa.

En caso de lesión tisular, las CMM favorecen situaciones localizadas que resultan en el alivio y resolución de la agresión (tabla 1).(1)

| |
|--|
| 1. Inhiben la remodelación fibrótica. |
| 2. Inhiben la apoptosis. |
| 3. Promueven la angiogénesis. |
| 4. Reducen la respuesta inmune proinflamatoria. |
| 5. Estimulan el reclutamiento y la proliferación de células madre locales. |

TABLA 1. Efectos en el lugar de lesión tisular.(1)

2. Resumen de las aplicaciones terapéuticas de las CMM.

Entre los años 1995 y 2011 se llevaron a cabo diversos ensayos consistentes en la inyección de CMM (obtenidas de diferentes orígenes y tanto autólogas como alogénicas) en diferentes tipos de tejidos o bien en su infusión en el torrente sanguíneo. De esta forma, se observó cómo las CMM se localizaban en las zonas de tejido afectado, donde aparecían vasos sanguíneos dañados o inflamados.(7)

El listado de aplicaciones terapéuticas para las CMM es muy variado, tanto en la diana, en la indicación o en la propia condición clínica. Algunos de los ejemplos incluyen el trasplante de médula ósea, la enfermedad injerto contra huésped, el infarto agudo de miocardio, el ictus, las afecciones de la médula espinal, las afecciones pulmonares (como asma o EPOC), el fallo renal agudo, la fibrosis hepática, la diabetes juvenil, el síndrome por radiación, las quemaduras y heridas, la osteoartritis, la artritis reumatoide, el lupus, el autismo, la enfermedad inflamatoria intestinal, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, la incontinencia urinaria y la sepsis.(7)

- **Enfermedad injerto contra huésped (EICH)**

La EICH aguda sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad después de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, tanto en niños como en pacientes adultos, y aparece por diferencias de histocompatibilidad con el donante.

El escenario clínico más frecuente de las CMM es su aplicación terapéutica en pacientes que padecen EICH aguda tras un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas o por la infusión de linfocitos de donante. El empleo de CMM en el tratamiento de la EICH aguda ya se aplica en centros experimentados, no solo como terapia experimental, sino también como la mejor práctica clínica en resistentes a corticoides.(8)

- **Quemaduras**

Dos de los pilares clínicos en el tratamiento de las quemaduras son la curación rápida de la herida y el control sobre la inflamación.

El proceso inflamatorio desencadenado va a depender del área corporal total expuesto al daño y, en quemaduras extensas, puede incluso desembocar en un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y fallo multiorgánico. En esta línea, las CMM pueden mitigar el exceso de inflamación atenuando la proliferación de las células inmunes efectoras, modificando el perfil secretor de citoquinas y, de forma directa, liberando factores inmunosupresores y antiinflamatorios, como TGF- β 1, IL-4 e indoleamina 2,3 dioxigenasa.

Asimismo, las CMM se han demostrado capaces de aliviar la fibrosis y promover la remodelación en pieles tratadas con bleomicina, lo cual podría extrapolarse a favor de su uso para mejorar la curación de heridas con menor cicatrización.

Los resultados de estudios sobre modelos de quemaduras profundas en modelos de rata y cerdo muestran que la administración local (tópica) de CMM autólogas o alogénicas da lugar a una curación más rápida de la herida en comparación con los controles, la reducción del infiltrado inflamatorio y el aumento de la neovascularización y del tejido de granulación ((4) y referencias incluidas).

- **Úlceras diabéticas**

Las úlceras diabéticas son la principal causa de amputación de extremidad inferior y, hoy por hoy, no disponen de un tratamiento efectivo.

En la diabetes, todo el proceso de sanación de heridas aparece trastornado y existe un retraso en la curación de heridas con inflamación crónica. En términos generales, hay un desequilibrio molecular en el ambiente de curación que favorece la perpetuación de la inflamación y un aumento de las proteasas que destruyen componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento vitales para la curación. Además, los factores tróficos críticos para la angiogénesis se encuentran reducidos. Por todo ello, parece que la terapia perfecta para la curación de heridas en la diabetes debe modular la inflamación y favorecer la proliferación celular y la angiogénesis.

Las CMM se han demostrado eficaces moduladores de la inflamación, son capaces de estimular a otras células y promover la regeneración y producen factores de crecimiento que favorecen la angiogénesis, como VEGF, TGF- β 1, FGF e IL-6. (4)

Diversos estudios avalan su potencial terapéutico en las úlceras diabéticas crónicas. Se ha demostrado que la aplicación de CMM, tanto autólogas como alogénicas, acelera dramáticamente el cierre de heridas en pacientes diabéticos, consiguiendo cierres completos incluso en casos de falta de respuesta tras intentos de tratamiento con injerto. ((4) y referencias incluidas)

- **Fístulas perianales en la enfermedad de Crohn**

Los tratamientos farmacológicos actuales para las fístulas complicadas perianales presentan una eficacia muy limitada en su curación y, de hecho, el infliximab (anticuerpo monoclonal anti-TNF) es el único fármaco que ha mostrado ser eficaz en un estudio clínico controlado y aleatorizado. Cuando los pacientes resultan refractarios al tratamiento, existen pocas posibilidades de rescate y la cirugía se asocia con mucha morbilidad.

Sirviendo la necesidad de tratamientos novedosos para el abordaje de los pacientes no respondedores, aparece la opción de la terapia con CMM y, en este sentido, nos

encontramos con ensayos clínicos sobre la población de pacientes con enfermedad de Crohn con fístulas perianales complejas, difíciles de tratar, que no han respondido a la terapia convencional o al tratamiento con fármacos biológicos.

En un ensayo en fase 3, controlado y aleatorizado con doble ciego, un grupo de los pacientes fue tratado con una única inyección de CMM derivadas de tejido adiposo distribuida por la zona adyacente a la fístula anal y otro grupo recibió placebo. En la semana 24 de tratamiento, se compararon ambos grupos en función de la remisión combinada, esto es, tanto clínica (cierre de la abertura externa y ausencia de drenaje) como por prueba de imagen (confirmación por RM) y se observó que el 50% de los pacientes tratados con CMM alcanzaban la remisión frente al 34% de los tratados con placebo. Los resultados obtenidos tras el análisis estadístico permiten establecer la inyección de CMM como un tratamiento efectivo, seguro y con respuesta clínica rápida para las fístulas perianales complejas en pacientes con enfermedad de Crohn que no respondieron a la terapia convencional y/o con biológicos.

En la misma línea, otro ensayo en fase 1 demostró que la inyección local de CMM de tejido adiposo autólogas provocaba el cierre completo del orificio externo de la fístula 8 semanas después de la inyección en 3 de 9 pacientes, mientras que el cierre fue parcial en otros 5 pacientes. Por su parte, otro ensayo clínico en fase 2, con el mismo proceso, demostró el cierre completo en 21 de 42 pacientes a las 8 semanas.((9) y referencias incluidas)

- **Patología cerebral**

Una de las características reconocidas de las CMM es su capacidad de diferenciación en elementos neuronales, por lo que parece lógico pensar que la introducción de estas células en una zona isquémica del cerebro podría favorecer la regeneración del tejido comprometido y, de hecho, se ha comprobado que la inyección/infusión de CMM en este contexto promueve la ganancia de función. No obstante, experimentos en un modelo de rata sugieren que el mecanismo subyacente al efecto beneficioso de la aplicación de las CMM no es un proceso de diferenciación celular, pues no se detectaron de forma significativa marcadores neuronales típicos en las células mesenquimales aisladas.(7)

- **Patología cardíaca**

Por su parte, los modelos experimentales de reparación cardíaca han demostrado que la administración de CMM resulta en ganancia funcional al compararla con los controles, tanto en parámetros hemodinámicos como por ecografía. Este efecto puede deberse a varios factores, como la neovascularización del tejido, la inhibición de la fibrosis, la disminución de la apoptosis, la reinervación, e incluso la diferenciación de las CMM en nuevos cardiomiocitos. Por el momento, si las CMM son en general capaces o no de diferenciarse en células cardíacas *in vivo*, continúa en tela de juicio; sin embargo, sí que hay evidencia que apoya que estas células tienen potencial para diferenciarse en

cardiomiocitos cuando se inyectan en embriones de ratón y para expresar *in vitro* marcadores típicos de cardiomiocitos cuando se cultivan en la presencia de un agente demetilante del DNA (5-azacitidina) o niveles bajos de dexametasona. Si dejamos a un lado la controversia del potencial de diferenciación y nos centramos en el efecto trófico, se ha documentado que la implantación de CMM sobre un miocardio isquémico provoca un incremento en la concentración de VEGF, un aumento de la densidad vascular y del flujo sanguíneo y una reducción de la apoptosis. Todo ello muy influenciado por la secreción de moléculas bioactivas y, en cierta medida, por la diferenciación directa en células endoteliales.((7) y referencias incluidas)

No obstante, los experimentos no han demostrado de forma concluyente cuáles son los mecanismos por los que las CMM ejercen su efecto terapéutico en la recuperación de función cardíaca, pero sí que existen evidencias de que la aplicación de estas células desencadena un efecto positivo y deseado. En resumen, las CMM ejercen un efecto trófico significativo y deseable sobre la reconstrucción cardíaca, pero los mecanismos detallados subyacentes no están totalmente establecidos.

- **Patología de menisco**

El menisco es una estructura fibrocartilaginosa avascular en su tercio distal que, en la articulación de la rodilla, proporciona cohesión a la articulación femorotibial. Su condición avascular limita su reparación y, por ello, actualmente, la cirugía se basa en una retirada parcial o total del menisco dañado. Esta situación implica inestabilidad articular, erosión del cartílago, formación de osteofitos y osteoartritis progresiva.

Un estudio en cabras adultas a las que se les extrajo mediante cirugía parte del menisco demuestra que la aplicación de CMM previene la erosión masiva del cartílago y la formación de osteofitos y favorece la recuperación completa de la estructura articular, en comparación con los controles tratados con ácido hialurónico. El menisco regenerado fue morfológicamente, histológicamente e inmunocitoquímicamente igual al menisco típico, por lo que se propone que las CMM son capaces de inhibir la fibrosis y la apoptosis y de estimular la angiogénesis y la capacidad reparativa de las células locales.(7)

- **Osteoartritis**

La inyección local intraarticular de CMM en modelos experimentales animales parece generar diversos efectos, entre ellos, inhibición de la formación de osteofitos, disminución de los niveles de inflamación sinovial, limitación de la degeneración del cartílago y estimulación de la proliferación de condrocitos y de la síntesis de la matriz extracelular.(1)

Un estudio clínico en fase 1 ha demostrado que la inyección intraarticular de CMM de médula ósea autólogas en 6 pacientes con osteoartritis de rodilla es segura y mejora el dolor y la capacidad funcional articular. Además, imágenes de resonancia magnética

revelaron un aumento en el grosor del cartílago y disminución del edema subcondral en 3 de los 6 pacientes.(1, 10).

Los resultados de los estudios sobre el menisco y la osteoartritis apoyan la utilidad de las CMM en la regeneración del cartílago articular y en la limitación de su degradación en la patología destructiva.(1)

Es interesante destacar que, en la mayoría de los modelos de aplicación terapéutica, se considera que la utilidad de las terapias con CMM dista de su mera capacidad para la diferenciación celular y se resalta la acción mediada por comunicación intercelular. De hecho, la administración de CMM en cualquiera de las anteriormente mencionadas entidades clínicas parece generar cambios mediante dos actividades terapéuticas generalizables, esto es, la inmunomodulación y la actividad trófica. La capacidad de inmunomodulación parece estar mediada por dos vías, su material de secreción y el contacto célula-célula, mientras que los efectos sobre el trofismo celular los llevan a cabo mediante la secreción de moléculas que inhiben la apoptosis y la fibrosis, que estimulan la angiogénesis y que favorecen la división y diferenciación de los progenitores intrínsecos del tejido dañado.

3. Factores solubles de las CMM. Hacia un nuevo paradigma de la regeneración tisular.

La terapia celular con CMM se ha demostrado válida para la recuperación funcional de tejidos dañados, sin provocar rechazo, mediante, en esencia, procesos de angiogénesis y reducción de la inflamación sin causar inmunosupresión.(11) Aunque inicialmente se atribuyó la regeneración tisular de las CMM exclusivamente a su capacidad de diferenciarse a tipos celulares diferentes, existen varios mecanismos a través de los cuales las CMM son capaces ejercer un efecto terapéutico.

El primero de ellos, ya mencionado, es la diferenciación celular. Así, las CMM trasplantadas, mediante rondas sucesivas de división y diferenciación sustituirían a las células dañadas originales y generarían un tejido nuevo en sustitución del anterior (figura 2 C). Además, las CMM son capaces de interactuar directamente con células presentes en la lesión, cambiando su fenotipo (figura 2 B). Por último, las CMM pueden ejercer su función a través de la secreción de compuestos con actividad biológica capaces de actuar de forma paracrina sobre las células vecinas a través de las diferentes vías de señalización (figura 2 A). El efecto de estos dos últimos mecanismos es la modificación del microambiente de la zona de la lesión, para pasar de un estado en el que predomina la destrucción del tejido mediada por la inflamación a otro en el que todas las células presentes modifican sus fenotipos para contribuir a la regeneración.

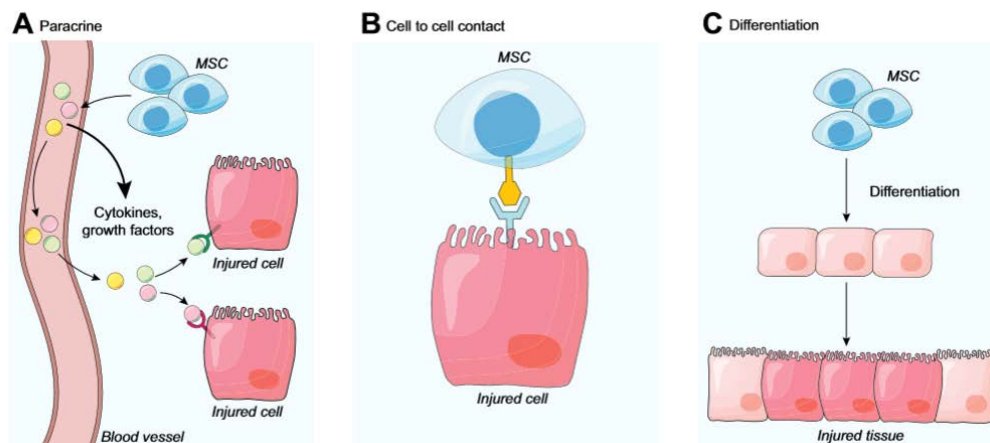


FIGURA 2. Mecanismos de acción de las CMM en la terapia celular.(5)

Cambio de paradigma

La hipótesis original, que consideraba que el proceso de regeneración tisular mediada por CMM trasplantadas se fundamentaba principalmente en la diferenciación celular, está siendo cuestionada por la existencia de cada vez más estudios que apuntan a que este proceso es probablemente bastante ineficiente.

En primer lugar, se ha demostrado que la tasa de enraizamiento de las CMM en el lugar donde ha tenido lugar el daño es bastante baja. Este hecho contrasta con la hipótesis de que la función de las CMM consista en reparar lesiones tisulares produciendo células

nuevas para reemplazar a las perdidas. Por otra parte, la supervivencia de las CMM en microambientes de daño es relativamente pobre y difícilmente podría justificar los efectos beneficiosos observados. Por último, hay evidencias de que, tras la administración sistémica, una proporción importante de las células queda atrapada como émbolos en los pulmones, debido a su tamaño y a la cantidad de receptores de adhesión celular en su superficie. A su vez, otra parte de las células administradas queda retenida pasivamente a su paso por los capilares de otros tejidos.(12)

La capacidad de diferenciación *in vivo* de las CMM es también objeto de controversia. El caso de la regeneración del músculo cardíaco constituye un buen ejemplo. Aunque en cultivo es posible la conversión de CMM en cardiomiocitos, no está claro que este proceso tenga lugar *in vivo* en las condiciones en que se ha descrito un efecto terapéutico de las CMM. De la misma forma, tampoco existen datos que apoyen la diferenciación de CMM en células renales. Las CMM son capaces de llegar a la región glomerular y peritubular, pero no se han detectado un cambio en los marcadores de diferenciación que sugiera que se hayan diferenciado en células renales tubulares.(12) De forma semejante, en los modelos de ictus, se estima que la tasa de diferenciación en tejido neural es prácticamente despreciable (3%) y la supervivencia de las CMM trasplantadas más allá de la segunda semana, desdeñable. A su vez, en los modelos de regeneración de heridas, los resultados parecen contradictorios y no hay certeza de que ocurra reparación tisular por medio de la proliferación y diferenciación de las células mesenquimales exógenas. Lo mismo sucede en los modelos de isquemia periférica, en los que la tasa de incorporación a las estructuras vasculares del huésped es también insignificante (menos del 1%).(12)

En los estudios recientes con CMM, se siguen registrando efectos de citoprotección y recuperación funcional en los resultados, pero estamos asistiendo un cambio de paradigma en el que los resultados ya no pretenden interpretarse en función de la generación de nuevo tejido viable a expensas de las células mesenquimales exógenas. En la actualidad, tanto las explicaciones de los autores, como el diseño de los ensayos, se inclinan por un mayor efecto de los productos de la secreción de las células mesenquimales.

Hoy día, la propuesta teórica con mayor valor científico, demostrada ampliamente en modelos experimentales de patología y daño tisular, es que las CMM trasplantadas generan beneficios anatómicos y funcionales a través de la secreción de factores solubles que actúan de forma paracrina. Estudios preclínicos no solo avalan esta hipótesis, sino que demuestran que el efecto beneficioso observado con la infusión de los factores solubles (el secretoma o medio condicionado, libre de células) sobre la función orgánica es igual, o incluso mejor, comparado con la técnica celular. En este sentido, parece imprescindible desarrollar la identificación de dichos factores de la secreción y caracterizarlos en función de su papel en el alivio de las patologías con el objetivo de aproximarnos al nuevo enfoque de la terapia basada en CMM.(12)

Principales acciones paracrinas de las CMM e identificación de mediadores paracrinos

El proceso de reparación de un tejido es extremadamente complejo. Se detiene la destrucción del tejido, se retiran los materiales y células de desecho y se preparan las células madre locales para, mediante la combinación de procesos de duplicación celular y diferenciación, dar lugar a las células necesarias para formar un tejido nuevo. El secretoma de las CMM desempeña un importante papel en todos estos procesos, ya que es capaz de bloquear la inflamación y la apoptosis, inducir la revascularización del tejido, impedir la formación de cicatrices y preparar a las células madre para la regeneración, regulando su metabolismo y su diferenciación (tabla 2). Existen muchas evidencias experimentales de que el medio condicionado/secretoma de las CMM posee efectos beneficiosos sobre todas las partes del proceso de regeneración tisular. A continuación, vamos a señalar unos ejemplos de cada uno de ellos. La información de este apartado se ha extraído de (12), en donde pueden encontrarse las referencias individuales.

| |
|--|
| 1. Citoprotección y reparación tisular. Bloqueo de la apoptosis y estimulación de la mitosis. |
| 2. Neovascularización. |
| 3. Efecto antiinflamatorio. |
| 4. Estimulación de la regeneración endógena por células madre locales. |
| 5. Efecto antifibrótico. |
| 6. Efecto regulador del metabolismo. |

TABLA 2. Efectos del secretoma de las CMM que favorecen la reparación.(12)

1. Citoprotección (inhibición de la apoptosis)

Detener la destrucción celular es esencial en el proceso de regeneración tisular. Las CMM bloquean la apoptosis mediante un mecanismo paracrino.

El cultivo de cardiomiocitos en medios con baja tensión de oxígeno es un modelo *in vitro* utilizado para estudiar el daño celular producido en el tejido cardíaco en condiciones isquémicas. En un cultivo de este tipo de cardiomiocitos de rata, la aplicación de un medio condicionado de CMM cultivadas en un ambiente hipóxico redujo la mortalidad de las células tanto por apoptosis como por necrosis. Se identificó a la sobreexpresión del gen Akt-1 como mediador del efecto. Este resultado fue posteriormente validado *in vivo* inyectando el medio condicionado de CMM que sobreexpresan Akt en un modelo de oclusión coronaria en ratas. La inyección del medio dio lugar a una disminución del tamaño del área infartada y a la preservación de la función. Es muy interesante que el empleo del medio condicionado (acelular) fue capaz de replicar los resultados

beneficiosos obtenidos en otros estudios con trasplante de CMM, lo que indica que gran parte de este efecto se debe a las sustancias secretadas por las células.

De la misma forma, un medio condicionado de CMM derivadas de médula ósea, se inyectó por vía intraperitoneal en un modelo murino de daño renal tubular. El resultado de la inyección del MC fue un descenso de la apoptosis y un aumento de la supervivencia de las células del túbulo, que se reflejaron en una mejoría significativa de la función renal.

Otro ejemplo de efecto citoprotector mediado por el producto de la secreción de CMM lo encontramos en los estudios sobre células de la línea embrionaria HEK 293, un modelo muy utilizado de epitelio renal humano. En cultivos de esta línea, el tratamiento con MC de CMM, previamente modificadas mediante la sobreexpresión de Lnc2, previno la apoptosis inducida por cisplatino, e indujo la expresión de factores de crecimiento y promitóticos.

Del mismo modo que en las situaciones anteriores, estudios sobre patología neuronal revelan datos de citoprotección y recuperación funcional tras la aplicación del secretoma mesenquimal. La inyección intravenosa de CMM en modelos de daño cerebral en ratas dio como resultado la estimulación de la producción de factores de crecimiento y tróficos por parte de células del tejido endógeno, principalmente astrocitos y células endoteliales. El aumento afecta sobre todo a los niveles de IGF-1, pero también hay un ascenso en los niveles de VEGF, EGF y bFGF. Todo ello se acompañó de una reducción del tamaño del infarto, una mejoría en el pronóstico funcional y en la plasticidad neuronal del tejido viable y neuroprotección. Muchos de estos efectos pueden obtenerse también mediante la inyección intraventricular de MC. En un modelo de ictus en ratas la inyección de MC de CMM dio como resultado una reducción en el tamaño del infarto y neuroprotección, efectos mediados por el inhibidor de metaloproteínasa-1 (TIMP-1) y la progranulina. En un modelo murino de daño cerebral por isquemia, la inyección de MC de CMM de tejido adiposo dio lugar a la recuperación de las funciones superiores (conducta y aprendizaje), reducción del déficit cognitivo a largo plazo y mejoría en la habilidad motora mediados por IGF-1 y BDNF.

2. Neovascularización

La formación de nuevos vasos es una parte importante de la formación del nuevo tejido en los procesos de regeneración tisular. Las CMM tienen de forma constitutiva un perfil secretor de citoquinas arteriogénicas y este perfil puede potenciarse mediante su cultivo en condiciones de hipoxia.

Mediante experimentos *in vitro* se demostró que el medio condicionado estimula tanto la proliferación como la migración de células endoteliales. Además, en estudios *in vivo*, la inyección de medio condicionado a ratones con isquemia periférica se demostró capaz de restablecer la circulación en las extremidades dañadas y la aplicación de un medio condicionado enriquecido en VEGF, HGF e IGF-1 sobre un sistema de insuficiencia renal aguda en ratas produjo un efecto vasculotrófico y un aumento de la densidad capilar.

El medio condicionado juega también un papel importante en la curación de las heridas mediante el reclutamiento de macrófagos y células endoteliales al lugar de lesión.

3. Efecto antiinflamatorio

En los procesos de respuesta al daño, el control de inflamación es imprescindible. La inflamación, necesaria en las primeras fases tras una agresión, debe desactivarse para proceder a la reparación. Las CMM funcionan a modo de interruptor promoviendo la conversión de un microambiente proinflamatorio a uno de formación de tejido. Este efecto antiinflamatorio de las CMM constituye la base de muchas de sus acciones terapéuticas.

Estudios *in vitro* muestran cómo la administración de CMM reduce la producción de citoquinas inflamatorias, como TNF- α , e inhibe la proliferación de células inmunes T y B, la producción de peróxido de hidrógeno en neutrófilos y el efecto citotóxico de linfocitos T y células natural killer (NK). Estos efectos de modulación de citoquinas, por un lado, y de células del sistema inmune, por otro, se ha visto reflejado en estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre múltiples modelos de la patología.

En un cultivo de células tubulares renales pretratadas con cisplatino, la aplicación de CMM dio como resultado la reducción en los niveles de TNF- α e IL-1 β . Del mismo modo sucede en un modelo de daño pulmonar *in vivo*, en el que se aprecia una disminución en los niveles plasmáticos de TNF- α , IL-6 e IFN γ en comparación con los controles.

Por su parte, la capacidad moduladora sobre las células inmunitarias aparece reflejada en un modelo animal de enfermedad inflamatoria intestinal en el que la administración de CMM resulta en la estimulación de la subpoblación de linfocitos T reguladores y en la reducción de los otros subtipos secretores de citoquinas proinflamatorias. En la misma línea, el trasplante de CMM en modelos experimentales de miocarditis aguda dio como resultados una disminución en las células CD68+ y en la expresión de proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) en el miocardio y alivio de la función cardíaca. La proteína MCP-1 parece desarrollar un papel importante en la patogenia de la miocarditis y se ha demostrado que el empleo terapéutico de CMM supone una reducción del daño mediado por esta vía. Igualmente ocurre en modelos de la patología neurológica, de tal forma que la inyección sistémica de CMM en un modelo de esclerosis múltiple en ratones resultó en la inhibición de la autoinmunidad mediada por células T.

En resumen, la propiedad antiinflamatoria de las CMM deriva de la producción y secreción de factores bioactivos, la estimulación e inhibición sobre diversos tipos celulares y la modulación de la secreción de citoquinas en otras células que participan en el proceso inflamatorio, de tal forma que limitan la expresión de moléculas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IFN γ , NO sintasa) y favorecen la sobreexpresión de aquellas antiinflamatorias (IL-10, bFGF, TGF- α , Bcl-2).

No obstante, el mecanismo exacto mediante el cual las CMM son capaces de regular la inflamación no es del todo conocido, por el momento.

4. Estimulación de la regeneración endógena por células madre locales

Una de las hipótesis más interesantes con respecto a los efectos terapéuticos mediados por CMM es que los factores producidos y liberados por estas células pueden inducir la regeneración endógena al estimular las células progenitoras residentes.

En el caso de la patología cardíaca, hay evidencia que sugiere que el trasplante de CMM puede activar las células progenitoras cardíacas y estimular la replicación de cardiomiocitos a través de su acción paracrina, mejorando así la regeneración cardíaca endógena. En este sentido, se ha demostrado que las CMM obtenidas desde médula ósea de rata secretan factores tróficos capaces de inducir la activación y proliferación *in vitro* de las células madre cardiogénicas. Asimismo, se ha comprobado que la administración intramiocárdica de factor de crecimiento hepatocitario (HGF) y factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-1) en la zona fronteriza del infarto es capaz de inducir la migración, proliferación y diferenciación de las células cardíacas progenitoras y, dado que las CMM liberan tanto HGF como IGF-1, particularmente bajo estimulación hipóxica, es razonable suponer que las CMM empleadas sobre corazones isquémicos puedan atraer y activar células madre cardíacas a través de estas moléculas. De hecho, un estudio en corazones de cerdo infartados demuestra cómo la inyección de CMM resulta en cardiomiocitos de nueva formación, pues el análisis histológico detallado revela la regeneración endógena de cardiomiocitos mediante la estimulación de c-kit en las células progenitoras y el ciclo celular de los propios cardiomiocitos.

Del mismo modo, estudios sobre modelos de enfermedad renal, neuronal y de curación de heridas muestran cómo la aplicación de CMM supone un incremento en la expansión y diferenciación de las células madre locales. En el caso de la patología renal, en ratones con insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino, las CMM se dirigieron al riñón dañado y aumentaron la proliferación de células tubulares. Por su parte, en un estudio *in vitro* sobre células progenitoras neuronales, se aplicó el medio condicionado derivado de CMM de médula ósea y se obtuvo como resultado la proliferación e incremento de la expresión de la proteína glial fibrilar ácida en células madre neuronales, diferenciación astrocítica y también diferenciación oligodendroglial. Como último ejemplo, el empleo de medio condicionado en diversos estudios sobre la curación de heridas resultó en la aceleración de la epitelización y del tejido de granulación, en la estimulación de la proliferación de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales por factores prometóticos y en el aumento de la producción de colágeno tipo I en los fibroblastos por modulación de su expresión genética.

5. Efecto antifibrótico

Las CMM son capaces de secretar un amplio rango de moléculas implicadas en la biogénesis del medio extracelular, como colágenos, metaloproteinasas, serinproteasas e inhibidores de serinproteasas, y también modulan la actividad secretora de otros tipos celulares responsables de la generación y remodelación de la matriz extracelular (MEC).

En el corazón, los productos de la secreción de las CMM modifican las propiedades de la matriz extracelular e inhiben el proceso fibrótico, esto es, disminuyen la cicatriz del

infarto, y la remodelación posisquémica. La administración de CMM sobre corazones de rata infartados redujo significativamente la expresión cardiaca de colágenos tipo I y III, inhibidor tisular de metaloproteinasa 1 (TIMP-1) y factor de crecimiento transformador beta (TGF- β) en comparación con los controles y, de modo muy similar, la aplicación del CM acelular disminuyó la proliferación de fibroblastos e inhibió la expresión de colágenos tipo I y III.

En el hígado, las CMM modulan la activación de las células estrelladas hepáticas (HSC) – las cuales se activan y proliferan en respuesta al daño hepático y favorecen la fibrogénesis– de tal forma que, restringen su producción colágena e incluso inhiben su proliferación. Los mediadores demostrados del efecto antifibrótico de las CMM en el hígado fueron IL-10, TNF- α y HGF.

En el pulmón, diversos estudios con CMM productoras de antagonista del receptor de IL-1 empleadas en el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina demuestran la validez biológica de esta molécula antiinflamatoria para reducir la severidad del proceso fibrótico. No obstante, el papel terapéutico de las CMM en la fibrosis pulmonar no está bien definido por el momento.

6. Efecto regulador del metabolismo

Ya hemos visto que las CMM y sus productos de la secreción son capaces de regular múltiples aspectos del microambiente (niveles y perfil de citoquinas...) y de las propias células vecinas (inhibición y activación...). En esta misma línea, se ha demostrado que las CMM también juegan un papel en la selección de rutas metabólicas favorables para la regeneración tisular y la recuperación funcional.

El empleo de CMM con sobreexpresión del gen Akt en un modelo de infarto agudo de miocardio en ratas dio como resultado la reversión del remodelado metabólico desfavorable típico de las fases agudas y subagudas tras un infarto de miocardio, consiguiéndose un pH normal no acidótico. En contraste, los controles no tratados presentaron un perfil metabólico acidótico perjudicial, que influye de manera negativa sobre el tamaño del infarto y la futura remodelación estructural ventricular.(13)

4. Definición de secretoma. Ventajas. Componentes. Contenido.

Recapitulando, hemos visto que, en un principio, se atribuía la capacidad terapéutica de las CMM a su condición de célula multipotente y, sin embargo, estudios sobre diferentes modelos de patologías en el laboratorio han ido desvelando que, en la mayoría de los escenarios, no es su capacidad de diferenciación lo que predomina en el proceso de alivio del daño tisular, sino, más bien, mecanismos controlados por moléculas de acción paracrina. El interés de este descubrimiento radica en la posibilidad de generar una nueva vía de terapias libres de células basada en los productos de secreción de las CMM, esto es, su secretoma.(14)

Hasta ahora, la administración de CMM se ha propuesto como un modelo válido para la regeneración de tejido funcional en el escenario de diversas patologías, pero su traducción a la clínica sigue enfrentando serios obstáculos.

Como ya se ha expuesto, en los últimos años, las CMM se han ido caracterizado por su capacidad secretora de diversas moléculas bioactivas en sus medios circundantes (el medio extracelular *in vivo* o el medio condicionado, MC, *in vitro*). El conjunto de las secreciones, denominado secretoma, puede aislarse fácilmente y provoca efectos beneficiosos demostrados en la regeneración tisular. Con el empleo del secretoma o de sus componentes se consiguen efectos similares a los producidos con el empleo de las propias CMM y su aplicación incluso presenta ciertas ventajas sobre la terapia basada en células.

El reconocimiento del secretoma como responsable principal de la amplia eficacia terapéutica derivada del empleo de CMM elimina muchos desafíos asociados con el uso de células replicativas vivas. Si bien las terapias de CMM se consideran en esencia seguras, tal como documentan múltiples estudios (15-17), el uso de células mesenquimales vivas conlleva riesgos consustanciales, como la oclusión en la microvasculatura debida a su tamaño o la transformación de células trasplantadas en otros tipos de células inapropiadas o cancerígenas. La capacidad de las CMM para diferenciarse en condrocitos y osteocitos también plantea problemas de seguridad a largo plazo por aparición de centros de osificación y calcificación ectópicos en los tejidos. Además, la terapia con células replicativas vivas también es arriesgada en el sentido de que las células introducidas no se pueden eliminar en caso de reacción adversa o simplemente al resolverse la enfermedad. Desde el punto de vista operativo, la producción de terapias basadas en células mesenquimales aún plantea desafíos importantes, ya que la viabilidad, la potencia biológica y la transformación de las células son factores difíciles de controlar y mantener en el proceso de fabricación y almacenamiento hasta su uso clínico en el paciente.(18)

Ventajas del secretoma

A diferencia de las células vivas, el secretoma, de tamaño nanométrico, no ocluirá la microvasculatura, no se transformará en tipos celulares indeseados y no persistirá como injertos permanentes al finalizar la terapia. Con respecto al proceso de obtención, su manufactura también es más adecuada para la optimización de la técnica, ya que la

fuente de células productoras podría seleccionarse clonalmente e inmortalizarse para garantizar la producción estandarizada y reproducible de secretagogos. Con todo, la terapia libre de células basada en el secretoma de CMM podría ser una modalidad de tratamiento más segura, más barata y efectiva (tabla 3), comparable al empleo de un fármaco comercial.(4, 18)

| |
|--|
| 1. Preservación y mantenimiento fáciles. |
| 2. Conservación por largos periodos de tiempo, asegurando sus propiedades. |
| 3. Producción a gran escala, como un fármaco convencional. |
| 4. Administración de dosis concretas y adecuadas. |
| 5. Procesos de extracción invasivos continuados no necesarios. |
| 6. Ahorro en tiempo y costes. |
| 7. Menor riesgo para tumores, reacciones antigénicas, rechazo e infección. |
| 8. Formato más seguro y conveniente. |

TABLA 3. Ventajas del secretoma respecto a la terapia celular.(19)

Como resultado de estas ventajas biológicas y logísticas sobre la terapia basada en CMM, la administración de secretoma derivado de CMM se ha considerado objeto de estudio para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias y degenerativas.(12)

Componentes del secretoma

En síntesis, el producto de la secreción de las CMM puede extraerse y aislarse, presenta ventajas frente a la terapia celular y ha demostrado su validez para la regeneración tisular en diversos ensayos. El secretoma hace referencia al conjunto de factores bioactivos derivados de CMM secretados al espacio extracelular (*in vivo*) o al medio condicionado (*in vitro*) y se compone de una parte soluble, principalmente, factores de crecimiento y citoquinas) y otra vesicular. Las vesículas extracelulares (VE) presentan una bicapa lipídica enriquecida en proteínas (tetraspaninas, integrinas, ligandos para los receptores de la superficie celular, etc.), que permiten su seguimiento y que participan en la adhesión y en la generación de respuesta biológica, y, en su interior, contienen una gran variedad de moléculas bioactivas derivadas de las CMM, incluyendo proteínas (enzimas, de señalización y transducción de señales...), material genético (DNA, fragmentos de RNA, microRNA y otros RNA no codificantes...) y lípidos.(2, 12)

La secreción de VE no es exclusiva de las células mesenquimales, sino que son segregadas también por otros tipos celulares, como linfocitos T, B, células dendríticas, plaquetas, mastocitos, células epiteliales, endoteliales, neuronas, células cancerígenas, oligodendrocitos, células de Schwann y células embrionarias. Las VE pueden encontrarse en fluidos fisiológicos, como la orina, la sangre, la leche materna, el LCR, el líquido amniótico o el líquido sinovial, y están implicadas en procesos fisiológicos y patológicos, como la respuesta inmune, la preservación de la homeostasis, la coagulación, la inflamación, la progresión del cáncer, la angiogénesis y la presentación antigénica.(3)

Las VE de origen mesenquimal engloban 3 subtipos vesiculares, los cuerpos apoptóticos, las microvesículas y los exosomas, distinguibles por su tamaño y por su proceso de formación en la célula. Los cuerpos apoptóticos representan las VE más grandes (> 1000 nm) y se forman por desintegración de las CMM durante la apoptosis. Las microvesículas, por su parte, son de menor tamaño que las anteriores (100–1000 nm) y se desarrollan brotando de la membrana plasmática celular. Por último, los exosomas serían las VE más pequeñas (30–200 nm) y se originan mediante un proceso de endogemación de las membranas de endosomas tardíos, llamándose entonces cuerpos multivesiculares (CMV). Tras la fusión de los CMV con la membrana plasmática, los exosomas son liberados por exocitosis en el medio extracelular.(12)

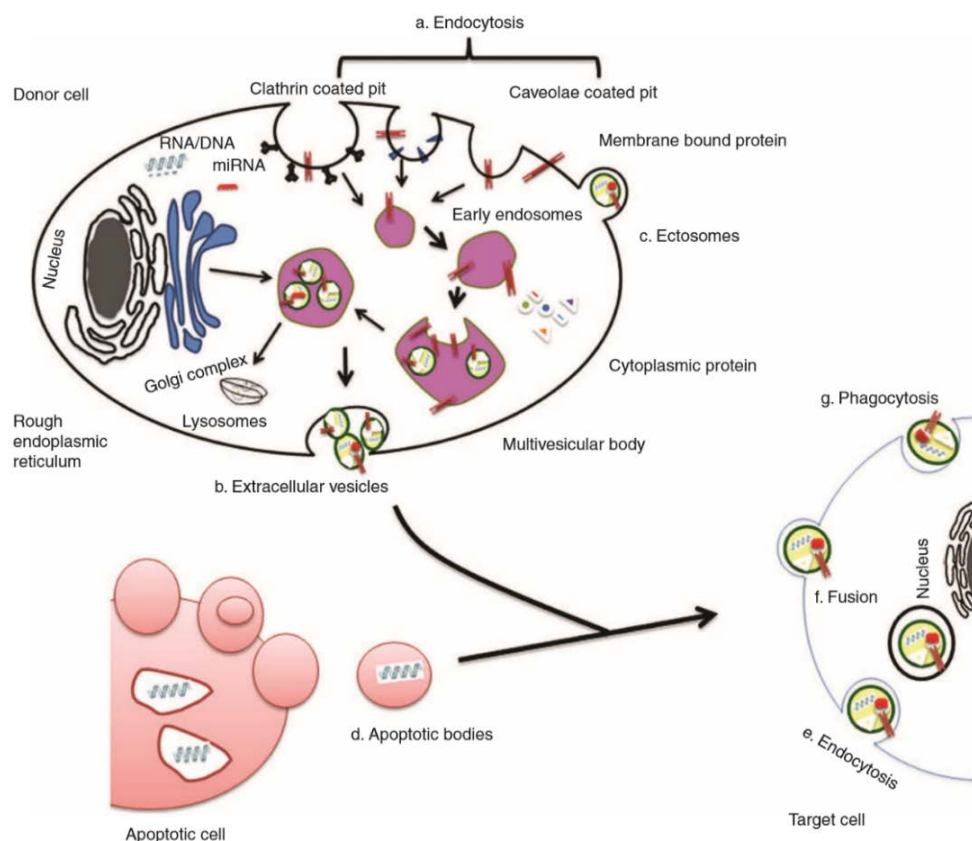


FIGURA 3. Formación de vesículas extracelulares.(3)

En esta figura (figura 3), se muestra de forma iconográfica el origen de cada subtipo de vesícula.

- a. Endocitosis.
- b. Endosomas tempranos, maduración a endosomas tardíos y fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana celular, con liberación de exosomas.
- c. Brote de la membrana plasmática y liberación de microvesículas.
- d. Cuerpos apoptóticos en formación.
- e. Endocitosis en célula diana.
- f. Fusión de membranas.
- g. Fagocitosis de vesículas.

Los 3 subtipos vesiculares y, en general y teóricamente, todos los componentes del medio condicionado de las células mesenquimales pueden separarse en el laboratorio por medios de centrifugación, filtración, metodologías basadas en precipitación de polímeros, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño. No obstante, los procesos de purificación presentan restricciones prácticas y, en concreto, la separación de microvesículas y exosomas se ve limitada por el hecho de coincidir en rangos de tamaño superpuestos. En consecuencia, cuando no se puede determinar por completo su separación, estos dos productos encapsulados se designan colectivamente como VE derivadas de CMM.(12)

Las VE pueden transportarse a sitios distantes a través de fluidos biológicos y, una vez alcanzan su lugar de acción, interactúan y se unen a la superficie celular diana y se internalizan, bien por medio de la fusión con la membrana celular, bien a través de la vía endocítica o bien por una interacción más específica con receptores de membrana (figura 4), para descargar su contenido intracelularmente.(19)

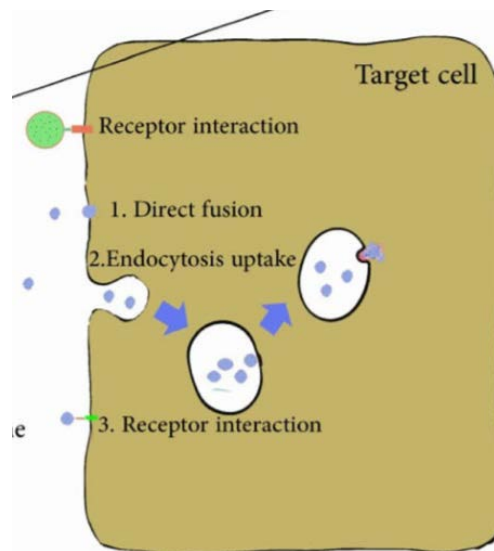


FIGURA 4. Vías de internalización de vesículas extracelulares en las células diana.(3)

Las vesículas extracelulares son fundamentales para la comunicación intercelular y pueden ejercer acciones tanto paracrinas como endocrinas y, en este sentido, tanto las microvesículas como los exosomas, pueden funcionar a modo de vehículos o transportadores estables para la transferencia de moléculas bioactivas, como citoquinas y factores de crecimiento para células adyacentes o distantes. Además, pueden ceder moléculas de RNA con el objetivo de modular la expresión génica o modificar la síntesis

de proteínas de las células diana. En este contexto, los productos de la secreción de las CMM van a promover la regeneración de los tejidos, a suprimir la respuesta inmune perjudicial y a inducir fenómenos de angiogénesis en tejidos isquémicos por medio de diferentes formatos moleculares y mecanismos de acción.

Contenido del secretoma

Con respecto a su composición, se ha demostrado que el secretoma de las CMM alberga una variedad de factores de crecimiento y diferenciación celular, incluyendo factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I, IGF-II), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos 2 o factor básico de crecimiento de fibroblastos (FGF-2 o bFGF), factor de crecimiento de queratinocitos o factor de crecimiento de fibroblastos-7 (KGF o FGF-7), factor de crecimiento de células endoteliales derivadas de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento neural (NGF) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); mediadores antiinflamatorios, como el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y las interleuquinas (IL) IL-6, IL-10, IL-27, IL-17 e IL-13; y mediadores proinflamatorios, incluyendo IL- 8 o CXCL-8, IL-9 e IL-1 β , factor de estimulación de colonias de granulocitos (GCSF), de macrófagos (GM-CSF) y la prostaglandina E2 (PGE2).(19)

Las CMM no liberan vesículas de forma indistinta, sino que su secretagogo y contenido secretor van a ser diferentes en función de su origen y de los estímulos que perciban del medio externo, esto es, el proceso de biogénesis y secreción de VE varía de un aislamiento celular a otro y está regulado por la información que captan de su microambiente.(19)

En este sentido, se ha comprobado que el secretoma presenta diferente potencial angiogénico en función del origen de la CMM. Como ejemplo, en la tabla 3 se recoge la variabilidad de la presencia de factores con capacidad angiogénica detectados en el análisis del producto de la secreción de células madre mesenquimales recogidas desde diferentes fuentes.

| Angiogenic factors | High | Low | None |
|-------------------------------|------------------------------|------------------------|-----------------|
| Angiogenic potential | WJ-MSC, BM-MSC, placenta-MSC | AT-MSC, umbilical cord | |
| VEGF secretion | AM-MSC, AT-MSC | CB-MSC, BM-MSC | |
| TGF- $\beta 1$ secretion | AM-MSC | AT-MSC | |
| VEGF-A, HGF, bFGF, ANG-1 | AM-MSC | AT-MSC | |
| M-CSF, IL-1ra, SDF-1 α | Primed perinatal MSCs | BM-MSCs | |
| MCP-1 | Perinatal MSCs | BM-MSCs | |
| IGF-1, IL-8, MMP-3, MMP-9 | AT-MSC | BM-MSC, D-MSC | |
| GRO | | BM-MSCs | AT-MSCs, D-MSCs |
| IL-6 | MSCs | | |
| VEGF-D | AT-MSC, BM-MSCs | | |
| FGF-2 | AT-MSC | | |

TABLA 3. Potencial angiogénico del secretoma de CMM según el origen celular.(2)

Además, el potencial angiogénico del secretoma puede incrementarse mediante la manipulación de las CMM, por ejemplo, con la exposición a PDGF, condiciones de hipoxia... Del mismo modo, otros de sus atributos beneficiosos, de interés para terapia, pueden también potenciarse modificando el microambiente de las CMM y, por ende, su perfil secretor. Por ejemplo, la habilidad inmunomoduladora del secretoma aparece aumentada tras la exposición de las CMM a citoquinas proinflamatorias, como TNF- α o INF- γ .(12, 19)

5. Efecto del secretoma sobre las patologías.

Las propiedades regenerativas de las células mesenquimales se producen, sobre todo, por su efecto en la angiogénesis y la inflamación. De esta manera, en primer lugar, se analizará el papel de los mediadores en ambos procesos y, seguidamente, se expondrán los principales hallazgos en la investigación con aplicación de secretoma sobre diferentes modelos de patología.

5.1 Efectos del secretoma en la angiogénesis y en la inflamación

ANGIOGÉNESIS

En la figura 4 se representa cómo las CMM aisladas de las 3 fuentes más comunes (tejido adiposo, médula ósea y cordón umbilical) y expandidas en cultivo liberan su secretoma *in vitro* e *in vivo*, actuando sobre mecanismos para la reparación de los tejidos y la angiogénesis.(2)

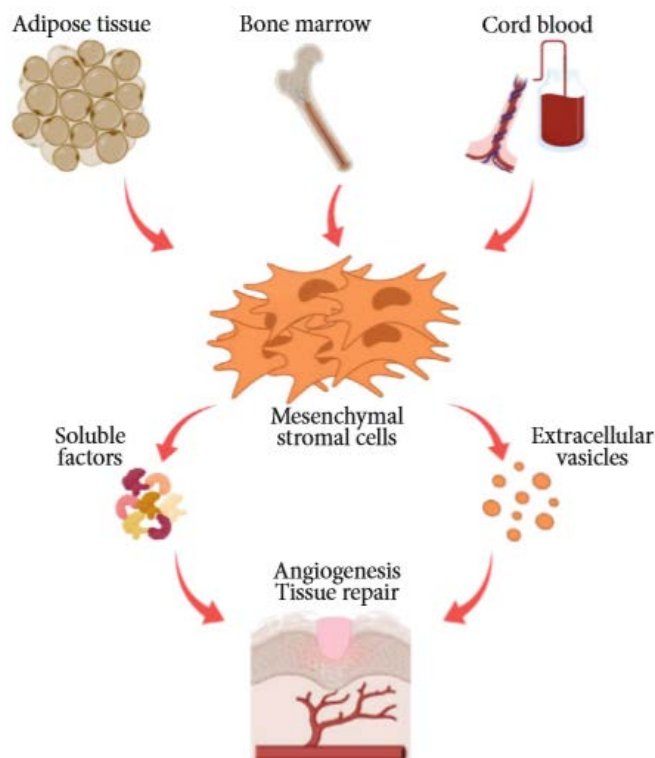


FIGURA 4. Relación de las CMM con el proceso de angiogénesis.(2)

El secretoma derivado de CMM promueve la formación de neovasos por mecanismos de actividad sinérgica entre moléculas bioactivas de naturaleza diversa transportadas por las VE, incluyendo proteínas, RNA no codificante (RNAnc) y lípidos.

Una publicación de Stem Cells International del 9 de marzo de 2020 recoge los hallazgos más actualizados en referencia a esta cuestión, los cuales se presentan a continuación de una forma más sintetizada. Las referencias concretas pueden encontrarse en esa publicación.(2)

- **Proteoma de las VE**

El análisis del contenido de las VE demuestra la presencia de múltiples factores de naturaleza proteica con poder angiogénico, entre los que se encuentran IGF-1, VEGF, IL-8, factor de von Willebrand (vWF), TGF- β 1, CD31, angiopoyetina, IL-6... Además, como ya se había comentado, el precondicionamiento de las CMM con factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) o el desarrollo de CMM en un entorno de hipoxia son condiciones que estimulan la secreción de VE con mayor poder angiogénico y, más en concreto, las VE de CMM tratadas con PDGF presentan un contenido enriquecido en c-kit, factor de células madre (SCF) y metaloproteinasas de matriz (MMP). Asimismo, La aplicación *in vitro* de las VE derivadas de CMM de tejido adiposo sobre células endoteliales microvasculares humanas (HMEC) induce la formación de estructuras vasculares.

En un modelo de lesión por isquemia-reperfusión en un colgajo de piel, se descubrió que las VE fomentan la recuperación del colgajo y la densidad capilar, mediante un mecanismo que involucra la acción de IL-6. Del mismo modo, también se ha estudiado el efecto protector de las VE derivadas de CMM sobre un modelo murino de lesión aguda renal por isquemia-reperfusión donde se obtuvo como resultado la formación de nuevas estructuras vasculares y el aumento de los factores angiogénicos CD31, vWF y angiopoyetina.

- **Ácidos nucleicos de las VE (fundamentalmente RNA no codificante)**

Además de los ya mencionados factores de crecimiento y proteínas, las VE también contienen moléculas de RNA no codificante. Dentro de este grupo, los microRNAs (miRNAs) son poderosos reguladores de la expresión génica. La señalización a través de este tipo particular de RNA se considera un mecanismo paracrino utilizado por las CMM para modular la angiogénesis por variaciones epigenéticas. Independientemente del tejido de origen de la CMM, el enriquecimiento de sus VE en miRNA ha demostrado promover la angiogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo* y se ha comprobado que los miRNA dirigen y modulan la expresión de genes angiogénicos reguladores que codifican para citoquinas, metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Entre los diferentes ejemplos de la actuación de los miRNAs podemos destacar los siguientes:

- miR-181b-5p, que modula la remodelación vascular cerebral en modelos de ictus.
- miR-23a-3p, miR-424-5p, miR-144, y miR-130a-3p que tienen como dianas más de 90 genes relacionados con el desarrollo de neovasos.
- miR-21-5p demuestra poder cardioprotectivo y estimulante de la angiogénesis en un modelo de infarto de miocardio en ratas.

Otro tipo de ncRNA con una alta representación en el contenido de las VE de CMM son los RNA de transferencia (tRNA) que, junto con los piwiRNA (piRNA), contribuyen al mantenimiento de la pluripotencia, promueven la supervivencia de la célula mesenquimal y regulan programas específicos de regeneración de tejidos. Asimismo, se ha comprobado que, otro tipo de RNA no codificante presente en las VE, en este caso los lncRNA (long-non-coding RNA), favorece la angiogénesis mediante la promoción de la diferenciación endotelial de las CMM.

• **Lípidos de las VE**

Los lípidos también son una parte integral de las VE, que proporcionan estabilidad y rigidez vesicular y participan en la interacción y captación celulares. Las VE presentan un contenido en lípidos diferente en función de la fuente celular, pero en general son ricas en colesterol, fosfolípidos (fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol), esfingomielina, glucofosfolípidos, diglicéridos, poliglicerol y gangliósidos GM3. Como resultado del alto contenido de lípidos, las VE tienen una capacidad inherente para atravesar barreras biológicas y escapar de la fagocitosis por el sistema reticuloendotelial, a la vez que son biocompatibles e inmunológicamente inertes. Algunos de los mediadores lipídicos con actividad biológica de las VE son los leucotrienos, el ácido araquidónico (AA), el ácido fosfatídico, las prostaglandinas (PG), la lisofosfatidilcolina... Se ha demostrado que los ácidos grasos van a influir en la producción de factores proangiogénicos en las CMM y se tiene constancia de que la estimulación con ácidos omega 6 y 9 durante su cultivo favorece el contenido vesicular de IL-6, VEGF y NO (factores proangiogénicos). Asimismo, la suplementación con lípidos durante el cultivo de las CMM se ha visto que aumenta la tasa de proliferación y las propiedades proangiogénica e inmunomoduladora.

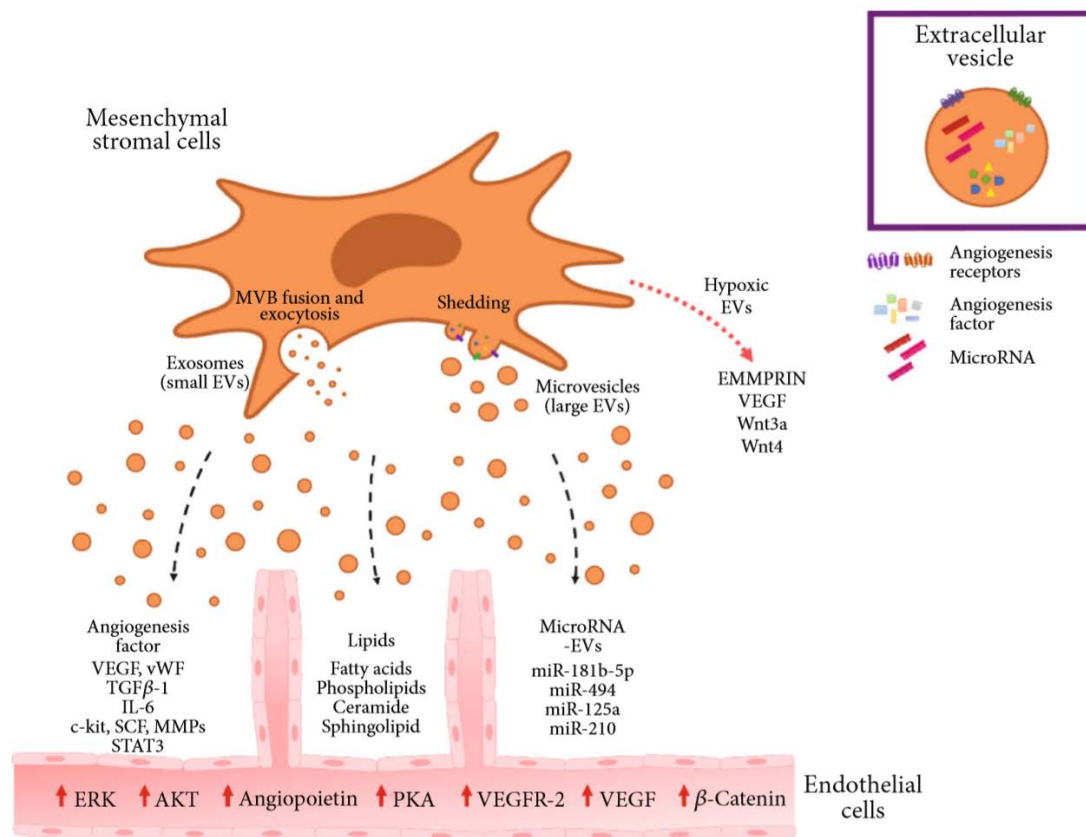


FIGURA 5. Efectos paracrinos de las CMM sobre las células endoteliales.(2)

En esta imagen (figura 5), se condensa la acción paracrina mediada por los componentes de las VE de CMM en la angiogénesis.

Como hecho comprobado, las células mesenquimales producen VE enriquecidas en factores proangiogénicos, incluyendo citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, miRNAs y lípidos que inducen mecanismos de señalización en las células endoteliales que favorecen la neoangiogénesis y, por ende, la reparación tisular. En situaciones de hipoxia, las CMM liberan VE aún más ricas en mediadores proangiogénicos, ampliando su potencial y su margen de acción para la regulación de la angiogénesis.

En vista a todo lo precedente, las CMM aparecen como una opción de alto interés para considerar en el terreno de la regeneración tisular y una promesa en potencia para su aplicación terapéutica enfocada a la aceleración de la reparación de los tejidos debido a su efecto proangiogénico. De hecho, el proceso de angiogénesis es esencial para la reparación tisular, ya que se requiere un entramado vascular adecuado para el aporte de sangre y factores de crecimiento en el tejido perjudicado.

INFLAMACIÓN

Estudios recientes demuestran que las CMM interactúan con los componentes de las respuestas inmunes innata y adaptativa y que, a través de sus interacciones, son capaces de desplegar acciones tanto antiinflamatorias (figura 6 y tabla 4) como proinflamatorias (figura 7 y tabla 5), es decir, las células mesenquimales presentan una dualidad fenotípica modificable y en respuesta a un microambiente inflamatorio determinado. Este concepto es crucial para entender y construir con fundamento su potencial terapéutico en los trastornos inmunes. Toda la información de este apartado, se ha extraído de la referencia (20) en donde pueden encontrarse las referencias individuales.

Se ha comprobado que, en presencia de un ambiente inflamatorio rico en TNF- α e IFN- γ (figura 6 A1) o tras la exposición a RNA de doble cadena (dsRNA) derivado de virus (figura 6 A2), las CMM se activan y adoptan un fenotipo inmunosupresor. El fenotipo MSC2 se caracteriza por un perfil secretor antiinflamatorio (incluyendo IDO, PGE2, NO, TGF- β , HGF y hemooxigenasa), por la inhibición de linfocitos T proinflamatorios y por favorecer la generación de linfocitos T reguladores (figura A3).

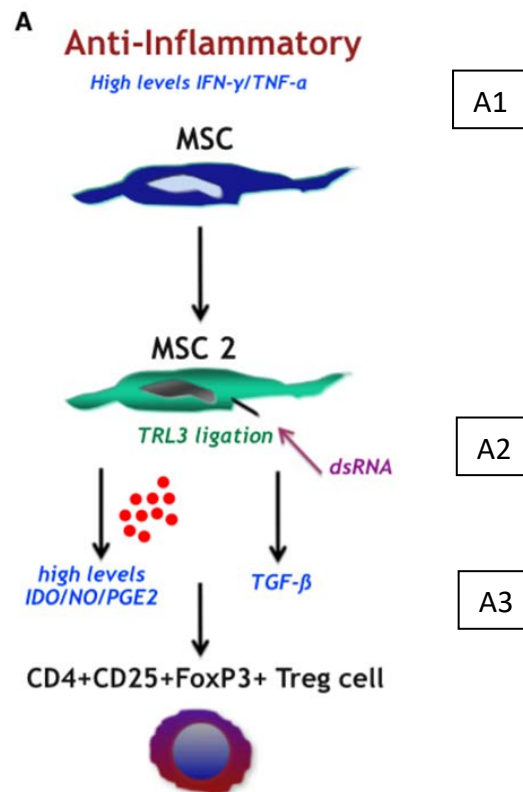


FIGURA 6. Polarización al fenotipo antiinflamatorio de la CMM (MSC2) y mediadores antiinflamatorios.

Por su parte, en ausencia de un ambiente inflamatorio propicio (niveles de TNF- α e IFN- γ bajos) (figura 7 B1) o tras la exposición al lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram negativas (figura 7 B2), la CMM adopta un fenotipo proinflamatorio MSC1. En este caso, el fenotipo MSC1 presenta un perfil secretor proinflamatorio y favorece la respuesta inmune T, a través de los mediadores quimiotácticos MIP-1a, MIP1-b, RANTES, CXCL9 y

CXCL10, que se unen a los receptores CCR5 y CXCR3 en la célula T (figura 7 B3). Se considera que el balance entre esta vía y la descrita con anterioridad es lo que establece una defensa adecuada en el huésped, de tal forma que se previene el daño tisular excesivo y se promueve la reparación tisular.

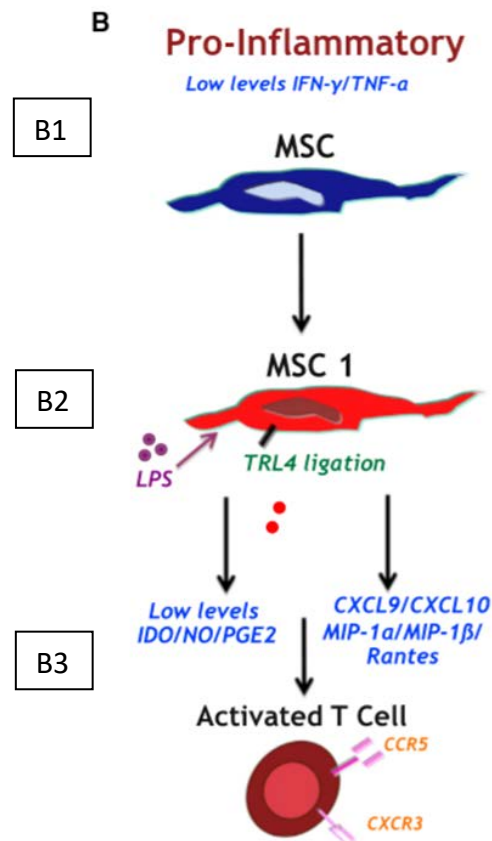


FIGURA 7. Polarización de la CMM al fenotipo proinflamatorio (MSC1) y mediadores proinflamatorios.

La respuesta inflamatoria constituye un sistema protector desencadenado por una infección o cualquier otro tipo de amenaza o daño tisular que sirve para la eliminación de los patógenos y preservar la integridad del organismo. Esta respuesta de defensa se inicia con el reconocimiento molecular a través de los receptores toll-like (TLR) presentes en las células efectoras del sistema inmune (SI) innato, lo cual desencadena la liberación de mediadores de la inflamación y activa células fagocíticas y estromales para constituir la primera línea de actuación (no específica) y el inicio del microambiente inflamatorio. En este contexto, la activación específica de los TLR por moléculas tanto exógenas como endógenas va a permitir establecer una respuesta inmune dirigida y apropiada al perjuicio percibido.

En función de la estimulación de los TLR de superficie, las CMM también van a ser capaces de modificar su fenotipo, resultando en diferentes efectos sobre la modulación de la actividad inmune y perfiles del secretoma. Las poblaciones CMM-TLR4 presentan un fenotipo MSC1 proinflamatorio (figura 7) y, por el contrario, las CMM -TLR3 se tornan MSC2 de perfil antiinflamatorio (figura 6). Las vías moleculares capaces de modificar la secreción de factores bioactivos en las CMM después del proceso de reconocimiento en

los TLR son aún desconocidas; sin embargo, el modelo de polarización celular en respuesta al microambiente supone una forma atractiva para explicar los efectos observados de las células mesenquimales sobre la inflamación, aparentemente contradictorios en un principio.

El perfil proinflamatorio de las CMM parece ser beneficioso en las fases más agudas de la inflamación, ya que ayuda a organizar una respuesta inmune apropiada. Las CMM expuestas a citoquinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF, IFN- α , IL-1 β) desarrollan un aumento en la expresión de un perfil específico de TLR en su superficie celular, de tal manera que incrementan su sensibilidad hacia el medio inflamatorio y colaboran en su mantenimiento; no obstante, una estimulación prolongada de estos TLR por sus ligandos va a provocar la disminución en la exposición de los tipos concretos TLR4 y TLR2, constituyendo así un mecanismo autorregulador y de seguridad para prevenir la hiperactivación indeseada de la respuesta inmune.

Por su parte, los monocitos desplazados hacia el sitio de la inflamación pueden, a su vez y de nuevo, en función del microambiente, desarrollar dos tipos fenotípicos diferentes: macrófagos activados M1 y macrófagos activados M2. La forma M1 estimula el proceso inflamatorio local mediante citoquinas proinflamatorias, mientras que los macrófagos M2 secretan un pool de citoquinas que alivian la inflamación y favorecen la regeneración tisular.

Las CMM se han demostrado capaces de influir sobre la actividad de los macrófagos dependiendo del contexto de la inflamación, por lo que podríamos proponer que la interacción de las CMM con el microambiente determina en última instancia cuál va a ser el comportamiento inflamatorio adoptado.

En un ejemplo de lo anterior, el escenario de macrófagos M1, células T y acúmulo de productos proinflamatorios desvía la balanza de la diferenciación fenotípica mesenquimal hacia el perfil MSC2 y, paralelamente, también hacia macrófagos M2. De esta manera, el equilibrio entre los efectos pro y antiinflamatorios queda establecido en función de la adopción de los diferentes fenotipos en las células mesenquimales y en los macrófagos y, a su vez, la balanza se inclina para un fenotipo u otro dependiendo del microambiente detectado y de los mediadores solubles.

En resumen, durante las primeras fases de la inflamación, las CMM parecen promover la migración y activación de neutrófilos para generar una respuesta inmune propicia (tabla 4), mientras que, en la inflamación crónica, la misión de las CMM es, todo lo contrario, inhibir la migración de células, proteger el tejido del perjuicio de la inflamación y promover la homeostasis (tabla 5).

CMM EN LA FASE MÁS AGUDA DE LA INFLAMACIÓN

- Reconocimiento de señales exógenas moleculares (patógenos).
- Producción de factores de crecimiento.
- Reclutamiento de neutrófilos.
- Estimulación de la actividad inflamatoria.
- Quimiotaxis de linfocitos.

TABLA 4. Acción de la CMM en las primeras fases de la inflamación.

CMM EN LA INFLAMACIÓN MÁS AVANZADA: SUPRESIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y LA INFLAMACIÓN PARA PROMOVER LA HOMEOSTASIS

- Favorecen el fenotipo de macrófagos M2 (se desconocen los mediadores).
- Favorecen la generación de Tregs (que son inmunosupresores).
- Favorecen la secreción de moléculas antiinflamatorias.

TABLA 5. Acción de la CMM en la inflamación cronicada.

5.2 Efectos del secretoma sobre diferentes patologías

Desde el primer informe en 2010, se ha ido demostrando que el exosoma de CMM es terapéuticamente eficaz en diferentes patologías, incluyendo la fibrosis hepática y la hepatitis por fármacos, las lesiones retinianas, la enfermedad isquémica periférica, el accidente cerebrovascular, las heridas cutáneas, las fracturas y la degeneración del cartílago. Este rango de actividad de los exosomas refleja la amplia eficacia terapéutica que se había reportado anteriormente con la aplicación de CMM en dichas patologías, lo cual podría sugerir que el beneficio clínico documentado se basa, en gran medida, en la acción de sus exosomas.(18)

En este punto, parece innegable el efecto regenerativo de las VE y los factores solubles y, más en concreto, las proteínas y los miRNA, presentes en el secretoma de las CMM sobre los principales órganos y tejidos después de una agresión. Sin embargo, dando un paso más allá, podríamos preguntarnos qué componente (o componentes) específico tiene el mayor peso en la generación de los efectos beneficiosos registrados. Un grupo de Singapur dedica una investigación en esta línea y establece como primer requisito para identificar la molécula candidata (proteína o miRNA con el potencial de provocar la respuesta terapéutica en las células diana) que debe estar presente en el secretoma (en el caso de su estudio, en los exosomas). Segundo, la molécula debe estar en una configuración biológicamente funcional. En el caso de la enzima proteica, esta propiedad podría evaluarse directamente por la actividad enzimática. Y tercero, la proteína candidata o miRNA debe encontrarse en una dosis terapéutica tal que sea capaz de provocar la respuesta biológica en la célula diana. Los resultados de su estudio sugieren que los miRNA considerados biológicamente relevantes no se encuentran en configuración ni concentración adecuadas en los exosomas, mientras que sí se demuestra presencia de dosis terapéutica de proteínas en una configuración apropiada.

Concluyen, por tanto, que las proteínas representarían la vía de acción más probable para los exosomas. (18)

En resumen, la idea fundamental que propone el grupo de trabajo de Singapur es que la simple presencia de una molécula concreta con potencial de provocar una respuesta terapéutica no es suficiente para implicar un papel mecanicista sin la debida consideración de su concentración y estructura. Además, proponen a las proteínas como el principal impulsor de la actividad terapéutica del exosoma de CMM.(18) No obstante, a pesar del atractivo de esta propuesta, otros estudios (como veremos más adelante) validan en sus investigaciones la actividad biológica y los efectos beneficiosos derivados de la aplicación de diversos tipos de miRNA en la terapia regenerativa, por lo que este asunto se mantiene aún abierto a la discusión.

Las VE fueron estudiados por primera vez en modelos de patología en 2010, en este caso en enfermedad miocárdica isquémica en un ensayo preclínico en ratones, y, posteriormente, se han ido desarrollando más investigaciones en otras situaciones clínicas. Se presentan, a continuación, los hallazgos de diversos estudios sobre modelos de patología, tanto *in vitro* como *in vivo*, que apoyan la validez del empleo del secretoma de CMM en el tratamiento de múltiples enfermedades inflamatorias y degenerativas.

- **Patología renal**

Varios estudios avalan la capacidad renoprotectora de las VE de CMM en modelos de lesión renal. En esencia, las VE son capaces de mejorar la función renal fomentando la proliferación de células tubulares y la neoangiogénesis y controlando la inflamación y el metabolismo oxidativo. Los mediadores involucrados en el proceso parecen ser principalmente RNA moduladores y algunas proteínas (factores de crecimiento). Para encontrar las referencias individuales consultar (3).

En un modelo de rata de lesión renal por isquemia-reperfusión, la inyección de VE de CMM mostró su eficacia para proteger a los animales del desarrollo de fracaso renal agudo mediante la reducción en la expresión de genes proapoptóticos (Bcl-xL, Bcl2, BIRC8) y la estimulación de otros antiapoptóticos (caspasas y linfotoxina alfa), lo que se tradujo en el incremento de la proliferación de células epiteliales tubulares y el alivio de la función renal. Además, se comprobó que el efecto renoprotector se abolía tras el pretratamiento de las VE con RNAsas, lo cual sugiere fuertemente que el efecto beneficioso observado depende, principalmente, de la acción de RNA moduladores.

A su vez, otro estudio sobre un modelo de fracaso renal agudo por isquemia-reperfusión en un modelo murino, demostró que las VE aplicadas presentaban un contenido enriquecido en factores de la transcripción proangiogénicos, como son VEGF, IGF-1 y bFGF, que favorecieron la recuperación de las células renales y, por ende, la recuperación general de la función renal.

En cuanto a sus efectos antiinflamatorios, las VE se han demostrado capaces de reducir el número de macrófagos presentes en el tejido renal dañado y, además, disminuyen la expresión de citoquinas proinflamatorias, como TNF α , IL-1 β e IL-6 y favorecen las

antiinflamatorias, como IL-6, de tal forma que se fomenta un ambiente adecuado para la regeneración y la recuperación funcional.

Por último, la capacidad antioxidante de las VE aparece reflejada en un estudio en ratas sobre un modelo de lesión renal aguda por isquemia-reperfusión en el que una sola inyección de VE de CMM detuvo la expresión de la NADPH oxidasa y la producción de especies reactivas de oxígeno en el tejido lesionado. La reducción del estrés oxidativo en las etapas tempranas del fracaso renal agudo implica protección frente a la fibrosis y mejoría de la función orgánica. En uno de estos estudios del efecto antioxidante de las VE, se descubrió que la vía principalmente implicada es la Nrf2/anti-oxidant response element (ARE) que, potenciada por las moléculas contenidas en las VE, activa la expresión de genes antioxidantes.

| |
|---|
| 1. Inhibición de la inflamación. |
| 2. Aumento de la angiogénesis. |
| 3. Reducción del estrés oxidativo. |
| 4. Aumento de la proliferación celular. |
| 5. Supresión de la apoptosis. |
| 6. Mejoría de la función renal. |

TABLA 6. Efectos renoprotectores de las VE de CMM.(3)

- **Patología hepática**

Los procesos de inflamación y fibrosis mantienen una relación muy estrecha en la enfermedad hepática. En respuesta a una agresión, las células inmunes residentes e infiltrantes secretan factores profibróticos, como TGF- β , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), IL-13 e IL-4, y favorecen la activación y proliferación de las células estrelladas hepáticas (HSC), productoras de matriz extracelular (MEC) en el hígado. De esta forma, las CMM encuentran dos vías de acción para ejercer sus efectos beneficiosos sobre el daño hepático; por un lado, pueden modular la inflamación y, por otro, son capaces de inhibir la actividad de las HSC.

Durante la fibrogénesis hepática, los macrófagos M1 proinflamatorios ubicados cerca de los miofibroblastos hepáticos activados secretan factores profibróticos, como TGF- β , PDGF y CCL2, que estimulan la activación, proliferación, quimiotaxis y la acción fibrogénica de los miofibroblastos; sin embargo, se ha comprobado que los macrófagos expuestos *in vitro* a los mediadores solubles de las CMM (NO, PGE2, IDO, IL-6, IL-10 y HLA-G) se polarizan a estados antiinflamatorios M2, que muestran una actividad fagocítica potenciada, debido a una mayor producción de IL-10 y a la disminución de la secreción de TNF- α e IL-12p40. Estos resultados sugieren que el secretoma de las CMM es capaz de inducir cambios en el perfil secretor de citoquinas de los macrófagos activados, limitando la activación de células profibróticas y promoviendo de forma indirecta la resolución de la fibrosis.

Por otro lado, las CMM también son capaces de modular directamente la actividad de los tipos celulares responsables de la fibrogénesis y, en este sentido, se ha comprobado que la secreción de IL-10, HGF, TGF- β 3 y TNF- α por parte de la CMM inhibe la proliferación de las HSC y, consecuentemente, disminuye la síntesis de matriz extracelular. Los mediadores TGF- β 3 y HGF inducen la detención del ciclo celular de las HSC en fase G0/G1, TNF- α e IL-10 inhiben la proliferación de las HSC activadas y HGF acelera la tasa de apoptosis.(5)

Además de prevenir y modular la fibrosis, el medio condicionado de las CMM genera efectos tróficos beneficiosos y hepatoprotectores, de tal manera que favorece la regeneración de hepatocitos dañados y evita su entrada en apoptosis. Las vías de señalización principalmente implicadas en estos procesos comprenden IDO-1/KYN, HGF, fibrinogen-like protein 1 e IL-6/gp130.(21)

En diversos estudios sobre modelos de fibrosis hepática, se ha determinado que la aplicación de VE provoca la inactivación de la vía TGF- β 1/Smad2, responsable de la transición a fibrosis en el hepatocito, mientras que favorece la acción de proteínas implicadas en la proliferación celular (PSCNA, ciclina D1) y de genes antiapoptóticos (Bcl-xL). Asimismo, los miRNAs parecen jugar un papel importante en la protección frente a la fibrogénesis hepática, de tal manera que las VE ricas en miR-125 mejoran la fibrosis hepática al bloquear la expresión de Smo (deteniendo la vía de señalización Hedgehog) y el miR-122 reduce la proliferación y la activación de las células responsables de la fibrosis hepática (HSC) y regula la expresión de otros genes relacionados con la producción de colágeno.(3)

Por otro lado, en modelos de hepatitis inmune, se demuestra que el empleo de VE provoca la disminución de los niveles séricos de ALT, genera un efecto antiinflamatorio beneficioso, con reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias y aumento de los niveles de otras antiinflamatorias y de la generación de linfocitos T reguladores, y, además, provoca un efecto antioxidante y citoprotector mediado por la peroxidasa GPX1.(3)

Por último, estudios sobre modelos de fallo hepático fulminante, recalcan la modulación de la respuesta inflamatoria y la activación de vías antiapoptóticas como principales mecanismos involucrados en la atenuación de la lesión hepática y en el aumento de la supervivencia. Particularmente, se destaca el efecto citoprotector específico demostrado del Y-RNA-1.(3)

| |
|--|
| 1. Aumento de la regeneración hepatocitaria. |
| 2. Reducción de la apoptosis. |
| 3. Supresión de la fibrosis hepática. |
| 4. Inhibición de la inflamación. |
| 5. Reducción del estrés oxidativo. |
| 6. Mejoría de la función hepática. |

TABLA 7. Efectos hepatoprotectores de las VE de CMM.(3)

- **Patología cardiovascular**

Un gran número de estudios experimentales demuestran que el secretoma derivado de CMM, más concretamente el subtipo de exosomas, genera efectos beneficiosos en la regeneración cardíaca. Una revisión más completa y las correspondientes referencias puede encontrarse en (3).

En este sentido, los hallazgos experimentales reportan que la aplicación de VE mesenquimales sobre modelos de patología cardíaca consigue reducir el tamaño del infarto, favorece la viabilidad y la contractilidad de los miocardiocitos y produce efectos antioxidantes, antiapoptóticos, antiinflamatorios, angiogénicos y cardioprotectores.

Los factores contenidos en las VE son capaces de modular el metabolismo acidótico típico de las lesiones isquémicas cardíacas, promoviendo el aumento de NADH y ATP, esto es, un perfil metabólico más favorable para la recuperación funcional. Además, fomentan la supervivencia de las células residentes mediante mecanismos que inactivan vías proapoptóticas (fosforilación de la vía c-JNK y reducción de la expresión de PUMA y p53) y que activan otras prometóticas (Bcl2 y VEGF). En cuanto a su habilidad antiinflamatoria, el empleo de VE sobre modelos de lesión miocárdica por isquemia-reperusión en ratones provoca una disminución en los niveles de infiltración local de macrófagos y neutrófilos.(3)

Diversos estudios recogen el potencial cardioprotector de los miRNAs almacenados en las VE, de tal manera que, en modelos de rata de infarto agudo de miocardio, el miR-22 genera un efecto antifibrótico por medio de la inhibición de methyl CpG binding protein 2 (Mecp2), el miRNA-19a presenta un efecto antiapoptótico por reducción en la expresión de PTEN y la activación de las vías Akt y ERK y el miR-210 favorece la angiogénesis.(3)

Finalmente, un estudio sobre un modelo de hipertensión pulmonar hipóxica en ratones define que la administración de VE mesenquimales se asocia a la reducción en la progresión de la propia hipertensión pulmonar y de la hipertrofia ventricular derecha, posiblemente por un mecanismo mediado por la inhibición de la señalización STAT3.(3)

| |
|---|
| 1. Reducción del tamaño del infarto. |
| 2. Inhibición de la inflamación. |
| 3. Estimulación de la angiogénesis. |
| 4. Disminución de la fibrosis cardíaca. |
| 5. Reducción de la apoptosis. |
| 6. Reducción del estrés oxidativo. |
| 7. Aumento de la proliferación celular. |

TABLA 8. Efectos cardioprotectores de las VE de CMM.(3)

- **Patología neurológica**

Las VE de CMM han demostrado potencial terapéutico para el tratamiento de numerosas enfermedades neurológicas y neurodegenerativas.

En el caso del ictus, estudios sobre modelos de accidente cerebrovascular agudo en ratas demuestran que las VE provocan un efecto neuroprotector a largo plazo, con recuperación funcional, aumento de la neurogénesis y angiogénesis y modulación de la respuesta inflamatoria posisquémica. El miR-133b fue el responsable de la remodelación neuronal y de la recuperación funcional y el miR-17-92 participó en la oligodendrogénesis, neurogénesis, plasticidad neuronal y en la recuperación funcional, posiblemente mediante la supresión de PTEN.

Las VE también se han probado en modelos de daño cerebral por trauma, escenario en el que se favorece la angiogénesis, la neurogénesis, la recuperación funcional y el aplanamiento de la inflamación. Además, un estudio sobre ratones demostró inhibición de la neuroinflamación reactiva y protección frente al deterioro de funciones cognitivas.

Por último, los hallazgos de estudios sobre modelos de enfermedad de Alzheimer determinan que la aplicación de VE enriquecidas en neprilisina –molécula que degrada el β -amiloide– reduce los niveles del péptido β -amiloide acumulado tanto extra como intracelularmente y, en este sentido, podríamos encontrarnos ante una vía terapéutica prometedora. En modelos de enfermedad de Parkinson, las VE mesenquimales provocan la parada de la apoptosis mediada por 6-hidroxi-dopamina en neuronas dopaminérgicas y, del mismo modo que en el Alzheimer, se podría ahondar más en este mecanismo en vistas a una terapia futura.

| |
|---|
| 1. Aumento de la neurogénesis. |
| 2. Aumento de la angiogénesis. |
| 3. Aumento del remodelado neuronal. |
| 4. Aumento de la proliferación celular. |
| 5. Inhibición de la neuroinflamación. |
| 6. Mejoría de la función neurológica. |

TABLA 9. Efectos neuroprotectores de las VE de CMM.(3)

- **Patología pulmonar**

La aplicación del medio condicionado de CMM ha demostrado efectos beneficiosos en diversos modelos animales de patología de enfermedad pulmonar aguda, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

En la lesión pulmonar aguda, la administración de VE mesenquimales se ha demostrado eficaz para disminuir tanto la entrada de células inflamatorias en el pulmón (neutrófilos, sobre todo), como la permeabilidad para el paso de proteínas, evitando de este modo la progresión a edema pulmonar. En esta línea, el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) contenido en las VE exhibe poder antiinflamatorio y reduce el

edema de pulmón en estudios sobre ratones, lo cual parece señalar a esta molécula como principal mediadora del efecto beneficioso reportado. No obstante, los RNA moduladores miR-17 y miR-204 aparecen también como mediadores antiinflamatorios demostrados en la patología pulmonar aguda.(3)

Con respecto a la patología asmática, los estudios de varios grupos de investigación han demostrado que las VE de CMM alivian la inflamación y la remodelación de las vías respiratorias en animales asmáticos, de tal manera que se redujeron los niveles de eosinófilos pulmonares, la expresión de TGF- β profibrótico y el depósito de fibras colágenas. Además, la aplicación sistémica de VE produjo la supresión de la respuesta inmune perjudicial Th2 y Th17 y se redujo el número de células T CD4+ productoras de IL-4, IL-5 e IL-17 y se favoreció el perfil secretor IL-10 y la actividad de los linfocitos T reguladores. En términos generales, el empleo de VE en modelos de asma propició un microambiente inmunosupresor en los pulmones que permitió una recuperación funcional favorable en los animales asmáticos.(21)

Varios grupos de estudio sugieren que los efectos beneficiosos de las VE derivadas de CMM en la EPOC son consecuencia tanto de la inhibición de la apoptosis en las células alveolares como de la supresión de linfocitos T (inmunomodulación). El principal mecanismo por el cual las VE parecen inducir la regeneración de las células epiteliales alveolares es dependiente del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y, en esta línea, las VE artificialmente enriquecidas en FGF-2 se han demostrado significativamente eficientes en la terapia de la EPOC en ratones, por lo que podría considerarse una vía interesante de estudio para el desarrollo de un nuevos tratamientos. Como curiosidad, en un estudio sobre ratas, la administración de VE revirtió los cambios inducidos por el humo de tabaco en la expresión de caspasa-3, p53, p21, p27, Akt y p-Akt, detuvo el depósito de fibras colágenas y restableció la función reparadora de los fibroblastos pulmonares.(21)

Por último, en la fibrosis pulmonar idiopática, el interés de las VE radica en sus componentes con efectos antifibróticos y, entre ellos, el miR-630 se demostró como el principal responsable de la supresión de genes profibróticos en los fibroblastos pulmonares. La administración de VE mesenquimales enriquecidas en miR-630 redujo significativamente la expresión de alfa actina de músculo liso en los fibroblastos pulmonares y contribuyó al alivio de la fibrogénesis. Otra vía de actuación demostrada de las VE en la FPI se encuentra en la supresión de la diferenciación miofibroblástica inducida por TGF-beta.(21)

| |
|--|
| 1. Disminución de la inflamación. |
| 2. Reducción del edema pulmonar. |
| 3. Estimulación de la regeneración y proliferación epitelial alveolar. |
| 4. Disminución de la apoptosis. |
| 5. Disminución de la fibrosis. |
| 6. Recuperación funcional. |

TABLA 10. Efectos neumoprotectores de las VE de CMM.(14, 21)

- **Curación de heridas**

Actualmente, las agresiones cutáneas representan uno de los escenarios clínicos más desarrollados para la introducción terapéutica de VE de CMM.

La aplicación local de VE derivadas de CMM de cordón umbilical en un modelo de lesión por quemaduras de segundo grado en ratas demostró un aumento significativo en diversos índices de curación (histológicos, moleculares...) en comparación con los controles tratados con solución salina o bien VE de fibroblastos de pulmón humano. Además, los efectos de reepitelización con VE se han comprobado también *in vitro* en queratinocitos y líneas de fibroblastos dérmicos y se ha demostrado que las VE favorecen la proliferación celular y reducen la apoptosis a través del mediador Wnt4 que activa las vías de señalización de la β -catenina y AKT.

- | |
|---|
| 1. Aumento de la tasa de reepitelización. |
| 2. Inhibición de la apoptosis. |
| 3. Aumento de la proliferación. |

TABLA 8. Efectos beneficiosos de las VE de CMM en la curación de heridas.(14)

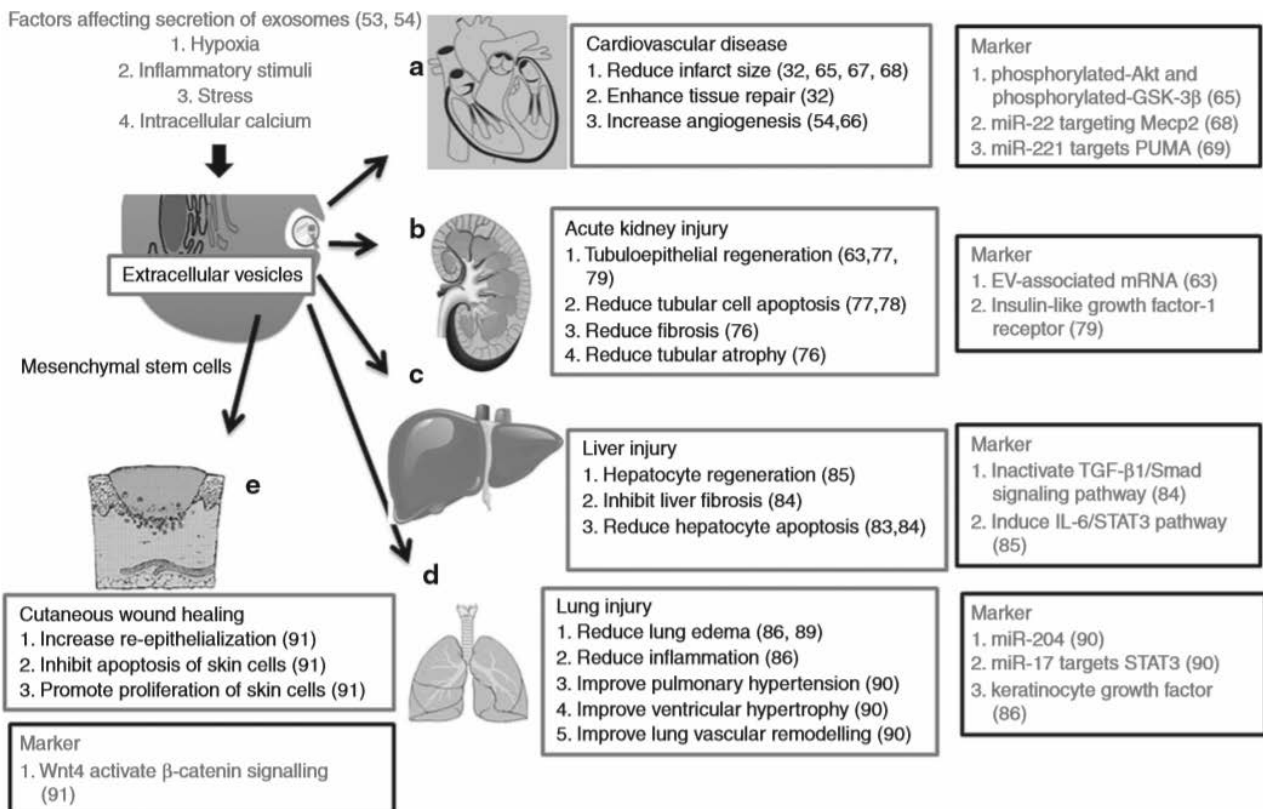


FIGURA 8. Beneficios terapéuticos y mediadores de acción de las VE derivadas de CMM en diversas patologías. (14)

Discusión

Las células madre mesenquimales son uno de los agentes terapéuticos con más futuro en el campo de la medicina regenerativa, pues su habilidad para diferenciarse en distintos linajes celulares, en conjunto con sus propiedades paracrina, las ha convertido en una opción clave para la reparación de tejidos. El número de ensayos clínicos que utilizan CMM aumenta a ritmo casi exponencial y se emplean en un repertorio creciente de patologías y de tejidos (9109 ensayos a 31 de mayo de 2020 registrados en <https://clinicaltrials.gov/>), siendo este amplio espectro de aplicación un reflejo de la ubicuidad de las CMM en el organismo.

Las CMM presentan la gran ventaja de ser muy poco inmunogénicas; de hecho, poseen la capacidad de regular la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, e, incluso, se han empleado en el trasplante de progenitores hematopoyéticos con la intención de evitar el rechazo(22) y en el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped(23). Además, la transformación maligna de las CMM es un suceso excepcional en las condiciones de cultivo habituales y no se ha podido demostrar en estudios *in vivo* que involucran del orden de 5000 pacientes(24). Por todo ello, aunque es cierto que se ha descrito algún caso de embolia pulmonar en pacientes tratados con CMM (25), en general, su utilización puede considerarse segura.

No obstante, a pesar de sus ventajosos atributos, los prometedores resultados de los ensayos con CMM encuentran un verdadero cuello de botella a la hora de ser trasladados a la clínica. Probablemente, una de las principales razones se encuentre en las dificultades para la estandarización de métodos. Por un lado, la identificación de las CMM es muy compleja y, en ausencia de marcadores únicos, se realiza en función de la presencia y ausencia de un número elevado de marcadores, así como de su capacidad de diferenciación. Quizás, debido a que las pautas de selección utilizadas son bastante rigurosas, existe la tendencia a considerar que todas las CMM que cumplen dichos criterios de identificación poseen capacidades terapéuticas idénticas y, sin embargo, numerosos ejemplos en la literatura sugieren que la procedencia de las células es, en sí, un factor diferenciador importante. Esta idea es aplicable no solamente al tejido, sino también a la situación de los donantes y a las condiciones de cultivo. A fin de cuentas, hay que considerar que las CMM son células vivas dotadas de una enorme plasticidad, capaces de adaptarse a condiciones muy diferentes. Por último, a diferencia de la mayoría de los medicamentos que conocemos, cuya producción puede escalarse en función de las necesidades, las CMM tienen una capacidad de expansión limitada y su producción depende de la disponibilidad de donantes y, con todo lo anterior, se apunta a la necesidad de homologar los protocolos de obtención, cultivo y administración para obtener mayor consistencia en los resultados.

Desde un primer momento, las CMM se caracterizan por su capacidad para diferenciarse en diversos linajes celulares y participar como elementos estructurales en la reparación de los tejidos; sin embargo, gracias a la investigación sobre múltiples modelos de enfermedades, se ha descrito que el principal mecanismo por el cual las CMM ejercen sus efectos terapéuticos es la comunicación con las otras células del entorno, bien mediante contacto intercelular, bien mediante la secreción de moléculas con actividad biológica. Este hecho ha supuesto un cambio de paradigma en el estudio de las

cualidades terapéuticas de las CMM(26) que se ve reflejado en el aumento del número de ensayos clínicos basados en las vesículas extracelulares derivadas de CMM, en particular, en los exosomas (<https://clinicaltrials.gov/>).

El empleo de los exosomas como agente terapéutico solventa muchos de los inconvenientes que conlleva la terapia celular. Por un lado, su condición de nanopartículas les permite atravesar barreras biológicas, como la hematoencefálica, que las CMM no pueden sobrepasar y, en el mismo sentido, su menor complejidad corre a favor de alcanzar una estandarización de protocolos mucho más sencilla y, por otro lado, aunque el riesgo de generación de tumores y/o procesos embólicos en la terapia con CMM es muy bajo, se reduce aún más con el uso de exosomas.

Las CMM pueden adoptar diferentes fenotipos en función de las condiciones de cultivo y de los estímulos a los que son sometidas y esta variabilidad se refleja en la cantidad y en la composición de sus exosomas. En este sentido, algunos autores han podido vincular un mayor rendimiento de exosomas a los cultivos 3D (27), a una mayor frecuencia de recolección o a una menor densidad celular de los cultivos (28). Asimismo, las CMM cultivadas en presencia de TNF α , IFN γ o TGF β son marcadamente más antiinflamatorias y poseen un mayor efecto inmunoregulador(29) y, además, se ha demostrado que el tratamiento de CMM con IL-1 β favorece e incrementa la secreción de miR-146a y, con ello, la eficacia de los exosomas en el tratamiento de la sepsis (28). Como último ejemplo, se ha comprobado también que los exosomas obtenidos de CMM cultivadas en presencia de PDGF poseen una capacidad neoangiogénica superior(30). Estos y varios ejemplos más (citados en (31)), ponen de manifiesto cómo la modulación de las condiciones ambientales de cultivo podría explotarse para conseguir exosomas más exclusivos, concebidos de manera específica en función de la patología concreta que haya que tratar.

Los exosomas constituyen unos vehículos ideales para el transporte de diversos tipos moleculares y, actualmente, muchos grupos de trabajo han concentrado sus investigaciones en el diseño de métodos para potenciar las propiedades terapéuticas de los exosomas, volviéndolos ricos en determinadas proteínas o miRNA. La manipulación para el enriquecimiento de exosomas puede conseguirse mediante la alteración genética de las CMM como, por ejemplo, a través de la sobreexpresión del factor de transcripción GATA, la mutación del factor de hipoxia HIF-1 α o la sobreexpresión de la quinasa Akt, dando lugar a exosomas que mejoran, respectivamente, la función cardíaca, la actividad angiogénica o la reparación del tejido cardíaco dañado (31). Otro modelo posible para el perfeccionamiento de la terapia con exosomas se basa en combinar su habilidad transportadora con el empleo de moléculas que determinan una mayor especificidad por determinados tipos celulares. En esta línea, en un experimento reciente, los exosomas procedentes de células dendríticas inmaduras conjugados con el aptámero sgc8 fueron capaces de liberar Doxorubicina y fluoróforos de forma específica a células de una línea de linfoma de células T(32).

La utilización de CMM en medicina regenerativa requiere el aislamiento y la producción mantenida de una elevada cantidad de células de una calidad compatible con la clínica. A pesar de que las CMM pueden expandirse con relativa facilidad, su capacidad de expansión es limitada y, por ello, es obligado estar persistentemente obteniendo nuevos

lotes de células a partir de donantes, lo cual implica la exposición de sujetos a técnicas invasivas de forma continuada. Por su parte, la producción comercial de exosomas a partir de cultivos primarios de CMM requiere, asimismo, un aumento de los aislamientos y un testeo continuo de la idoneidad de los lotes de células, lo que, sin duda, supone un impedimento para la viabilidad de la comercialización de preparados de exosomas. Por esta razón y en busca de una solución satisfactoria, varios grupos de investigación se han dedicado al desarrollo de líneas de CMM inmortales. La primera de ellas, obtenida mediante transfección de CMM de tejido adiposo con el oncogén myc, presenta algunas diferencias con las CMM originales, entre las que se encuentra un bloqueo para la diferenciación adipocítica, pero, aun así, se demuestra eficaz en la reducción de las lesiones en un modelo murino de isquemia y reperfusión miocárdica(33). Asimismo, como alternativa a esta práctica con oncogenes, se ha logrado obtener una línea celular mesenquimal inmortal mediante la inducción de la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT)(34).

Conclusiones

El producto de la secreción de las CMM aparece como una alternativa viable y ventajosa para el desarrollo de nuevas terapias en medicina regenerativa, que evita las limitaciones asociadas a las prácticas basadas en células madre. Las estrategias dependientes del secretoma se han demostrado válidas para reestablecer la funcionalidad de los tejidos dañados en múltiples modelos de enfermedad, a través de la transferencia de moléculas bioactivas, en especial, proteínas y RNA, de forma más segura y conveniente que las CMM. No obstante, todavía se requieren más estudios experimentales y clínicos que terminen por definir con precisión los protocolos para una producción industrial rentable y para la síntesis de secretomas más específicos, esto es, estandarizar los métodos de manipulación y precondicionamiento de las CMM inmortales para obtener secretomas adecuados para condiciones particulares de la patología.

Referencias

1. Maumus M, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: Role of secretome and exosomes. *Biochimie*. 2013;95:7.
2. Maacha S, Sidahmed H, Jacob S, Gentilcore G, Calzone R, Grive J-C, et al. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stromal Cells in Angiogenesis. *Stem Cells International*. 2020;2020:12.
3. Keshtkar S, Azapira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018;63:9.
4. Maranda EL, Rodriguez-Menocal L, Badiavas EV. Role of Mesenchymal Stem Cells in Dermal Repair in Burns and Diabetic Wounds. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2017;12:10.
5. Alfaifi M, Eom YW, Newsome PN, Baik SK. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2018;68:13.
6. Caplan AI, Correa D. The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011;9:5.
7. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006;98:9.
8. Bernardo ME, Locatelli F. Mesenchymal Stromal Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Methods in Molecular Biology. 2016:18.
9. Panés J, García-Olmo D, Assche GV, Colombi JF, Reinish W, Baumgart DC, et al. Expanded allogenic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *The Lancet*. 2016;388:10.
10. Emadedin M, Aghdami N, Taghiyar L, Fazeli R, Moghadasali R, Jahangir S, et al. Intra-articular Injection of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Six Patients With Knee Osteoarthritis *Archives of Iranian Medicine*. 2012;15:7.
11. Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *trends in Molecular Medicine*. 2010;16:7.
12. Gnecci M, Danieli P, Malpasso G, Ciuffreda MC. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Methods in Molecular Biology*. 2016:24.
13. Gnecci M, He H, Melo LG, Noiseux N, Morello F, Boer Rd, et al. Early Beneficial Effects of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Akt on Cardiac Metabolism after Myocardial Infarction. *Stem Cells*. 2009;27:9.
14. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *The American Society of Gene & Cell Therapy*. 2015;23:12.
15. Fernández O, Izquierdo G, Fernández V, Leyva L, Reyes V, Guerrero M, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells (AdMSC) for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: A triple blinded, placebo controlled, randomized phase I/II safety and feasibility study. *Plos one*. 2018;13(5):14.
16. Makhloogh A, Shekarchian S, Moghadasali R, Einollahi B, Dastgheib M, Janbabaee G, et al. Bone marrow–mesenchymal stromal cell infusion in patients with

chronic kidney disease: A safety study with 18 months of follow-up. *Cytotherapy*. 2018;20(5):10.

17. Safety and Efficacy of the Intravenous Infusion of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Patients With Heart Failure: A Phase 1/2 Randomized Controlled Trial (RIMECARD Trial [Randomized Clinical Trial of Intravenous Infusion Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Cardiopathy]) [database on the Internet]. 2017.

18. Toh WS, Lai RC, Zhang B, Lim SK. MSC exosome works through a protein-based mechanism of action. *Biochemical Society Transactions*. 2018;46:11.

19. Mosy SE, Radwan IA, Rady D, Abbass MMS, El-Rashidy AA, Sadek KM, et al. Dental Stem Cell-Derived secretome/Conditioned Medium: The Future Regenerative Therapeutic Applications. *Stem Cells International*. 2020;2020:29.

20. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013;13:10.

21. Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells*. 2019;8:34.

22. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 2007;110(7):2764-7. Epub 2007/07/20.

23. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579-86. Epub 2008/05/13.

24. Barkholt L, Flory E, Jekerle V, Lucas-Samuel S, Ahnert P, Bisset L, et al. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies--bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy*. 2013;15(7):753-9. Epub 2013/04/23.

25. Jung JW, Kwon M, Choi JC, Shin JW, Park IW, Choi BW, et al. Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy. *Yonsei medical journal*. 2013;54(5):1293-6. Epub 2013/08/07.

26. Akyurekli C, Le Y, Richardson RB, Fergusson D, Tay J, Allan DS. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem cell reviews and reports*. 2015;11(1):150-60. Epub 2014/08/06.

27. Zhang Y, Chopp M, Zhang ZG, Katakowski M, Xin H, Qu C, et al. Systemic administration of cell-free exosomes generated by human bone marrow derived mesenchymal stem cells cultured under 2D and 3D conditions improves functional recovery in rats after traumatic brain injury. *Neurochemistry international*. 2017;111:69-81. Epub 2016/08/20.

28. Patel DB, Gray KM, Santharam Y, Lamichhane TN, Stroka KM, Jay SM. Impact of cell culture parameters on production and vascularization bioactivity of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Bioengineering & translational medicine*. 2017;2(2):170-9. Epub 2017/09/22.

29. Harting MT, Srivastava AK, Zhaorigetu S, Bair H, Prabhakara KS, Toledano Furman NE, et al. Inflammation-Stimulated Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Inflammation. *Stem Cells*. 2018;36(1):79-90. Epub 2017/10/28.

30. Lopatina T, Bruno S, Tetta C, Kalinina N, Porta M, Camussi G. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal

stem cells and enhances their angiogenic potential. *Cell communication and signaling : CCS*. 2014;12:26. Epub 2014/04/15.

31. Park KS, Bandeira E, Shelke GV, Lasser C, Lotvall J. Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):288. Epub 2019/09/25.

32. Zou J, Shi M, Liu X, Jin C, Xing X, Qiu L, et al. Aptamer-Functionalized Exosomes: Elucidating the Cellular Uptake Mechanism and the Potential for Cancer-Targeted Chemotherapy. *Analytical chemistry*. 2019;91(3):2425-30. Epub 2019/01/09.

33. Chen TS, Arslan F, Yin Y, Tan SS, Lai RC, Choo AB, et al. Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs. *Journal of translational medicine*. 2011;9:47. Epub 2011/04/26.

34. Wolbank S, Stadler G, Peterbauer A, Gillich A, Karbiener M, Streubel B, et al. Telomerase immortalized human amnion- and adipose-derived mesenchymal stem cells: maintenance of differentiation and immunomodulatory characteristics. *Tissue engineering Part A*. 2009;15(7):1843-54. Epub 2009/01/08.