Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

XANADU como medio de expansión químicamente definido para células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga

AUTOR

Cecilia Isabel PAJUELO REYES

ASESORES

Dra. Martha Esther VALDIVIA CUYA

Dr. Juan Rigoberto TEJEDO HUAMÁN

Lima, Perú

2021

Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Pajuelo, C. (2021). *XANADU como medio de expansión químicamente definido para células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Cecilia Isabel Pajuelo Reyes
Tipo de documento de identidad	**DNI**
Número de documento de identidad	71024305
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7712-4453
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Martha Esther Valdivia Cuya
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06449624
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8301-5536
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Juan Rigoberto Tejedo Huamán
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08633602
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8434-7516
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Edith Fanincia Rodríguez Quispe
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09202308
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Giovanna Elizabeth Sotil Caycho
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25836223

Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Claudia Fiorella Barletta Carrillo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40846770
Datos de investigación	
Línea de investigación	**No aplica**
Grupo de investigación	**No aplica**
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt). -Banco Mundial. Contrato Nº 09-2019-FONDECYT-BM-INC.INV
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) País: España Departamento: Andalucia Provincia: Sevilla Calle: Calle Américo Vespucio 24 Latitud: 37°24′44″N Longitud: 6°00′21″O Edificio: Instituto de Enfermedades Tropicales-UNTRM País: Perú Departamento: Amazonas Provincia: Chachapoyas Distrito: Chachapoyas Calle: Higos Urco cuadra 1 Latitud: -6.23296 Longitud: -77.85316
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019-2020
URL de disciplinas OCDE	Biología del desarrollo https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.09 Otros temas de Biología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.16 Tecnologías que implican la manipulación de células, tejidos, órganos o todo el organismo https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.02

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)

Siendo las 15:05 horas del 19 de agosto de 2021, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue https://meet.google.com/wzq-ypud-usx, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **CECILIA ISABEL PAJUELO REYES.**
Luego de dar lectura y conformidad al expediente **N° UNMSM-20210032556,** la titulando expuso su tesis: **"XANADU como medio de expansión químicamente definido para Células Madre Mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **18**, calificativo: **APROBADO CON MENCIÓN HONROSA**.
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **CECILIA ISABEL PAJUELO REYES** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título conforme a ley.
Siendo las 17:00 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 19 de agosto de 2021.

Mg. EDITH RODRIGUEZ QUISPE
(PRESIDENTA)

UNMSM
Firmado digitalmente por VALDIVIA CUYA Martha Esther FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 19.08.2021 16:47:21 -05:00

Dra. MARTHA VALDIVIA CUYA
(ASESORA)

Mg. GIOVANNA SOTIL CAYCHO
(MIEMBRO)

Mg. CLAUDIA BARLETTA CARRILLO
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A mi querida mamá, por ser mi fortaleza y apoyo incondicional

A mi hermano, por ser mi cómplice y un genio en la animación.

A mis abuelitos "Mamá Vea" y "Papá Mimín", por criarme y darme su amor y confianza en cada paso que he dado.

AGRADECIMIENTOS

A mi universidad, la decana de América, por haberme formado en estos cinco años de carrera. A los excelentes profesores de mi facultad y en especial a mis compañeros de la base 15 de Genética y Biotecnología con quienes viví experiencia que siempre permanecerán en mi memoria.

A mi asesora interna, la Dra. Martha Valdivia Cuya, por su guía en mis años universitarios y por abrirme las puertas de su laboratorio Fisiología de la Reproducción por tres años, donde empecé a hacer ciencia y conocí a personas increíbles ¡Gracias equipo LFRA!

A mi mentor y asesor externo, el Dr. Juan Tejedo Huamán, por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar una pasantía y mi tesis en uno de los mejores institutos en el área de biomedicina, el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa en España. Por su constante apoyo y consejos que sin duda me hicieron crecer a nivel profesional y definieron mi línea de investigación.

Al equipo del laboratorio de Medicina Regenerativa 2 en CABIMER, a Ana y Fátima por hacerme parte del equipo con esa alegría que siempre las caracteriza, por sus consejos y enseñanzas. A Irene por hacer de mis almuerzos algo también especial.

A todos mis amigos del Instituto de Enfermedades Tropicales de la UNTRM, por su apoyo y compañerismo en la última etapa del desarrollo de mi tesis. A los doctores Rafael y Stella por sus consejos y apoyo en estos años tan difíciles a causa de la pandemia.

Finalmente agradezco a la entidad FONDECYT, quienes mediante el proyecto N°009-2019 “Implementación de una plataforma de referencia para el Control y Vigilancia de Enfermedades Parasitarias de Alto Impacto en el Perú y Desarrollo de un Dispositivo Multidiagnóstico en Puntos de Atención al Paciente” financiaron en parte la realización de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

1. **INTRODUCCIÓN** 1

2. **MARCO TEORICO** 3

2.1. **Definición de célula madre y tipos:** 3

2.1.1. **Según su potencialidad** 3

2.1.2. **Según su origen** 4

2.2. **Células Madre Mesenquimales** 5

2.2.1. **Marcadores de CMM** 6

2.3. **Propiedades de las CMM** 8

2.3.1. **Propiedades secretoras** 9

2.3.2. **Propiedades inmunomoduladoras** 9

2.3.3. **Migración y *homing*** 10

2.3.4. **Potencial de diferenciación** 10

2.4. **Potencial Terapéutico de las CMM** 11

2.4.1. **Enfermedades autoinmunes: Diabetes** 12

2.4.2. **Enfermedades inflamatorias: COVID-19** 13

2.5. **Terapias libres de células** 14

2.7. **Producción de CMMh y medios de cultivo** 16

2.7.1. **Medios de cultivo suplementados con SFB** 16

2.7.2. **Medios de cultivo químicamente definidos (MQD)** 17

3. **HIPOTESIS Y OBJETIVOS** 19

3.1. **Hipótesis** 19

3.2. **Objetivo general:** 19

3.3. **Objetivos específicos:** 19

4. **MATERIALES Y METODOS** 20

4.1. **Línea de células madre mesenquimales humanas (CMMh) utilizada:** 20

4.2.1. Subcultivo de las líneas celulares 20

4.3. Evaluación de la cinética de crecimiento y análisis prospectivo de la producción de CMMh 21

4.3.1. Evaluación morfológica, cálculo del tiempo de duplicación (Td) y doblaje acumulativo poblacional (CPD) 21

4.3.2. Análisis prospectivo de la producción de células expandidas 22

4.4. Caracterización inmunofenotípica mediante citometría de flujo 22

4.5. Evaluación de la capacidad de diferenciación 23

4.5.1. Diferenciación hacia condroblasto 23

4.5.2. Diferenciación hacia adipocitos 24

4.5.3. Diferenciación hacia osteoblastos 24

4.6. Evaluación del potencial inmunomodulador: Experimento de inmunosupresión 25

4.6.1. Obtención del secretoma 25

4.6.2. Aislamiento de esplenocitos 25

4.6.3. Cultivo de esplenocitos y marcaje con carboxifluoresceína succinimidil éster (CFDA) 26

4.6.4. Activación con fitohemaglutinina (PHA) 26

4.6.5. Evaluación por citometría mediante el marcador CFDA 26

4.6.6. Evaluación por microscopía 27

4.7. Caracterización de la expresión génica 27

4.7.1. Extracción de ARN total 28

4.7.2. Transcripción reversa (RT) 28

4.7.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) 29

4.8. Evaluación cariotípica de las líneas celulares de CMMh expandidas 29

4.9. Análisis estadístico 29

5. RESULTADOS 31

5.1. Evaluación de la morfología, cinética de crecimiento y análisis prospectivo de la producción de CMMh 31

5.2. Caracterización inmunofenotípicas de las CMMh 34

5.3. Evaluación de la capacidad de diferenciación de las CMMh 35

5.4. Comparación del potencial inmunomodulador del secretoma de CMMh 36

5.5. Caracterización de la expresión de marcadores de potencial de diferenciación. 38

5.6. Caracterización de la expresión de marcadores de inmunomodulación y migración y *homing* 39

5.7. Caracterización de la expresión de marcadores de regulación del ciclo celular. 40

5.8. Evaluación de la estabilidad cromosómica luego de un cultivo a largo plazo 42

6. CONCLUSIÓN 54

7. RECOMENDACIONES 55

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56

9. ANEXOS 82

i. ACRONIMOS Y ABREVIATURAS

XANADU	**X**eno-free and Hum**AN** Component- free Chemic**A**lly define**D** C**U**lture Media
CABIMER	**C**entro **A**ndaluz de **BI**ologia **M**olecular y **ME**dicina **R**egenerativa
CMM	Células Madre Mesenquimales
CMMh	Células Madre Mesenquimales humanas
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación
SFB	Suero Fetal Bovino
MQD	Medio Químicamente Definido
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
HLA-DR	Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo 2
FABP4	Proteína de unión a ácido grasos 4
RUNX2	Factor de transcripción 2 relacionado con *Runt*
IL-10	Interleucina 10
IDO	Indolamina 2,3-dioxygenasa
CXCL9	Quimioquina 9
CXCL10	Quimioquina 10
CXCR4	Receptor de quimioquina 4
pRb	Proteína del retinoblastoma
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbeco
Td	Tiempo de duplicación
CPD	Doblaje acumulativo poblacional
ml	Mililitros
µl	Microlitros
TA	Temperatura ambiente
RT	Retrotranscripción
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa
CFDA	Carboxifluoresceína succinimidil éster
PHA	Ficohemaglutinina

ii. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de las células madre según su origen y potencialidad. Imagen creada con el programa BioRender (biorender.com). 3

Figura 2. Características de las CMM según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT). 1) Adherencia al plástico, **2)** Expresión de marcadores de linaje **3)** Diferenciación a osteoblasto, adipocito y condroblasto. Imagen creada con el programa BioRender (biorender.com). 6

Figura 3. Propiedades principales de las CMM. 1) Potencial de diferenciación hacia los tres linajes: ectodermo, mesodermo y endodermo **2)** Secreción de factores como miARN, proteínas, exosomas y mitocondrias **3)** Propiedades inmunomoduladoras contra células efectoras: células NK, linfocitos B, T y macrófagos M1 y contra células reguladoras: macrófagos M2 y linfocitos Treg **4)** Migración y *homing* al sitio de la lesión. (Fuente: Sanchez-Castro et al., 2021) .11

Figura 4. Potencial terapéutico en casos graves de COVID-19. CMM, Célula madre mesenquimal; IDO, indolamina 2,3-dioxygenasa; IL-10, interleucina 10; TGFβ, factor de crecimiento transformante beta (TGF-β); TNFα, factor de necrosis tumoral alfa; INFγ, interferón gamma; IL-6, interleucina 6; IL1, interleucina 1; Th1, linfocito Th1; CTL, linfocito T citotóxico; ACE2, enzima convertidora de angiotensina 2.....13

Figura 5. Resumen gráfico del procedimiento para la evaluación de la capacidad de diferenciación. Imagen creada con el programa BioRender (biorender.com). 25

Figura 6. Resumen gráfico del procedimiento para el ensayo de inmunosupresión con esplenocitos. CFDA, carboxifluoresceína succinimidil éster; PHA, fitohemaglutinina. Imagen creada con el programa BioRender (biorender.com).27

Figura 7. Morfología a través de los pases de las CMMh cultivadas en medio XANADU y medio control. Se observa que la morfología de las CMMh en medio XANADU es similar a la encontrada en medio control (DMEM+10% SFB). En ambos cultivos las células son fibroblásticas y adherentes al plástico. Las figuras son representativas de 3 experimentos independientes. Ampliación de 100X....32

Figura 8. Evaluación de la cinética de crecimiento de las CMMh cultivadas en medios químicamente definidos y medio control. A. Tiempo de duplicación a través de los pases de las CMMh cultivadas en medio control (DMEM+10% SFB), medio XANADU o MQD-Comercial. **B.** Duplicación acumulativa de la población (CPD) a través de los pases. Los datos de A y B son la media más la desviación de tres experimentos independientes o replicas excepto para MQD-Comercial que

corresponden a la única replica realizada. T-student, *p < 0.05 estadísticamente significativo frente al medio control.....33

Figura 9. Caracteristicas fenotípicas de las CMMh cultivadas en medio XANADU y otros medios. Citometría de flujo en los pases 6, 10 y 13 de los marcadores positivos de membrana: CD73, CD90 y CD105; y negativos: CD45, CD34 y HLA-DR de las CMMh expandidas en medio XANADU, medio MQD-Comercial y medio control (DMEM+10%SFB). El eje Y representa el porcentaje de células marcadas. Los resultados corresponden a la media más la desviación de al menos tres experimentos independientes o replicas excepto para MQD-Comercial que corresponden a la única replica realizada. No se observaron diferencias significativas. HLA, antígeno leucocitario humana-DR. 35

Figura 10. Capacidad de diferenciación multilinaje de las CMMh cultivadas en medio XANADU y medio control. Se observa la formación a partir de CMMh del pase 10 de adipocitos marcados en rojo con *oil red*, de osteoblastos también marcados en rojo con *alizarin red* y de condroblastos marcados en azul con *alcian blue*. Las figuras mostradas tienen aumento 100x y son representativas de tres experimentos independientes.....36

Figura 11. **Actividad inmunomoduladora del secretoma de las CMMh expandidas con medio XANADU y MQD-Comercial.** Ensayo de inmunosupresión de la proliferación de esplenocitos de ratón marcados con CFDA. **A)** Figuras y citometrías representativas de los esplenocitos de raton activados con fitohemaglutinina luego de 72h de tratamiento con 0%, 10%, 25%, 50%, 75% y 100% de secretoma o medio condicionado**. B**) Porcentaje de células con pérdida de CFDA versus los tratamientos. Los resultados corresponden a la media más la desviación de tres experimentos independientes. Control positivo de proliferación: PHA+ y 0% de medio condicionado y control negativo: PHA- y 0% de medio condicionado. PHA, fitohemaglutinina, CFDA, carboxyfluorescein diacetate T-student, *p-value < 0.05 estadísticamente significativo frente al control positivo. 37

Figura 12. **Perfiles de expresión de los marcadores de potencial de diferenciación de las CMMh expandidas con medio XANADU y otros medios.** PCR cuantitativa en los pases 6, 10 y 13 de los marcadores de adipogénesis, FABP4; osteogénesis, RUNX2, y condrogénesis, SOX9 en CMMh expandidas en medio XANADU, medio MQD-Comercial y medio control (DMEM+10%SFB). El eje Y representa la expresión relativa. Los valores fueron normalizados a los valores de expresión de la β-actina, como control interno y al medio control como grupo calibrador, usando el algoritmo ΔΔCt. Los resultados corresponden a la media más

la desviación de tres experimentos independientes o replicas excepto para MQD-Comercial que corresponden a la única replica realizada. T-student *p-value<0,05 estadísticamente significativo frente al medio control. FABP4, proteína 4 de unión a ácidos grasos; RUNX2, factor de transcripción 2 relacionado con Runt; SOX9, factor de transcripción 9 de la caja SRY. 38

Figura 13. Perfiles de expresión de los marcadores de inmunomodulación y migración y *homing* de las CMMh expandidas con medio XANADU y otros medios. PCR cuantitativa en los pases 6, 10 y 13 de los marcadores de inmunomodulación: IL-10, IDO, CXCL9, CXCL10 y migración y *homing*: CXCR4 en CMMh expandidas en medio XANADU, medio MQD-Comercial y medio control (DMEM+10%SFB). El eje Y representa la expresión relativa. Los valores fueron normalizados a los valores de expresión de la β-actina, como control interno y al medio control como grupo calibrador, usando el algoritmo ΔΔCt. Los resultados corresponden a la media más la desviación de tres experimentos independientes o replicas excepto para MQD-Comercial que corresponden a la única replica realizada. T-student *p-value<0,05 estadísticamente significativo frente al medio control. IDO, indolamina 2,3-dioxigenasa; IL-10, interleucina 10; CXCL9, quimiocina 9; CXCL10, quimiocina 10; CXCR4, receptor 4 de quimioquinas. 39

Figura 14. Perfiles de expresión de los marcadores de regulación del ciclo celular en CMMh expandidas en medio XANADU y otros medios. PCR cuantitativa en los pases 6, 10 y 13 de los marcadores de regulación del ciclo celular: p21, p53 y pRB en CMMh expandidas en medio XANADU, medio MQD-Comercial y medio control (DMEM+10%SFB). El eje Y representa la expresión relativa. Los valores fueron normalizados a los valores de expresión de la β-actina, como control interno y al pase 6 del medio control como grupo calibrador, usando el algoritmo ΔΔCt. Los resultados corresponden a la media más la desviación de tres experimentos independientes o replicas excepto para MQD-Comercial que corresponden a la única replica realizada. ANOVA, *p-value < 0.05 estadísticamente significativo frente al pase 6 del medio control, T-student #p-value<0,05 estadísticamente significativo frente al medio control. pRB, proteína del retinoblastoma. 41

Figura 15. Análisis cariotípico de las CMMh expandidas con medio XANADU luego de un cultivo a largo plazo. A) Cariotipo con bandeo G del pase 6 **B)** Cariotipo con bandeo G del pase 10. En ambos no se observan aberraciones cromosómicas. Los cariotipos mostrados son representativos de las 10 placas metafásicas estudiadas. 42

iii. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Productos a base de CMM que han sido aprobados para tratamiento. (Fuente: Levy et al. 2020) 12

Tabla 2. Medios químicamente definidos evaluados en CMM 18

Tabla 3. Análisis prospectivo de la producción de células expandidas. Se consideró una semilla de 125 mil células para el análisis prospectivo, las dosis de 100 millones de células fueron calculadas considerando facilidades logísticas adecuadas: ambiente, material y personal. 34

iv. RESUMEN

Las células madre mesenquimales humanas (CMMh) derivadas de tejido adiposo tienen características y propiedades que las hacen atractivas para la medicina regenerativa. Para ser llevadas a clínica estas células deben ser cultivadas en condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación y los medios químicamente definidos son los ideales para mantener estas condiciones por su composición definida libre de elementos xenogénicos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el medio químicamente definido XANADU como medio de expansión a largo plazo para CMMh en comparación con un medio suplementado con suero fetal bovino (medio control) y un medio comercial químicamente definido (MQD-Comercial). La cinética de crecimiento fue evaluada a lo largo de 8 pases (56 días). La morfología y adherencia al plástico fue evaluada visualmente por microscopía. Se midieron la presencia de marcadores específicos de CMMh: presencia de CD73, CD90 y CD105, y ausencia de CD45, CD34 y HLA-DR. Se realizaron ensayos de diferenciación hacia condroblasto, adipocito y osteoblasto. Se evaluó la capacidad de la inmunosupresión del secretoma de las CMMh y la expresión de marcadores de potencial de diferenciación: FABP4, RUNX2, SOX9; de capacidad de inmunomodulación: IL-10, IDO, CXCL9, CXCL10; de migración y *homing*: CXCR4 y reguladores del ciclo celular: p21, p53, pRb. Además, se evaluó la estabilidad cromosómica mediante un análisis de cariotipo. En todos los experimentos el medio XANADU logró mantener o mejorar significativamente ($p<0,05$) el perfil de las CMMh expandidas en relación al medio control y el MQD-Comercial. Durante los 8 pases analizados XANADU, en relación al medio control, mantuvo un tiempo de duplicación significativamente menor entre 45 y 70 horas, similar expresión de marcadores de CMMh y capacidad de diferenciación. Además, la capacidad de inmunosupresión del secretoma de las CMM en medio XANADU fue significativamente mayor al MQD-Comercial. En torno a la expresión génica el medio XANADU aumento significativamente la expresión de los marcadores de potencial de diferenciación, los antiinflamatorios: IL-10, IDO y el quimiorreceptor CXCR4; mientras que mantuvo la expresión de los marcadores proinflamatorios CXCL9 y CXCL10 y los marcadores de regulación del ciclo celular similares al control. Además, las células expandidas en medio XANADU no presentaron aberraciones cromosómicas. En conclusión, el medio químicamente definido XANADU es un medio de expansión que mejora las propiedades y características de las CMMh, que las hacen relevantes para su uso en ensayos clínicos.

Palabras claves: Células Madre Mesenquimales, medio químicamente definido, XANADU

v. ABSTRACT

The characteristics and properties of human mesenchymal stem cells (hMSCs) derived from adipose tissue makes them attractive for regenerative medicine. hMSCs for clinical applications must be cultured under Good Manufacturing Practices (GMP) regulations. So that, a chemically defined media is ideal for maintaining these conditions due to their xeno-free defined composition. The purpose of the present work was to evaluate the chemically defined medium XANADU as a long-term expansion medium for hMSCs in comparison with a medium supplemented with fetal bovine serum (control medium) and a chemically defined commercial medium (MQD-Commercial). Growth kinetics were evaluated over 8 passages (56 days). The growth kinetics was tested over 8 passages (56 days). The morphology and adherence to the plastic were visually determined by microscopy. The presence of specific markers of hMSC were measured: presence of CD73, CD90 and CD105, and absence of CD45, CD34 and HLA-DR. Differentiation tests towards chondroblast, adipocyte and osteoblast were performed. The capacity for immunosuppression of the hMCM secretome and the expression of markers of differentiation potential: FABP4, RUNX2, SOX9; immunomodulation capacity: IL-10, IDO, CXCL9, CXCL10; migration and homing: CXCR4 and cell cycle regulators: p21, p53, pRb, were evaluated. In addition, chromosomal stability was evaluated by karyotype analysis. In all the experiments, the XANADU medium managed to maintain or significantly improve (p-value <0.05) the profile of the expanded hMSC in contrast to the control medium and the MQD-Commercial. During the 8 passages, XANADU, in relation to the control medium, maintained a shorter doubling time between 45 and 70 hours, similar expression of hMSC markers, and differentiation capacity. Furthermore, the immunosuppression capacity of the secretome of MSCs in XANADU medium was significantly higher than in MQD-Commercial. Regarding gene expression, thr XANADU medium significantly increased the expression of the markers of differentiation potential, the anti-inflammatory ones: IL-10, IDO, and the chemoreceptor CXCR4; while maintained the expression of pro-inflammatory markers CXCL9 and CXCL10, and cell cycle regulation ones similar to the control. Also, cells expanded in XANADU medium did not show chromosomal aberrations. In conclusion, the chemically defined medium XANADU is an expansion medium that enhances the properties and characteristics of hMSC, making them relevant for use in clinical trials.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells, chemically defined medium, XANAD

1. INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales humanas (CMMh) derivadas de tejido adiposo son consideradas un recurso extremadamente valioso en aplicaciones clínicas, como la medicina regenerativa (Wilson et al. 2019). Estas células tienen el potencial para ser utilizadas de manera autóloga y alogénica, debido a que no expresan el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo 2, HLA-DR (Dominici et al. 2006); sin embargo, debido a que se necesitan dosis que contengan altas cantidades de células, alrededor de 1 millón de células por kilogramo de peso del paciente, su utilización en la clínica conlleva a una serie de limitaciones técnicas. Entre las principales limitaciones tenemos que deben obtenerse mediante un protocolo que sea altamente reproducible y ser expandidas en instalaciones de buenas prácticas de fabricación (BPF) (Aghayan, Goodarzi y Arjmand 2014). Además, durante la expansión deben mantener sus características fenotípicas, su potencial de diferenciación y su potencial inmunomodulador (Grau-vorster et al. 2019).

En la actualidad, los medios de cultivo que se utilizan para la obtención y expansión de las CMMh, son principalmente suplementados con suero fetal bovino (SFB). La utilización del SFB presenta grandes desventajas (Jung et al. 2012), tales como el riesgo de una posible trasmisión zoonótica de patologías animales, principalmente virales y priónicas; la contaminación de las células por la incorporación o adherencia con proteínas xenogénicas (Blande et al. 2009) que puede ser causa del rechazo de las células en el paciente; alto grado de variabilidad de lote a lote que dificulta la estandarización de protocolos (Jung et al. 2012) y además de una composición compleja, con elementos con efectos negativos para el cultivo, como endotoxinas (Gstraunthaler, Lindl y Van Der Valk 2013). Actualmente, con la intensión de solucionar estos problemas, se ha estudiado la suplementación de los medios de cultivo con lisado de plaquetas humanas y suero humano. Los resultados que se han obtenido son muy promisorios, sin embargo, el suministro de este suplemento no soportaría la producción a gran escala de CMMh, además de ser una potencial fuente de contaminación por enfermedades virales humanas y tener una gran variabilidad entre lotes (Saury et al. 2018).

En ese sentido, el uso de un medio libre de suplementos animales y humanos, y suplementados con proteínas y factores de crecimiento recombinantes grado BPF que puede ser clasificado en la categoría de medio químicamente definido (MQD) es esencial para superar estas dificultades (Karnieli et al. 2017). La optimización, la

obtención y expansión de las CMMh en estos medios es clave para el desarrollo de bioprocesos clínicamente aceptables que generen células con una calidad asegurada (Jung et al. 2012). En este sentido, el Medio Químicamente Definido XANADU, antes conocido como MQD-CABIMER, fue desarrollado y optimizado por el grupo del Dr. Juan R. Tejedo (Beltran Povea 2016).

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el medio XANADU como medio de expansión a largo plazo para CMMh derivadas de tejido adiposo en comparación de un medio control suplementado con SFB y un medio MQD-Comercial. Se comparó la cinética de proliferación y se evaluó sus características inmunofenotípicas mediante citometría, así como su capacidad de diferenciación. Se evaluó la capacidad antiinflamatoria de su secretoma mediante un ensayo de inmunomodulación *in-vitro* y la expresión génica de marcadores de potencial de diferenciación, inmunomodulación, migración y *homing* y de reguladores del ciclo celular mediante RT-qPCR. Finalmente, su estabilidad cromosómica fue evaluada mediante análisis cariotípico. En este sentido, los resultados que fueron obtenidos serían de importancia en la línea de investigación de la medicina regenerativa ya que la gran mayoría de los actuales medios de cultivo químicamente definidos, no son comercializados o no superan a los medios suplementados con suero.

2. MARCO TEORICO

2.1. Definición de célula madre y tipos:

Una célula madre o troncal es una célula **con potencial de diferenciación** hacia distintas estirpes celulares y de **autorrenovación** ya que su división simétrica genera células iguales a ellas misma (Bongso y Lee 2005).

Las células madre pueden ser clasificadas según su potencialidad o nivel de diferenciación y de acuerdo a su origen. **(Figura 1)**

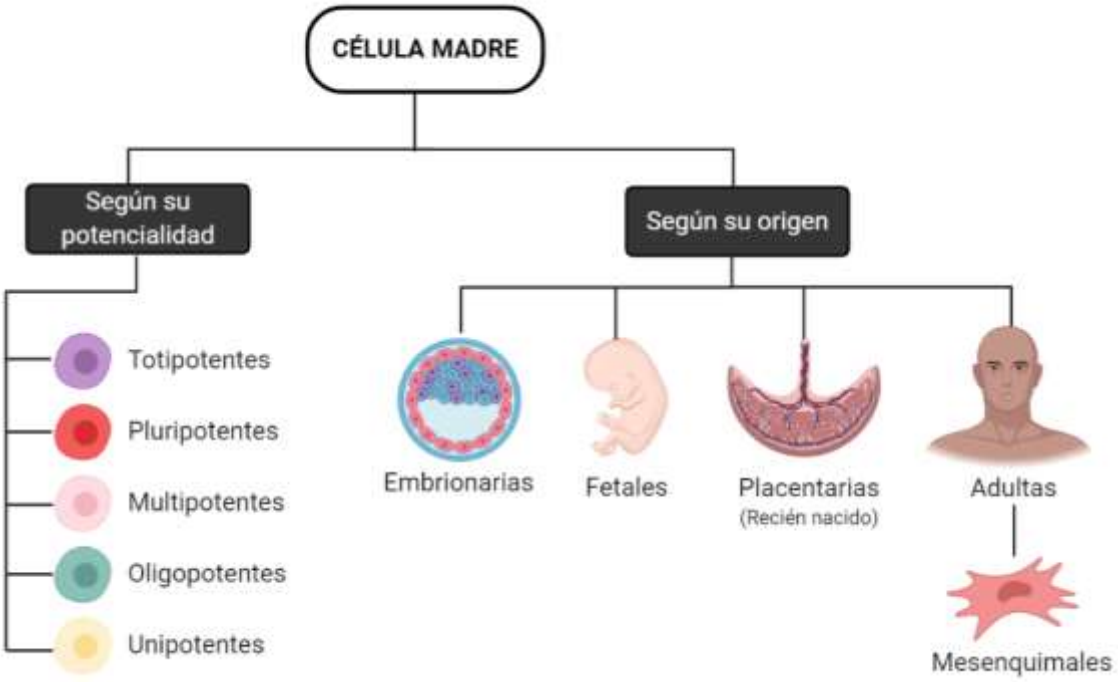

Figura 1. Clasificación de las células madre según su origen y potencialidad. Imagen creada con el programa BioRender (biorender.com).

2.1.1. Según su potencialidad

La potencialidad de estas células, se define por su nivel de compromiso con un linaje celular, mientras más avanzada se encuentre menor será su capacidad para diferenciarse. A continuación, se mencionan los tipos de células madre de mayor a menor potencialidad (Zakrzewski et al. 2019):

- **Células madre totipotentes:** Son aquellas con la capacidad de diferenciarse hacía cualquier célula que compone un organismo, es

decir, pueden diferenciarse a células de tejidos embrionarios y extra-embrionarios. El cigoto es la única célula totipotente.

- **Células madre pluripotentes:** Que pueden diferenciarse hacia los tres linajes embrionarios. Estas células pueden ser extraídas a partir de la masa celular interna del blastocisto. Otro ejemplo son las células madre pluripotentes inducidas, que son generadas artificialmente desde células somáticas (Takahashi et al., 2007).
- **Célula madre multipotentes:** Estas pueden diferenciarse hacia linajes celulares específicos. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas pueden dar origen a varios tipos de células sanguíneas.
- **Células madre oligopotentes:** Son células que pueden diferenciarse en varios tipos dentro de un linaje. Por ejemplo, la célula madre mieloide puede dar origen a macrófagos y neutrófilos.
- **Células madre unipotentes:** Mantienen su capacidad de proliferación y se pueden dividir solo a un tipo celular. Las células madre espermatogoniales son consideradas en este grupo.

2.1.2. Según su origen

Dependiendo el estadio de desarrollo desde el cual fueron obtenidas las células, se pueden clasificar de la siguiente manera (Bongso y Lee 2005):

- **Células madre embrionarias:** Son obtenidas de estadios temprano en el desarrollo del embrión. Las células madre de la masa celular interna del blastocisto son pluripotentes, mientras que las células madre del trofoblasto y del endodermo extraembrionario son de linaje restringido ya que dan lugar al trofectodermo y al endodermo primitivo (Pera y Tam 2010).
- **Células madre fetales:** Células aisladas a partir de tejidos de fetos abortados que pueden ser tanto pluripotentes como multipotentes. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas fetales.
- **Células madre placentarias:** Principalmente extraídas del recién nacido. Entre estas se considera a las células madre de cordón umbilical, las cuales son multipotentes.
- **Células madre adultas:** Son células provenientes de tejidos maduros. Tienen una menor potencialidad que las células antes mencionadas, siendo por lo cual multipotentes o unipotentes. Entre estas células se

encuentran las células madre de línea germinal y las células madre somáticas como las hematopoyéticas, mesenquimales y epiteliales.

2.2. Células Madre Mesenquimales

Las células madre mesenquimales (CMM) o estromales son células madre multipotentes que se pueden derivar desde diferentes tejidos. Estas células fueron aisladas por primera vez desde medula ósea (Friedenstein, Chailakhyan y Gerasimov 1987) y desde entonces se han reportado células con características similares, aisladas de tejido adiposo, sangre periférica, sangre fetal, cordón umbilical, pulpa dental, líquido amniótico, placenta, tejido conectivo del músculo esquelético, leche materna, entre otros (Patki et al. 2010; Berebichez-Fridman y Montero-Olvera 2018). Actualmente, según ClinicalTrial (clinicaltrial.gov) las CMM derivadas de tejido adiposo son la tercera fuente más utilizada en los ensayos clínicos como terapia celular para diversas enfermedades, como el COVID-19 (Sánchez-Guijo et al. 2020), siendo una fuente considerada de fácil acceso y rendimiento (Bortolotti et al. 2015).

Las células de diferentes fuentes deben compartir ciertas características para poder ser consideradas CMM. La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha propuesto tres criterios mínimos para definir las CMM **(Figura 2)** (Dominici et al. 2006):

1. Adherencia al plástico
2. Presencia de antígenos de superficie de linaje específico (presencia de CD73, CD90 y CD105; ausencia de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 y HLA-DR)
3. Potencial de diferenciación multipotente en osteoblasto, adipocito y condroblasto.

Otras características compartidas son el aumento de su proliferación en un cultivo hipóxico (Kwon et al. 2017) y su potencial terapéutico (D'souza et al. 2015)

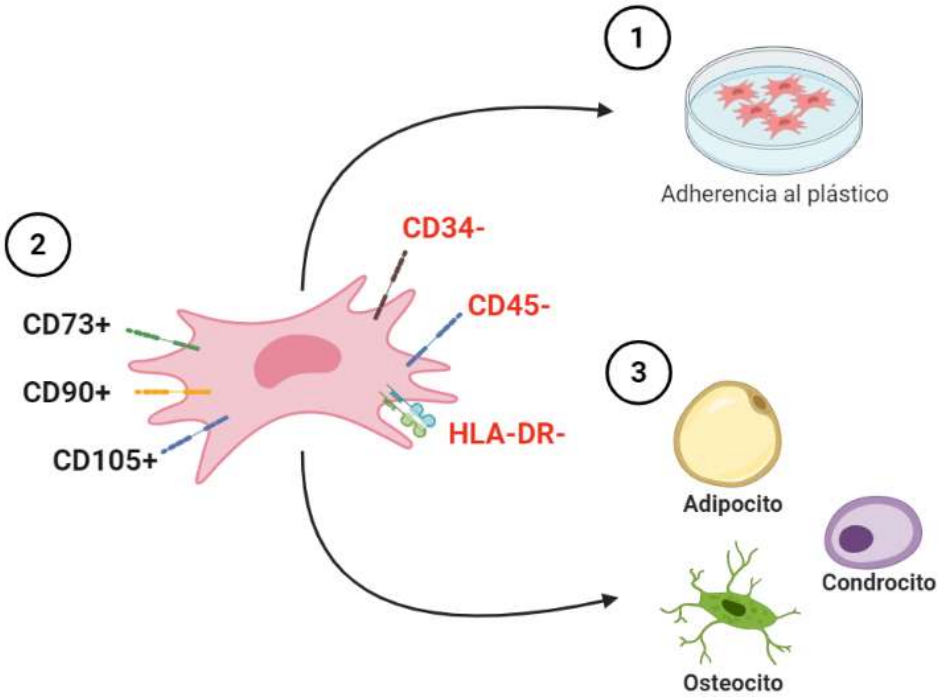

Figura 2. Características de las CMM según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT). 1) Adherencia al plástico, **2)** Expresión de marcadores de linaje **3)** Diferenciación a osteoblasto, adipocito y condroblasto. Imagen creada con el programa BioRender (biorender.com).

2.2.1. Marcadores de CMM

CD73: El marcador positivo CD73, conocido como ecto 5´ nucleotidasa, cataliza la producción de adenosina extracelular desde AMP limitando la respuesta inmune inflamatoria y promoviendo el cambio de fenotipo antiinflamatorio M2 en los macrófagos (Xu et al. 2018). En las CMM la expresión de CD73 se ha relacionado con la función inmunomoduladora de estas células, lo que favorece sus propiedades reparadoras (Chen et al. 2016; Tan et al. 2019). Además, la expresión de CD73 en gran parte de la población de CMM de tejido adiposo se ha relacionado con un mayor potencial de diferenciación a cardiomiocitos *in-vitro* y con promover la angiogénesis (Li et al., 2013, 2020)

CD90: El marcador positivo CD90 o Thy-1, es una glicoproteína de superficie que participa en una gran cantidad de vías de señalización, migración y en la interacción célula-célula y célula-matriz (Moraes et al. 2016). La expresión reducida de CD90 en una población de CMM favorece la diferenciación osteogénica y adipogénica en presencia de inductores (Flores et al. 2019;

Wiesmann et al. 2006; Pan et al. 2019), por lo que es considerado un protector de la potencia de las CMM al inhibir la diferenciación celular. Por otro lado, el efecto de este marcador en la actividad inmunosupresora de las CMM aún no es claro (Moraes et al. 2016; Campioni et al. 2009).

CD105: El marcador positivo CD105, endoglina, es un receptor de TGF-beta (Warrington et al. 2005), por lo que juega un papel crucial en la proliferación, diferenciación y otras funciones de las CMM, como el potencial angiogénico (Kim et al., 2014; Nassiri et al., 2011), pero se ha descrito que su expresión varía según el tejido de origen (Kern et al. 2006; Ponnaiyan y Jegadeesan 2014). Poblaciones enriquecidas de CD105 mostraron un mayor potencial osteogénico y principalmente condrogénico en CMM de diferentes orígenes como tejido adiposo, tejido sinovial y cordón umbilical (Jiang et al. 2010; Fan et al. 2016), pero no de medula ósea (Cleary et al. 2016).

CD45: El marcador negativo CD45, proteína tirosina fosfatasa, es considerado un marcador exclusivo de células del linaje hematopoyético, muy abundante en los linfocitos y que participa en la activación de estos (Woodford-Thomas y Thomas 1993). A pesar de ser considerado un marcador negativo para CMM, la expresión de CD45 puede ser inducida bajo ciertas condiciones de microambiente (medio con factores IL-1, TNF-alfa, IL-6) en CMM de médula ósea de pacientes con mieloma (Yeh et al. 2006). Sin embargo, se ha descrito que la presencia de células CD45+ en el cultivo de CMM sí altera su capacidad angiogénica y que la eliminación de las células CD45+ está directamente correlacionado con la mejor formación de la red de células de crecimiento endotelial (EOC) (Peters et al. 2015).

Por otro lado, en estudios *in-vivo* se ha observado que CD45 y CD34 sí se encuentran expresados en las CMM de los tejidos de manera heterogénea. Las fracciones que expresan estos marcadores mantienen su potencial de diferenciación a osteocitos, adipocitos y condrocitos (Kaiser et al. 2007)

CD 34: El marcador negativo CD34, fosfoglicoproteína transmembrana, es un marcador de células primitivas hematopoyéticas y células endoteliales (Donnelly et al. 1999), propuesto como marcador general para células madres (Sidney et al. 2014). La expresión *in-vivo* de este marcador en CMM cumpliría un papel clave en la regeneración hematopoyética y en la regeneración de tejidos degenerados (Viswanathan et al. 2017). Se ha reportado que la pérdida de

expresión de este marcador se daría en el transcurso de los pases, considerándose como un artificio dado por las condiciones de cultivo *in-vitro*, principalmente la de dos dimensiones (Lin et al. 2012). Cultivos 3D en esferoides sumados a factores de crecimiento como el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) pueden devolver la expresión de CD34 a CMM de tejido adiposo (Bellagamba et al. 2018).

HLA-DR: El marcador negativo HLA-DR es un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo 2. Su principal papel es la presentación antigénica, pero a su vez son antígenos capaces de estimular una respuesta inmune muy poderosa (Wiebe et al. 2019). Estudios lo han relacionado directamente con el rechazo de trasplantes, siendo en los primeros meses el principal causante de la incompatibilidad (Schulman et al. 1998). En CMM de grado clínico la expresión de este marcador es dinámica e impredecible en los cultivos, tanto en medios suplementados con suero humano como lisado plaquetario (Grau-vorster et al. 2019). Su expresión puede ser estimulada en presencia de altos niveles de interleucina 17, interleucina 33 y bFGF o bajos niveles de Interferón-gamma, pero a pesar de esto las células HLA-DR + mantienen la morfología fibroblástica, la identidad del fenotipo mesenquimatoso, la multipotencia *in-vitro* y la capacidad inmunomoduladora (Grau-Vorster et al. 2019; Dighe et al. 2013). La esperada baja expresión de HLA-DR se ha relacionado con la baja inmugenicidad de CMM alogénicas (Lee et al., 2014) por lo que más estudios serían necesarios para comprender el impacto del aumento en la expresión de este marcador, sobre todo en trasplantes alogénicos donde podría ocurrir un rechazo de estas células.

2.3. Propiedades de las CMM

Las CMM han sido atractivas para el campo de la biomedicina desde su descripción debido a sus propiedades con extraordinario potencial terapéutico como son (i) la secreción de moléculas bioactivas, (ii) la falta de inmunogenicidad y capacidad de inmunomodulación, (iii) su capacidad de dirigirse de manera específica hacia los lugares dañados de un organismo y (iv) su potencial de diferenciarse en distintos tipos celulares **(Figura 3)** (Hosseini et al., 2018; Kim & Cho, 2013).

2.3.1. Propiedades secretoras

Las CMM tienen la capacidad de secretar múltiples moléculas bioactivas, a las cuales conocemos como secretoma. Su fracción soluble proteica, está compuesta por citoquinas, quimioquinas, péptidos antimicrobianos y factores de crecimiento, y su fracción vesicular por exosomas y microvesículas (Teixeira y Salgado 2020; Alcayaga-Miranda, Cuenca y Khoury 2017). Asimismo se ha visto relacionada con la transferencia mitocondrial de estas células (Konari et al. 2019).

Los exosomas derivados de CMM son los componentes principales del secretoma (Alcaraz, Compañ y Guillén 2020). Estos son pequeñas vesículas membranosas con 30-150 nm de diámetro, derivadas del sistema endosómico, enriquecidos con miARN, ARNm, péptidos, proteínas, citoquinas y lípidos (Nikfarjam et al. 2020).

2.3.2. Propiedades inmunomoduladoras

Esta propiedad se relaciona a su falta de inmunogenicidad ya que no expresan HLA-DR (Dominici et al. 2006) y la capacidad de realizar funciones antiinflamatorias como proinflamatorias, mediante contacto directo o secreción de citoquinas y factores inmunomoduladores (Song, Scholtemeijer y Shah 2020).

El perfil antiinflamatorio de las CMMs destaca por la expresión de la interleucina 10 (IL-10), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) y la indolamina 2,3-dioxygenasa (IDO). Cabe resaltar que cada uno de los factores mencionados actúan directamente sobre distintos tipos celulares. IL-10, TGF-β e IDO promueven el cambio de clase de los macrófagos proinflamatorios (M1) a macrófagos antiinflamatorios (M2) e inhiben la diferenciación de linfocitos T de ayuda 1 (Th1) y citotóxicos (CTL). IDO con TNF-β inhiben la actividad de los neutrófilos. IL-10 inhibe la diferenciación a macrófagos M1 y promueve la proliferación de linfocitos T reguladores, mientras que IDO inhibe la actividad de las células asesinas naturales (NK) (Maqsood et al. 2020; Song, Scholtemeijer y Shah 2020).

Por otro lado, un perfil proinflamatorio de las CMM se ha visto favorecido en cocultivos con macrófagos, en donde la expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias IL-6 y CXCL10, se han visto aumentados (Anton, Banerjee y Glod 2012).

2.3.3. Migración y *homing*

Esta propiedad se trata de la capacidad de albergar sitios de inflamación después de una lesión tisular cuando se inyecta por vía intravenosa, es decir llegar al lugar del daño mediante moléculas de comunicación celular. En este sentido, la migración y *homing* de las CMM está relacionada con la expresión de receptores de quimioquinas principalmente CXCR4 y CXCR7 y expresión de moléculas de adhesión como ICAM1 y VCAM1 (Hosseini et al. 2018; Ge et al. 2017).

2.3.4. Potencial de diferenciación

Las CMM fueron reconocidas por su multipotencia al diferenciarse a osteoblasto, adipocito y condroblasto. Sin embargo, se ha comprobado su capacidad de diferenciación *in-vitro* hacia los tres linajes celulares: ectodermo, mesodermo y endodermo (Hosseini et al. 2018). Entre estas células se encuentran las células beta pancreáticas, hepatocitos, células musculares, células pulmonares, células intestinales, incluido cardiomiocitos y células neurales (Maqsood et al. 2020; Sanchez-Castro et al. 2021).

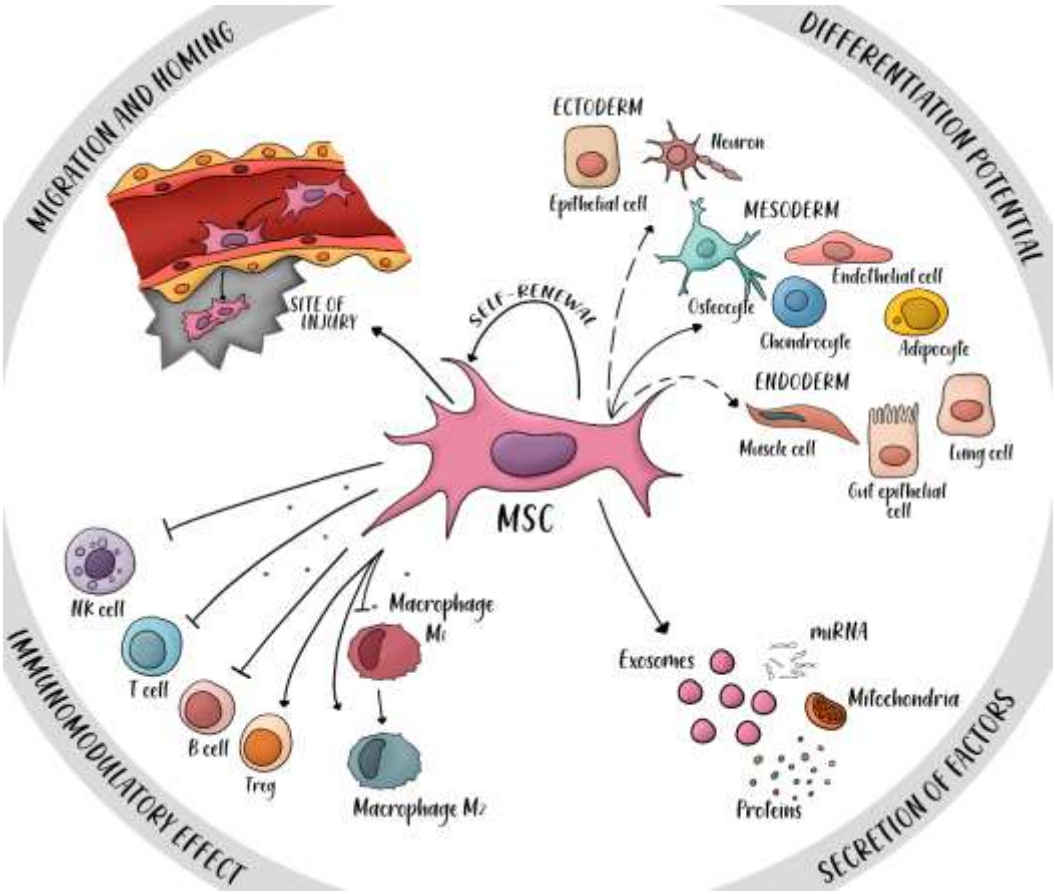

Figura 3. Propiedades principales de las CMM. 1) Potencial de diferenciación hacia los tres linajes: ectodermo, mesodermo y endodermo **2)** Secreción de factores como miARN, proteínas, exosomas y mitocondrias **3)** Propiedades inmunomoduladoras contra células efectoras: células NK, linfocitos B, T y macrófagos M1 y contra células reguladoras: macrófagos M2 y linfocitos Treg **4)** Migración y *homing* al sitio de la lesión. (Fuente: Sanchez-Castro et al. 2021)

2.4. Potencial Terapéutico de las CMM

Actualmente se habla de múltiples aplicaciones para las células madre en medicina regenerativa y en el tratamiento de diversas enfermedades (Mahla 2016). En el mundo, en torno a las CMM de tejido adiposo existen diversos estudios sobre su potencial uso en regeneración de tejidos (Kim & Cho, 2013). Por otro lado, gracias a su capacidad inmunomoduladora han sido evaluadas como tratamiento para diversas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como la diabetes y el COVID-19, obteniendo resultados alentadores (Sánchez-Guijo et al. 2020; Cao et al. 2017)

Hasta 2021 existen 11 terapias celulares con CMM humanas (CMMh) aprobadas alrededor del mundo. Entre ellas tenemos la terapia Temcell HS Inj para la enfermedad aguda de injerto contra el huésped en trasplante de médula ósea, aprobada en Japón en 2015 y la terapia Stempeucel para la isquemia causada por la enfermedad de Buerger, aprobada en India en 2016 **(Tabla 1)** (Levy et al. 2020). Las terapias fueron aprobadas principalmente en países asiáticos, pero en marzo del 2018, la Comisión Europea aprobó la comercialización del primer medicamento celular, CMM: Alofisel (Darvadstrocel) para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, dando inicio a las terapias celulares aprobadas en torno a las CMM en Europa (Galipeau y Sensébé 2018).

En la base de datos internacional ClinicalTrial (clinicaltrial.gov) para ensayos clínicos con CMMh, se observa que hasta enero 2021 existe un total de 911 ensayos clínicos registrados alrededor del mundo, de los cuales 16 son ensayos clínicos en fase III terminados. Esto sumado a los más 69 mil trabajos de investigación sobre CMM en PubMed, demuestran el futuro prometedor de estas células "mágicas" para la medicina regenerativa y como están empezando a cambiar la medicina como la conocemos.

Tabla 1. Productos a base de CMM que han sido aprobados para tratamiento. (Fuente: Levy et al. 2020)

Nombre comercial	Origen de las CMM	Para tratamiento de	País de licencia	Compañia
Alofisel	Tejido adiposo humano	Fístulas perianales complejas en la enfermedad de Crohn	Europa (2018)	TiGenix NV/Takeda
Prochymal (remestemcel-L)	Médula ósea humana	Enfermedad de injerto contra huésped	Canadá y N. Zelanda (2012)	Osiris Therapeutics Inc./Mesoblast Ltd.
Temcell HS Inj	Médula ósea humana	Enfermedad de injerto contra huésped	Japón (2015)	JCR Pharmaceuticals
Queencell	Tejido adiposo humano	Defectos del tejido subcutáneo	Corea del Sur (2010)	Anterogen Co. Ltd.
Cupistem	Tejido adiposo humano	Fístulas de Crohn	Corea del Sur (2012)	Anterogen Co. Ltd.
Neuronata-R	Médula ósea humana	Esclerosis lateral amiotrófica	Corea del Sur (2014)	Corestem Inc.
Cartistem	Cordón umbilical humano	Defectos del cartílago articular de la rodilla	Corea del Sur (2012)	Medipost Co. Ltd.
Stemirac	Médula ósea humana	Lesión de la médula espinal	Japón (2018)	Nipro Corp.
Stempeucel	Médula ósea humana	Isquemia crítica de las extremidades	India (2016)	Stempeutics Research PVT
Cellgram-AMI	Médula ósea humana	Infarto agudo de miocardio	Corea del Sur (2011)	Pharmicell Co. Ltd.

2.4.1. Enfermedades autoinmunes: Diabetes

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune, donde nuestro cuerpo ataca a las células beta productoras de insulina. Respecto a la terapia celular de la diabetes utilizando CMMh, se ha mostrado que estas facilitan la interacción de islotes pancreáticos trasplantados con el tejido adyacente (Fransson et al. 2015). Recientemente, se ha mostrado que el cultivo de agregados de islotes de origen alogénico con CMM facilita la implantación del injerto y la normalización de la glucosa en animales diabéticos sin inmunosupresión (Westenfelder et al. 2017), y que los islotes de ratón y humanos son capaces de formar organóides de alta eficiencia cuando son auto-agregados con CMM y células endoteliales (Takahashi et al. 2018), lo que evidencia su importancia en la búsqueda de nuevas terapias para esta enfermedad.

Otro punto importante es la inflamación sistémica, común en los pacientes diabéticos, y que trae un sin número de complicaciones en otros tejidos (Moura et al. 2017). Respecto a complicaciones de la enfermedad, hasta el momento existen evidencias en ensayos clínicos que las CCMh son seguras y en general son significativamente favorables en el tratamiento de las ulceras de pie diabético causadas por la ausencia de respuesta antiinflamatoria (Cao et al. 2017; Gadelkarim et al. 2018; Lopes et al. 2018). El mecanismo por el cual las CMMh

contribuyen al cerramiento de las ulceras de pie diabético aún no se conoce completamente, pero existen evidencias que diversos factores paracrinos producidos por las CMMh promueven una respuesta inmunosupresora sobre células efectoras del sistema inmune e incrementan la migración celular, la angiogénesis y la re-epitelización que contribuyen a su efecto terapéutico (Cao et al. 2017; Gadelkarim et al. 2018; Strassburg et al. 2013)

2.4.2. Enfermedades inflamatorias: COVID-19

La propuesta de utilizar CMM para tratar la COVID-19 principalmente se basa en su capacidad de regular la respuesta inmune antiinflamatoria (Song, Scholtemeijer y Shah 2020) y poder combatir la tormenta de citoquinas proinflamatorias mediante factores como IL-10, TGF-β e IDO; modulando positivamente la proliferación de células T reguladoras y / o generando el cambio de macrófagos M1 a M2 **(Figura 4)**. Además, los efectos antimicrobianos e incluso antivirales descritos de las CMM podrían ayudar a evitar las coinfecciones bacterianas y reducir los estragos de la infección viral (Alcayaga-Miranda, Cuenca y Khoury 2017).

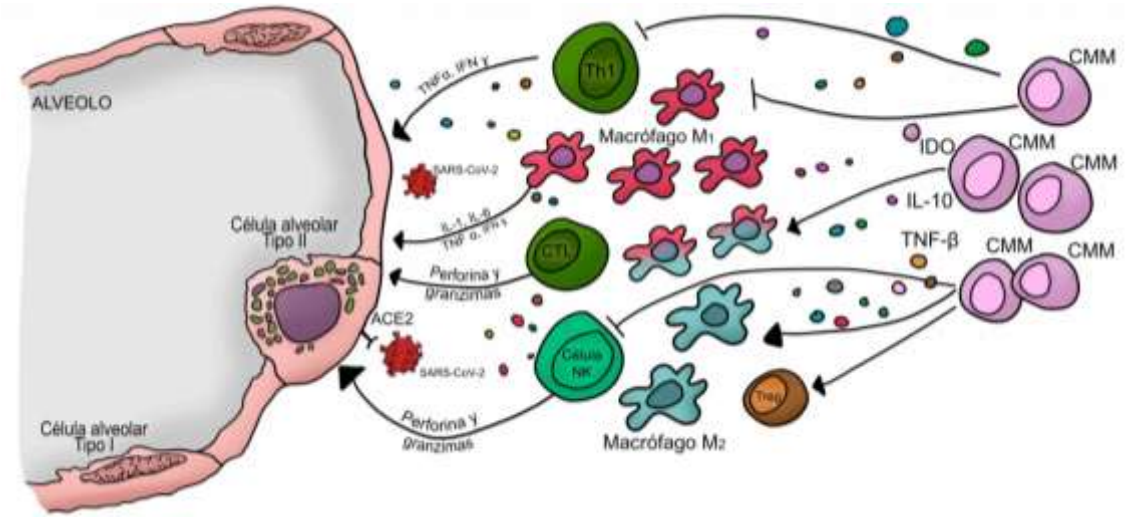

Figura 4. Potencial terapéutico en casos graves de COVID-19. CMM, Célula madre mesenquimal; IDO, indolamina 2,3-dioxygenasa; IL-10, interleucina 10; TGFβ, factor de crecimiento transformante beta (TGF-β); TNFα, factor de necrosis tumoral alfa; INFγ, interferón gamma; IL-6, interleucina 6; IL1, interleucina 1; Th1, linfocito Th1; CTL, linfocito T citotóxico; ACE2, enzima convertidora de angiotensina 2.

Una consideración importante a tener en cuenta con respecto a las terapias basadas en CMM para el tratamiento de COVID-19 es que, en aquellos casos

severos, la activación de los efectos antiinflamatorios de las CMM puede verse comprometida debido a que los linfocitos T en estos pacientes se encuentran deteriorados liberando bajos niveles de IFNγ (el activador de esta característica)(Shi et al. 2020). No obstante, esta situación podría sortearse o bien utilizando CMM de tercera o cuarta generación (que sean pre-condicionadas o modificadas genéticamente para ganar cualidades beneficiosas, respectivamente) (Hunt et al. 2017) o bien utilizando terapias libres de células donde se pueda cuantificar el potencial antiinflamatorio independientemente del microambiente donde se aplicarían. Sin embargo, vale resaltar que aún sin aplicar estas posibles mejoras, las terapias contra la COVID-19 basadas en CMM van mostrando resultados prometedores.

Mediante una búsqueda rápida en el portal web de ClinicalTrials.gov, se observa que hasta enero 2021 hay un total de 67 estudios registrados alrededor del mundo que buscan utilizar CMMh (obtenidas de gelatina de Wharton, tejido adiposo, cordón umbilical y pulpa dental) para el tratamiento de casos severos de COVID-19. De los cuales se encuentran principalmente en fase 2 (42) y sólo un estudio iraní ha sido aprobado para su fase 3 (NCT04366063). La locación de 16 de estos ensayos es en Estados Unidos y 11 en China, mientras que en Latinoamérica se registran 2 que se realizan en Brasil.

2.5. Terapias libres de células

Durante muchos años, la terapia celular con CMM fue el primer candidato que se introdujo en aplicaciones clínicas (Kassem et al., 2004) pero, actualmente se están considerando otras terapias basadas en CMM como el secretoma de CMM y los exosomas derivados de CMM, que eliminan algunos problemas con el uso de células vivas y mantienen sus propiedades.

Estas terapias presentan distintas ventajas como 1) Menor inmunogenicidad, 2) Menor número de células requeridas para el tratamiento 3) Mayor tasa de producción 4) Más económico y práctico para aplicaciones clínicas 5) Fácil de modificar para obtener efectos específicos 6) Menor tiempo y costo de cultivo 7) Evaluación de seguridad, dosificación y eficiencia más similar a los compuestos farmacéuticos 8) Almacenamiento fácil y seguro (Teixeira & Salgado, 2020)

En esta década, el potencial terapéutico y el éxito de estas terapias libres de células se han reportado en varios estudios a diferentes niveles (Nikfarjam et al., 2020;

Teixeira & Salgado, 2020). ClinicalTrial (clinicaltrial.gov), hasta enero del 2021, informa 3 ensayos clínicos de fase 1/2 para secretoma de CMM y 8 ensayos clínicos para exosomas de CMM, 1 en fase III. El más reciente es un estudio clínico piloto de fase I sobre la inhalación de exosomas de CMM para tratan neumonía grave por COVID-19, el cual fue completado en setiembre del 2020.

2.6. Estado de las terapias celulares en el Perú

A pesar del gran potencial de las CMMh para tratar los casos severos de diversas enfermedades. La aplicación de estas terapias en el Perú, a corto o mediano plazo, sólo sería posible mediante la compra de este medicamento celular a países que ya lo produzcan y comercialicen, lo cual aumentaría drásticamente el costo de la aplicación de esta terapia en nuestro territorio. Esto se explica porque no es posible su producción nacional debido a 2 motivos principales.

En primer lugar, el Perú carece de una adecuada infraestructura, profesionales capacitados, controles de calidad del producto celular, entre otras consideraciones necesarias para la producción de CMM de grado clínico que puedan ser aplicados en pacientes, dado que estas CMM deben ser producidas bajo estándares de BPM (López-Beas et al. 2020).

En segundo lugar, el Perú carece de leyes o normativas específicas a nivel nacional que regulen la producción y aplicación de medicamentos celulares como las CMM. Si bien se tiene el Reglamento de la Ley General de Donación y Trasplante de Órganos y/o Tejido Humanos (Toledo 2005), donde se establecen lineamientos en cuanto al internamiento y desplazamiento de tejidos regenerables para trasplante en nuestro territorio, en este mismo documento no existen disposiciones sobre la producción ni aplicación de estos, dejando indicado que los establecimientos de salud acreditados por la Organización Nacional de Donación y Trasplante son los competentes para definirlas. Sin embargo, todavía se carece de especificaciones técnicas con respecto la producción y aplicación de estas células, evidenciando la necesidad de una normativa general.

Sobre este último punto, cabe mencionar que, en Latinoamérica, países como Brasil, Argentina, Chile y otros han mostrado esfuerzos en establecer las medidas regulatorias en coordinación con sus Ministerios de Ciencia y Tecnología, mientras que en Europa los lineamientos ya están claramente establecidos por la Agencia

Europea de Medicamentos (EMA) y en Estados Unidos por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) (López-Beas et al. 2020; Palma et al. 2015).

2.7. Producción de CMMh y medios de cultivo

Para la aplicación de las CMMh en medicina regenerativa o en cualquier propuesta de aplicación clínica, la producción se debe dar en un proceso controlado bajo los exigentes estándares de seguridad y calidad de BPF, en instalaciones certificadas (Aghayan, Goodarzi y Arjmand 2014) y con adecuados medios de cultivo.

La producción inicia con la toma de muestra de individuos sanos, por ejemplo, biopsias de tejido adiposo abdominal de donde luego se aíslan las CMM. Estas células son evaluadas para agentes patógenos y forman el banco maestro de células, a partir de este se expande mediante cultivo y se producen los bancos de trabajo. Desde los bancos de trabajo se expanden las CMM hasta obtener la cantidad necesaria para las dosis requeridas, siempre bajo los estándares de BPF, control microbiológico, caracterización celular y uso de medios definidos. Finalmente, las dosis se empacan en forma de suspensión inyectable, se rotulan y son enviadas para ser administradas al paciente (Gálvez et al. 2014).

2.7.1. Medios de cultivo suplementados con SFB

Actualmente, la expansión celular se realiza en medios de cultivo suplementados con SFB, el cual es usado por su alto contenido en factores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, transportadores de hierro y hormonas que inducen la proliferación celular. Sin embargo el SFB presenta grandes desventajas (Jung et al. 2012) como el riesgo de una posible trasmisión zoonótica de infecciones por virus como el adenovirus bovino, el parvovirus bovino, el virus parainfluenza-3, el virus de la rabia, y enfermedades por priones como la encefalopatía espongiforme bovina. En segundo lugar, la contaminación de las células expandidas por la incorporación o adherencia con proteínas xenogénicas que puede ser causa del rechazo de las células en el paciente (Blande et al. 2009). En tercer lugar, las condiciones éticas de producción que implica la matanza de un número elevado de fetos ante el incremento exponencial de la demanda de uso. En cuarto, el alto grado de variabilidad de lote a lote que dificulta la estandarización de protocolos (Jung et al. 2012) y además de una composición compleja, con elementos con efectos negativos para el cultivo, como endotoxinas (Gstraunthaler, Lindl y Van Der Valk 2013).

Por lo antes mencionado surge la necesidad de generar nuevos medios de cultivo más rentables y homogéneos como los medios de cultivo químicamente definidos libres de componentes animales.

2.7.2. Medios de cultivo químicamente definidos (MQD)

En los últimos años con el desarrollo de medios químicamente definidos, estos se han ido utilizando en cultivos celulares. Estos medios, principalmente, contienen un medio base suplementado con proteínas recombinantes (albumina, insulina, TFGβ y bFGF), hierro, selenio y un sistema antioxidante (2-mercaptoetanol) (Jayme y Smith 2000). A pesar que en la literatura y en el mercado se encuentran diversos ejemplos de medios químicamente definidos (Wu et al., 2020; Yin et al., 2019) **(Tabla 2),** muchos de estos no presentan una eficiencia esperada. Por ejemplo, el medio químicamente definido StemCell1 suplementado con 2 mM L-glutamina fue evaluado para el crecimiento y expansión de cultivos primarios de CMM de tejido adiposo ya caracterizados, concluyendo que el uso de este medio era igual de productivo que el uso de un medio a base de suero (Salzig et al. 2016). Sin embargo, otros medios como el MQD-STK2 si reportaron mejores tasas de crecimiento y expresión de marcadores en los cultivos de CMMh de tejido adiposo de hasta 15 pases a comparación de un medio a base de suero (Lee et al., 2017), pero siguen siendo poco comercializados.

Finalmente en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla y el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) han desarrollado y patentado (WO/2017/021535-PCT/EP2016/068767) (Soria Escoms et al. 2017) el medio XANADU basado en la utilización de factores de crecimiento y suplementación con sustancias que promueven una respuesta a hipoxia e incrementan la proliferación (Beltran Povea 2016).

Tabla 2. Medios químicamente definidos evaluados en CMM

Medio	Compañía/ Institución
StemCell1	CellCulture Technologies
STK1/2	Abion Inc.
XANADU	Universidad Pablo de Olavide/ CABIMER
StemPro® MSC SFM XenoFree	Invitrogen
RoosterNourish	Rooster Bio
Mesencult®-XF medium	Stem Cell Technologies
TheraPEAK® MSCGM-CD	Lonza
NBVbe medium	Shenzhen University
S&XFM-CD	Beijing Jing-Meng Stem Cell Technology
mTeSR	Stem Cell Technologies
MSCM-acf	ScienCell
BD MOSAIC Hmsc SF medium	BD
CellGro® Serum-free MSC Medium	CellGenix
MSC NutriStem® XF Medium	BI CISBIO
MesenGro® Chemically Defined Medium	StemRD
PRIME-XV MSC Expansion XSFM	FUJIFILM
StemMACS MSC Expansion Media kit XF	Miltenyi Biotec

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Las células madre mesenquimales humanas (CMMh) expandidas a largo plazo en condiciones químicamente definidas presentan mejores características fenotípicas e inmunomoduladoras que las expandidas en presencia de suero fetal bovino.

3.2. Objetivo general:

Evaluar el medio químicamente definido XANADU como medio de expansión a largo plazo para células madre mesenquimales humanas (CMMh) derivadas de tejido adiposo.

3.3. Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto del medio XANADU sobre la morfología, cinética de crecimiento y la producción a gran escala de las CMMh, en comparación al medio suplementado con SFB.
- Evaluar las características inmunofenotipícas y capacidad de diferenciación de las CMMh expandidas en medio XANADU respecto a las expandidas en medio suplementado con suero.
- Comparar el potencial inmunomodulador *in-vitro* del secretoma de las CMMh en medio XANADU respecto al secretoma obtenido de CMMh en un medio químicamente definido comercial.
- Caracterizar la expresión de marcadores de potencial de diferenciación, inmunomodulación, migración y *homing* y regulación del ciclo celular mediante RT-qPCR.
- Evaluar la estabilidad cromosómica después de un cultivo a largo plazo mediante análisis cariotípico.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Línea de células madre mesenquimales humanas (CMMh) utilizada:

La línea se obtuvo a partir de una biopsia de tejido adiposo de un donante sano previo consentimiento informado (011419-CABIMER) siguiendo los lineamientos para el trabajo con CMMh en España **(Anexo 1,2).** La línea de CMMh de tejido adiposo Ad-hMSC-GMP fue aislada y estabilizada en Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbeco (DMEM) suplementado con 10% SFB hasta el pase 5 (35 días) en condiciones controladas en el área BPF de CABIMER con personal capacitado. A partir del pase 6 la línea estabilizada fue utilizada para realizar los experimentos descritos en la presente tesis en un laboratorio de bioseguridad 2.

4.2. Cultivo en medio XANADU, medio comercial químicamente definido (MQD-Comercial) y medio DMEM suplementado con SFB (medio control)

Frascos de 75 cm^2 (Corning) fueron previamente tratados para los medios químicamente definidos con 5 ml de vitronectina a 2,5 µg/ml (Sigma, SRP3186) durante 30 min a T.A. Se sembraron 2000 células/cm^2 en cada frasco de MQD-Comercial y medio XANADU con fórmula bajo patente WO/2017/021535-PTC/EP2016/068767 (Soria Escoms et al. 2017). Para el medio control, los frascos no fueron pretratados y las CMMh fueron sembradas a una densidad de 4 000 células/cm^2 en frascos de 75 cm^2 en un medio compuesto por DMEM+ Glutamax™ (Sigma) suplementado con 10% de SFB (Sigma) y penicilina/estreptomicina a 100U/mL (Sigma). Todos los frascos se mantuvieron en condiciones estables de cultivo a 37 °C y 5% de CO_2. El medio se cambió diariamente para el caso del medio XANADU y cada dos días para los otros medios. Los pases o resiembra de las células se realizaron cada siete días hasta los 56 días de cultivo u ocho pases. Se realizaron tres réplicas o experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones, excepto para el caso del MQD-Comercial que por limitaciones del medio se realizó una única replica.

4.2.1. Subcultivo de las líneas celulares

Para cada subcultivo o pase los cultivos fueron lavados con PBS sin calcio ni magnesio (DPBS, Thermo) y tratados con 5 ml de tripsina recombinante libre de origen animal 1X (TrypLE, Gibco) a 37 °C por 5 min. La tripsina se neutralizó con

el mismo volumen de DMEM con 10% de SFB, y las células fueron centrifugadas a 300 g por 5 min (Beltran Povea 2016). El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en su respectivo medio de cultivo. Se determinó la cantidad de células con un hemocitómetro y se sembró en las densidades antes descritas según el medio.

4.3. Evaluación de la cinética de crecimiento y análisis prospectivo de la producción de CMMh

4.3.1. Evaluación morfológica, cálculo del tiempo de duplicación (Td) y doblaje acumulativo poblacional (CPD)

La morfología fue evaluada mediante observación en un microscopio invertido. Considerando a una morfología fibroblástica a células fusiformes adheridas al plástico (Blande et al. 2009). Campos representativos fueron fotografiados a 40X, 100X y 200X antes de realizar el subcultivo o pase.

En cada pase se determinó la concentración celular en un hemocitómetro, tiñendo las células muertas con Azul de Tripán (Sigma) al 0,4% en PBS, en una proporción 1:10 (v/v). Se contó solo las células viables y se calculó la concentración celular según la siguiente formula:

$$[\,]celular\ \left(\frac{celulas}{\mu l}\right) = \frac{células\ vivas\ contadas}{superf.cont.(mm^2)\cdot profundidad\ cámara\ (mm)\cdot dilución}$$

A partir del conteo celular se calculó el **tiempo de duplicación (Td)** (Gruber et al. 2012) y la duplicación acumulativa de la **población (CPD)** (Izadpanah et al. 2006) para cada pase, mediante las siguientes formulas:

$$Td = \frac{tiempo \cdot \log(2)}{Log([\,]\,final) - Log([\,]\,inicial)}$$

$$CPD = \frac{Log([\,]\,final) - Log([\,]\,inicial)}{\log(2)}$$

La media más la desviación estándar de los valores obtenidos en los 8 pases de las tres replicas, fueron utilizadas para construir gráficas de cinética: número de pase vs Td o CPD.

4.3.2. Análisis prospectivo de la producción de células expandidas

En base a los datos de cinética, Td en horas, obtenidos en los 4 primeros pases evaluados, para cada medio de cultivo se realizó un análisis prospectivo de 28 días de expansión considerando facilidades logísticas adecuadas: ambiente, material y personal a disposición, partiendo de una semilla de 125 000 células.

Mediante las siguientes fórmulas se calculó el número de dosis de 100 millones de células:

- Para el cálculo del número de dosis del día 7.

$$\#Dosis\ (dia\ 7) = \frac{125\ 000 \cdot 2^{168/Td(pase\ 6)}}{100\ 000\ 000}$$

- Para el cálculo del número de dosis del día 14.

$$\#Dosis(dia\ 14) = \frac{125\ 000 \cdot 2^{\frac{168}{Td(pase\ 6)}} \cdot 2^{\frac{168}{Td(pase\ 7)}}}{100\ 000\ 000}$$

$$\#Dosis\ (dia\ 14) = \#Dosis(dia\ 7) \cdot 2^{\frac{168}{Td(pase\ 7)}}$$

- Para el cálculo del número de dosis del día 21.

$$\#Dosis\ (día\ 21) = \#Dosis(dia\ 14) \cdot 2^{\frac{168}{Td(pase\ 8)}}$$

- Para el cálculo del número de dosis del día 28.

$$\#Dosis\ (día\ 28) = \#Dosis(dia\ 21) \cdot 2^{\frac{168}{Td(pase\ 9)}}$$

El número de dosis fue calculado para cada una de las repeticiones de las réplicas. En este sentido, para cada medio de expansión los resultados se expresaron como el promedio de los valores: #Dosis ± desviación estándar (DE)

4.4. Caracterización inmunofenotípica mediante citometría de flujo

Los marcadores de membrana CD-73, CD-90, CD-105, CD-34, CD-45 y HLA-DR para CMMh fueron evaluados en los pases 6, 10 y 13 para cada medio.

Las células recuperadas en cada pase se resuspendieron en 1 ml de solución de bloqueo (0,3 M de L-glicina (Sigma) y 5% de SFB en DPBS). Se repartió en volúmenes de 50 µl correspondiente a por lo menos 10 000 de células y se incubó con 1 µl de cada anticuerpo monoclonal durante 30 min a temperatura ambiente (TA) y en oscuridad. Pasada la media hora se completó el volumen a 1 ml con DPBS. Todos los anticuerpos fueron obtenidos de BD y estaban acoplados a isocianato de

fluoreceína (FITC) o ficoeritrina (PE): anti-CD73/PE (BD, 550257), anti-CD90/FITC (BD, 555595), anti-CD105/PE (BD, 560839), anti-CD34/PE (BD, 555822), anti-CD45/FITC (BD, 345808) o anti HLA-DR/FITC (BD, 555558) (Beltran Povea 2016). Como controles de isotipo se empleó IgG-FITC y IgG-PE.

Los datos de la caracterización inmunofenotípica se obtuvieron en el Citómetro de Flujo FACScan (Becton Dickinson) mediante el programa BD CellQuest™ en base a una plantilla donde los datos de selección de población por SSC y FSC estaban preestablecidos. Los controles de isotipo se utilizaron para definir la población y el umbral en el histograma, dejando un 0,2% de células positivas. Posteriormente, se corrieron las muestras marcadas con anticuerpos y el programa calculó automáticamente el número de células positivas. Para la organización y presentación final de los datos se utilizó el programa de libre acceso Flowing Sofware versión 2.5 (Turku Bioscience).

En todos los casos los resultados fueron representados como la media más la desviación estándar de tres experimentos independientes o replicas excepto para el MQD-Comercial, cuyos datos corresponden a la única replica realizada.

4.5. Evaluación de la capacidad de diferenciación

En cada replica, las células cultivadas en medio control y medio XANADU obtenidas al final del pase 10 fueron cultivas por triplicado en medios de diferenciación específicos para condroblasto, adipocitos y osteoblasto, usando los kits: StemProChondrogenesis, StemProAdipogenesis y StemProOsteogenesis (Life Technologies, UK), respectivamente. Los medios de diferenciación fueron preparados según las instrucciones del fabricante y se siguió el protocolo de Beltran Povea (2016), detallado a continuación:

4.5.1. Diferenciación hacia condroblasto

En una placa de 6 pocillos se sembró una gota de 50 µl de la suspensión a una concentración de 10^7 células/ml, para formar una micromasa, y se mantuvo por 2 horas en una incubadora a 37 ºC y 5% de CO_2. Posteriormente se agregó 1 ml gota a gota del medio de diferenciación hacia condroblasto y se continuó incubando a condiciones controladas. El cambio de medio se realizó cada 72 horas durante 21 días.

Para la tinción de las células diferenciadas a condroblasto, las células fueron lavadas con DPBS y fijadas con paraformaldehido (Sigma) al 4% PBS por 30 min a TA. Luego fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con la solución de tinción Alcian Blue al 1% en PBS por 1 hora a TA, se lavaron 3 veces con DPBS y una vez con agua destilada. Finalmente, las muestras fueron observadas en un microscopio invertido y fotografiadas. Las células diferenciadas se observaron de azul **(Figura 5).**

4.5.2. Diferenciación hacia adipocitos

En una placa de 6 pocillos se sembró células a una concentración de 5 000 células/cm^2, con el medio control o medio XANADU. Las placas fueron incubadas a 37 ºC y 5% de CO_2 durante tres días y luego el medio inicial fue remplazado por medio de diferenciación hacia adipocitos. El cambio de medio se realizó cada 72 horas durante 21 días.

Para la tinción de células diferenciadas a adipocitos, las células fueron lavadas con DPBS y fijadas con paraformaldehido al 4% en agua/PBS por 30 min y a TA. Luego fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con la solución de tinción *oil red* (Sigma) al 1% en isopropanol por 5 min a TA. Finalmente fueron lavadas tres veces con agua destilada. Se observaron en un microscopio invertido y se fotografiaron campos representativos. Las células diferenciadas con depósitos de lípidos se observaron de rojo **(Figura 5).**

4.5.3. Diferenciación hacia osteoblastos

En una placa de 6 pocillos se sembró células a una concentración de 5 000 células/cm^2, con el medio control o medio XANADU. Las placas fueron incubadas a 37 ºC y 5% de CO_2 durante tres días y luego el medio inicial fue remplazado por medio de diferenciación hacia osteoblasto. El cambio de medio se realizó cada 72 horas durante 21 días.

Para la tinción de células diferenciadas a osteoblastos, las lavadas con DPBS y fijadas con paraformaldehido al 4% en agua/PBS por 30 min y a TA. Luego fueron lavadas suavemente a 2 veces con PBS e incubadas con la solución *alizarin red S* (Sigma) al 2% en PBS por 15 min a TA. Finalmente fueron lavadas ocho veces con agua destilada. Se observaron en un microscopio invertido y se

fotografiaron campos representativos. Las células diferenciadas con depósitos de calcio se observaron de rojo **(Figura 5).**

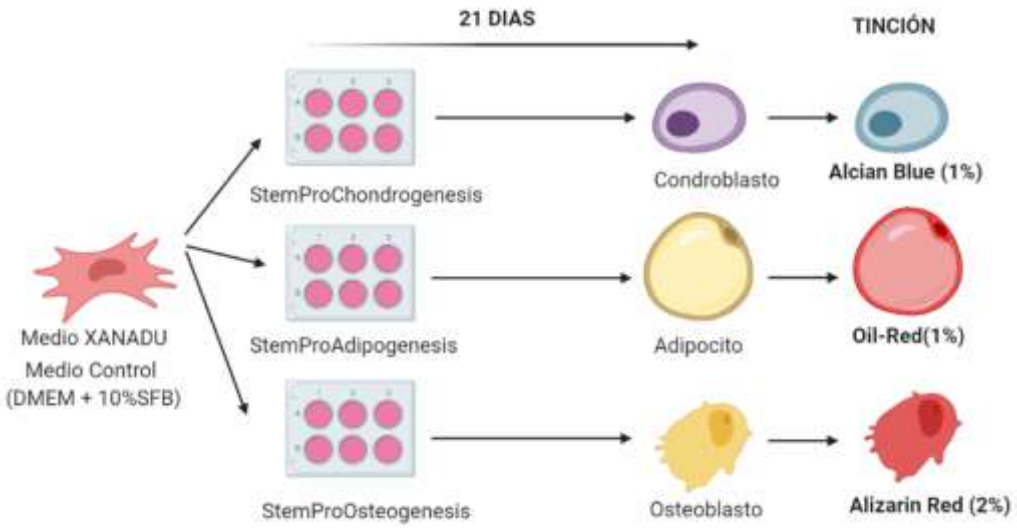

Figura 5. Resumen gráfico del procedimiento para la evaluación de la capacidad de diferenciación. Imagen creada con el programa BioRender (biorender.com).

4.6. Evaluación del potencial inmunomodulador: Experimento de inmunosupresión

4.6.1. Obtención del secretoma

En el pase 10 se colectó el secretoma en tubos cónicos de 15 ml de los cultivos de la línea celular expandidos en medio XANADU o MQD-Comercial. El medio fue filtrado con un filtro de 0.22 µm (Millipore, Budapest, Hungría).

4.6.2. Aislamiento de esplenocitos

El bazo de un ratón Swiss-Webster de 8 semanas fue extraído por los técnicos del bioterio de CABIMER. La extracción de los esplenocitos se realizó mediante disgregación del bazo en medio RPMI-1640 (Gibco) (Zanganeh, Soudi y Hosseini 2020). Se realizó una separación por gradiente de densidad con Ficoll Hypaque (Sigma) en una relación 2:1 y se centrifugó a 1500 RPM o 300 g por 30 min. Se separó la fase del medio correspondiente a las células esplénicas y se lavó con PBS para eliminar cualquier resto de Ficoll (Quah y Parish 2010) **(Figura 6).**

4.6.3. Cultivo de esplenocitos y marcaje con carboxifluoresceína succinimidil éster (CFDA)

Los esplenocitos fueron cultivados en frascos de 25 cm^2 en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (RPMI-SFB). Después de 2 días se lavó los esplenocitos con PBS 1X (Sigma). Se resuspendió a una concentración de 1 x 10^7 células/mL en PBS 1X y se incubó con 5 µM CFDA durante 5 min a TA en la oscuridad. La reacción se detuvo con SFB en relación 1:3 y se centrifugó por 10 min a 1500 RPM o 300 g a 4 ° C (Quah y Parish 2010). Se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces con RPMI-SFB y finalmente se determinó la concentración de los esplenocitos con un hemocitómetro.

4.6.4. Activación con fitohemaglutinina (PHA)

Los esplenocitos marcados fueron sembrados a 2 x 10^5 células en frascos de 25 cm^2 en medio RPMI con 0%, 10%, 25%, 75% y 100% de secretoma obtenido de las células cultivas en medio XANADU o MQD-Comercial. Simultáneamente se estimuló la activación con 10 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA) (Sigma) por 72 horas (Martínez Peinado 2017) en todos los frascos excepto los controles.

- Control positivo de proliferación u activación: activación con 10 µg/ml de PHA y cultivo en medio RPMI
- Control negativo de proliferación u activación: Linfocitos sin activar y cultivo en medio RPMI

4.6.5. Evaluación por citometría mediante el marcador CFDA

A las 72 horas los esplenocitos fueron recolectados por cada tratamiento en 1 ml de DPBS y como control de compensación se utilizó esplenocitos sin CFDA.

Los datos de proliferación de esplenocitos se obtuvieron en el Citómetro de Flujo FACScan (Becton Dickinson) mediante el programa BD CellQuest™ en base a una plantilla donde los datos de selección de población por SSC y FSC estaban preestablecidos. Linfocitos sin marcar se utilizaron para definir la población y el umbral en el histograma, dejando un 0,2% de células positivas. A continuación, se corrieron las muestras marcadas y el programa calculó automáticamente el número de células positivas y negativas. Para la organización y presentación final de los datos se utilizó el programa de libre acceso Flowing Sofware versión 2.5 (Turku Bioscience).

Los resultados del porcentaje de células con pérdida de CFDA fueron representados como la media más la desviación estándar de tres experimentos independientes o réplicas **(Figura 6).**

4.6.6. Evaluación por microscopía

También a las 72 horas, las colonias de linfocitos fueron observadas directamente en el microscopio invertido y se fotografió 50 campos representativos.

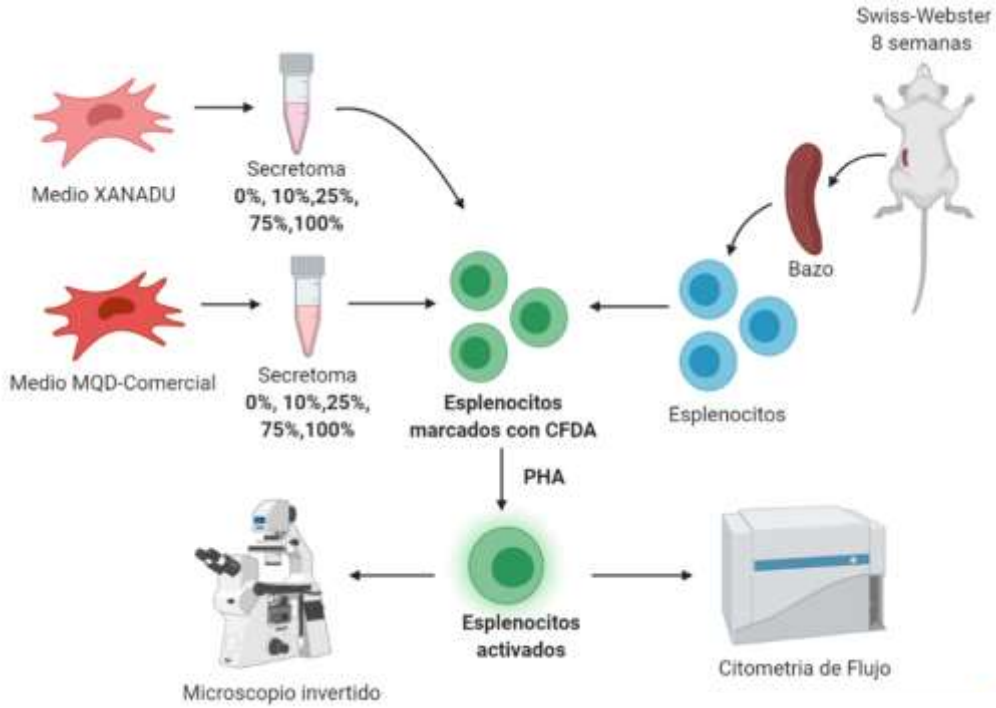

Figura 6. Resumen gráfico del procedimiento para el ensayo de inmunosupresión con esplenocitos. CFDA, carboxifluoresceína succinimidil éster; PHA, fitohemaglutinina. Imagen creada con el programa BioRender (biorender.com).

4.7. Caracterización de la expresión génica

Para las tres repeticiones de cada replica se almacenó en cada pase 1 x 10^6 células a -80 °C para la caracterización de la expresión génica. En los pases 6, 10 y 13 de cada medio, se evaluaron la expresión de 10 genes: relacionados con la potencialidad de diferenciación (FBPA4, adipogenesis; RUNX2, osteogénesis; SOX9, condrogénesis), marcadores de inmunomodulación y migración y *homing* (IL-10, CXCL9, CXCL10, CXCR4) y marcadores de regulación del ciclo celular (p21, p53, pRB).

4.7.1. Extracción de ARN total

El ARN total de las células fue extraído mediante el método de tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo en base al reactivo Easy Blue® (Intron Biotechnology Kyungki-Do, Korea), el cual favorece la extracción del ARN total con un alto rendimiento y pureza que puede ser directamente usado para la síntesis de cDNA.

Al millón de células almacenadas en los pases 6, 10 y 13 se le agregó 800 µl del reactivo Easy Blue® y se dejó incubar a T.A por 5 min. A continuación, se le agrego 200 ul de cloroformo (Sigma) y se centrifugó a 4 ºC x 15 min a 14000 g. Se recogió los 500 ul de la fase acuosa transparente, donde se encuentra el ARN y se realizó la precipitación con 500 ul de isopropanol (Sigma) por 1hora a -20 °C. Posteriormente se centrifugó a 4ºC x 15 min a 1400 g y se eliminó el sobrenadante. Se lavó tres veces con 500 ul de etanol al 75% (Panreac), centrifugando a 4 ºC x 5 min a 14000 g. Después del tercer lavado, se terminó a secar en un termobloque a 40 °C. El ARN extraído se resuspendió entre 20 a 40 µl de H_2O de grado molecular según el tamaño del pellet y se calentó en un termobloque a 65 °C x 5 min (Beltran Povea 2016). El ARN extraído se mantuvo a -20 ºC hasta la síntesis del ADN complementario (ADNc). La concentración y la pureza se evaluaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Willmington, DE, EEUU), midiendo la absorbancia a 260 nm y la relación 260 nm/280 nm respectivamente. Se tomó en consideración valores entre 1.8 y 2 de la relación 260 nm/280 nm como óptimos.

4.7.2. Transcripción reversa (RT)

Para la transcripción reversa se utilizó el kit SensiFAST™ cDNA Synthesis (Bioline) con 1 µg de ARN extraído para un volumen final de 20 µl. Para la hibridación de los cebadores los tubos fueron colocados a TA por 10 min, luego para la transcripción reversa los tubos fueron colocados en el termobloque a 42 ºC por 15 min, y por último para la inactivación, los tubos fueron colocados en un termobloque a 85 ºC por 5 min. El ADNc obtenido se almacenó a 4 °C hasta el momento de la cuantificación relativa. Se consideró como control de la RT al mix sin agregar ARN.

4.7.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La qPCR se realizó por triplicado para cada gen utilizando el kit ITaqTM Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) y el termociclador 7500 Real Time PCR System® (Applied Biosystem). Cada reacción de 15 µL comprendió de: 7,5 µL de ITaqTM Universal SYBR Green Supermix, 0.3 µL de cada cebador a 10 µM, 1 µL del ADNc (0.05 µg/ µl) y agua grado molecular. La relación de genes y secuencias de cebadores, así como el tamaño del amplificado esperado se incluyen en el **Anexo 3**.

En el termociclador los parámetros de amplificación fueron 1 ciclo de activación a 95 ºC durante 30 s y 40 ciclos de 95 ºC durante 15 s y 60 ºC durante 1 min. Los datos se analizaron con el programa Real Time PCR Applied Biosystems 7500® v 2.06. Para la normalización se utilizó como control interno de expresión de β-actina, y se usó el método ΔΔCT (Pfaffl 2001), tomando como grupo calibrador al medio control suplementado con suero. En cada una de las corridas se realizó curvas de disociación al finalizar la PCR de manera predeterminada, elevando la temperatura a 95 °C por 15 s. De esta manera se evaluó la especificidad de las reacciones.

Para todos los genes los resultados fueron representados como la media más la desviación estándar de tres experimentos independientes o replicas excepto para el MQD-Comercial, cuyos datos corresponden a la única replica realizada.

4.8. Evaluación cariotípica de las líneas celulares de CMMh expandidas

Muestras de los pases 6 y 10 de la línea celular expandida en medio XANADU fueron enviadas al servicio de citogenética de la Universidad de Granada, en donde se evaluó el cariotipo convencional con bandas G en 10 placas metafásicas. Se seleccionó cariotipos representativos.

4.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software IBM SPSS para Windows, versión 20 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). Para los resultados obtenidos de los ensayos de la cinética de crecimiento, expresión y caracterización de las CMMh mediante qPCR y citometría, así como para el ensayo de inmunomodulación se empleó T-student de una cola, que permitió evaluar el medio XANADU frente al

medio control o el medio MQD-Comercial. Para los resultados obtenidos de la expresión de marcadores carcinogénicos se utilizó ANOVA de una vía, para luego realizar un test de comparaciones múltiples de Tukey, lo cual nos permitió comparar entre todos los grupos. Las diferencias significativas se establecieron para un p-value menor a 0.05.

5. RESULTADOS

5.1. Evaluación de la morfología, cinética de crecimiento y análisis prospectivo de la producción de CMMh

Las células expandidas en medio XANADU durante los 8 pases consecutivos (56 días, cada 7 días), presentaron una morfología fibroblástica característica de las CMMh, sin signos de senescencia replicativa **(Figura 7).** En torno a la cinética de crecimiento, el recuento de células viables mostró que las CMMh cultivadas en medio XANADU presentaron bajos tiempos de duplicación, entre 45 y 70 horas, similar al que se obtuvo utilizando MQD-Comercial y significativamente menor (p-value < 0.05) a lo que se obtuvo con el medio control (DMEM+10% SFB). Por su parte, las células en el medio control a lo largo de los pases aumentaban progresivamente su tiempo de duplicación, llegando a ser 260 horas en el pase 13 **(Figura 8A)**.

Además, la expansión de la línea celular en medio XANADU muestra un CPD, medido entre los pases 6 y 13, similar a lo obtenido en MQD comercial y significativamente superior al medio control (p-value < 0.05). Mientras que la población de CMMh se duplicó 25.6 veces en medio XANADU, solo se duplicó 14.21 veces en el medio control **(Figura 8B).**

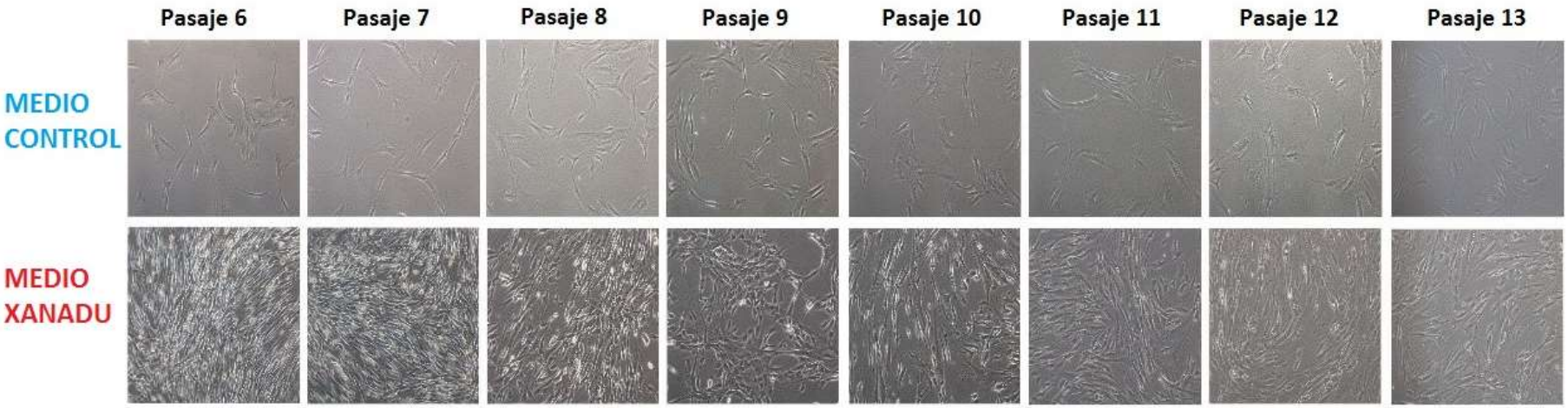

Figura 7. Morfología a través de los pases de las CMMh cultivadas en medio XANADU y medio control. Se observa que la morfología de las CMMh en medio XANADU es similar a la encontrada en medio control (DMEM+10% SFB). En ambos cultivos las células son fibroblásticas y adherentes al plástico. Las figuras son representativas de 3 experimentos independientes. Ampliación de 100X.

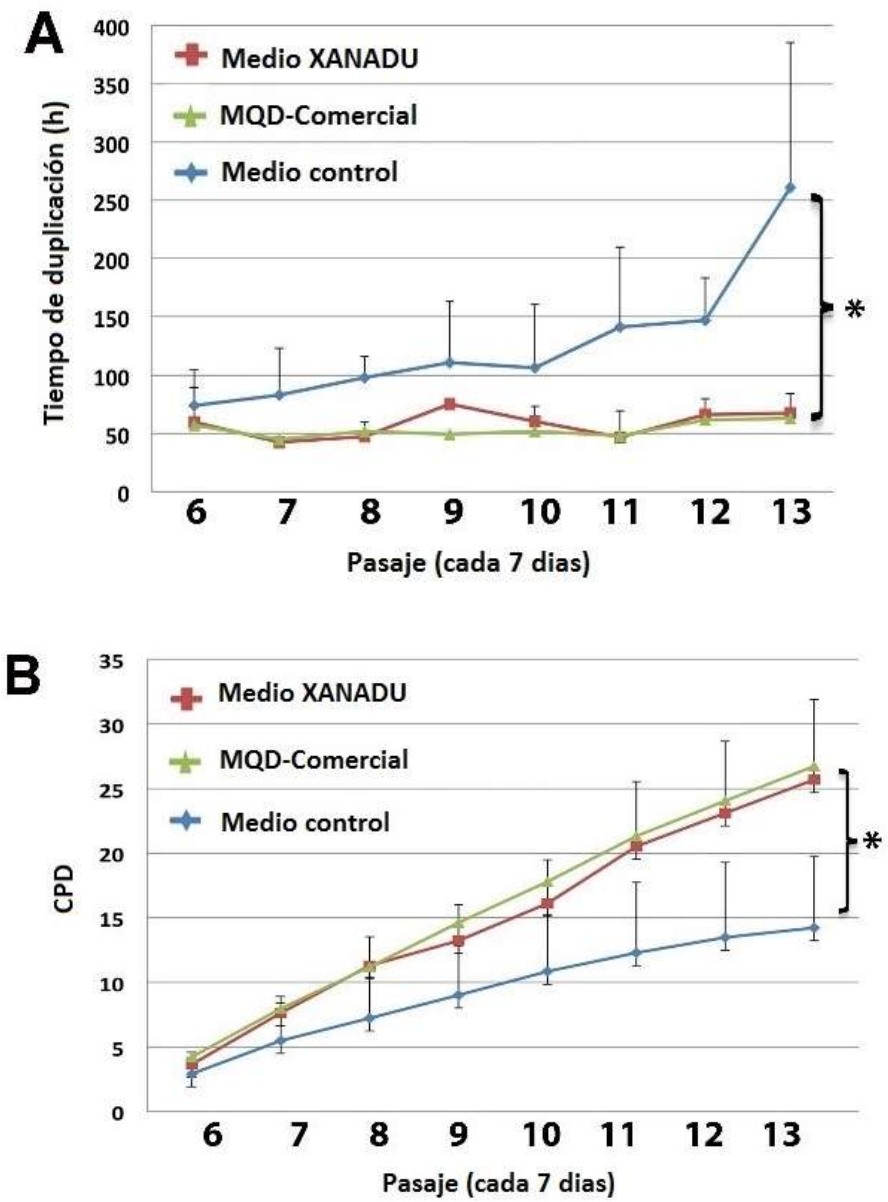

Figura 8. Evaluación de la cinética de crecimiento de las CMMh cultivadas en medios químicamente definidos y medio control. A. Tiempo de duplicación a través de los pases de las CMMh cultivadas en medio control (DMEM+10% SFB), medio XANADU o MQD-Comercial. **B.** Duplicación acumulativa de la población (CPD) a través de los pases. Los datos de A y B son la media más la desviación de tres experimentos independientes o replicas excepto para MQD-Comercial que corresponden a la única replica realizada. T-student, *$p < 0.05$ estadísticamente significativo frente al medio control.

En un análisis prospectivo **(Tabla 3)** en base a los datos de proliferación obtenidos y considerando facilidades logísticas adecuadas: ambiente, material y personal a disposición, podemos calcular que, partiendo de una semilla de 125 000 células, en

14 días con el medio XANADU se pueden obtener 3,66 dosis de 100 millones de células cada una, mientras que con el medio control se obtienen 0,23 dosis. Al día 28 de cultivo se pueden llegar a obtener 3 521 dosis con medio XANADU, mientras que con el medio control se obtendrían solo 303 dosis.

Tabla 3. Análisis prospectivo de la producción de células expandidas. Se consideró una semilla de 125 mil células para el análisis prospectivo, las dosis de 100 millones de células fueron calculadas considerando facilidades logísticas adecuadas: ambiente, material y personal**.**

	Dosis de 100 millones				
	día 0	**día 7**	**día 14**	**día 21**	**día 28**
Medio control con SFB	0,00125	0,014 ± 0,0056	0,23 ± 0,036	9,69 ± 1,91	303 ± 15,6
Medio XANADU	0,00125	0,053 ± 0,0057	3,66 ± 0,7	425 ± 95	3 521 ± 264
Medio MQD-Commercial	0,00125	0,05 ± 0,0027	3,7 ± 1,7	384 ± 102	3 767 ± 136

5.2. Caracterización inmunofenotípicas de las CMMh

Alícuotas de los pases 6, 10 y 13 fueron analizadas para marcadores de linaje mediante citometría de flujo. En las células cultivas en medio XANADU la mayoría de los marcadores positivos para CMMh (CD73, CD90 y CD105) y negativos (CD45, CD34 y HLA-DR) (Dominici et al. 2006) presentaron un comportamiento similar a lo visto en las células cultivadas en medio control y MQD comercial. En el pase 13 se observan las diferencias más notables. Las células cultivadas en medio XANADU y medio control mantienen la expresión de los marcadores positivos mayores al 70%, mientras que las células en MQD comercial presentan una clara tendencia a la baja expresión del marcador CD105 (<40%). Asimismo, respecto a la expresión de marcadores negativos, las células cultivadas en medio control presentan una tendencia al incremento del marcador CD34 en el transcurso de los pases, siendo este en el pase 13 mayor al 10%. **(Figura 9).**

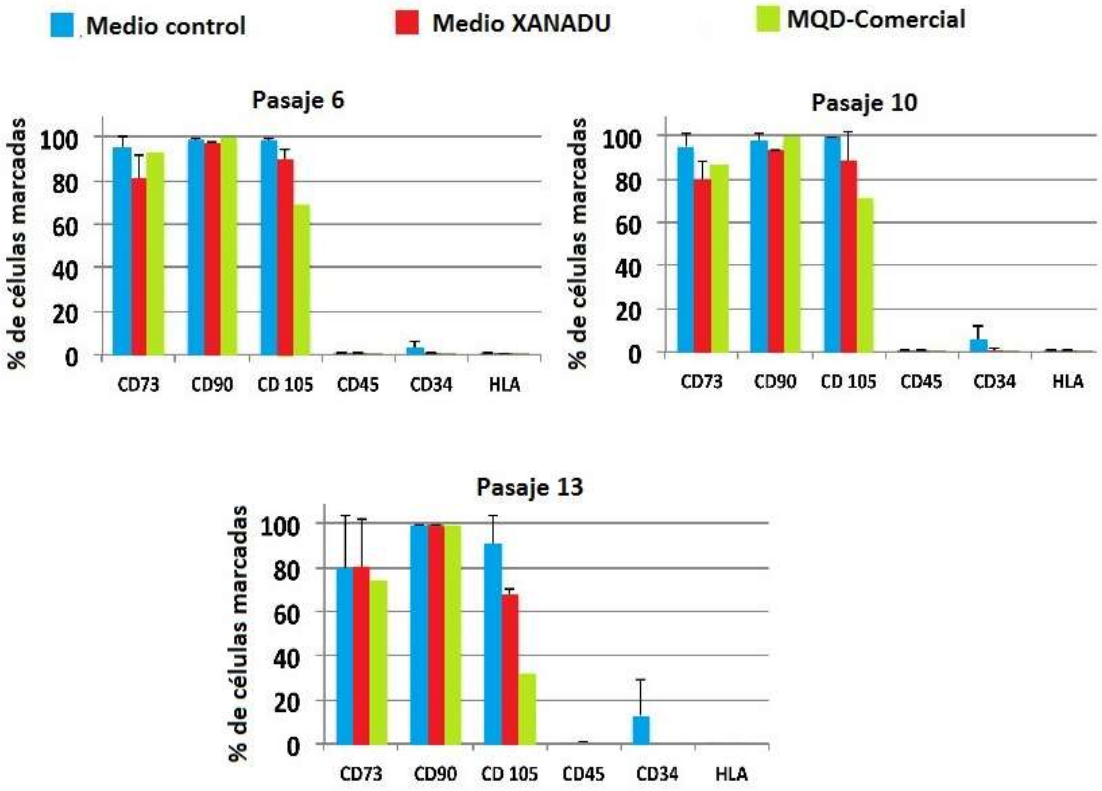

Figura 9. Características fenotípicas de las CMMh cultivadas en medio XANADU y otros medios. Citometría de flujo en los pases 6, 10 y 13 de los marcadores positivos de membrana: CD73, CD90 y CD105; y negativos: CD45, CD34 y HLA-DR de las CMMh expandidas en medio XANADU, medio MQD-Comercial y medio control (DMEM+10%SFB). El eje Y representa el porcentaje de células marcadas. Los resultados corresponden a la media más la desviación de al menos tres experimentos independientes o replicas excepto para MQD-Comercial que corresponden a la única replica realizada. No se observaron diferencias significativas. HLA, antígeno leucocitario humana-DR.

5.3. Evaluación de la capacidad de diferenciación de las CMMh

Al culminar el pase 10 las células fueron cultivadas en medios comerciales de diferenciación y posteriormente fueron analizadas utilizando *oil red, alizarin red y alician blue* como marcadores de los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico respectivamente.

Las CMMh cultivadas en medio XANADU mantienen su capacidad diferenciadora hacia los tres linajes. Además, en cada uno de estos se observa una mayor cantidad de células diferenciadas para el medio XANADU que para el medio control (DMEM+10%SFB) **(Figura 10).**

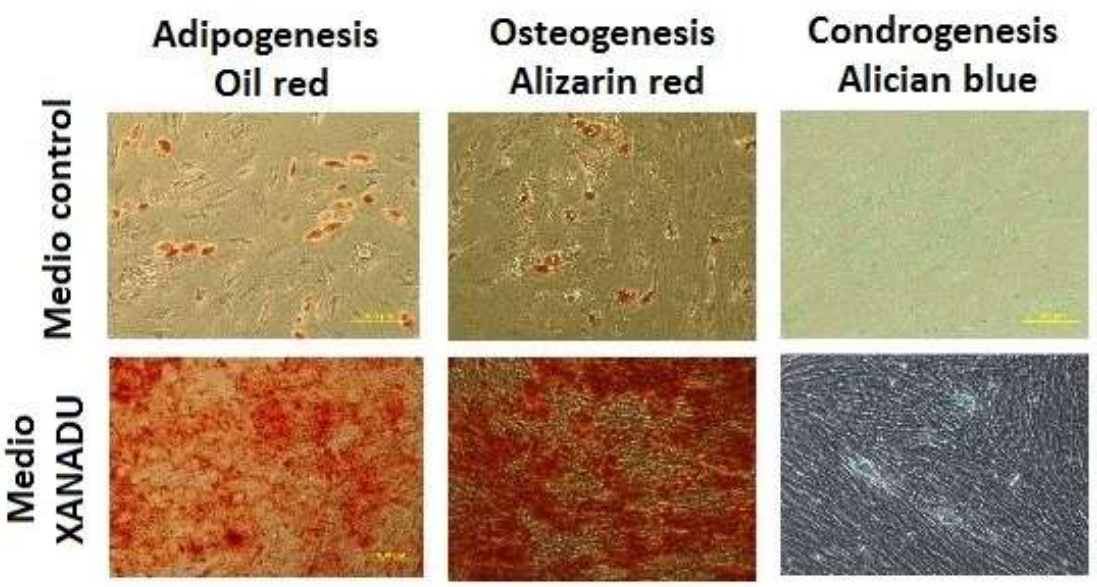

Figura 10. Capacidad de diferenciación multilinaje de las CMMh cultivadas en medio XANADU y medio control. Se observa la formación a partir de CMMh del pase 10 de adipocitos marcados en rojo con *oil red*, de osteoblastos también marcados en rojo con *alizarin red* y de condroblastos marcados en azul con *alcian blue*. Las figuras mostradas tienen aumento 100x y son representativas de tres experimentos independientes.

5.4. Comparación del potencial inmunomodulador del secretoma de CMMh

Para comparar el potencial inmunomodulador del secretoma o medio condicionado obtenido de las CMMh expandidas en medio XANADU y el medio MQD-Comercial. Se utilizaron esplenocitos de bazos de ratones Swiss Webster y secretoma de cultivos del pase 10. Los esplenocitos fueron 1) marcados con CFDA, marcador de proliferación 2) cultivados en medio RPMI con 0%, 10%, 25%, 75% y 100% de secretoma y activados simultáneamente con fitohemaglutinina (PHA)

Mediante microscopia se observó que al aumentar el porcentaje del secretoma en el medio para esplenocitos hay una clara disminución del número y tamaño de las colonias generadas a las 72 horas, llegando a ser comparables con el control sin activar (Figura 11A). Asimismo, por citometría se comprobó que el porcentaje de células activadas o en proliferación disminuye al aumentar el porcentaje del secretoma de CMMh. El reemplazo del 10 % con el secretoma o medio condicionado de las CMMh expandidas en medio XANADU es capaz de disminuir significativamente la proliferación de esplenocitos de ratón activados con

fitohemaglutina a diferencia del secretoma obtenido en medio MQD-comercial que logra aun este efecto con el remplazo del 50% del medio control. **(Figura 11B).**

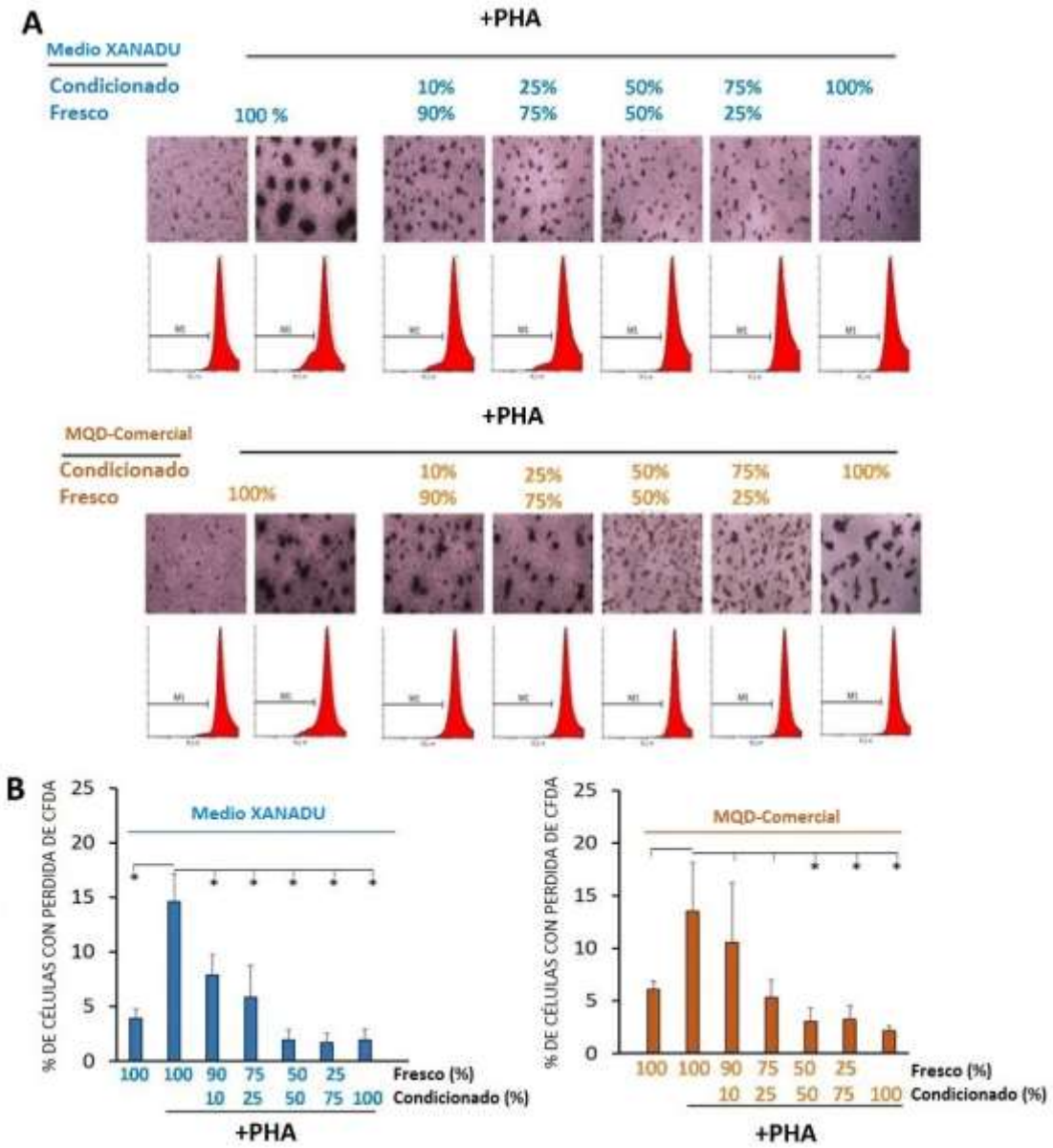

Figura 11. **Actividad inmunomoduladora del secretoma de las CMMh expandidas con medio XANADU y MQD-Comercial.** Ensayo de inmunosupresión de la proliferación de esplenocitos de ratón marcados con CFDA. **A)** Figuras y citometrías representativas de los esplenocitos de raton activados con fitohemaglutinina luego de 72h de tratamiento con 0%, 10%, 25%, 50%, 75% y 100% de secretoma o medio condicionado**. B**) Porcentaje de células con pérdida de CFDA versus los tratamientos. Los resultados corresponden a la media más la desviación de tres experimentos independientes. Control positivo de proliferación: PHA+ y 0% de medio condicionado y control negativo: PHA- y 0% de medio condicionado. PHA, fitohemaglutinina, CFDA,

carboxyfluorescein diacetate T-student, *p-value < 0.05 estadísticamente significativo frente al control positivo.

5.5. Caracterización de la expresión de marcadores de potencial de diferenciación.

Se realizó un análisis de expresión génica mediante qPCR como un ensayo complementario para confirmar el incremento del potencial de diferenciación. La cuantificación de los factores de diferenciación en los pases 6, 10 y 13 muestran que las células cultivadas en medio XANADU tienen mayor potencial para diferenciarse a adipocitos, ya que expresan significativamente mayores niveles (p-value < 0,05) de FBPA4 que el control. El potencial de diferenciación a osteocitos medido por RUNX2 se mantiene similar al MQD-Comercial y es significativamente mayor (p-value < 0,05) a lo visto en el medio control. Sin embargo, a pesar que en el pase 6 la expresión de SOX9, marcador del potencial de diferenciación hacia condrocitos, es significativamente mayor (p-value < 0,05) para el medio XANADU que, para el medio control, su expresión se observa similar en los pases 10 y 13 **(Figura 12).**

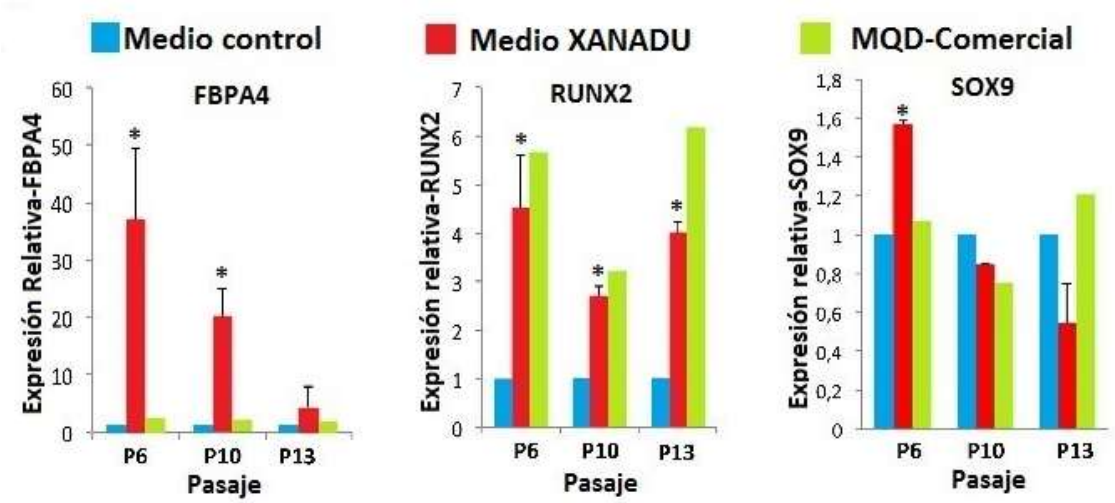

Figura 12. **Perfiles de expresión de los marcadores de potencial de diferenciación de las CMMh expandidas con medio XANADU y otros medios.** PCR cuantitativa en los pases 6, 10 y 13 de los marcadores de adipogénesis, FABP4; osteogénesis, RUNX2, y condrogénesis, SOX9 en CMMh expandidas en medio XANADU, medio MQD-Comercial y medio control (DMEM+10%SFB). El eje Y representa la expresión relativa. Los valores fueron normalizados a los valores de expresión de la β-actina, como control interno y al medio control como grupo calibrador, usando el algoritmo ΔΔCt. Los resultados corresponden a la media más la desviación de tres experimentos

independientes o replicas excepto para MQD-Comercial que corresponden a la única replica realizada. T-student *p-value<0,05 estadísticamente significativo frente al medio control. FABP4, proteína 4 de unión a ácidos grasos; RUNX2, factor de transcripción 2 relacionado con Runt; SOX9, factor de transcripción 9 de la caja SRY.

5.6. Caracterización de la expresión de marcadores de inmunomodulación y migración y *homing*

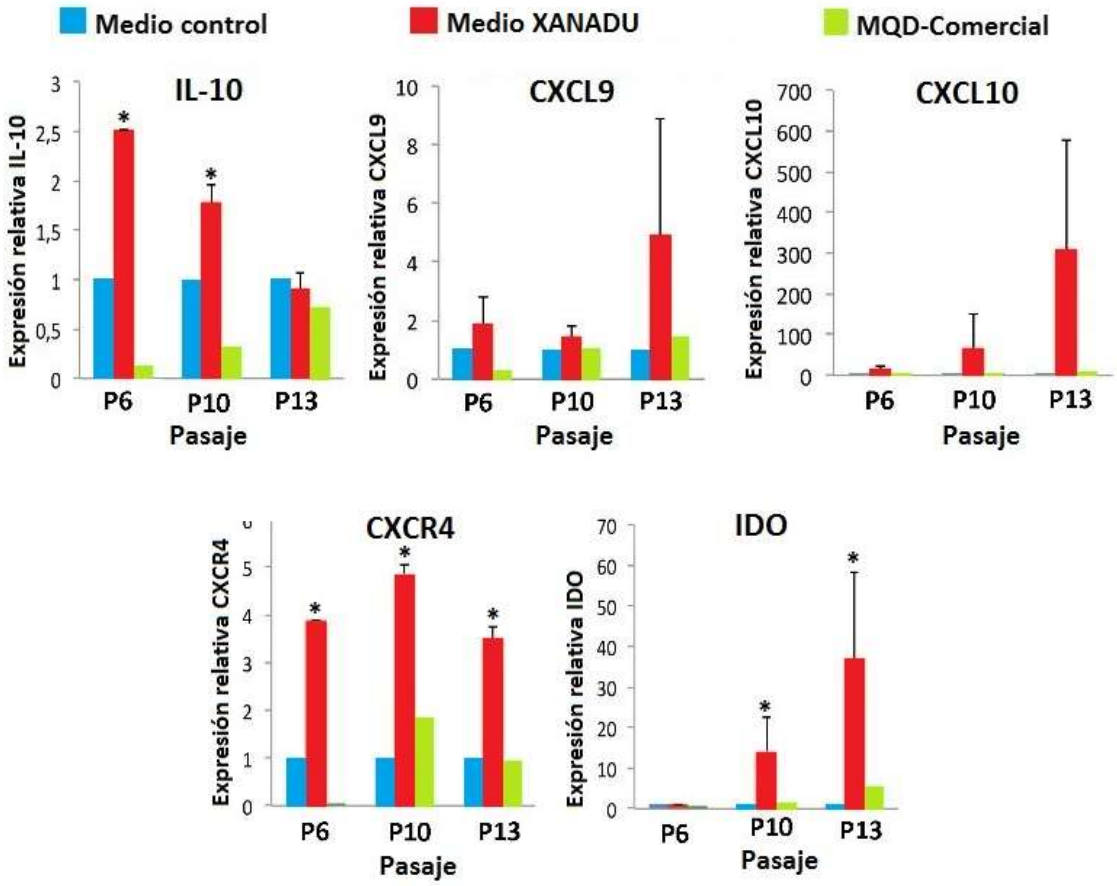

Figura 13. Perfiles de expresión de los marcadores de inmunomodulación y migración y *homing* de las CMMh expandidas con medio XANADU y otros medios. PCR cuantitativa en los pases 6, 10 y 13 de los marcadores de inmunomodulación: IL-10, IDO, CXCL9, CXCL10 y migración y *homing*: CXCR4 en CMMh expandidas en medio XANADU, medio MQD-Comercial y medio control (DMEM+10%SFB). El eje Y representa la expresión relativa. Los valores fueron normalizados a los valores de expresión de la β-actina, como control interno y al medio control como grupo calibrador, usando el algoritmo ΔΔCt. Los resultados corresponden a la media más la desviación de tres experimentos independientes o replicas excepto para MQD-Comercial que corresponden a la única replica realizada. T-student *p-value<0,05 estadísticamente

significativo frente al medio control. IDO, indolamina 2,3-dioxigenasa; IL-10, interleucina 10; CXCL9, quimiocina 9; CXCL10, quimiocina 10; CXCR4, receptor 4 de quimioquinas.

Complementario al experimento de inmunosupresión, se realizó un análisis por qPCR de la expresión de marcadores de inmunomodulación como los factores antiinflamatorios indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y la interleucina 10 (IL-10) y quimioquinas proinflamatorio CXCL9 y CXCL10, así como factores relacionados con la migración y *homing*, el receptor 4 de quimioquinas (CXCR4). Las CMMh cultivadas en medio XANADU mostraron una expresión significativamente mayor (p-value < 0.05) de los factores antiinflamatorios IDO e IL-10, así como del marcador de *homing* CXCR4, en comparación con las células en el medio control. Asimismo, la expresión de las quimioquinas proinflamatorias CXCL9 y CXCL10 fue mayor, pero no mostró diferencias significativas. En contraste el MQD-Comercial mostró un comportamiento similar al medio control **(Figura 13).**

5.7. Caracterización de la expresión de marcadores de regulación del ciclo celular.

Para estudiar una posible desregulación del ciclo celular, se realizó un análisis mediante qPCR de la expresión de genes marcadores de regulación del ciclo celular como p21, p53 y pRB. En este experimento los pases 6, 10 y 13 del medio control (DMEM+10%SFB), medio XANADU y MQD-Comercial fueron evaluados.

Las células expandidas en medio XANADU expresaron niveles iguales o significativamente menores (p-value < 0.05) de p21, p53 y pRB que las células en medio control del pase 6. Asimismo, en cada pase evaluado, la expresión en medio XANADU fue significativamente menor (p-value < 0.05) que en el medio control. Cabe resaltar que el medio XANADU tuvo una tendencia a una menor expresión de los marcadores de regulación del ciclo celular que el MQD-Comercial y que la expresión de estos marcadores en el medio control se vio aumentada significativamente en el transcurso de los pases **(Figura 14).**

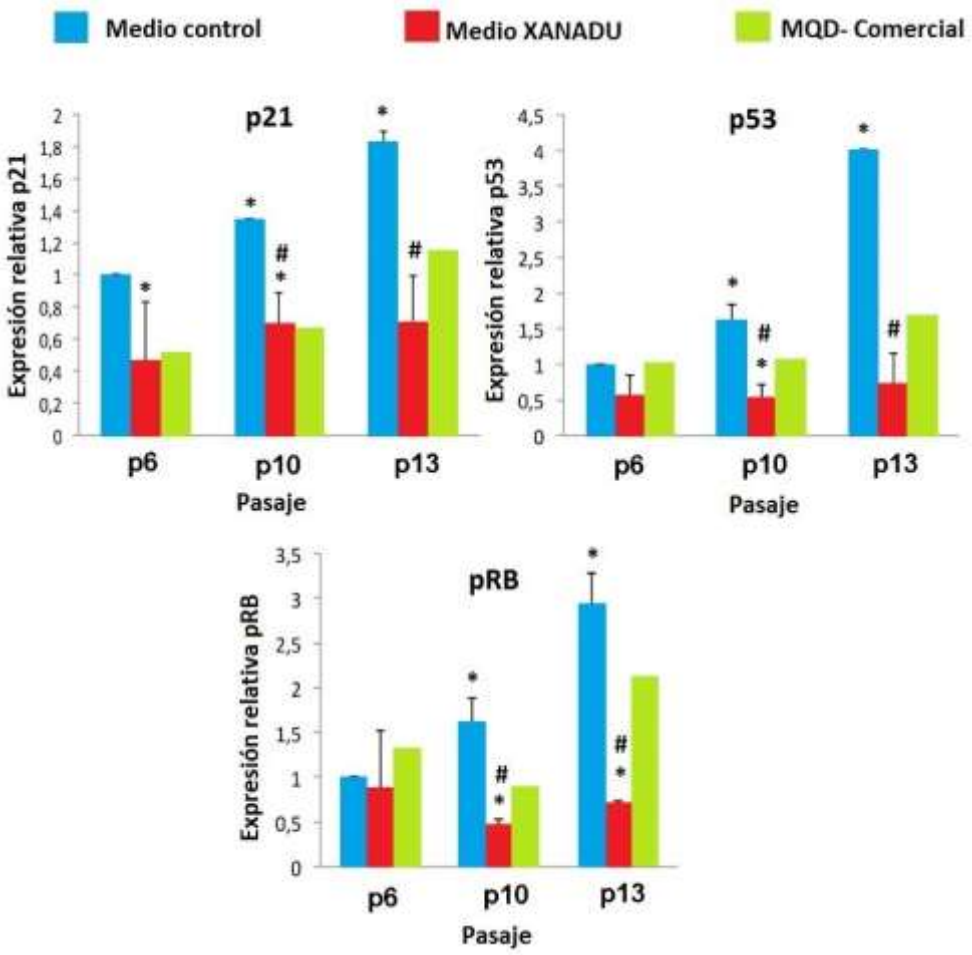

Figura 14. Perfiles de expresión de los marcadores de regulación del ciclo celular en CMMh expandidas en medio XANADU y otros medios. PCR cuantitativa en los pases 6, 10 y 13 de los marcadores de regulación del ciclo celular: p21, p53 y pRB en CMMh expandidas en medio XANADU, medio MQD-Comercial y medio control (DMEM+10%SFB). El eje Y representa la expresión relativa. Los valores fueron normalizados a los valores de expresión de la β-actina, como control interno y al pase 6 del medio control como grupo calibrador, usando el algoritmo ΔΔCt. Los resultados corresponden a la media más la desviación de tres experimentos independientes o replicas excepto para MQD-Comercial que corresponden a la única replica realizada. ANOVA, *p-value < 0.05 estadísticamente significativo frente al pase 6 del medio control, T-student #p-value<0,05 estadísticamente significativo frente al medio control. pRB, proteína del retinoblastoma.

5.8. Evaluación de la estabilidad cromosómica luego de un cultivo a largo plazo

El cariotipo de las CMMh fue evaluado en los pases 6 y 10. Para cada pase se evaluó 10 placas metafásicas mediante bandeo G. Las CMMh en medio XANADU no presentaron aberraciones cromosómicas en los pases evaluados, sugiriendo que el medio mantiene la estabilidad cromosómica durante al menos 8 pases consecutivos (56 días de cultivo) **(Figura 15A, 15B).**

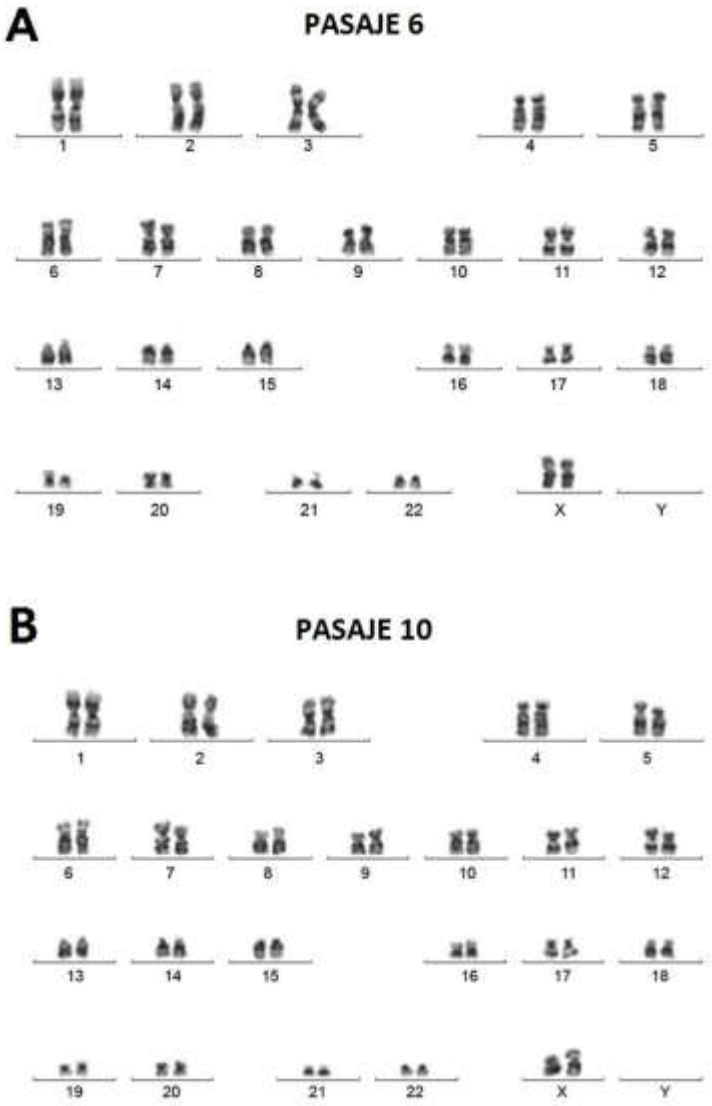

Figura 15. Análisis cariotípico de las CMMh expandidas con medio XANADU luego de un cultivo a largo plazo. A) Cariotipo con bandeo G del pase 6 **B)** Cariotipo con bandeo G del pase 10. En ambos no se observan aberraciones cromosómicas. Los cariotipos mostrados son representativos de las 10 placas metafásicas estudiadas.

DISCUSIÓN

En los últimos años el uso de CMM en terapia celular ha ido en aumento. Los medios con suero suelen ser los más usados para la expansión de estas células sin tomar en cuenta que representan un gran obstáculo para la producción segura y eficiente con fines terapéuticos (Gottipamula et al. 2013). Por lo cual, la disponibilidad de medios químicamente definidos libres de suero es crucial para estudiar los mecanismos de acción de la CMM en muchas enfermedades y lograr una producción de células con características y rendimientos reproducibles.

Mantener la capacidad proliferativa permite obtener altas biomasas de CMM en periodos cortos de producción. Del mismo modo, un medio de expansión, debe ser capaz de evitar la senescencia del cultivo al mantener la morfología celular, la potencialidad, tiempos cortos de duplicación y un alto doblaje poblacional.

El primer criterio mínimo para definir un cultivo de CMM propuesto por el *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Commitee* del ISCT es que las células en cultivo se adhieran al plástico (Dominici et al. 2006). El medio XANADU mantuvo su adherencia al plástico y la morfología fibroblástica característica de las CMM en el transcurso de los 8 pases realizados en condiciones de bioseguridad 2.

Asimismo, las CMM cultivadas con el medio XANADU no presentaron características de senescencia replicativa durante 13 pases (91 días), las que si se presentaron cuando las CMM fueron cultivadas con medio control con SFB. Las CMM cultivas en medio con SFB mostraron el tiempo de duplicación elevado y la ralentización significativa del CPD en comparación con los medios químicamente definidos. Estos resultados son similares a los observados con el MQD-STK2, que en 15 pases (105 días) no mostró senescencia replicativa, mientras que su control con SFB si (Lee et al., 2017). Otros medios a base de SFB como el Lonza MSCGM ™ han mostrado incrementos significativos en el Td en el transcurso de los pases, mostrando senescencia antes del pase 11 (77 días), identificado mediante el cálculo de la actividad de la beta-galactosidasa (Gruber et al. 2012). Además el tiempo de duplicación para el medio XANADU al pase 13 fue menor a lo reportado en la mayoría de cultivos a largo plazo (>100h) en medios con suero, libres de suero o xeno-free (Hassan et al. 2020). En este sentido las células cultivadas con medio XANADU presentarían un crecimiento favorable para la aplicación clínica a diferencia del medio control.

Lo antes mencionado, fue sustentado con el análisis prospectivo de la producción. Se conoce que para que una terapia celular sea viable a gran escala, se debe producir una gran cantidad de dosis en un corto periodo de tiempo. Una dosis por ejemplo para una terapia con CMMh en casos severos de COVID-19 es 1 millón de células/kg de peso, lo que equivale en promedio para una persona adulta entre 50-75 millones de células por dosis (Sánchez-Guijo et al. 2020). En algunos casos como en el mencionado se necesitan más de una dosis para completar el tratamiento, lo que haría inviable que el tratamiento llegue a una gran cantidad de personas. Continuando con el ejemplo del COVID-19 si nosotros buscaríamos aplicar en el Perú el tratamiento con CMMh a todos los casos severos en el pico de la pandemia necesitaríamos 10 mil dosis, considerando 1 dosis por persona, lo cual se podría duplicar o triplicar.

En el análisis prospectivo se calculó que, partiendo de una semilla con un mes de producción en condiciones ideales de infraestructura, equipamiento, reactivos y personal utilizado, con el medio XANADU se podría producir un biobanco de 3 521 dosis de 100 millones de células, lo que sería más que suficiente para completar las dosis en el caso presentado. Por el contrario, en el mismo tiempo y condiciones la producción con el medio control seria solo de 303 dosis, con las cuales sería mucho más difícil satisfacer la demanda. En resumen, si las facilidades logísticas son adecuadas el medio XANADU, es un medio robusto para la expansión en gran escala de CMMh.

El segundo criterio mínimo para definir un cultivo de CMMh propuesto por el ISCT es la expresión de marcadores positivos CD73, CD105 y CD90 en lo posible en más del 95% de la población y de marcadores negativos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA-DR en menos del 2% de la población (Dominici et al. 2006).

Tanto el marcador CD73 como el CD90 no mostraron diferencias significativas entre los medios y se expresaron en gran parte de la población a lo largo de los 8 pases realizados, sugiriendo que las CMMh mantenían sus propiedades de diferenciación, inmunomodulación y angiogénesis ligadas a estos marcadores. La presencia del marcador CD105 en la población de CMMh en medio control y medio XANADU se encontró en una proporción aceptable a lo largo de los pases, siendo esta cercana a lo indicado por la ISCT (Dominici et al. 2006). Cabe resaltar que el medio XANADU fue ligeramente menor al medio control, pero sin diferencias significativas. Por el contrario, en la población de CMM en medio MQD-Comercial, el CD105 se expresó en menos de mitad de la población (< 40%). Se ha descrito que en los medios sin suero disminuye la expresión de CD105 a diferencia de los medios a base de suero, ya que ciertos factores contenidos serían necesarios para su expresión (Mark et al. 2013). Aunque esto podría

explicar lo sucedido, es claro que para dar una hipótesis certera se tendría que conocer la composición del medio lo cual es secreto de patente. Por otro lado, que la población de CMM en medio XANADU, también libre de suero, no haya sufrido una disminución drástica en los niveles de CD105, se debería a que la expresión de esta puede ser inducida por TGF-β y condiciones de hipoxia (Sánchez-Elsner et al. 2002), las cuales son condiciones presentes en el medio XANADU (Beltran Povea 2016). En este medio el óxido nítrico (NO) se comporta como el simulador de las condiciones hipóxicas al activar diferentes vías de señalización, como las relacionadas con la proteína reguladora del factor inducible por hipoxia (HIF-1) (Tapia Limonchi 2013).

El nivel de expresión de HLA-DR, CD34 y CD45 a lo largo de los 8 pases se mantuvo menor al 2% en las poblaciones de CMMh expandidas en los medios XANADU y MQD-Comercial, lo que indica la baja inmunogenicidad, menor rechazo de estas células y el mantenimiento del perfil negativo esperado para CMMh. Por el contrario, el incremento de 5 veces del marcador negativo CD45 en el medio control, podría indicar una disminución en el potencial angiogénico (Peters et al. 2015). Ya que la expresión de CD45 se puede estimular bajo condiciones de microambiente, como la presencia aumentada de ciertas citoquinas y factores de crecimiento (medio con factores IL-1, TNF-α, IL-6) (Yeh et al. 2006), la gran cantidad de componentes, muchos de ellos desconocidos, los cuales varían cuantitativamente y cualitativamente según el lote del suero explicarían el aumento de CD45 en el medio control (Gstraunthaler, Lindl y Van Der Valk 2013), mientras que las condiciones químicamente definidas y estables del medio XANADU serían las más adecuadas para mantener la baja expresión de este marcador.

En resumen, el medio XANADU sería el único medio, a comparación de los medios aquí probados que es capaz de mantener en el transcurso de los pases los marcadores positivos y negativos propios de las CMMh en una proporción aceptable, cercana a lo indicado por la ISCT (Dominici et al. 2006). Las CMMh producidas en medio XANADU serían las más adecuadas para la aplicación en clínica por expresar marcadores ya relacionados con las potencialidades de estas células y presentar una baja inmunogenicidad, clave para la aplicación en una terapia alogénica.

El tercer criterio mínimo para definir un cultivo de CMMh propuesto por la ISCT es la capacidad de diferenciación multipotente a osteoblasto, adipocito y condroblasto *in-vitro*, demostrada mediante tinción (Dominici et al. 2006). La capacidad de diferenciación también es una de las cuatro propiedades que hacen atractivas a estas células para aplicaciones clínicas (Hosseine,2018).

Luego de la inducción en medios comerciales respectivos de diferenciación, se demostró la capacidad de diferenciación a osteoblastos mediante el colorante *alizarin red*, que colorea los depósitos de calcio (Mineralización) (Gregory et al. 2004); la diferenciación a adipocitos mediante el colorante *oil red*, que colorea fuertemente los lípidos (Kraus et al. 2016) y la diferenciación a condroblasto mediante el colorante *alician blue*, que forma complejos con los proteoglicanos (PG) presentes en la membrana de los condrocitos (Terry et al. 2000). Tanto en las células expandidas en medio control como en las expandidas en medio XANADU se observó la capacidad de diferenciación a estos tres linajes, siendo visualmente mayor la concentración de células diferenciadas en el cultivo expandido en medio XANADU. Se ha reportado que otros medios xeno-free y/o libres de suero también igualan o aumentan la capacidad de diferenciación de las CMMh (Chase et al. 2010; Naung et al. 2019; Qu et al. 2020)

Los análisis de capacidad de diferenciación pueden ser complementados con análisis de potencialidad mediante marcadores de expresión, los cuales son fácilmente cuantificables. La proteína de unión a ácido grasos 4 (FABP4), es un marcador característico del tejido adiposo y de adipocitos, siendo la expresión de FABP4 altamente inducida durante la adipogénesis (Furuhashi et al. 2014). La expresión de este marcador temprano de adipogénesis luego de 21 días de diferenciación se ha visto aumentado por diferentes condiciones de cultivo, como el uso de andamios de colágeno (Voss et al. 2016; Mauney, Volloch y Kaplan 2005) y medios de cultivo sin suero en presencia de ácido ascórbico (AsA) (Jurek et al. 2020). Además, se ha descrito que la expresión de FABP4 en CMMh no diferenciadas de personas sanas es significativa mayor que en CMM de pacientes diabéticos, lo que se acompaña de un menor número de células diferenciadas de pacientes diabéticos luego de 21 días de diferenciación (Barbagallo et al. 2017). Por lo que la significativa mayor expresión de FABP4 en la población de CMM expandidas en medio XANADU a diferencia de los otros medios apoyaría la mayor capacidad de diferenciación a adipocitos observada en este. Cabe resaltar que se ha reportado que el AsA, uno de los componentes del medio XANADU (WO/2017/021535-PTC/EP2016/068767), regula la expresión de FABP4 (Jurek et al. 2020), lo que también podría explicar estos resultados.

Por otro lado, la diferencia en la potencialidad es mayor en el pase temprano 6 pero luego disminuye en los pases tardíos 10 y 13, lo que concuerda con lo reportado (Mauney, Volloch y Kaplan 2005; Eom et al. 2018). Mauney, Volloch y Kaplan (2015) reportaron que luego de 21 días de diferenciación la expresión de FABP4 es

significativamente menor en un pase tardío que en un pase temprano y que esto se acompaña de un menor número de células diferenciadas teñidas con *oil red*.

El factor de transcripción 2 relacionado con *Runt* (RUNX2), es una proteína clave implicada en la osteogénesis. RUNX2 se expresa en CMMh no comprometidas y su expresión aumenta hasta un nivel máximo en los osteoblastos inmaduros pero inhibe la maduración en etapas posteriores (Komor 2010). Por lo que el medio XANADU al mantener la expresión de RUNX2 significativamente mayor que en el medio control en todos los pases indicaría una potencial de diferenciación osteogénica superior. Cabe resaltar que la expresión de RUNX2 en CMM también se ha relacionado con la regulación de la proliferación (Kawane et al. 2018; Komori 2019).

Sin embargo, HIF-1, proteína que aumenta su expresión en presencia del NO, un componente del medio XANADU, se ha visto relacionada con la regulación negativa de RUNX2 (Yang et al., 2011), por lo que más estudios serán necesarios para entender como el medio XANADU aumenta la expresión de RUNX2 y con ellos su potencialidad. Por otro lado, múltiples factores están involucrando en el destino osteogénico en relación a RUNX2. En primer lugar, se ha reportado que la metilación del ARNm de RUNX2 por la Metiltransferasa tipo 3 (MEETL3) es necesaria para favorecer la diferenciación osteogénica (Yan et al. 2020) y miR-30 suprime el ARNm de RUNX2 (Yi, Liu y Xiao 2019). En segundo lugar, se ha propuesto el indicador RUNX2/SOX9 para evaluar el potencial osteogénico (Loebel et al. 2015). Además, SOX9 inhibe la diferenciación osteogénica al regular negativamente a RUNX2 (Stöckl et al. 2013; Liao et al. 2014), por lo que nuestras células al expresar SOX9 y RUNX2 en conjunto mantendrían el estado no diferenciado y la multipotencialidad.

El factor de transcripción SOX9 es una proteína requerida en la condrogénesis de las CMM y la formación de cartílago (Hardingham, Oldershaw y Tew 2006). Se ha reportado que la sobreexpresión de SOX9 en CMM facilita la condrogénesis *in-vitro* e *in-vivo*, sin alterar las características y morfología de las células (Wang et al. 2014; Zhao et al. 2017). SOX9 para medio XANADU no tuvo un comportamiento constante a lo largo de los pases, siendo en el pase 6 significativamente mayor al medio control, mientras que en los pases 10 y 13 su expresión no tuvo diferencias significativamente con el control indicando así el mantenimiento del potencial condrogénico.

Por lo tanto, las células expandidas en medio XANADU tienen una alta potencialidad y capacidad de diferenciación a adipocitos y osteoblastos. Además, el medio XANADU también muestra una alta capacidad de diferenciación a condroblasto a pesar de

presentar un potencial de diferenciación similar al medio control definido por la expresión de SOX9. El que SOX9 por si solo sea insuficiente para lograr la diferenciación (Green et al., 2015; Yang et al., 2011) y que existan mecanismos postranscripcional para su regulación mediante microARNs (Guérit et al. 2013) podrían explicar la mayor capacidad de diferenciación condrogénica del medio XANADU frente al medio control.

La capacidad de diferenciación de las CMMh ha sido muy estudiada a pesar de no ser la propiedad terapéutica más atractiva de estas células. Se han realizado intentos para aprovechar su capacidad de diferenciación en enfermedades como distrofia muscular de Duchenne (Tabebordbar et al. 2016) y sobre todo en el desarrollo de la ingeniería de tejidos (Colle et al. 2020; Contentin et al. 2020). Por la potencialidad y capacidad de diferenciación antes mostrada por las CMMh cultivadas en medio XANADU, este sería óptimo para aprovechar al máximo esta propiedad. Nuevos estudios con medio XANADU serían necesarios para probar su potencialidad de diferenciación hacia otros linajes celulares ya reportados para CMM como células neuronales y epiteliales (Păunescu et al. 2007; Uccelli, Moretta y Pistoia 2008; Anghileri et al. 2008).

Las propiedades de inmunomodulación y secreción de factores tróficos como citoquinas, quimioquinas y exosomas también son consideradas parte de las cuatro propiedades que hacen atractivas a estas células para aplicaciones clínicas (Hosseini et al. 2018).

La capacidad inmunomoduladora del secretoma de los medios MQD se evaluó mediante un ensayo de inmunomodulación con esplenocitos los cuales fueron activados por PHA. Los esplenocitos son glóbulos blancos: linfocitos T, linfocitos B, células NK y células NK-T que se encuentran en el bazo, de donde son purificados (Ebrahim et al. 2020). La fitohemaglutinina (PHA) es una molécula usualmente utilizada para estimular la activación o proliferación de células T (Perlés et al. 1977). Esta lectina mitogénica se une a los azucares de las proteínas incluido el TCR de los linfocitos T (Chilson y Kelly-Chilson 1989), de esta manera activa las vías JNK y calcineurina aumentando los niveles de ciclina T1 y con ello la proliferación (Marshall et al. 2005). Por otro lado, el CFSE/CFDA fue utilizado para realizar el control de la división celular mediante citometría. Esta es una molécula soluble que se une covalentemente a las proteínas, siendo de larga vida intracelular, por lo que las células hijas de las células marcadas presentan la mitad de moléculas del marcador (Quah y Parish 2010).

El secretoma de medio XANADU presentó una mayor capacidad inmunomoduladora que del MQD- Comercial. La activación de los linfocitos disminuyó significativamente desde el remplazo del 10% con secretoma del medio XANADU mientras que con el

medio MQD-Comercial se observaron diferencias significativas desde el 50% de remplazo. Otros medios xeno-free y libres de suero también han mostrado que mantienen o aumentan las capacidades inmunomoduladoras a comparación de medios suplementados con suero, incluido en los ensayos de inmunosupresión con linfocitos (Blázquez-Prunera et al., 2017; Wu et al., 2014). El medio XANADU por lo cual resulta ser un medio mucho más propicio para que las CMMh generen factores inmunomoduladores (antiinflamatorios) ya que evita con un menor porcentaje de medio la activación de los esplenocitos. Además, el encontrar que el secretoma puede producir este efecto inmunomodulador también es un resultado alentador. Ya que el uso del secretoma tiene otras ventajas en comparación con las terapias celulares como: fácil almacenamiento y manipulación, mayor vida útil, menor riesgo de rechazo y fácil dosificación (Teixeira & Salgado, 2020; Vizoso et al., 2017), lo que ayuda a que una terapia libre de células sea aprobada más fácilmente.

La influencia de las CMM en las células del sistema inmune se debe principalmente a la liberación de factores paracrinos y exosomas que componen el secretoma (Song, Scholtemeijer y Shah 2020). Estos componentes pueden variar según las condiciones de cultivo (Clabaut et al., 2015; Teixeira et al., 2015), el origen de las células (Konala, Bhonde y Pal 2020) o el primado utilizado (Seo, Shin y Kim 2019; Maffioli et al. 2017), por lo que para poder explicar mejor el aumento de la capacidad inmunomoduladora, se evaluó la expresión de factores de inmunomodulación: citocinas, interleucinas y quimioquinas en las células cultivadas en los diferentes medios.

La IL-10, se considera una citocina de gran poder anti-inflamatorio. Entre sus propiedades destaca su función supresora, al inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias en linfocitos T y macrófagos, además de participar en la diferenciación de células T reguladoras (Heo et al. 2010; Howes, Gabryšová y O'Garra 2014). En CMMh la expresión de IL-10 desempeña funciones importantes en su potencial inmunomodulador. En este sentido la IL-10 está relacionada con el potencial terapéutico de las CMMh como en la enfermedad de injerto contra huésped (Min et al. 2007), enfermedades inflamatorias pulmonares (Bustos et al. 2013) y diabetes (Al-Azzawi et al. 2020). En el medio XANADU, la IL-10 se expresó en mayor cantidad, siendo significativamente mayor hasta el pase 10 en relación al medio control. Del mismo modo se midió IDO, la cual es una proteína inducida por INFγ producida como respuesta a la inflamación (Taylor y Feng 1991). IDO tiene una función inmunosupresora al limitar la función de las células efectoras y activar mecanismos de tolerancia inmune (Munn y Mellor 2013). En CMM, IDO degrada el triptófano evitando la activación y proliferación

de células efectoras, dando un efecto antiinflamatorio (Tipnis, Viswanathan y Majumdar 2010). Además, la expresión de IDO se ha visto relacionado con la capacidad antimicrobiana de estas células (Meisel et al. 2011). En el medio XANADU la expresión de IDO fue desde el pase 10 significativamente mayor al medio control.

En general, la IL-6, IL-10, la prostanglandina E2 (PGE2), TGF-β, IDO y NO, entre otros presentes en el secretoma de las CMMh suprimen la proliferación de linfocitos T y B, la maduración de células dendríticas e inducen la activación de T reguladoras (Song et al., 2020; Yang et al., 2009). Por lo tanto, IL-10 e IDO al ser elementos antiinflamatorios claves, podrían explicar la mayor capacidad de inmunomodulación frente a los esplenocitos del medio XANADU en comparación con el MQD comercial. Además, una expresión mayor de IDO e IL-10 también se han reportado en otros medios xeno-free y libres de sueros (Clark et al., 2016; Kang et al., 2020; Wu et al., 2014).

Entorno a los factores proinflamatorios se midieron CXCL9 y CXCL10. La primera es una quimiocina inducida por IFNy, mientras que la segunda es estimulada por IFNy e IFN tipo I. Ambas quimioquinas interaccionan con el receptor CXCR3 produciendo inflamación (Kuo et al. 2018). Entre sus propiedades destaca su actividad quimioatrayente para células inmunes activadas, actividad moduladora de la angiogénesis y su actividad antitumoral (Metzemaekers et al. 2018). En CMMh la expresión de CXCL10 se ha visto incrementada en cocultivos con macrófagos, estando relacionada con un fenotipo proinflamatorio (Anton, Banerjee y Glod 2012), mientras que la inhibición de la expresión de CXCL9 promueve la angiogénesis y osteogénesis *in-vitro* (Shen et al. 2019). Sin embargo, cabe rescatar que CXCL9 y CXCL10 también se han visto relacionadas con el reclutamiento de T reguladoras $CXCR3^+$ y por lo cual con el potencial terapéutico de las CMMh (Li et al., 2020). En el medio XANADU, las CMMh no mostraron diferencias significativas en la expresión de CXCL9 y CXCL10 en relación al medio control. En este sentido el medio XANADU estaría impulsando más un perfil antiinflamatorio que uno proinflamatorio y por lo cual adecuado como tratamiento para enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Además, no olvidar que los efectos anti o proinflamatorios no son producidos por una o un par de citoquinas, sino por un conjunto de moléculas que orquestan la respuesta inmunológica, en este sentido el ensayo de inmunosupresión fue crucial para comprobar este potencial. Asimismo, más estudios serán necesarios para conocer el perfil completo de citoquinas que impulsa la expansión en medio XANADU.

En CMMh la migración y *homing* también es considerada una de las cuatro propiedades que hacen atractivas a estas células para aplicaciones clínicas (Hosseini et al. 2018).

Esta propiedad se debe principalmente a la expresión de CXCR4, el cual es un receptor de quimiocina, específicamente de la quimiocina CXCL12 (Hu et al. 2013). Además, CXCR4 también aumenta la capacidad paracrina, sin afectar la autorrenovación y diferenciación (Yang et al., 2015). Se sabe que mientras mayor sea la presencia de CXCR4 en la membrana, mayor es el potencial terapéutico de las CMM, ya que estas se dirigirán a donde exista daño tisular, como es el caso de un accidente cerebrovascular (Yu et al. 2012) o una lesión isquémica del corazón (Wu et al., 2017). En medio XANADU a lo largo de los pases la expresión de CXCR4 es significativamente mayor que el medio control, esto nos indicaría el mayor potencial migratorio de estas células expandidas en medio XANADU y por lo tanto el mayor potencial terapéutico.

En resumen, el medio XANADU incrementa la expresión de factores anti-inflamatorios (IL-10 e IDO), mantiene la expresión de factores quimiotácticos-proinflamatorios (CXCL9, CXCL10) e incrementa los factores quimiotácticos como CXCR4 en comparación al medio control. En este sentido, por las propiedades ya discutidas, la línea celular cultivada en medio XANADU presentaría características inmunomoduladoras que indican que puede ser utilizada con eficiencia en pacientes con enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como la diabetes y el COVID-19. Cabe resaltar, que esto solo se podrá demostrar utilizando esta línea expandida en un ensayo clínico.

La estabilidad cromosómica como indicador adicional de la calidad de las células fue evaluada mediante un análisis cariotípico. Cabe resaltar, que hasta el momento el metanálisis de los ensayos clínicos que utilizan CMMh por vía intravenosa ha demostrado que continúan siendo seguras (Thompson et al. 2020).

Las aberraciones cromosómicas están relacionadas con un aumento en el potencial carcinogénico (Ben-David y Benvenisty 2011). En un análisis comparativo a gran escala con 135 muestras de CMM humanas se ha reportado que estas presentan grandes aberraciones cromosómicas en menos del 4% (Rebuzzini et al. 2015). Cabe resaltar que estudios más pequeños, en específico con CMMh de tejido adiposo reportaron que en cultivos de más de 6 meses mantienen la estabilidad cromosómica y que las escasas mutaciones encontradas son eliminadas espontáneamente en la población (Meza-Zepeda et al. 2008). Sin embargo, otro estudios de cultivos a largo plazo en medios suplementados con suero si han reportado aberraciones cromosómicas inclusive en los primeros pases (Rebuzzini et al. 2015). Las CMMh cultivadas en medio XANADU no mostraron aberraciones cromosómicas después de 70 días de cultivo (13 pases) en ninguna de las metafases analizadas. Cabe resaltar que faltarían análisis más

detallados para observar microdeleciones o SNPs que comprobarían su estabilidad. Asimismo, los resultados concuerdan con lo encontrado en medios xeno-free químicamente definidos donde se mantiene la estabilidad genética en 9 pases analizados, siendo significativamente mejor que lo encontrado en el medio suplementado con SFB (Lee et al., 2017).

Por otro lado, otro indicador adicional de calidad evaluado fue la expresión de marcadores de regulación del ciclo celular como p53, p21 y pRB.

La proteína p53 conocida como el "guardián del genoma", es una proteína supresora de tumores que regula la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, la homeostasis, la reparación del ADN, la apoptosis y autofagia (Beyfuss y Hood 2018). Se ha relacionado con un comportamiento aberrante y el cáncer principalmente cuando existen modificaciones postraduccionales causadas por estrés oxidativo y la sobreexpresión de proteínas mutadas (Beyfuss y Hood 2018; Khan et al. 2005). Por su parte p21 se destaca por ser un mediador en la actividad supresora de tumor de p53. Su principal papel se centra en inhibir la actividad de complejo de quinasa dependientes de ciclina (CDK) y con ello la división celular, pero además inducir el crecimiento, diferenciación y senescencia. Sobre todo, su baja expresión se ha relacionado con el cáncer, pero también en ciertos contextos se ha comportado como un oncogén (Abbas y Dutta 2009). Finalmente, la proteína del retinoblastoma (pRB) inhibe la progresión del ciclo celular antes de la mitosis y con ello la proliferación celular (Harrington et al. 1998). También es considerada un marcador cancerígeno, ya que su expresión se ha visto alterada en varios canceres (Di Fiore et al. 2013).

En CMMh la pérdida de la expresión de p53 se ha relacionado con el aumento de la inestabilidad genética y la tumorogénesis (Rodriguez et al. 2009). Sin embargo, la activación y el incremento de las vias p21/p53 y p16/pRb en CMMh de médula ósea se ha visto relacionada con la senescencia e inhibición de la proliferación (Gu et al. 2013; 2014; Shang et al. 2016). En el medio XANADU se observó que la expresión de estos marcadores se mantuvo a lo largo de los pases, sin embargo, en el medio control la expresión de p21, p53 y pRB aumentó. En este sentido el aumento de estos marcadores de regulación estaría relacionado con la senescencia replicativa y el aumento del tiempo de duplicación visto en estas células. Cabe resaltar que en CMMh criopreservadas también se ha relacionado un riesgo bajo de tumorogénesis con la expresión mantenida de estos marcadores (Yang et al. 2009). Aun así, son necesarias evaluaciones a nivel de secuencia para complementar los resultados de estos marcadores entorno a su relación con el cáncer.

Finalmente, el Perú, de cara a aplicar este tipo de terapias avanzadas, deberá crear centros de investigación con la infraestructura adecuada y profesionales capacitados, así como crear el marco legal específico que regule estas terapias y haga factible su desarrollo y aplicación en el país. Un reto inmenso en lo económico y técnico, sin duda. Sin embargo, la posibilidad de disponer de este tipo de medicamentos celulares con potencial para tratar enfermedades crónicas, inmunitarias, degenerativas y también emergentes e impredecibles como la de una pandemia global, como la actual, debería ser un motivo suficiente como para impulsar la inversión de parte de las autoridades competentes.

6. CONCLUSIÓN

- El medio químicamente definido XANADU ha demostrado ser un medio de expansión que promueve la proliferación de las CMMh incrementando sus propiedades terapéuticas: inmunomodulación, diferenciación sin incrementar la inestabilidad genética, lo cual lo hace relevante para ser utilizado en ensayos clínicos.
- El medio XANADU permite una mejor cinética de crecimiento de las CMMh, sin senescencia replicativa y con una proyección a una rápida producción de dosis en comparación con un medio suplementado con suero.
- El medio XANADU mantiene los criterios mínimos de las CMMh: adherencia al plástico, características inmunofenotípicas y capacidad de diferenciación
- La expansión de las CMMh en medio XANADU favorece a la actividad inmunomoduladora de su secretoma, siendo superior al medio MQD-Comercial.
- El medio XANADU estimula la expresión de marcadores de potencial de diferenciación, antinflamatorios y de migración y *homing*, mientras que mantiene la expresión de factores proinflamatorios y reguladores del ciclo celular, en contraste al medio suplementado con suero.
- La expansión de las CMMh en medio XANADU permite cultivar a largo plazo (más de 10 pases) sin la presencia de aberraciones cromosómicas.

7. RECOMENDACIONES

- Comparar con otros medios químicamente definidos disponibles en el mercado la eficiencia en la expansión de las CMMh.
- Evaluar en comparación con otros medios el perfil inmunomodulador, capacidad de diferenciación, potencial de secreción y capacidad de migración y *homing* de las células expandidas.
- Realizar estudios complementarios en torno a la estabilidad genética y potencial oncogénico, evaluar presencia de SNPs o microdeleciones en cultivos a largo plazo.
- Probar *in-vivo* el potencial terapéutico de las células expandidas en medio XANADU y del secretoma obtenido en un modelo de enfermedad inflamatoria o autoinmune.
- Realizar un análisis completo de los componentes: proteínas, microARNs, péptidos, carbohidratos y lipididos del secretoma obtenido en medio XANADU.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, T. y DUTTA, A., 2009. p21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, no. 6, pp. 400-414. ISSN 14741768. DOI 10.1038/nrc2657.

AGHAYAN, H.R., GOODARZI, P. y ARJMAND, B., 2014. GMP-compliant human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for cellular therapy. *Stem Cells and Good Manufacturing Practices*, vol. 1283, pp. 93-107. DOI https://doi.org/10.1007/7651_2014_112.

AL-AZZAWI, B., MCGUIGAN, D.H., KOIVULA, F.N.M., ELTTAYEF, A., DALE, T.P., YANG, Y., KELLY, C. y FORSYTH, N.R., 2020. The Secretome of Mesenchymal Stem Cells Prevents Islet Beta Cell Apoptosis via an IL-10-Dependent Mechanism. *The Open Stem Cell Journal*, vol. 6, no. 1, pp. 1-12. ISSN 1876-8938. DOI 10.2174/1876893802006010001.

ALCARAZ, M.J., COMPAÑ, A. y GUILLÉN, M.I., 2020. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells as novel treatments for musculoskeletal diseases. *Cells*, vol. 9, no. 1, pp. 98. DOI 10.3390/cells9010098.

ALCAYAGA-MIRANDA, F., CUENCA, J. y KHOURY, M., 2017. Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies. *Frontiers in immunology*, vol. 8, pp. 339. DOI 10.3389/fimmu.2017.00339.

ANGHILERI, E., MARCONI, S., PIGNATELLI, A., CIFELLI, P., GALIÉ, M., SBARBATI, A., KRAMPERA, M., BELLUZZI, O. y BONETTI, B., 2008. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, vol. 17, no. 5, pp. 909-916. ISSN 15473287. DOI 10.1089/scd.2007.0197.

ANTON, K., BANERJEE, D. y GLOD, J., 2012. Macrophage-associated mesenchymal stem cells assume an activated, migratory, pro-inflammatory phenotype with increased IL-6 and CXCL10 secretion. *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, pp. 1-10. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0035036.

BARBAGALLO, I., LI VOLTI, G., GALVANO, F., TETTAMANTI, G., PLUCHINOTTA, F.R., BERGANTE, S. y VANELLA, L., 2017. Diabetic human adipose tissue-

derived mesenchymal stem cells fail to differentiate in functional adipocytes. *Experimental Biology and Medicine*, vol. 242, no. 10, pp. 1079-1085. ISSN 15353699. DOI 10.1177/1535370216681552.

BELLAGAMBA, B.C., GRUDZINSKI, P.B., ELY, P.B., NADER, P.D.J.H., NARDI, N.B. y DA SILVA MEIRELLES, L., 2018. Induction of expression of CD271 and CD34 in mesenchymal stromal cells cultured as spheroids. *Stem Cells International*, vol. 2018. ISSN 16879678. DOI 10.1155/2018/7357213.

BELTRAN POVEA, A., 2016. *Estudio sobre la regulación de la funcionalidad de las células pluripotentes por el óxido nítrico* [en línea]. S.l.: Tesis doctoral, Universidad Pablo de Olavide. Disponible en: http://hdl.handle.net/10433/3014.

BEN-DAVID, U. y BENVENISTY, N., 2011. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nature Reviews Cancer* [en línea], vol. 11, no. 4, pp. 268-277. ISSN 1474175X. DOI 10.1038/nrc3034. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nrc3034.

BEREBICHEZ-FRIDMAN, R. y MONTERO-OLVERA, P.R., 2018. Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells state-of-the-art review. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, vol. 18, no. 3, pp. e264-e277. ISSN 20750528. DOI 10.18295/squmj.2018.18.03.002.

BEYFUSS, K. y HOOD, D.A., 2018. A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle. *Redox Report*, vol. 23, no. 1, pp. 100-117. ISSN 17432928. DOI 10.1080/13510002.2017.1416773.

BLANDE, I., BASSANEZE, V., LAVINI-RAMOS, C., FAE, K., KALIL, J., MIYAKAWA, A., SCHETTERT, I. y KRIEGER, J., 2009. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion*, vol. 49, no. 12, pp. 2680-2685. ISSN 00411132. DOI 10.1111/j.1537-2995.2009.02346.x.

BLÁZQUEZ-PRUNERA, A., ALMEIDA, C.R. y BARBOSA, M.A., 2017. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells Preserve Their Immunomodulatory and Chemotactic Properties When Expanded in a Human Plasma Derived Xeno-Free Medium. *Stem Cells International*, vol. 2017. ISSN 16879678. DOI 10.1155/2017/2185351.

BONGSO, A. y LEE, E.H., 2005. Stem Cells : Their Definition ,Classification and

Sources. *Stem Cells: From Bench To Bedside* [en línea], pp. 1-13. Disponible en: http://www.worldscibooks.com/lifesci/5729.html.

BORTOLOTTI, F., UKOVICH, L., RAZBAN, V., MARTINELLI, V., RUOZI, G., PELOS, B., DORE, F., GIACCA, M. y ZACCHIGNA, S., 2015. In vivo therapeutic potential of mesenchymal stromal cells depends on the source and the isolation procedure. *Stem Cell Reports*, vol. 4, no. 3, pp. 332-339. ISSN 22136711. DOI 10.1016/j.stemcr.2015.01.001.

BUSTOS, M.L., HULEIHEL, L., MEYER, E.M., DONNENBERG, A.D., DONNENBERG, V.S., SCIURBA, J.D., MROZ, L., MCVERRY, B.J., ELLIS, B.M., KAMINSKI, N. y ROJAS, M., 2013. Activation of Human Mesenchymal Stem Cells Impacts Their Therapeutic Abilities in Lung Injury by Increasing Interleukin (IL)-10 and IL-1RN Levels. *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 2, no. 11, pp. 884-895. ISSN 2157-6564.

CAMPIONI, D., RIZZO, R., STIGNANI, M., MELCHIORRI, L., FERRARI, L., MORETTI, S., RUSSO, A., BAGNARA, G.P., BONSI, L., ALVIANO, F., LANZONI, G., CUNEO, A., BARICORDI, O.R. y LANZA, F., 2009. A decreased positivity for CD90 on human mesenchymal stromal cells (MSCs) is associated with a loss of immunosuppressive activity by MSCs. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, vol. 76, no. 3, pp. 225-230. ISSN 15524949. DOI 10.1002/cyto.b.20461.

CAO, Y., GANG, X., SUN, C. y WANG, G., 2017. Mesenchymal Stem Cells Improve Healing of Diabetic Foot Ulcer. *Journal of Diabetes Research*, vol. 2017. ISSN 23146753. DOI 10.1155/2017/9328347.

CHASE, L.G., LAKSHMIPATHY, U., SOLCHAGA, L.A., RAO, M.S. y VEMURI, M.C., 2010. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, vol. 1, no. 1, pp. 1-11. ISSN 17576512. DOI 10.1186/scrt8.

CHILSON, O.P. y KELLY-CHILSON, A.E., 1989. Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. *European Journal of Immunology*, vol. 19, no. 2, pp. 389-396. ISSN 15214141. DOI 10.1002/eji.1830190225.

CLABAUT, A., GRARE, C., LÉGER, T., HARDOUIN, P. y BROUX, O., 2015. Variations of secretome profiles according to conditioned medium preparation: The example

of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Electrophoresis*, vol. 36, no. 20, pp. 2587-2593. ISSN 15222683. DOI 10.1002/elps.201500086.

CLARK, K.C., KOL, A., SHAHBENDERIAN, S., GRANICK, J.L., WALKER, N.J. y BORJESSON, D.L., 2016. Canine and Equine Mesenchymal Stem Cells Grown in Serum Free Media Have Altered Immunophenotype. *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 12, no. 2, pp. 245-256. ISSN 15586804. DOI 10.1007/s12015-015-9638-0.

CLEARY, M.A., NARCISI, R., FOCKE, K., VAN DER LINDEN, R., BRAMA, P.A.J. y VAN OSCH, G.J.V.M., 2016. Expression of CD105 on expanded mesenchymal stem cells does not predict their chondrogenic potential. *Osteoarthritis and Cartilage* [en línea], vol. 24, no. 5, pp. 868-872. ISSN 15229653. DOI 10.1016/j.joca.2015.11.018. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2015.11.018.

COLLE, J., BLONDEEL, P., DE BRUYNE, A., BOCHAR, S., TYTGAT, L., VERCRUYSSE, C., VAN VLIERBERGHE, S., DUBRUEL, P. y DECLERCQ, H., 2020. Bioprinting predifferentiated adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids with methacrylated gelatin ink for adipose tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [en línea], vol. 31, no. 4, pp. 1-15. ISSN 15734838. DOI 10.1007/s10856-020-06374-w. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s10856-020-06374-w.

CONTENTIN, R., DEMOOR, M., CONCARI, M., DESANCÉ, M., AUDIGIÉ, F., BRANLY, T. y GALÉRA, P., 2020. Comparison of the Chondrogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Umbilical Cord Blood Intended for Cartilage Tissue Engineering. *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 16, no. 1, pp. 126-143. ISSN 26293277. DOI 10.1007/s12015-019-09914-2.

D'SOUZA, N., ROSSIGNOLI, F., GOLINELLI, G., GRISENDI, G., SPANO, C., CANDINI, O., OSTURU, S., CATANI, F., PAOLUCCI, P., HORWITZ, E.M. y DOMINICI, M., 2015. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies. *BMC Medicine*, vol. 13, no. 1, pp. 1-15. ISSN 17417015. DOI 10.1186/s12916-015-0426-0.

DI FIORE, R., D'ANNEO, A., TESORIERE, G. y VENTO, R., 2013. RB1 in cancer: Different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology*, vol. 228, no. 8, pp. 1676-1687.

ISSN 00219541. DOI 10.1002/jcp.24329.

DIGHE, P.A., VISWANATHAN, P., MRUTHUNJAYA, A.K. y SEETHARAM, R.N., 2013. Effect of bFGF on HLA-DR expression of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Stem Cells*, vol. 8, no. 1, pp. 43-57. ISSN 15568539.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPET-CORTENBACH, I., MARINI, F.C., KRAUSE, D.S., ... y HORWITZ, E.M., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315-317.

DONNELLY, D.S., ZELTERMAN, D., SHARKIS, S. y KRAUSE, D.S., 1999. Functional activity of murine CD34+ and CD34- hematopoietic stem cell populations. *Experimental Hematology*, vol. 27, no. 5, pp. 788-796. ISSN 0301472X. DOI 10.1016/S0301-472X(99)00032-6.

EBRAHIM, F., ABOLAYHA, A., ELZAGHEID, A. y ABOSRER, F., 2020. Isolation of primary mice splenocytes for in vitro research. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, vol. 64, no. 2, pp. 13. ISSN 1110-2047. DOI 10.5455/ajvs.82519.

EOM, J., FEISST, V., RANJARD, L., LOOMES, K., DAMANI, T., JACKSON-PATEL, V., LOCKE, M., SHEPPARD, H., NARAYAN, P. y DUNBAR, P.R., 2018. Visualization and Quantification of Mesenchymal Cell Adipogenic Differentiation Potential with a Lineage Specific Marker. *Journal of visualized experiments : JoVE*, no. 133, pp. 1-8. ISSN 1940087X. DOI 10.3791/57153.

FAN, W., LI, J., WANG, Y., PAN, J., LI, S., ZHU, L., GUO, C. y YAN, Z., 2016. CD105 promotes chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells through Smad2 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [en línea], vol. 474, no. 2, pp. 338-344. ISSN 10902104. DOI 10.1016/j.bbrc.2016.04.101. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.101.

FLORES, E.M., WOELLER, C.F., FALSETTA, M.L., SUSIARJO, M. y PHIPPS, R.P., 2019. Thy1 (CD90) expression is regulated by DNA methylation during adipogenesis. *The FASEB Journal*, vol. 33, no. 3, pp. 3353-3363. ISSN 15306860. DOI 10.1096/fj.201801481R.

FRANSSON, M., BRÄNNSTRÖM, J., DUPREZ, I., ESSAND, M., LE BLANC, K.,

KORSGREN, O. y MAGNUSSON, P.U., 2015. Mesenchymal stromal cells support endothelial cell interactions in an intramuscular islet transplantation model. *Regenerative Medicine Research* [en línea], vol. 3, no. 1, pp. 1-12. ISSN 2050-490X. DOI 10.1186/s40340-015-0010-9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s40340-015-0010-9.

FRIEDENSTEIN, A.J., CHAILAKHYAN, R.K. y GERASIMOV, U. V, 1987. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell proliferation*, vol. 20, no. 3, pp. 263-272.

FURUHASHI, M., SHIGEYUKI, S., KAZUAKU, S. y TETSUJI, M., 2014. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clinical Medicine Insights: Cardiology*, vol. 8, no. S3, pp. 23-33. DOI 10.4137/CMC.S17067.

GADELKARIM, M., ABUSHOUK, A.I., GHANEM, E., HAMAAD, A.M., SAAD, A.M. y ABDEL-DAIM, M.M., 2018. Adipose-derived stem cells: Effectiveness and advances in delivery in diabetic wound healing. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 107, pp. 625-633. ISSN 19506007. DOI 10.1016/j.biopha.2018.08.013.

GALIPEAU, J. y SENSÉBÉ, L., 2018. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell*, vol. 22, no. 6, pp. 824-833. ISSN 18759777. DOI 10.1016/j.stem.2018.05.004.

GÁLVEZ, P., CLARES, B., BERMEJO, M., HMADCHA, A. y SORIA, B., 2014. Standard requirement of a microbiological quality control program for the manufacture of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Stem cells and development*, vol. 23, no. 10, pp. 1074-1083. ISSN 1557-8534 (Electronic). DOI 10.1089/scd.2013.0625.

GE, G., ZHANG, H., LI, R. y LIU, H., 2017. The function of SDF-1-cxcr4 axis in sp cells-mediated protective role for renal ischemia/reperfusion injury by Shh/Gli1-ABCG2 pathway. *Shock*, vol. 47, no. 2, pp. 251-259. ISSN 15400514. DOI 10.1097/SHK.0000000000000694.

GOTTIPAMULA, S., MUTTIGI, M.S., KOLKUNDKAR, U. y SEETHARAM, R.N., 2013. Serum-free media for the production of human mesenchymal stromal cells: A review. *Cell Proliferation*, vol. 46, no. 6, pp. 608-627. ISSN 09607722. DOI

10.1111/cpr.12063.

GRAU-VORSTER, M., LAITINEN, A., NYSTEDT, J. y VIVES, J., 2019. HLA-DR expression in clinical-grade bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells : a two-site study. *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 9, pp. 1-8.

GRAU-VORSTER, M., RODRÍGUEZ, L., TORRENTS-ZAPATA, S., VIVAS, D., CODINACH, M., BLANCO, M., OLIVER-VILA, I., GARCÍA-LÓPEZ, J. y VIVES, J., 2019. Levels of IL-17F and IL-33 correlate with HLA-DR activation in clinical-grade human bone marrow–derived multipotent mesenchymal stromal cell expansion cultures. *Cytotherapy*, vol. 21, no. 1, pp. 32-40. ISSN 14772566. DOI 10.1016/j.jcyt.2018.09.009.

GREEN, J.D., TOLLEMAR, V., DOUGHERTY, M., YAN, Z., YIN, L., YE, J., COLLIER, Z., MOHAMMED, M.K., HAYDON, R.C., LUU, H.H., KANG, R., LEE, M.J., HO, S.H., HE, T.C., SHI, L.L. y ATHIVIRAHAM, A., 2015. Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering. *Genes and Diseases* [en línea], vol. 2, no. 4, pp. 307-327. ISSN 23523042. DOI 10.1016/j.gendis.2015.09.003. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2015.09.003.

GREGORY, C.A., GUNN, W.G., PEISTER, A. y PROCKOP, D.J., 2004. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry*, vol. 329, no. 1, pp. 77-84. ISSN 00032697. DOI 10.1016/j.ab.2004.02.002.

GRUBER, H.E., SOMAYAJI, S., RILEY, F., HOELSCHER, G.L., NORTON, H.J., INGRAM, J. y HANLEY, E.N., 2012. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: Serial passaging, doubling time and cell senescence. *Biotechnic and Histochemistry*, vol. 87, no. 4, pp. 303-311. ISSN 10520295. DOI 10.3109/10520295.2011.649785.

GSTRAUNTHALER, G., LINDL, T. y VAN DER VALK, J., 2013. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology*, vol. 65, no. 5, pp. 791-793. ISSN 09209069. DOI 10.1007/s10616-013-9633-8.

GU, Z., JIANG, J., TAN, W., XIA, Y., CAO, H., MENG, Y., DA, Z., LIU, H. y CHENG, C., 2013. P53/p21 pathway involved in mediating cellular senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus

patients. *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2013. ISSN 17402522. DOI 10.1155/2013/134243.

GU, Z., TAN, W., FENG, G., MENG, Y., SHEN, B., LIU, H. y CHENG, C., 2014. Wnt/β-catenin signaling mediates the senescence of bone marrow-mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients through the p53/p21 pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 387, no. 1, pp. 27-37. ISSN 03008177. DOI 10.1007/s11010-013-1866-5.

GUÉRIT, D., PHILIPOT, D., CHUCHANA, P., TOUPET, K., BRONDELLO, J.M., MATHIEU, M., JORGENSEN, C. y NOËL, D., 2013. Sox9-Regulated miRNA-574-3p Inhibits Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 4. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0062582.

HARDINGHAM, T.E., OLDERSHAW, R.A. y TEW, S.R., 2006. Cartilage, SOX9 and Notch signals in chondrogenesis. *Journal of Anatomy*, vol. 209, no. 4, pp. 469-480. ISSN 00218782. DOI 10.1111/j.1469-7580.2006.00630.x.

HARRINGTON, E.A., BRUCE, J.L., HARLOW, E. y DYSON, N., 1998. pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 20, pp. 11945-11950. ISSN 00278424. DOI 10.1073/pnas.95.20.11945.

HASSAN, M.N.F. Bin, YAZID, M.D., YUNUS, M.H.M., CHOWDHURY, S.R., LOKANATHAN, Y., IDRUS, R.B.H., NG, A.M.H. y LAW, J.X., 2020. Large-Scale Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, vol. 2020. ISSN 16879678. DOI 10.1155/2020/9529465.

HEO, Y.J., JOO, Y. Bin, OH, H.J., PARK, M.K., HEO, Y.M., CHO, M. La, KWOK, S.K., JU, J.H., PARK, K.S., CHO, S.G., PARK, S.H., KIM, H.Y. y MIN, J.K., 2010. IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4+ T cell population of rheumatoid arthritis patients. *Immunology Letters*, vol. 127, no. 2, pp. 150-156. ISSN 01652478. DOI 10.1016/j.imlet.2009.10.006.

HOSSEINI, S., TAGHIYAR, L., SAFARI, F. y ESLAMINEJAD, M.B., 2018. Regenerative medicine applications of mesenchymal stem cells. *Cell Biology and Translational Medicine*, vol. 2, pp. 115-141. ISSN 22148019. DOI 10.1007/5584_2018_213.

HOWES, A., GABRYŠOVÁ, L. y O'GARRA, A., 2014. Role of IL-10 and the IL-10

Receptor in Immune Responses. *Reference Module in Biomedical Sciences*, vol. 1, pp. 1-11. DOI 10.1016/b978-0-12-801238-3.00014-3.

HU, C., YONG, X., LI, C., LÜ, M., LIU, D., CHEN, L., HU, J., TENG, M., ZHANG, D., FAN, Y. y LIANG, G., 2013. CXCL12/CXCR4 axis promotes mesenchymal stem cell mobilization to burn wounds and contributes to wound repair. *Journal of Surgical Research* [en línea], vol. 183, no. 1, pp. 427-434. ISSN 00224804. DOI 10.1016/j.jss.2013.01.019. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2013.01.019.

HUNT, C.L., HER, Y.F., LAW, L.A., BYDON, M., NASSR, A., SMITH, J., MAUCK, W.D., ELDRIGE, J.S., MALANGA, G.A. y QU, W., 2017. Five generations of cell preparation : a translational framework for categorizing regenerative stem cell therapies on m er us e on on m. *Journal of the American Academy of Regenerative Medicine*, vol. 1, pp. 7239. DOI 10.4081/jaarm.2017.7239.

IZADPANAH, R., TRYGG, C., PATEL, B., KRIEDT, C., DUFOUR, J., GIMBLE, J.M. y BUNNELL, B.A., 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 99, no. 5, pp. 1285-1297. ISSN 07302312. DOI 10.1002/jcb.20904.

JAYME, D.W. y SMITH, S.R., 2000. Media formulation options and manufacturing process controls to safeguard against introduction of animal origin contaminants in animal cell culture. *Cytotechnology*, vol. 33, no. 1, pp. 27-36. ISSN 09209069. DOI 10.1023/A:1008133717035.

JIANG, T., LIU, W., LV, X., SUN, H., ZHANG, L., LIU, Y., ZHANG, W.J., CAO, Y. y ZHOU, G., 2010. Potent in vitro chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells. *Biomaterials* [en línea], vol. 31, no. 13, pp. 3564-3571. ISSN 01429612. DOI 10.1016/j.biomaterials.2010.01.050. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.050.

JUNG, S., PANCHALINGAM, K.M., ROSENBERG, L. y BEHIE, L.A., 2012. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media. *Stem Cells International*, vol. 2012. ISSN 16879678. DOI 10.1155/2012/123030.

JUNG, S., SEN, A., ROSENBERG, L. y BEHIE, L.A., 2012. Human mesenchymal stem cell culture: rapid and efficient isolation and expansion in a defined serum-free medium. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* [en línea], vol.

6, no. 3, pp. 391-403. ISSN 23256621. DOI 10.1002/term. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2010.06.007.

JUREK, S., SANDHU, M.A., TRAPPE, S., BERMÚDEZ-PEÑA, M.C., KOLISEK, M., SPONDER, G. y ASCHENBACH, J.R., 2020. Optimizing adipogenic transdifferentiation of bovine mesenchymal stem cells: a prominent role of ascorbic acid in FABP4 induction. *Adipocyte* [en línea], vol. 9, no. 1, pp. 35-50. ISSN 2162397X. DOI 10.1080/21623945.2020.1720480. Disponible en: https://doi.org/10.1080/21623945.2020.1720480.

KAISER, S., HACKANSON, B., FOLLO, M., MEHLHORN, A., GEIGER, K., IHORST, G. y KAPP, U., 2007. BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype. *Cytotherapy* [en línea], vol. 9, no. 5, pp. 439-450. ISSN 14653249. DOI 10.1080/14653240701358445. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/14653240701358445.

KANG, J.Y., OH, M.-K., JOO, H., PARK, H.S., CHAE, D.-H., KIM, J., LEE, H.-R., OH, I.-H. y YU, K.-R., 2020. Xeno-Free Condition Enhances Therapeutic Functions of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells against Experimental Colitis by Upregulated Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity. *Journal of Clinical Medicine*, vol. 9, no. 9, pp. 2913. ISSN 2077-0383. DOI 10.3390/jcm9092913.

KARNIELI, O., FRIEDNER, O.M., ALLICKSON, J.G., ZHANG, N., JUNG, S., FIORENTINI, D., ABRAHAM, E., EAKER, S.S., YONG, T.K., CHAN, A., GRIFFITHS, S., WHEN, A. k., OH, S. y KARNIELI, O., 2017. A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy* [en línea], vol. 19, no. 2, pp. 155-169. ISSN 14772566. DOI 10.1016/j.jcyt.2016.11.011. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.11.011.

KAWANE, T., QIN, X., JIANG, Q., MIYAZAKI, T., KOMORI, H., YOSHIDA, C.A., MATSUURA-KAWATA, V.K. dos S., SAKANE, C., MATSUO, Y., NAGAI, K., MAENO, T., DATE, Y., NISHIMURA, R. y KOMORI, T., 2018. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 1-17. ISSN 20452322. DOI 10.1038/s41598-018-31853-0.

KERN, S., EICHLER, H., STOEVE, J., KLÜTER, H. y BIEBACK, K., 2006. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or

Adipose Tissue. *Stem Cells*, vol. 24, no. 5, pp. 1294-1301. ISSN 10665099. DOI 10.1634/stemcells.2005-0342.

KHAN, S.A., THOMAS, H.C., TOLEDANO, M.B., COX, I.J. y TAYLOR-ROBINSON, S.D., 2005. p53 mutations in human cholangiocarcinoma: A review. *Liver International*, vol. 25, no. 4, pp. 704-716. ISSN 14783223. DOI 10.1111/j.1478-3231.2005.01106.x.

KIM, Y. Il, RYU, J.S., YEO, J.E., CHOI, Y.J., KIM, Y.S., KO, K. y KOH, Y.G., 2014. Overexpression of TGF-β1 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [en línea], vol. 450, no. 4, pp. 1593-1599. ISSN 10902104. DOI 10.1016/j.bbrc.2014.07.045. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.045.

KIM, N. y CHO, S.G., 2013. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Clinical applications of mesenchymal stem cells*, vol. 28, no. 4, pp. 387. DOI 10.1016/B978-0-08-102680-9.00005-6.

KOMOR, T., 2010. Regulation of osteoblast and odontoblast differentiation by RUNX2. *Journal of Oral Biosciences*, vol. 52, no. 1, pp. 22-25. ISSN 13490079. DOI 10.2330/joralbiosci.52.22.

KOMORI, T., 2019. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by runx2. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 7. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms20071694.

KONALA, V.B.R., BHONDE, R. y PAL, R., 2020. Secretome studies of mesenchymal stromal cells (MSCs) isolated from three tissue sources reveal subtle differences in potency. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, vol. 56, no. 9, pp. 689-700. ISSN 1543706X. DOI 10.1007/s11626-020-00501-1.

KONARI, N., NAGAISHI, K., KIKUCHI, S. y FUJIMIYA, M., 2019. Mitochondria transfer from mesenchymal stem cells structurally and functionally repairs renal proximal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy in vivo. *Scientific Reports* [en línea], vol. 9, no. 1, pp. 1-14. ISSN 20452322. DOI 10.1038/s41598-019-40163-y. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-40163-y.

KRAUS, N.A., EHEBAUER, F., ZAPP, B., RUDOLPHI, B., KRAUS, B.J. y KRAUS, D., 2016. Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture.

Adipocyte [en línea], vol. 5, no. 4, pp. 351-358. ISSN 2162397X. DOI 10.1080/21623945.2016.1240137. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/21623945.2016.1240137.

KUO, P.T., ZENG, Z., SALIM, N., MATTAROLLO, S., WELLS, J.W. y LEGGATT, G.R., 2018. The role of CXCR3 and its chemokine ligands in skin disease and cancer. *Frontiers in Medicine*, vol. 5, pp. 271. ISSN 2296858X. DOI 10.3389/fmed.2018.00271.

KWON, S.Y., CHUN, S.Y., HA, Y.S., KIM, D.H., KIM, J., SONG, P.H., KIM, H.T., YOO, E.S., KIM, B.S. y KWON, T.G., 2017. Hypoxia Enhances Cell Properties of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 14, no. 5, pp. 595-604. ISSN 22125469. DOI 10.1007/s13770-017-0068-8.

LEE, M., JEONG, S.Y., HA, J., KIM, M., JIN, H.J., KWON, S.J., CHANG, J.W., CHOI, S.J., OH, W., YANG, Y.S., KIM, J.S. y JEON, H.B., 2014. Low immunogenicity of allogeneic human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [en línea], vol. 446, no. 4, pp. 983-989. ISSN 10902104. DOI 10.1016/j.bbrc.2014.03.051. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.051.

LEE, M.S., YOUN, C., KIM, J.H., PARK, B.J., AHN, J., HONG, S., KIM, Y.D., SHIN, Y.K. y PARK, S.G., 2017. Enhanced cell growth of adipocyte-derived mesenchymal stem cells using chemically-defined serum-free media. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 8. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms18081779.

LEVY, O., KUAI, R., SIREN, E.M.J., BHERE, D., MILTON, Y., NISSAR, N., DE BIASIO, M., HEINELT, M., REEVE, B., ABDI, R., ALTURKI, M., FALLATAH, M., ALMALIK, A., ALHASAN, A.H., SHAH, K. y KARP, J.M., 2020. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. *Science Advances*, vol. 6, no. 30, pp. 1-19. ISSN 23752548. DOI 10.1126/sciadv.aba6884.

LI, W., CHEN, W., HUANG, S., YAO, G., TANG, X. y SUN, L., 2020. Mesenchymal stem cells prevent overwhelming inflammation and reduce infection severity via recruiting CXCR3+ regulatory T cells. *Clinical and Translational Immunology*, vol. 9, no. 10, pp. 1-15. ISSN 20500068. DOI 10.1002/cti2.1181.

LIAO, J., HU, N., ZHOU, N., LIN, L., ZHAO, C., YI, S., FAN, T., BAO, W., LIANG, X.,

CHEN, H., XU, W., CHEN, C., CHENG, Q., ZENG, Y., SI, W., YANG, Z. y HUANG, W., 2014. Sox9 potentiates BMP2-induced chondrogenic differentiation and inhibits BMP2-induced osteogenic differentiation. *PLoS one*, vol. 9, no. 2, pp. e89025. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0089025.

LIN, C.S., NING, H., LIN, G. y LUE, T.F., 2012. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy*, vol. 14, no. 10, pp. 1159-1163. ISSN 14772566. DOI 10.3109/14653249.2012.729817.

LOEBEL, C., CZEKANSKA, E.M., BRUDERER, M., SALZMANN, G., ALINI, M. y STODDART, M.J., 2015. In vitro osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio. *Tissue Engineering - Part A*, vol. 21, no. 1-2, pp. 115-123. ISSN 1937335X. DOI 10.1089/ten.tea.2014.0096.

LOPES, L., SETIA, O., AURSHINA, A., LIU, S., HU, H., ISAJI, T., LIU, H., WANG, T., ONO, S., GUO, X., YATSULA, B., GUO, J., GU, Y., NAVARRO, T. y DARDIK, A., 2018. Stem cell therapy for diabetic foot ulcers: A review of preclinical and clinical research. *Stem Cell Research and Therapy*, vol. 9, no. 1, pp. 1-16. ISSN 17576512. DOI 10.1186/s13287-018-0938-6.

LÓPEZ-BEAS, J., GUADIX, J.A., CLARES, B., SORIANO-RUIZ, J.L., ZUGAZA, J.L., GÁLVEZ-MARTÍN, P. y ANTONIO, J., 2020. An overview of international regulatory frameworks for mesenchymal stromal cell-based medicinal products: From laboratory to patient. *Medicinal Research Reviews*, vol. 40, no. 4, pp. 1315-1334. DOI 10.1002/med.21659.

MAFFIOLI, E., NONNIS, S., ANGIONI, R., SANTAGATA, F., CALÌ, B., ZANOTTI, L., NEGRI, A., VIOLA, A. y TEDESCHI, G., 2017. Proteomic analysis of the secretome of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells primed by pro-inflammatory cytokines. *Journal of Proteomics* [en línea], vol. 166, pp. 115-126. ISSN 18767737. DOI 10.1016/j.jprot.2017.07.012. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.07.012.

MAHLA, R., 2016. Adipose Stem Cells Applications in Regenerative Medicine. *International Journal of Cell Biology*, vol. 3, no. 4, pp. 1-24. ISSN 1687-8876.

MAQSOOD, M., KANG, M., WU, X., CHEN, J., TENG, L. y QIU, L., 2020. Adult mesenchymal stem cells and their exosomes: Sources, characteristics, and application in regenerative medicine. *Life Sciences* [en línea], vol. 256, pp.

118002. ISSN 18790631. DOI 10.1016/j.lfs.2020.118002. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118002.

MARK, P., KLEINSORGE, M., GAEBEL, R., LUX, C.A., TOELK, A., PITTERMANN, E., DAVID, R., STEINHOFF, G. y MA, N., 2013. Human mesenchymal stem cells display reduced expression of CD105 after culture in serum-free medium. *Stem Cells International*, vol. 2013. ISSN 16879678. DOI 10.1155/2013/698076.

MARSHALL, R.M., SALERNO, D., GARRIGA, J. y GRAÑA, X., 2005. Cyclin T1 Expression Is Regulated by Multiple Signaling Pathways and Mechanisms during Activation of Human Peripheral Blood Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, vol. 175, no. 10, pp. 6402-6411. ISSN 0022-1767. DOI 10.4049/jimmunol.175.10.6402.

MARTÍNEZ PEINADO, P., 2017. *Perfil Fenotípico y Capacidad Inmunomoduladora de Distintos Clones de Células Troncales Mesenquimales* [en línea]. S.l.: Tesis doctoral, Universidad de Alicante. Disponible en: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/64651/1/tesis_martinez_peinado.pdf.

MAUNEY, J.R., VOLLOCH, V. y KAPLAN, D.L., 2005. Matrix-mediated retention of adipogenic differentiation potential by human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *Biomaterials*, vol. 26, no. 31, pp. 6167-6175. ISSN 01429612. DOI 10.1016/j.biomaterials.2005.03.024.

MEISEL, R., BROCKERS, S., HESELER, K., DEGISTIRICI, O., BÜLLE, H., WOITE, C., STUHLSATZ, S., SCHWIPPERT, W., JÄGER, M., SORG, R., HENSCHLER, R., SEISSLER, J., DILLOO, D. y DÄUBENER, W., 2011. Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, vol. 25, no. 4, pp. 648-654. ISSN 14765551. DOI 10.1038/leu.2010.310.

METZEMAEKERS, M., VANHEULE, V., JANSSENS, R., STRUYF, S. y PROOST, P., 2018. Overview of the mechanisms that may contribute to the non-redundant activities of interferon-inducible CXC chemokine receptor 3 ligands. *Frontiers in Immunology*, vol. 8, pp. 1970. ISSN 16643224. DOI 10.3389/fimmu.2017.01970.

MEZA-ZEPEDA, L.A., NOER, A., DAHL, J.A., MICCI, F., MYKLEBOST, O. y COLLAS, P., 2008. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue

stem cells cultured to senescence: Stem Cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 12, no. 2, pp. 553-563. ISSN 15821838. DOI 10.1111/j.1582-4934.2007.00146.x.

MIN, C.K., KIM, B.G., PARK, G., CHO, B. y OH, I.H., 2007. IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, vol. 39, no. 10, pp. 637-645. ISSN 02683369. DOI 10.1038/sj.bmt.1705644.

MORAES, D.A., SIBOV, T.T., PAVON, L.F., ALVIM, P.Q., BONADIO, R.S., DA SILVA, J.R., PIC-TAYLOR, A., TOLEDO, O.A., MARTI, L.C., AZEVEDO, R.B. y OLIVEIRA, D.M., 2016. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research and Therapy* [en línea], vol. 7, no. 1, pp. 1-14. ISSN 17576512. DOI 10.1186/s13287-016-0359-3. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s13287-016-0359-3.

MOURA, J., RODRIGUES, J., GONÇALVES, M., AMARAL, C., LIMA, M. y CARVALHO, E., 2017. Impaired T-cell differentiation in diabetic foot ulceration. *Cellular and Molecular Immunology*, vol. 14, no. 9, pp. 758-769. ISSN 16727681. DOI 10.1038/cmi.2015.116.

MUNN, D.H. y MELLOR, A.L., 2013. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in Immunology* [en línea], vol. 34, no. 3, pp. 137-143. ISSN 14714906. DOI 10.1016/j.it.2012.10.001. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.10.001.

NASSIRI, F., CUSIMANO, M.D., SCHEITHAUER, B.W., ROTONDO, F., FAZIO, A., YOUSED, G.M., SYRO, L. V., KOVACS, K. y LLOYD, R., 2011. Endoglin (CD105): A Review of its Role in Angiogenesis and Tumor Diagnosis, Progression and Therapy. *Anticancer research*, vol. 31, no. 6, pp. 2283-2290.

NAUNG, N.Y., DUNCAN, W., SILVA, R. De y COATES, D., 2019. Localization and characterization of human palatal periosteum stem cells in serum-free, xeno-free medium for clinical use. *European Journal of Oral Sciences*, vol. 127, no. 2, pp. 99-111. ISSN 16000722. DOI 10.1111/eos.12603.

NIKFARJAM, S., REZAIE, J., ZOLBANIN, N.M. y JAFARI, R., 2020. Mesenchymal stem cell derived-exosomes: a modern approach in translational medicine. *Journal*

of Translational Medicine [en línea], vol. 18, no. 1, pp. 1-21. ISSN 14795876. DOI 10.1186/s12967-020-02622-3. Disponible en: https://doi.org/10.1186/s12967-020-02622-3.

PALMA, V., PITOSSI, F.J., REHEN, S.K., TOURIÑO, C. y VELASCO, I., 2015. Stem cell research in Latin America: Update, challenges and opportunities in a priority research area. *Regenerative Medicine*, vol. 10, no. 6, pp. 785-798. ISSN 1746076X. DOI 10.2217/rme.15.44.

PAN, Z., ZHOU, Z., ZHANG, H., ZHAO, H., SONG, P., WANG, D., YIN, J., ZHAO, W., XIE, Z., WANG, F., LI, Y., GUO, C., ZHU, F., ZHANG, L. y WANG, Q., 2019. CD90 serves as differential modulator of subcutaneous and visceral adipose-derived stem cells by regulating AKT activation that influences adipose tissue and metabolic homeostasis. *Stem Cell Research and Therapy*, vol. 10, no. 1, pp. 1-18. ISSN 17576512. DOI 10.1186/s13287-019-1459-7.

PATKI, S., KADAM, S., CHANDRA, V. y BHONDE, R., 2010. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Human Cell*, vol. 23, no. 2, pp. 35-40. ISSN 09147470. DOI 10.1111/j.1749-0774.2010.00083.x.

PĂUNESCU, V., DEAK, E., HERMAN, D., SISKA, I.R., TĂNASIE, G., BUNU, C., ANGHEL, S., TATU, C.A., OPREA, T.I., HENSCHLER, R., RÜSTER, B., BISTRIAN, R. y SEIFRIED, E., 2007. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 11, no. 3, pp. 502-508. ISSN 15821838. DOI 10.1111/j.1582-4934.2007.00041.x.

PERA, M.F. y TAM, P.P.L., 2010. Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature*, vol. 465, no. 7299, pp. 713-720. ISSN 00280836. DOI 10.1038/nature09228.

PERLÉS, B., FLANAGAN, M.T., AUGER, J. y CRUMPTON, M.J., 1977. Mechanism of lymphocyte activation: the binding of phytohemagglutinin to the lymphocyte surface. *European Journal of Immunology*, vol. 7, no. 9, pp. 613-619. ISSN 15214141. DOI 10.1002/eji.1830070907.

PETERS, E.B., CHRISTOFOROU, N., MOORE, E., WEST, J.L. y TRUSKEY, G.A., 2015. CD45+ Cells Present Within Mesenchymal Stem Cell Populations Affect Network Formation of Blood-Derived Endothelial Outgrowth Cells. *BioResearch Open Access*, vol. 4, no. 1, pp. 75-88. ISSN 21647860. DOI

10.1089/biores.2014.0029.

PFAFFL, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, vol. 29, no. 9, pp. e45. ISSN 00358711. DOI 10.1111/j.1365-2966.2012.21196.x.

PONNAIYAN, D. y JEGADEESAN, V., 2014. Comparison of phenotype and differentiation marker gene expression profiles in human dental pulp and bone marrow mesenchymal stem cells. *European Journal of Dentistry*, vol. 8, no. 3, pp. 307-313. ISSN 13057464. DOI 10.4103/1305-7456.137631.

QU, C., BROHLIN, M., KINGHAM, P.J. y KELK, P., 2020. Evaluation of growth, stemness, and angiogenic properties of dental pulp stem cells cultured in cGMP xeno-/serum-free medium. *Cell and Tissue Research*, vol. 380, no. 1, pp. 93-105. ISSN 14320878. DOI 10.1007/s00441-019-03160-1.

QUAH, B.J.C. y PARISH, C.R., 2010. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *Journal of Visualized Experiments*, no. 44, pp. 4-7. ISSN 1940087X. DOI 10.3791/2259.

REBUZZINI, P., ZUCCOTTI, M., REDI, C.A. y GARAGNA, S., 2015. Chromosomal Abnormalities in Embryonic and Somatic Stem Cells. *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 147, no. 1, pp. 1-9. ISSN 1424859X. DOI 10.1159/000441645.

RODRIGUEZ, R., RUBIO, R., MASIP, M., CATALINA, P., NIETO, A., DE LA CUEVA, T., ARRIERO, M., SAN MARTIN, N., DE LA CUEVA, E., BALOMENOS, D., MENENDEZ, P. y GARCÍA-CASTRO, J., 2009. Loss of p53 Induces Tumorigenesis in p21-Deficient Mesenchymal Stem Cells. *Neoplasia* [en línea], vol. 11, no. 4, pp. 397-IN9. ISSN 14765586. DOI 10.1593/neo.81620. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1593/neo.81620.

SALZIG, D., LEBER, J., MERKEWITZ, K., LANGE, M.C., KÖSTER, N. y CZERMAK, P., 2016. Attachment, Growth, and Detachment of Human Mesenchymal Stem Cells in a Chemically Defined Medium. *Stem Cells International*, vol. 2016. ISSN 16879678. DOI 10.1155/2016/5246584.

SANCHEZ-CASTRO, E.E., PAJUELO-REYES, C., TEJEDO, R., SORIA-JUAN, B., TAPIA-LIMONCHI, R., ANDREU, E., FRANZ, M., CAHUANA, G.M., GUERRA-DUARTE, C., SILVA DE ASSIS, T.C., BEDOYA, F.J., SORIA, B., CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C. y TEJEDO, J.R., 2021. Mesenchymal Stromal Cell-Based

Therapies as Promising Treatments for Muscle Regeneration After Snakebite Envenoming. *Frontiers in Immunology*, vol. 11, pp. 3732. DOI 10.3389/fimmu.2020.609961.

SÁNCHEZ-ELSNER, T., BOTELLA, L.M., VELASCO, B., LANGA, C. y BERNABÉU, C., 2002. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-β pathways. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 46, pp. 43799-43808. ISSN 00219258. DOI 10.1074/jbc.M207160200.

SÁNCHEZ-GUIJO, F., GARCÍA-ARRANZ, M., LÓPEZ-PARRA, M., MONEDERO, P., MATA-MARTÍNEZ, C., SANTOS, A., SAGREDO, V., ÁLVAREZ-AVELLO, J.M., GUERRERO, J.E., PÉREZ-CALVO, C., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, M.V., DEL-POZO, J.L., ANDREU, E.J., FERNÁNDEZ-SANTOS, M.E., SORIA-JUAN, B., HERNÁNDEZ-BLASCO, L.M., ANDREU, E., SEMPERE, J.M., ZAPATA, A.G., MORALEDA, J.M., SORIA, B., FERNÁNDEZ-AVILÉS, F., GARCÍA-OLMO, D. y PRÓSPER, F., 2020. Adipose-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of patients with severe SARS-CoV-2 pneumonia requiring mechanical ventilation. A proof of concept study. *EClinicalMedicine*, vol. 25, pp. 100454. ISSN 25895370. DOI 10.1016/j.eclinm.2020.100454.

SAURY, C., LARDENOIS, A., SCHLEDER, C., LEROUX, I., LIEUBEAU, B., DAVID, L., CHARRIER, M., GUÉVEL, L., VIAU, S., DELORME, B. y ROUGER, K., 2018. Human serum and platelet lysate are appropriate xeno-free alternatives for clinical-grade production of human MuStem cell batches. *Stem Cell Research and Therapy* [en línea], vol. 9, no. 1, pp. 1-20. ISSN 1757-6512. Disponible en: http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L621936019%0Ahttp://dx.doi.org/10.1186/s13287-018-0852-y.

SCHULMAN, L.L., WEINBERG, A.D., MCGREGOR, C., GALANTOWICZ, M.E., SUCIU-FOCA, N.M. y ITESCU, S., 1998. Mismatches at the HLA-DR and HLA-B loci are risk factors for acute rejection after lung transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 157, no. 6, pp. 1833-1837. ISSN 1073449X. DOI 10.1164/ajrccm.157.6.9707007.

SEO, Y., SHIN, T.H. y KIM, H.S., 2019. Current strategies to enhance adipose stem cell function: An update. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 15. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms20153827.

SHANG, J., YAO, Y., FAN, X., SHANGGUAN, L., LI, J., LIU, H. y ZHOU, Y., 2016. MiR-29c-3p promotes senescence of human mesenchymal stem cells by targeting CNOT6 through p53-p21 and p16-pRB pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* [en línea], vol. 1863, no. 4, pp. 520-532. ISSN 18792596. DOI 10.1016/j.bbamcr.2016.01.005. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.005.

SHEN, Q., FAN, X., JIANG, M., YE, Z., ZHOU, Y. y TAN, W.S., 2019. Inhibiting expression of Cxcl9 promotes angiogenesis in MSCs-HUVECs co-culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [en línea], vol. 675, pp. 108108. ISSN 10960384. DOI 10.1016/j.abb.2019.108108. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108108.

SHI, Y., WANG, Y., SHAO, C., HUANG, J., GAN, J., HUANG, X., BUCCI, E., PIACENTINI, M., IPPOLITO, G. y MELINO, G., 2020. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell death and differentiation*, pp. 1451-1454. ISSN 1476-5403. DOI 10.1038/s41418-020-0530-3.

SIDNEY, L.E., BRANCH, M.J., DUNPHY, S.E., DUA, H.S. y HOPKINSON, A., 2014. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*, vol. 32, no. 6, pp. 1380-1389. DOI http://dx.doi.org/ 10.1002/stem.1661.

SONG, N., SCHOLTEMEIJER, M. y SHAH, K., 2020. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends in Pharmacological Sciences* [en línea], vol. 41, no. 9, pp. 653-664. ISSN 18733735. DOI 10.1016/j.tips.2020.06.009. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009.

SORIA ESCOMS, B., HMADCHA, A., TEJEDO HUAMAN, J.R., BEDOYA BERGUA, FRANCISCO, J., CAHUANA MACEDO, G.M., RODRÍGUEZ CAMPINS, B., TAPIA LIMONCHI, R. y BELTRÁN POVEA, A., 2017. Improved Cell Culture Medium for human Progenitor Cells (hPC) [en línea]. WO/2017/021535. España. WO/2017/021535. Disponible en: http://ws134.juntadeandalucia.es/ofertastecnologicas/patentes/2015/08/24/improved-cell-culture-medium-for-human-progenitor-cells-hpc/.

STÖCKL, S., GÖTTL, C., GRIFKA, J. y GRÄSSEL, S., 2013. Sox9 modulates proliferation and expression of osteogenic markers of adipose-derived stem cells

(ASC). *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 31, no. 4-5, pp. 703-717. ISSN 14219778. DOI 10.1159/000350089.

STRASSBURG, S., NIENHUESER, H., STARK, G.B., FINKENZELLER, G. y TORIO-PADRON, N., 2013. Human adipose-derived stem cells enhance the angiogenic potential of endothelial progenitor cells, but not of human umbilical vein endothelial cells. *Tissue Engineering - Part A*, vol. 19, no. 1-2, pp. 166-174. ISSN 19373341. DOI 10.1089/ten.tea.2011.0699.

TABEBORDBAR, M., ZHU, K., CHENG, J.K.W., CHEW, W.L., WIDRICK, J.J., YAN, W.X., MAESNER, C., WU, E.Y., XIAO, R., RAN, F.A., CONG, L., ZHANG, F., VANDENBERGHE, L.H., CHURCH, G.M. y WAGERS, A.J., 2016. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, vol. 21, no. 18, pp. 4062-4072. ISSN 09652140. DOI 10.1126/science.aad5177.In.

TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K. y YAMANAKA, S., 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 861-872. ISSN 00928674. DOI 10.1016/j.cell.2007.11.019.

TAKAHASHI, Y., SEKINE, K., KIN, T., TAKEBE, T. y TANIGUCHI, H., 2018. Self-Condensation Culture Enables Vascularization of Tissue Fragments for Efficient Therapeutic Transplantation. *Cell Reports* [en línea], vol. 23, no. 6, pp. 1620-1629. ISSN 22111247. DOI 10.1016/j.celrep.2018.03.123. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.123.

TAPIA LIMONCHI, R., 2013. *Evaluación del efecto del óxido nítrico sobre la expresión génica en células madre embrionarias* [en línea]. S.l.: Tesis doctoral, Universidad Pablo de Olavide. Disponible en: http://hdl.handle.net/10433/609.

TAYLOR, M.W. y FENG, G., 1991. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *The FASEB Journal*, vol. 5, no. 11, pp. 2516-2522.

TEIXEIRA, F. y SALGADO, A., 2020. Mesenchymal stem cells secretome: current trends and future challenges Mesenchymal stem cells (MSCs) secretome: a good candidate for medical biotechnology? *Neural Regen Res*, vol. 15, pp. 75-77. DOI 10.4103/1673-5374.264455.

TEIXEIRA, F.G., PANCHALINGAM, K.M., ANJO, S.I., MANADAS, B., PEREIRA, R.,

SOUSA, N., SALGADO, A.J. y BEHIE, L.A., 2015. Do hypoxia/normoxia culturing conditions change the neuroregulatory profile of Wharton Jelly mesenchymal stem cell secretome? *Stem Cell Research and Therapy* [en línea], vol. 6, no. 1, pp. 1-14. ISSN 17576512. DOI 10.1186/s13287-015-0124-z. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s13287-015-0124-z.

TERRY, D.E., CHOPRA, R.K., OVENDEN, J. y ANASTASSIADES, T.P., 2000. Differential use of Alcian blue and toluidine blue dyes for the quantification and isolation of anionic glycoconjugates from cell cultures: Application to proteoglycans and a high-molecular-weight glycoprotein synthesized by articular chondrocytes. *Analytical Biochemistry*, vol. 285, no. 2, pp. 211-219. ISSN 00032697. DOI 10.1006/abio.2000.4761.

THOMPSON, M., MEI, S.H.J., WOLFE, D., CHAMPAGNE, J., FERGUSSON, D., STEWART, D.J., SULLIVAN, K.J., DOXTATOR, E., LALU, M., ENGLISH, S.W., GRANTON, J., HUTTON, B., MARSHALL, J., MAYBEE, A., WALLEY, K.R., SANTOS, C. Dos, WINSTON, B. y MCINTYRE, L., 2020. Cell therapy with intravascular administration of mesenchymal stromal cells continues to appear safe: An updated systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*, vol. 19. ISSN 25895370. DOI 10.1016/j.eclinm.2019.100249.

TIPNIS, S., VISWANATHAN, C. y MAJUMDAR, A.S., 2010. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Role of B7-H1 and IDO. *Immunology and Cell Biology* [en línea], vol. 88, no. 8, pp. 795-806. ISSN 08189641. DOI 10.1038/icb.2010.47. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/icb.2010.47.

TOLEDO, A., 2005. Aprueban Reglamento de la Ley General de Donación y Trasplante de Órganos y/o Tejidos Humanos. *El Peruano, DECRETO SUPREMO No 014-2005-SA El Peruano*. 2005.

UCCELLI, A., MORETTA, L. y PISTOIA, V., 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 9, pp. 726-736. ISSN 14741733. DOI 10.1038/nri2395.

VISWANATHAN, C., KULKARNI, R., BOPARDIKAR, A. y RAMDASI, S., 2017. Significance of CD34 Negative Hematopoietic Stem Cells and CD34 Positive Mesenchymal Stem Cells. *Current stem cell research & therapy*, vol. 12, no. 6, pp. 476-483. DOI 10.2174/1574888X12666170502095625.

VIZOSO, F.J., EIRO, N., CID, S., SCHNEIDER, J. y PEREZ-FERNANDEZ, R., 2017. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 9. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms18091852.

VOSS, A., MCCARTHY, M.B., HOBERMAN, A., COTE, M.P., IMHOFF, A.B., MAZZOCCA, A.D. y BEITZEL, K., 2016. Extracellular Matrix of Current Biological Scaffolds Promotes the Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery* [en línea], vol. 32, no. 11, pp. 2381-2392. ISSN 15263231. DOI 10.1016/j.arthro.2016.04.033. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.arthro.2016.04.033.

WANG, Z.H., LI, X.L., HE, X.J., WU, B.J., XU, M., CHANG, H.M., ZHANG, X.H., XING, Z., JING, X.H., KONG, D.M., KOU, X.H. y YANG, Y.Y., 2014. Delivery of the Sox9 gene promotes chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in an in vitro model. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 47, no. 4, pp. 279-286. ISSN 16784510. DOI 10.1590/1414-431X20133539.

WARRINGTON, K., HILLARBY, M.C., LI, C., LETARTE, M. y KUMAR, S., 2005. Functional role of CD105 in TGF-β1 signalling in murine and human endothelial cells. *Anticancer Research*, vol. 25, no. 3 B, pp. 1851-1864. ISSN 02507005.

WESTENFELDER, C., GOOCH, A., HU, Z., AHLSTROM, J. y ZHANG, P., 2017. Durable Control of Autoimmune Diabetes in Mice Achieved by Intraperitoneal Transplantation of “Neo-Islets,” Three-Dimensional Aggregates of Allogeneic Islet and “Mesenchymal Stem Cells”. *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 6, no. 7, pp. 1631-1643. ISSN 21576580. DOI 10.1002/sctm.17-0005.

WIEBE, C., KOSMOLIAPTSIS, V., POCHINCO, D., GIBSON, I.W., HO, J., BIRK, P.E., GOLDBERG, A., KARPINSKI, M., SHAW, J., RUSH, D.N. y NICKERSON, P.W., 2019. HLA-DR/DQ molecular mismatch: A prognostic biomarker for primary alloimmunity. *American Journal of Transplantation*, vol. 19, no. 6, pp. 1708-1719. ISSN 16006143. DOI 10.1111/ajt.15177.

WIESMANN, A., BÜHRING, H.-J., MENTRUP, C. y WIESMANN, H.-P., 2006. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head & Face Medicine*, vol. 2, no. 1, pp. 1-6. ISSN 1746-160X. DOI 10.1186/1746-160x-2-8.

WILSON, A., CHEE, M., BUTLER, P. y BOYD, A.S., 2019. Isolation and Characterisation of Human Adipose-Derived Stem Cells. En: A (ed.), *Immunological Tolerance*. New York, NY: Humana Press, New York, NY, pp. 3-13. ISBN 9781493990047.

WOODFORD-THOMAS, T. y THOMAS, M.., 1993. The leukocyte common antigen, CD45 and other protein tyrosine phosphatases in hematopoietic cells. *Seminars Cell Biology*, vol. 4, no. 6, pp. 409-418. DOI https://doi.org/10.1006/scel.1993.1049.

WU, M., HAN, Z.B., LIU, J.F., WANG, Y.W., ZHANG, J.Z., LI, C.T., XIN, P.L., HAN, Z.C. y ZHU, X.P., 2014. Serum-free media and the immunoregulatory properties of mesenchymal stem cells in vivo and in vitro. *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 33, no. 3, pp. 569-580. ISSN 14219778. DOI 10.1159/000358635.

WU, S.Z., LI, Y.L., HUANG, W., CAI, W.F., LIANG, J., PAUL, C., JIANG, L., WU, Z.C., XU, M., ZHU, P. y WANG, Y., 2017. Paracrine effect of CXCR4-overexpressing mesenchymal stem cells on ischemic heart injury. *Cell Biochemistry and Function*, vol. 35, no. 2, pp. 113-123. ISSN 10990844. DOI 10.1002/cbf.3254.

WU, X., MA, Z. y WU, D., 2020. Derivation of clinical-grade mesenchymal stromal cells from umbilical cord under chemically defined culture condition – platform for future clinical application. *Cytotherapy* [en línea], vol. 22, no. 7, pp. 377-387. ISSN 14772566. DOI 10.1016/j.jcyt.2020.03.431. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.03.431.

YAN, G., YUAN, Y., HE, M., GONG, R., LEI, H., ZHOU, H., WANG, W., DU, W., MA, T., LIU, S., XU, Z., GAO, M., YU, M., BIAN, Y., PANG, P., LI, X., YU, S., YANG, F., CAI, B. y YANG, L., 2020. m6A Methylation of Precursor-miR-320/RUNX2 Controls Osteogenic Potential of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* [en línea], vol. 19, pp. 421-436. ISSN 21622531. DOI 10.1016/j.omtn.2019.12.001. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.001.

YANG, D.C., YANG, M.H., TSAI, C.C., HUANG, T.F., CHEN, Y.H. y HUNG, S.C., 2011. Hypoxia inhibits osteogenesis in human mesenchymal stem cells through direct regulation of RUNX2 by TWIST. *PLoS ONE*, vol. 6, no. 9. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0023965.

YANG, J.X., ZHANG, N., WANG, H.W., GAO, P., YANG, Q.P. y WEN, Q.P., 2015. CXCR4 receptor overexpression in mesenchymal stem cells facilitates treatment of acute lung injury in rats. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, no. 4, pp. 1994-2006. ISSN 1083351X. DOI 10.1074/jbc.M114.605063.

YANG, S.H., PARK, M.J., YOON, I.H., KIM, S.Y., HONG, S.H., SHIN, J.Y., NAM, H.Y., KIM, Y.H., KIM, B. y PARK, C.G., 2009. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 41, no. 5, pp. 315-324. ISSN 20926413. DOI 10.3858/emm.2009.41.5.035.

YEH, S.P., CHANG, J.G., LO, W.J., LIAW, Y.C., LIN, C.L., LEE, C.C. y CHIU, C.F., 2006. Induction of CD45 expression on bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leukemia*, vol. 20, no. 5, pp. 894-896. ISSN 14765551. DOI 10.1038/sj.leu.2404181.

YI, J., LIU, D. y XIAO, J., 2019. LncRNA MALAT1 sponges miR-30 to promote osteoblast differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells by promotion of Runx2 expression. *Cell and Tissue Research*, vol. 376, no. 1, pp. 113-121. ISSN 14320878. DOI 10.1007/s00441-018-2963-2.

YIN, J.Q., ZHU, J. y ANKRUM, J.A., 2019. Manufacturing of primed mesenchymal stromal cells for therapy. *Nature Biomedical Engineering* [en línea], vol. 3, no. 2, pp. 90-104. ISSN 2157846X. DOI 10.1038/s41551-018-0325-8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/s41551-018-0325-8.

YU, X., CHEN, D., ZHANG, Yang, WU, X., HUANG, Z., ZHOU, H., ZHANG, Yanding y ZHANG, Z., 2012. Overexpression of CXCR4 in mesenchymal stem cells promotes migration, neuroprotection and angiogenesis in a rat model of stroke. *Journal of the Neurological Sciences* [en línea], vol. 316, no. 1-2, pp. 141-149. ISSN 0022510X. DOI 10.1016/j.jns.2012.01.001. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2012.01.001.

ZAKRZEWSKI, W., DOBRZYŃSKI, M., SZYMONOWICZA, M. y RYBAK, Z., 2019. Fuel Cells: Past, Present and Future. *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 128, no. 5, pp. 329-332. ISSN 03854205. DOI https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5.

ZANGANEH, E., SOUDI, S. y HOSSEINI, A.Z., 2020. Intralesional Injection of Mouse Mesenchymal Stem Cells Reduces IL-10 Production and Parasite Burden in L.

major Infected BALB/c Mice. *Cell Journal*, vol. 22, pp. 11-18. ISSN 22285814. DOI 10.22074/cellj.2020.6838.

ZHAO, C., JIANG, W., ZHOU, N., LIAO, J., YANG, M., HU, N., LIANG, X., XU, W., CHEN, H., LIU, W., SHI, L.L., OLIVEIRA, L., WOLF, J.M., HO, S., ATHIVIRAHAM, A., TSAI, H.M., HE, T.C. y HUANG, W., 2017. Sox9 augments BMP2-induced chondrogenic differentiation by downregulating Smad7 in mesenchymal stem cells (MSCs). *Genes and Diseases* [en línea], vol. 4, no. 4, pp. 229-239. ISSN 23523042. DOI 10.1016/j.gendis.2017.10.004. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.10.004.

PARTE DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS HAN SIDO PUBLICADOS: FIGURA 5, 6 EN EL SIGUIENTE ARTÍCULO:

SANCHEZ-CASTRO, E.E., **PAJUELO-REYES, C.**, TEJEDO, R., SORIA-JUAN, B., TAPIA-LIMONCHI, R., ANDREU, E., FRANZ, M., CAHUANA, G.M., GUERRA-DUARTE, C., SILVA DE ASSIS, T.C., BEDOYA, F.J., SORIA, B., CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C. y TEJEDO, J.R., 2021. Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies as Promising Treatments for Muscle Regeneration After Snakebite Envenoming. Frontiers in Immunology, vol. 11, pp. 3732. DOI 10.3389/fimmu.2020.609961.

9. ANEXOS

Anexo 1. Documento de Respaldo

Prof Dr Bernat Soria, MD, PhD, FRCP (Hon)

A QUIEN PUEDA INTERESAR

Bernat Soria Escoms, Catedrático de Universidad, con DNI 73 931 831 X, como Director que fue del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (2005-2007) (CABIMER), del Departamento de Terapias Avanzadas y Regeneracion Tisular (2009-2019) y Ministro de Sanidad y Consumo del Gobierno de España (2007-2009)

CERTIFICA:

Que Dª Cecilia Isabel Pajuelo Reyes, realizó en parte su actividad experimental bajo la supervisión del Prof Juan R Tejedo Huaman y por mí mismo sobre el tema cuyo Titulo Preliminar es:

"XANADU como medio de expansión químicamente definido para Células Madre Mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo"

Como TESIS para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga

En su trabajo se utilizaron Células Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo que se obtuvieron y procesaron con el correspondiente Consentimiento Informado y que no precisan de una Autorización especial por parte de los Comités de Ética y Garantías

En experimentos control se utilizaron líneas celulares derivadas Celulas Embrionarias Humanas (ESC) y Células Pluripotenciales Inducidas (iPSC) para los que se obtuvo la correspondiente autorización (adjunta)

Lo que firmo en Alicante el 29 de Marzo de 2021, a los efectos oportunos

Bernat Soria

- Prof of Physiology, School of Medicine
  ISABIAL- Health Research Institute of Alicante University Hospital
  University Miguel Hernandez, 03550 Sant Joan d'Alacant, Alicante (Spain)
  Institute of Bioengineering, Avenida de la Universidad s/n, 03202 ELCHE (Alicante) bernat.soria@umh.es

- Extraordinary Prof of Regenerative Medicine
  University Pablo de Olavide
  Carretera de Utrera 1
  41013 Sevilla (Spain) bsoresc@acu.upo.es

Anexo 2. Modelo de consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

OBTENCIÓN DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES

I. INTRODUCCIÓN

El Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) se encuentra haciendo una investigación con el fin de obtener células madre mesenquimales (CMM), expandirlas en determinados medios de cultivo y evaluar sus propiedades terapéuticas frente a enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Las células serán obtenidas a partir de tejido adiposo omental, la cual es una fuente rica de CMM. Actualmente estas células están siendo estudiadas a nivel mundial en el tratamiento de diversas enfermedades, demostrando un efecto beneficioso.

II. ¿POR QUÉ SE ESTÁ REALIZANDO ESTE ESTUDIO?

El presente estudio, ayudará entender la viabilidad del uso de células madre mesenquimales para el tratamiento de diversas enfermedades, centrándose en la obtención, cultivo y caracterización.

III. ¿POR QUÉ LE PEDIMOS QUE FORME PARTE DE ESTE ESTUDIO?

Solicitamos nos done una muestra de tejido adiposo omental en el caso se someta a una cirugía menor. Este tejido será obtenido mediante biopsia y su donación no generará ningún cambio en los procedimientos que realizará su médico en su cirugía.

IV. ¿EN QUÉ CONSISTE EL ESTUDIO Y QUÉ PRUEBAS LE REALIZAREMOS SI INGRESA AL ESTUDIO?

1. Después de la firma del consentimiento informado en su cirugía menor se realizará la biopsia del tejido omental. Las intervenciones se realizarán siguiendo los procedimientos que indique su médico tratante. El médico tratante nos entregara el tejido adiposo omental al finalizar el procedimiento.

2. Las fuentes de CMM serán transportadas de forma estéril al CABIMER, en donde se seguirán los procedimientos para la obtención de células en un ambiente de buenas prácticas de fabricación (BPF ó GMP por sus siglas en ingles). Todos los procedimientos que realizaremos no tendrán ninguna repercusión sobre ud.

V. ¿CUÁLES SON LOS RIESGOS PARA EL PARTICIPANTE?

Por su parte el tejido adiposo omental será obtenido a partir de una biopsia en el caso usted tenga una cirugía menor. La cirugía deberá ser coordinada previamente con su medico tratante. La donación de la muestra no traerá un RIESGO MAYOR a su cirugía.

VI. ¿COMO SE BENEFICIARÁ EL PARTICIPANTE?

Toda donación es altruista y por lo cual no tendrá ningún beneficio directo para usted.

VII. ¿USTED RECIBIRÁ DINERO POR PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

NO

VIII. CONFIDENCIALIDAD

Toda la información y análisis obtenido de las muestras desde el ingreso al Área de proceso hasta su preservación, será codificada. Adicionalmente, la información se

encontrará bajo seguridad en el CABIMER, siendo el director del centro el único que tendrá acceso a dicha información.
Si nuestros experimentos son correctos podremos obtener una línea que será usada en la investigación, Si nuestros experimentos no resultan las muestras serán desechadas inmediatamente.

IX. DECLARACIÓN DEL PARTICIPANTE

Su participación es totalmente VOLUNTARIA, podrá elegir SI QUIERE DONAR SU MUESTRA o elegir si quiere QUE NO SE USE LA MUESTRA O RESULTADOS EN EL MOMENTO QUE DESEE.

X. PARTICIPACION VOLUNTARIA

Usted será la persona quien decida su participación, ningún miembro del equipo de investigación, ni su médico tratante podrá obligarlo o presionarlo para que Ud. participe en el estudio.

XI. INFORMACION ADICIONAL

Para obtener mayor información sobre la investigación y los resultados obtenidos en este estudio, Usted podrá conversar con los responsables:

Juan R. Tejedo PhD.
Departamento de Terapia Celular y Regeneración
Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa-CABIMER
E-mail: juan.tejedo@cabimer.es

XII. DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Declaración voluntaria del participante.
El presente estudio me ha sido explicado completamente, así mismo he tenido la oportunidad de hacer preguntas, las que han sido respondidas a mi satisfacción. Por tal motivo acepto voluntariamente participar en este estudio. Entiendo que puedo negarme a participar en este estudio o retirarme en cualquier momento si así lo decido, sin tener que dar explicaciones y que mi decisión será respetada, sin ningún tipo de sanción y sin que cambie la atención que se me da en el hospital.
Si durante el estudio tengo algunas preguntas, puedo comunicarme con los investigadores cuyos datos aparecen en la parte superior. Si tengo alguna pregunta acerca de los aspectos éticos del estudio, o si me parece que mis derechos son lastimados al participar en este estudio, puedo comunicarme con los investigadores del Centro Andaluz de Biología Celular y Medicina Regenerativa.

Yo, _____ de _____años de edad, luego de haber leído y entendido el contenido de este documento, SI ( ) / NO ( ) ACEPTO participar en este estudio y que la muestra de tejido adiposo omental sea tomada, utilizada y analizada durante esta investigación, confirmando mi participación mediante la firma de este documento en presencia de la persona quien obtiene el consentimiento.

Firma del participante:
DNI del participante:

_____

Firma del Testigo:
DNI del testigo:

_____

Nombre y Firma del Investigador:
DNI del Investigador:

_____

Fecha: _____, de _____ del 20__

Huella digital

Anexo 3. Listado de genes y cebadores utilizados

Primer o cebador		Secuencia	Tamaño (b)	Tm (°C)	Tamaño del amplificado (pb)
hIDO1	Forward	5´-CCA GCT TCG AGA AAG AGT TG- 3´	20	58	
	Reverse	5´-TGA TGC ATC CCA GAA CTA GA- 3´	20	56	101
hCXCL9	Forward	5´-TGT TCT TCT ACC ACC CAC CAG- 3´	21	61	
	Reverse	5´-CAG CAT GCT AAC AGG CTT AGG- 3´	21	61	202
hCXCL10	Forward	5´-CTG TAC GCT GTA CCT GCA TCA- 3´	21	61	
	Reverse	5´-TTC TTG ATG GCC TTC GAT TC- 3´	20	56	172
hCXCR4	Forward	5´-CTG GCC TTC ATC AGT CTG GA- 3´	20	60	
	Reverse	5´-TCA TCT GCC TCA CTG ACG TT- 3´	20	58	167
hIL10	Forward	5´-GAC AGA CTT GCA AAA GAA GGC A- 3´	22	59	
	Reverse	5´-CAG CTG TTC TCA GAC TGG GTG- 3´	21	60	110
hp53	Forward	5´-GGG ATG TTT GGG AGA TGT AAG- 3´	21	60	
	Reverse	5´-CAG ATA TGG GCC TTG AAG TTA G- 3´	22	60	148
hp21	Forward	5´- GCT GGG AGT AGT TGT CTT TC- 3´	20	60	
	Reverse	5´-AGT CCA GGC CAG TAT GTT A- 3´	19	60	128
hpRb	Forward	5´-GCC TAT CTC CGG CTA AAT ACA C- 3´	22	62	
	Reverse	5´-GTC CAA ATG CCT GTC TCT CAT - 3´	21	62	132
hSOX9	Forward	5´-GTG CTG CTG GGA AAC ATT TG- 3´	20	62	
	Reverse	5´-GCA CTT ATT GGC TGC TGA AAC- 3´	21	62	139
hFBPA4	Forward	5´-GGA AAG TCA AGA GCA CCA TAA C- 3´	22	61	
	Reverse	5´-TCT CTC ATA AAC TCT CGT GGA AG- 3´	23	61	158
hRUNX2	Forward	5´-TCT AAA TCG CCA GGC TTC ATA G- 3´	22	62	
	Reverse	5´-CCC TGT TGT GTT GTT TGG TAA G- 3´	22	62	149