

**PROTOCOLOS PARA LA EVALUACIÓN DEL SECRETOMA DE LAS CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA, PULPA DENTAL, Y CORDÓN UMBILICAL. REVISIÓN  
NARRATIVA**

**Vianny Cecilia Garcia Vera.**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
PROGRAMA DE ODONTOLOGIA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
BOGOTA DC - MAYO 2019**

## HOJA DE IDENTIFICACION

<b>Universidad</b>	El Bosque
<b>Facultad</b>	Odontología
<b>Programa</b>	Odontología
<b>Título:</b>	Protocolos para la evaluación del secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical. revisión narrativa
<b>Grupo de Investigación:</b>	Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO)
<b>Línea de investigación:</b>	Revisiones Narrativas Regeneración Tisular & Células Stem en Odontología
<b>Tipo de investigación:</b>	Pregrado/Grupo
<b>Estudiantes</b>	Vianny Cecilia Garcia Vera.
<b>Director:</b>	Juan Carlos Munevar
<b>Codirector</b>	Martha Tamayo

## **DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE**

<b>HERNANDO MATIZ CAMACHO</b>	Presidente del Claustro
<b>JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO</b>	Presidente Consejo Directivo
<b>MARIA CLARA RANGEL G.</b>	Rector(a)
<b>RITA CECILIA PLATA DE SILVA</b>	Vicerrector(a) Académico
<b>FRANCISCO FALLA</b>	Vicerrector Administrativo
<b>MIGUEL OTERO CADENA</b>	Vicerrectoría de Investigaciones.
<b>LUIS ARTURO RODRÍGUEZ</b>	Secretario General
<b>JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS</b>	División Postgrados
<b>MARIA ROSA BUENAHORA</b>	Decana Facultad de Odontología
<b>MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL</b>	Secretaria Académica
<b>DIANA ESCOBAR</b>	Directora Área Bioclínica
<b>MARIA CLARA GONZÁLEZ</b>	Director Área comunitaria
<b>FRANCISCO PEREIRA</b>	Coordinador Área Psicosocial
<b>INGRID ISABEL MORA DIAZ</b>	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
<b>IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES</b>	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

**“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.**

## GUÍA DE CONTENIDO

<b>Resumen</b>	
<b>Abstract</b>	
	<b>Pág.</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>4</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>6</b>
<b>4. Metodología para el desarrollo de la revisión</b>	<b>7</b>
<b>a. Tipo de estudio</b>	<b>7</b>
<b>b. Métodos</b>	<b>7</b>
<b>1. Pregunta(s) orientadoras</b>	<b>7</b>
<b>2. Estructura de la revisión</b>	<b>7</b>
<b>3. Búsqueda de información</b>	<b>7</b>
<b>a. Selección de palabras claves por temática</b>	<b>7</b>
<b>b. Estructuración de estrategia de búsqueda por temática</b>	<b>8</b>
<b>c. Resultados de aplicación de estrategia de búsqueda por temática en la base de datos(Pubmed)</b>	<b>8</b>
<b>d. Preselección de artículos por temática</b>	<b>8</b>
<b>4. Selección final de artículos por temática</b>	<b>11</b>
<b>5. Proceso de extracción de información de artículos por temática</b>	<b>11</b>
<b>6. Proceso estructuración de artículo</b>	<b>12</b>
<b>7. Proceso de Edición en español para publicación</b>	<b>12</b>
<b>5. Consideraciones en Propiedad Intelectual</b>	<b>16</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>20</b>
<b>1. Artículo original con su bibliografía version 2</b>	<b>20</b>
<b>2. Artículo con correcciones de estilo</b>	<b>35</b>
<b>3. Artículo Final</b>	<b>51</b>
<b>7. Referencias bibliográficas</b>	<b>67</b>

## RESUMEN

### PROTOCOLOS PARA LA EVALUACIÓN DEL SECRETOMA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA, PULPA DENTAL, Y CORDÓN UMBILICAL. REVISIÓN NARRATIVA

Las células madre mesenquimales son células multipotentes que han sido ampliamente estudiadas debido a que poseen propiedades inmunomoduladoras y de auto renovación, así como un potencial de diferenciación que permiten su aplicación clínica para el tratamiento de enfermedades degenerativas y de defectos óseos. La evidencia demuestra que la única vía importante por la cual las células madre mesenquimales participan en la reparación y regeneración de tejidos es a través de su secretoma, por lo que es esencial entender sus características y su comportamiento. Por tal razón el objetivo de este estudio fue identificar y describir – con base en la evidencia científica existente, los protocolos para la evaluación del secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental y cordón umbilical. Para desarrollar esta revisión se partió de la formulación de una pregunta orientadora a partir de la cual se establecieron 4 temáticas. Se realizaron 4 búsquedas electrónicas en la base de datos PUBMED- una por cada temática desarrollada en la revisión, para cada una se establecieron diferentes estrategias de búsqueda con sus respectivas palabras clave además se realizaron búsquedas manuales, se seleccionaron todos los artículos de revisión en texto completo. La búsqueda no tuvo restricción de idioma, lugar o fecha de publicación. Se seleccionaron 40 estudios experimentales *in-vivo* e *in-vitro*. Para cada temática se estructuró una tabla para la extracción de los datos principales de cada artículo seleccionado a partir de la cual se escribió la revisión siguiendo los parámetros de redacción científica establecidos en las directrices de Asociación Europea de Editores Científicos (EASE) y en los Requisitos de Uniformidad para Manuscritos enviados a Revistas Biomédicas (Vancouver) y con base en estas, este artículo recibió intervención editorial de corrección de estilo. A partir de esta revisión se pudo concluir que el procedimiento de la preparación del medio condicionado tiene una gran influencia sobre la calidad del secretoma (diferenciación y proliferación de células) además se observó que existen diferentes métodos reportados para caracterizar el secretoma sintetizado por las células madre mesenquimales, sin embargo, no es posible concluir cuál es el mejor método para detectar *in vitro* el mayor número de factores solubles, micro vesículas y exosomas derivados de las células madre mesenquimales.

**Palabras claves:** Secretoma, exosomas, factores de crecimiento, medio condicionado, células madre mesenquimales.

## ABSTRACT

### PROTOCOLS FOR EVALUATING MESENCHYMAL STEM CELLS FROM BONE MARROW, DENTAL PULP AND UMBILICAL CORD; A NARRATIVE REVISION

Mesenchymal stem cells are multi-potent cells amply studied because they possess immune-modulating and self-renovating properties, as well as a differentiating potential which permits their clinical application on degenerative diseases and osseous defects. Evidence has shown that secretome is the main channel by which these stem cells interact in tissue regeneration and repair, thus the importance of understanding its characteristics and behaviour. The aim of the present study was then to identify and describe – based on scientific evidence – the protocols for evaluating bone marrow, dental pulp and umbilical cord mesenchymal stem cell secretome. A base question was formulated from which four topics were established and electronic searches for each topic in the revision carried out in *PUBMED*. Different strategies were established for each search with their respective key words, all complete revision articles were selected by manual search, without restriction of language, location or publishing date and 40 *in-vivo* and *in-vitro* experimental studies were selected. A table was structured for each topic in order to file the main data from each article and the revision was developed based on scientific editorial guidelines established by the European Association of Scientific Editors (EASE) and the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (Vancouver). The article then underwent a style revision. The revision allowed to conclude that the preparation procedure of the conditioned medium greatly influences the quality of the secretome (cell differentiation and proliferation) and that different methods have been reported regarding characterisation of stem cell synthesised secretome. However, it is not possible to conclude which is the best method to detect *in vitro* the highest number of soluble factors, micro-vesicles and exosomes derived from mesenchymal stem cells.

**Key words:** secretome, exosomes, growth factors, conditioned medium, mesenchymal stem cells.

## 1. Introducción

Las células madre mesenquimales (MSC) son células madre multipotentes que dan lugar a diversos tipos de células de la capa germinal mesodérmica. Debido a su capacidad única para ubicarse en tejidos lesionados y cancerosos, las (MSC) tienen un gran potencial en medicina regenerativa. (Tan *et al.*, 2014). Las células madre mesenquimales (MSC) también contribuyen a los procesos de reparación en diferentes afecciones patológicas, incluidas las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que solo una pequeña proporción de células madre mesenquimales (MSC) trasplantadas pueden sobrevivir e incorporarse en los tejidos del huésped. (Tan *et al.*, 2014). Las células madre mesenquimales (MSC) fueron identificadas originalmente por Friedenstein y sus colegas como los principales componentes transplantables del microambiente de la médula ósea y necesarios para el mantenimiento de la hematopoyesis definitiva. Más específicamente, Friedenstein *et al.* definieron las MSC como células fibroblásticas y mesodérmicas derivadas que son clonogénicas y adherentes. (Tan *et al.*, 2014). Las MSC derivadas de tejidos de adultos son las más comúnmente utilizadas, pero la capacidad de proliferación de las MSC para adultos es muy limitada, lo que dificulta la ampliación de estas para aplicaciones terapéuticas. Por lo tanto, se requiere una fuente alternativa para promover la regeneración de órganos y tejidos a partir de las células estromales mesenquimales para la aplicación clínica. Las células estromales mesenquimales de tejidos embrionarios extra son una opción ideal para las células madre mesenquimales, ya que pueden superar la limitación proliferativa que presentan las MSC adultas. (Sabapathy *et al.*, 2014). Aunque la médula ósea es la mejor fuente de obtención; 0.003% de las células mononucleares de médula ósea humana son MSCs según Beyer & Da Silva (2006), existen algunos aspectos que dificultan su uso como: limitada tasa de crecimiento, la capacidad de diferenciación de acuerdo a la edad del donante de la médula y el riesgo en la toma de muestra. (Wexler *et al.*, 2003). Sobre la obtención de células madre mesenquimales a partir de sangre de cordón umbilical, este procedimiento requiere optimizar puntos críticos para lograr un cultivo exitoso, tales como el tiempo de recolección y procesamiento que debe ser inferior a 16 horas, así como el volumen de sangre recolectado igual o superior a 30 ml. (Bieback *et al.*, 2004). Los factores bioactivos de las células troncales de pulpa dental (DPSCs)



desempeñan un papel primordial en las terapias basadas en células, contribuyendo en el microambiente de la regeneración tisular. Además, las células troncales de pulpa dental (DPSCs) tienen funciones inmunoreguladoras mediante interacciones célula-célula, secreción de citocinas y/o ambos mecanismos. (Shi *et al.*, 2005).

Durante los procesos de regeneración tisular se evidencia la participación de distintos factores solubles secretados por las células madre modulando actividades biológicas como la respuesta inmune, la síntesis de matriz extracelular, factores solubles y el comportamiento de las células del huésped. Hay suficiente evidencia para demostrar que la única vía importante por la cual las MSCs participan en la reparación y regeneración de tejidos es a través de su secretoma. Al mismo tiempo, un gran número de investigaciones se ha centrado en la caracterización del secretoma del MSCs incluyendo tanto factores solubles como factores liberados en vesículas extracelulares, por ejemplo, exosomas y microvesículas (Vijay *et al.*, 2016).

Existen diferentes métodos reportados en la evidencia para caracterizar el secretoma sintetizado por las células madre mesenquimales. Sin embargo, no es claro cuál es el mejor método para detectar *in vitro* el mayor número de factores solubles, microvesículas y exosomas derivados de las células madre mesenquimales. Por tal razón se realizó esta revisión narrativa con el fin de describir los medios condicionados de las células madre mesenquimales, de identificar y analizar cuáles son los productos secretados por las células madre de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical, y por último de analizar y documentar los métodos y protocolos que evalúan el secretoma de células troncales mesenquimales de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical.

En una primera fase (Barriga, 2018) se formuló una pregunta orientadora a partir de la cual se establecieron 4 temáticas. Se realizaron 4 búsquedas electrónicas en la base de datos PUBMED- una por cada temática desarrollada en la revisión, para cada una se establecieron diferentes estrategias de búsqueda con sus respectivas palabras clave además se realizaron búsquedas manuales a partir de artículos de revisión, la búsqueda no tuvo restricción de idioma, lugar o fecha de publicación. A partir de ella se seleccionaron estudios experimentales *in-vivo* e *in-vitro*. De acuerdo a cada temática se estructuró una tabla para la extracción de los datos principales de cada artículo seleccionado a partir de las cuales se redactó el artículo

de revision final, siguiendo los parámetros de redacción científica establecidos en las directrices de Asociación Europea de Editores Científicos (EASE,2018).

## 2. Antecedentes

Durante los últimos años se ha realizado un esfuerzo creciente para analizar el secretoma de las células madre mediante diferentes enfoques, que buscan caracterizar factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas secretadas por las células troncales para profundizar en los mecanismos involucrados en procesos inmunomoduladores, antiinflamatorios, neoangiogénicos, de viabilidad celular, diferenciación y reclutamiento celular, así como la regulación del comportamiento celular en general en distintos estadios y condiciones (Salem & Thiermermann, 2010). Las células madre se definen como células indiferenciadas que exhiben auto-renovación y capacidad de diferenciación de múltiples linajes. Las células madre se pueden clasificar en células madre pluripotentes (embrionarias) o pluripotentes inducidas, y células madre adultas (también conocidas como específicas de los tejidos) (Ashri *et al.*, 2015).

Las propiedades únicas de las células madre mesenquimales (MSCs) para auto-renovarse y su multipotencialidad las han convertido en un atractivo para los investigadores y los clínicos. Además del potencial de diferenciación, el amplio repertorio de factores tróficos secretados (citocinas) que exhiben funciones diversas como la inmunomodulación, la actividad antiinflamatoria, la angiogénesis y la antiapoptótica, comúnmente conocida como secretoma del MSCs, ha ganado inmensa atención en los últimos años (Vijay *et al.*, 2016). Las MSCs se estudian intensamente porque exhiben propiedades biológicas únicas *in vivo* que se explotan para el tratamiento de muchas afecciones patológicas, especialmente defectos óseos, enfermedades degenerativas y autoinmunidad (Baglio *et al.*, 2015).

Hay suficiente evidencia para demostrar que la única vía importante por la cual las MSCs participan en la reparación y regeneración de tejidos es a través de su secretoma. Al mismo tiempo, un gran número de investigaciones se ha centrado en la caracterización del secretoma del MSCs incluyendo tanto factores solubles como factores liberados en vesículas extracelulares, por ejemplo, exosomas y microvesículas. (Vijay *et al.*, 2016)

Los exosomas son microvesículas que se originan del compartimento endosomal por fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. Aunque la bibliografía indica que los exosomas son partículas con un diámetro menor de 100 nm y las microvesículas partículas mayores de 100 nm, la International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) señala que la estricta separación por tamaño u origen aún no ha sido exactamente establecida, ni existe

consenso sobre los marcadores que puedan distinguir el origen de estas vesículas (Witwer *et al.*, 2013).

En diversos estudios se ha demostrado que las células madre mesenquimales pueden ser aisladas a partir de fuentes como la sangre del cordón umbilical, sangre periférica, tejido adiposo, folículo capilar, ligamento periodontal y pulpa dental, entre otros (Barry & Murphy, 2004) y pueden ser usadas en varias terapias basadas en células y enfoques de ingeniería de tejidos. Es importante seleccionar el tipo de MSCs que son los candidatos más prometedores para aplicaciones clínicas específicas (Xiaoyan *et al.*, 2017).

Los protocolos más avanzados han demostrado la posible ingeniería tisular periodontal y craneofacial utilizando diferentes combinaciones de células tipo MSCs de orígenes dentales y no dentales juntas en combinación con factores de crecimiento (Ashri *et al.*, 2015).

La gelatina de Wharton del cordón umbilical humano (WJ-MSCs), las células madre mesenquimales de la médula ósea (BM-MSCs) y las células madre pluripotentes similares a la pulpa dental recientemente identificadas (DPPSC) son nuevas fuentes de células madre con uso prospectivo en regeneración celular y terapia. Estas células son auto renovables, se pueden diferenciar en varias líneas, y pueden potenciar las respuestas inmunes (Mennan *et al.*, 2013).

### 3. Objetivos

**Objetivo general:**

Analizar con base en la evidencia científica los métodos para evaluar *in vitro* los factores solubles secretados por células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical.

**Objetivos específicos:**

- Describir los medios condicionados de las células madre mesenquimales.
- Identificar y analizar cuáles son los productos secretados por las células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical.
- Analizar y documentar los métodos y protocolos que analicen el secretoma de células troncales mesenquimales de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical.

## 4. Metodología para el desarrollo de la revisión

**a. Tipo de estudio:** Revisión narrativa

### b. Metodos

#### 1. Pregunta orientadora

Se realizó una búsqueda en la literatura de revistas científicas indexadas en la base de datos PUBMED MEDLINE con el planteamiento previo de la pregunta de investigación la cual fue: ¿Cuáles son los protocolos mas utilizados para analizar los factores solubles del secretoma de las células madres mesenquimales de médula ósea, cordón umbilical y pulpa dental?

#### .2. Estructura de la revisión

- a. Introducción/objetivo
- b. Metodología de búsqueda de información
- c. Generalidades del secretoma de las células madres mesenquimales.
- d. Medios condicionados de las células madres mesenquimales.
- e. Descripción del secretoma de las células madres mesenquimales de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical.
- f. Métodos para analizar factores solubles secretados por células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical.
- g. Conclusiones
- h. Referencias

#### 4.3. Búsqueda de información:

##### a. Selección de palabras claves por temática

Se establecen las variables para cada temática a ser tratada en la revisión a partir de las cuales se establecen las palabras claves para poder elaborar estrategias de búsqueda de cada una de las temáticas propuestas y registrarlas en la tabla 1.

Tabla 1. Selección de palabras claves por temática de revisión		
Temática	Generalidades del secretoma de las células madres mesenquimales.	
Variable	Palabras claves	
Secretoma	Palabra/termino clave	Secretome, Soluble factors, Secretary, vesicles
	Términos [MeSH] ingles	Growth factors, Chemokines, Proteases, Proteins
	Términos [DeSC] inglés	

	Sinónimos o términos no MeSH encontrados en el menú de PUBMED	Microvesicle, Secretary Vesicles, Mesenchymal stem Cell-Derived Microparticles
Células madre mesenquimales	Palabra/termino clave	Mesenchymal Stem Cells
	Términos [MeSH] ingles	Mesenchymal Stromal Cells, Stem cells.
	Términos [DeSC] español/ inglés/ portugués	
	Sinónimos o términos no MeSH encontrados en el menú de PUBMED	Progenitor Cells

a. Estructuración de estrategia de búsqueda por temática

A partir de la tabla 1 se seleccionan las palabras claves más pertinentes para estructurar los algoritmos de las estrategias de búsqueda por tematica que se diligencian en la Tabla 2.

(Ejemplo temática 1)

Tabla 2. Estrategia de búsqueda temática 1	
Temática 1	Generalidades del secretoma de las células madres mesenquimales.
#1	(Secretome) OR (Soluble factors) OR (Secretary) OR (Vesicles) OR (Mesenchymal stem cell secretome) OR (Secretary Vesicles) OR (Microvesicle) OR (Mesenchymal stem Cell-Derived Microparticles)
#2	(Mesenchymal stem cells) OR (Mesenchymal stromal cells) OR (Stem cells) OR (Progenitor cells)
#3	#1 AND #2 ((Secretome) OR (Soluble factors) OR (Secretary) OR (Vesicles) OR (Mesenchymal stem cell secretome) OR (Secretary Vesicles) OR (Microvesicle) OR (Mesenchymal stem Cell-Derived Microparticles)) AND (Mesenchymal stem cells) OR (Mesenchymal stromal cells) OR (Stem cells) OR (Progenitor cells))

b. Resultados de aplicación de estrategia de búsqueda por temática en base de datos (Pubmed)

Se aplica la estrategia de búsqueda en la base de datos PUBMED MEDLINE y se registran los resultados en la tabla 3. (Ejemplo temática 1)

Tabla 3. Estructuración Estrategia de búsqueda por Temática - PUBMEDSort by: Relevance Fecha: SEPT-2018			
Búsqueda	Algoritmos	Cantidad de artículos encontrados	Cantidad seleccionada por Titulo/ abstract
#1	(Secretome) OR (Soluble factors) OR (Secretary) OR (Vesicles) OR (Secretary Vesicles) OR (Microvesicle) OR (Mesenchymal stem Cell-Derived Microparticles)	9013	
#2	(Mesenchymal stem cells) OR (Mesenchymal stromal cells) OR (Stem cells) OR (Progenitor cells)	185588	
#3	#1 AND #2 ((Secretome) OR (Soluble factors) OR (Secretary) OR (Vesicles) OR (Mesenchymal stem cell secretome) OR (Secretary Vesicles) OR (Microvesicle) OR (Mesenchymal stem Cell-Derived Microparticles)) AND (Mesenchymal stem cells) OR (Mesenchymal stromal cells) OR (Stem cells) OR (Progenitor cells)	186149	8

c. Preselección de artículos por temática

Los artículos encontrados y seleccionados por título o abstract se registran en la tabla 4.

Tabla 4. Artículos preseleccionados con estrategia final tematica 1	
ESTRATEGIA FINAL	(Secretome) OR (Soluble factors) OR (Secretory) OR (Vesicles) OR (Mesenchymal stem cell secretome) OR (Secretory Vesicles) OR (Microvesicle) OR (Mesenchymal stem Cell-Derived Microparticles) AND Mesenchymal stem cells) OR (Human apical papilla stem cells) OR (Wharton's jelly mesenchymal stem cells) OR (Bone marrow mesenchymal stem cells) OR (Mesenchymal Stromal Cells) OR (SCAPs) OR (Progenitor Cells)
<p><b>1. Tan X, Gong YZ, Wu P, Liao DF, Zheng XL. Mesenchymal stem cell-derived microparticles: a promising therapeutic strategy. Int J Mol Sci. 2014 Aug 18;15(8):14348-63.</b></p> <p>Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells that give rise to various cell types of the mesodermal germ layer. Because of their unique ability to home in on injured and cancerous tissues, MSCs are of great potential in regenerative medicine. MSCs also contribute to reparative processes in different pathological conditions, including cardiovascular diseases and cancer. However, many studies have shown that only a small proportion of transplanted MSCs can actually survive and be incorporated into host tissues. The effects of MSCs cannot be fully explained by their number. Recent discoveries suggest that microparticles (MPs) derived from MSCs may be important for the physiological functions of their parent. Though the physiological role of MSC-MPs is currently not well understood, inspiring results indicate that, in tissue repair and anti-cancer therapy, MSC-MPs have similar pro-regenerative and protective properties as their cellular counterparts. Thus, MSC-MPs represent a promising approach that may overcome the obstacles and risks associated with the use of native or engineered MSCs.</p> <p><b>2. Teixeira FG, Carvalho MM, Sousa N, Salgado AJ. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? Cell Mol Life Sci. 2013Oct;70(20):3871-82.Epub2013Mar1.</b></p> <p>The low regeneration potential of the central nervous system (CNS) represents a challenge for the development of new therapeutic strategies. Mesenchymal stem cells (MSCs) have been proposed as a possible therapeutic tool for CNS disorders. In addition to their differentiation potential, it is well accepted nowadays that their beneficial actions can also be mediated by their secretome. Indeed, it was already demonstrated, both in vitro and in vivo, that MSCs are able to secrete a broad range of neuroregulatory factors that promote an increase in neurogenesis, inhibition of apoptosis and glial scar formation, immunomodulation, angiogenesis, neuronal and glial cell survival, as well as relevant neuroprotective actions on different pathophysiological contexts. Considering their protective action in lesioned sites, MSCs' secretome might also improve the integration of local progenitor cells in neuroregeneration processes, opening a door for their future use as therapeutical strategies in human clinical trials. Thus, in this review we analyze the current understanding of MSCs secretome as a new paradigm for the treatment of CNS neurodegenerative diseases.</p> <p><b>3. Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, Verweij FJ, Pérez Lanzón M, Zini N, Naaijken B, Perut F, Niessen HW, Baldini N, Pegtel DM. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. Stem Cell Res Ther. 2015 Jul 1; 6:127.</b></p> <p>INTRODUCTION: Administration of mesenchymal stem cells (MSCs) represents a promising treatment option for patients suffering from immunological and degenerative disorders. Accumulating evidence indicates that the healing effects of MSCs are mainly related to unique paracrine properties, opening opportunities for secretome-based therapies. Apart from soluble factors, MSCs release functional small RNAs via extracellular vesicles (EVs) that seem to convey essential features of MSCs. Here we set out to characterize the full small RNAome of MSC-produced exosomes. METHODS: We set up a protocol for isolating exosomes released by early passage adipose- (ASC) and bone marrow-MSCs (BMSC) and characterized them via electron microscopy, protein analysis and small RNA-sequencing. We developed a bioinformatics pipeline to define the exosome-enclosed RNA species and performed the first complete small RNA characterization of BMSCs and ASCs and their corresponding exosomes in biological replicates. RESULTS: Our analysis revealed that primary ASCs and BMSCs have highly similar small RNA expression profiles dominated by miRNAs and snoRNAs (together 64-71 %), of which 150-200 miRNAs are present at physiological levels. In contrast, the miRNA pool in MSC exosomes is only 2-5 % of the total small RNAome and is dominated by a minor subset of miRNAs. Nevertheless, the miRNAs in exosomes do not merely reflect the cellular content and a defined set of miRNAs are overrepresented in exosomes compared to the cell of origin. Moreover, multiple highly expressed miRNAs are precluded from exosomal sorting, consistent with the notion that these miRNAs are involved in functional repression of RNA targets. While ASC and BMSC exosomes are similar in RNA class distribution and composition, we observed striking differences in the sorting of evolutionary conserved tRNA species that seems associated with the differentiation status of MSCs, as defined by Sox2, POU5F1A/B and Nanog expression. CONCLUSIONS: We demonstrate that primary MSCs release small RNAs via exosomes, which are increasingly implicated in intercellular communications. tRNAs species, and in particular tRNA halves, are preferentially released and their specific sorting into exosomes is related to MSC tissue origin and stemness. These findings may help to understand how MSCs impact neighboring or distant cells with possible consequences for their therapeutic usage.</p> <p><b>4. Chen J, Liu Z, Hong MM, Zhang H, Chen C, Xiao M, Wang J, Yao F, Ba M, Liu J, Guo ZK, Zhong J. Proangiogenic compositions of microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. PLoS One. 2014 Dec 16;9(12):e115316. eCollection 2014.</b></p>	



**INTRODUCTION & OBJECTIVE:** Microvesicles (MVs) derived from mesenchymal stem cells (MSCs) have been shown to promote angiogenesis. This study was aimed to shed a light on the mechanisms by analyzing the angiogenesis-promoting compositions of MSC-MVs. Also, we try to figure out the impact of hypoxia on angiogenesis. **METHODS:** MVs were isolated from the culture supernatants of MSCs under hypoxia/normoxia and serum-deprivation condition. The morphological features of MVs were revealed

by an electron microscope and the origin of the MVs was identified by a bead-bound assay. An antibody array was used to analyze the expression of angiogenic cytokines from MVs and the parent MSCs as well. The major candidate factors were screened, and the results were validated by immune blotting. **RESULTS:** MSC-MVs were around 80 nm in diameter. They expressed CD29, CD44, and CD73, but not CD31 and CD45. Antibody array showed that both MSCs and MVs expressed many angiogenesis-promoting biomolecules, including interleukin-6 (IL-6), basic fibroblast growth factors (bFGF), and receptor of urokinase-type plasminogen activator (UPAR). MSC-MVs contained angiogenin, vascular endothelial growth factor (VEGF), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and the receptor-2 for vascular endothelial growth factor at higher levels than the parent MSCs. Under hypoxic condition most cytokines were expressed in greater quantity than normoxic in MSCs while in MVs there was no significant difference between hypoxic and normoxic conditions except UPAR, Angiogenin, VEGF, IGF, Tie-2/TEK, and IL-6 which were higher in MVs under hypoxic conditions than those in normoxic condition. **CONCLUSION:** Upon serum-deprivation condition, MSCs could secrete MVs that contain a variety of factors contributing to their angiogenesis-promoting function. And among them, Angiogenin, VEGF, MCP-1, VEGF R2 might be of greater importance than the other cytokines. Also UPAR, Angiogenin, VEGF, IGF, Tie-2/TEK, IL-6 might be responsible for hypoxia-augmented proangiogenic effects of MVs

**5. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. Int J Mol Sci. 2017 Aug 25;18(9).**

Earlier research primarily attributed the effects of mesenchymal stem cell (MSC) therapies to their capacity for local engrafting and differentiating into multiple tissue types. However, recent studies have revealed that implanted cells do not survive for long, and that the benefits of MSC therapy could be due to the vast array of bioactive factors they produce, which play an important role in the regulation of key biologic processes. Secretome derivatives, such as conditioned media or exosomes, may present considerable advantages over cells for manufacturing, storage, handling, product shelf life and their potential as a ready-to-go biologic product. Nevertheless, regulatory requirements for manufacturing and quality control will be necessary to establish the safety and efficacy profile of these products. Among MSCs, human uterine cervical stem cells (hUCESCs) may be a good candidate for obtaining secretome-derived products. hUCESCs are obtained by Pap cervical smear, which is a less invasive and painful method than those used for obtaining other MSCs (for example, from bone marrow or adipose tissue). Moreover, due to easy isolation and a high proliferative rate, it is possible to obtain large amounts of hUCESCs or secretome-derived products for research and clinical use.

**6. Chiellini C1, Cochet O, Negroni L, Samson M, Poggi M, Ailhaud G, Alessi MC, Dani C, Amri EZ. Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. BMC Mol Biol. 2008 Feb 26;9:26.**

**BACKGROUND:** It is well established that adipose tissue plays a key role in energy storage and release but is also a secretory organ and a source of stem cells. Among different lineages, stem cells are able to differentiate into adipocytes and osteoblasts. As secreted proteins could regulate the balance between both lineages, we aimed at characterizing the secretome of human multipotent adipose-derived stem cell(hMADS) at an early step of commitment to adipocytes and osteoblasts. **RESULTS:** A proteomic approach, using mono-dimensional electrophoresis and tandem mass spectrometry, allowed us to identify a total of 73 proteins at day 0 and day 3 of adipocyte and osteoblast differentiation. Analysis of identified proteins showed that 52 % corresponded to classical secreted proteins characterized by a signal peptide, that 37 % previously described in the extracellular compartment were devoid of signal peptide and that 11 % neither exhibited a signal peptide nor had been previously described extracellularly. These proteins were classified into 8 clusters according to their function. Quantitative analysis has been performed for 8 candidates: PAI-1, PEDF, BIGH3, PTX3, SPARC, ENO1, GRP78 and MMP2. Among them, PAI-1 was detected at day 0 and day 3 of osteoblast differentiation but never in adipocyte secretome. Furthermore, we showed that PAI-1 mRNA was down-regulated in the bone of ovariectomized mice. **CONCLUSION:** Given its regulation during the early events of hMADS cell differentiation and its status in ovariectomized mice, PAI-1 could play a role in the adipocyte/osteoblast balance and thus in bone diseases such as osteoporosis.

**7. Beer L.; Mildner M.; Ankersmit H.J. Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: When regulatory affairs meet basic science. Ann. Transl. Med. 2017, 5, 170.**

“Regenerative medicine” or “tissue regeneration” had become to an inspired term recently since it has been realized in the last decade that many organs such as the skin display morphological plasticity and possess healing capacity instead of being a post-mitotic terminally developed organ.

**8. Vishnubhatla, I.; Corteling, R.; Stevanato, L.; Hicks, C.; Sinden, J. The development of stem cell-derived exosomes as a cell-free regenerative medicine. J. Circ. Biomark. 2014, 3, 2.**

A successful strategy in regenerative medicine over the last decade has been the translation of stem cell therapy to repair diseased or damaged tissue in a wide range of indications, despite limited evidence attributing any therapeutic benefit to cell survival or differentiation. Recent findings, however, have demonstrated that the conditioned media from stem cell cultures can produce similar efficacious effects compared to those observed for cells. This has led to the stem cell paracrine hypothesis, proposing that secreted factors released from the stem cells contribute significantly to their beneficial effects. It has been well documented that stem cells have the ability to release a range of growth factors, cytokines and chemokines relevant to their function; however, these factors are released at levels too low to account for the reported therapeutic effects. Further purification of the conditioned media has since identified that not only are small molecules released by the stem cells, but so too are a large quantity of membrane-bound vesicles, including exosomes, in a functionally relevant manner. In this review, we present our current understanding and explore the evidence supporting the development of stem cell-derived exosomes as a cell-free regenerative medicine.

#### *4. Selección final de artículos por temática (criterios de selección e inclusión de artículos)*

Los artículos seleccionados se obtendrán en texto completo y se les aplicarán los siguientes criterios de selección de los artículos de acuerdo con cada temática para la revisión final.

*Criterios de selección de artículos:*

*Criterios de inclusión*

- Se seleccionarán artículos sin restricción en idioma, periodo de publicación, año y tipo de estudio.
- Se aplicaron las estrategias de búsqueda en la base de datos de PubMed

*Criterios de exclusión*

Se excluyeron todos aquellos artículos que no se ajustaran a las temáticas a desarrollar.

#### *5. Proceso de extracción de información de artículos por temática*

A cada artículo se le extraerán los datos y la información pertinente que serán consignados en la tabla de Excel o Word de extracción de datos para cada temática. Esto con el fin de sustraer de manera organizada la información y facilitar la redacción del artículo final- evitando el plagio. (Tabla 5)

De cada artículo fueron extraídos los siguientes datos:

Autor(es), País, Tipo de estudio, sitio anatómico origen o tipo stemcells (fuentes de células madres), grupos de estudio o intervención, indicador de resultados, instrumentos de medición, resultados descriptivos, diferencias estadísticas, conclusiones; observaciones.

#### *6. Proceso estructuración de artículo*

La Redacción del artículo se hará siguiendo las Normas y el estilo para artículos de revisión de tema, acorde a las instrucciones de los autores de la revista (en anexo 2 se encuentra una guía para la estructura básica de un artículo de revisión narrativa)

#### *7. Proceso de Edición en español para publicación*

Una vez terminado el artículo, se realizará corrección de estilo y traducción al inglés por parte de un editor certificado en español y en inglés para este fin teniendo como base las normas internacionales de Vancouver.

**Tabla 5. Extracción de datos temática 1**

Autor país	Tipo de estudio /n-muestra /criterios selección (inclusión y	Sitio anatómico origen / tipo stemcells	Grupos de estudio o intervención	Indicador de resultados ej índices, / instrumentos de medición ej. Citometría de flujo	Resultados descriptivos/ diferencias estadísticas	Conclusiones del artículo/ observaciones propias o en discusión
Tan et al., 2014. China	Estudio descriptivo	Células madre mesenquimales sin origen específico	Un solo grupo	Tamaño de MSC-MP en $\mu\text{m}$ Contenido de las MSC-MP	0,1 a 1 $\mu\text{m}$ Proteínas (transducción de señales y proteínas efectoras, receptores, citoesqueleto), lípidos e incluso ácidos nucleicos (ARNm, microARN o miARN y ADN)	Dado que los MP imitan las propiedades de MSC, los MSC-MP podrían desarrollarse para mejorar los resultados de los ensayos clínicos actuales que utilizan células adultas.
	NR			Citometría de flujo	NR	El uso de MSC-MP tiene un futuro prometedor en medicina regenerativa, se requieren investigaciones adicionales multidisciplinares para comprender mejor este concepto emergente.
	NR			Células madre mesenquimales de médula ósea	Un solo grupo	Potencial del secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea  Composición del secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea
NR	NR	NR	A lo largo de los años se ha hecho evidente que el secretoma de las MSC podrían tener un papel en las futuras estrategias terapéuticas.			
Baglio <i>et al.</i> , 2015. China	Estudio experimental	Médula ósea	Células madre mesenquimales de médula ósea			Factores solubles producidos por MSC
	BM-MSCs n=4 A-MSCs n=3			Composición de los exosomas	Ácidos nucleicos, especialmente	

Autor país	Tipo de estudio /n-muestra /criterios selección (inclusión y	Sitio anatómico origen / tipo stemcells	Grupos de estudio o intervención	Indicador de resultados ej índices, / instrumentos de medición ej. Citometría de flujo	Resultados descriptivos/ diferencias estadísticas	Conclusiones del artículo/ observaciones propias o en discusión
	NR	Tejido adiposo	Células madre mesenquimales de tejido adiposo	Mezcla maestra de PCR SYBR Green + LightCycler 480	varias especies de ARN con funciones reguladoras  NR	de una manera dependiente del tipo de célula.  El papel del ARN transferido por EV en los procesos fisiológicos in vivo no está claro, en parte porque la cantidad mínima de moléculas de ARN individuales que se requieren para causar cambios fisiológicos en las células diana es difícil de predecir y es probable que involucre muchos factores.
Chen et al., 2014. China	Estudio experimental  NR  NR	Células madre mesenquimales de cordón umbilical humano	MV en condición de hipoxia  MV en condición de normoxia	Diámetro de las MV- MSC en nm  Expresión de las MV- MSC  Recuento celular de MSC viables  Citometría de flujo	80 nm  CD29, CD44 y CD73, IL-6, bFGF, UPAR, angiogenina, VEGF, MCP-1.  Día 0 = $0,97 \pm 0,06 \times 10^7$  El número de células después de 3 días de cultivo en hipoxia con privación de suero fue mayor que en normoxia ( $1,4 \pm 0,08 \times 10^7$ vs. $0,86 \pm 0,06 \times 10^7$ , $p < 0,05$ ).	En condiciones de privación de suero, las MSC podrían segregar MV que contienen una variedad de factores que contribuyen a su función promotora de la angiogénesis. Y entre ellos, la angiogenina, VEGF, MCP-1, VEGF R2 podría ser de mayor importancia que las otras citoquinas. También UPAR, angiogenina, VEGF, IGF, Tie-2 / TEK, IL-6 podrían ser responsables de los efectos proangiogénicos aumentados de hipoxia de MV.  Los resultados mostraron que el cultivo en hipoxia reveló una mayor actividad de proliferación que la normoxia, por lo tanto, se demostró que la hipoxia induce a las MSC a producir más VM que la normoxia.
Vizoso et al., 2017. España	Estudio descriptivo  NR	Células madre mesenquimales sin origen específico	Un solo grupo	Tiempo mínimo de expansión celular in vitro antes de implantación. (semanas) Composición del secretoma Diámetro de exosomas (nm) Densidad de exosomas (g/ml)	10 semanas  Proteínas solubles, ácidos nucleicos libres, lípidos y vesículas extracelulares (cuerpos apoptóticos, micropartículas y exosomas) de 40 a 150 nm 1,09 a 1,18 g / ml	Las MSC han atraído mucho interés por sus beneficios terapéuticos en la modulación inmune y la remodelación de tejidos. Estudios recientes han revelado que las MSC implantadas no sobreviven por mucho tiempo, lo que sugiere que los beneficios de la terapia con MSC podrían atribuirse a sus factores secretados. Los enfoques basados en secretomas que utilizan medios condicionados o exosomas pueden presentar considerables ventajas potenciales sobre las células vivas en términos de fabricación, almacenamiento,

Autor país	Tipo de estudio /n-muestra /criterios selección (inclusión y	Sitio anatómico origen / tipo stemcells	Grupos de estudio o intervención	Indicador de resultados ej índices, / instrumentos de medición ej. Citometría de flujo	Resultados descriptivos/ diferencias estadísticas	Conclusiones del artículo/ observaciones propias o en discusión
	NR			Espectrometría de masas	NR	<p>manejo, vida útil del producto y su potencial como agente terapéutico biológico listo para usar.</p> <p>Teniendo en cuenta que los organismos nacionales han aprobado múltiples ensayos clínicos con MSC, es perfectamente razonable esperar la aprobación de productos derivados de secretomas de MSC. Aunque la composición de los productos derivados de secretomas de MSC es compleja, esto en sí mismo no debería ser un impedimento para la aprobación reguladora de un producto regenerativo.</p>
Chiellini <i>et al</i> , 2008. Francia	<p>Estudio experimental</p> <p>NR</p> <p>Donantes jóvenes de tejido adiposo</p>	Células madre mesenquimales de tejido adiposo (hMADS)	Un solo grupo	<p>Moléculas secretadas en el primer pasaje (Porcentaje)</p> <p>Concentraciones de proteínas en el primer pasaje (<math>\mu\text{g} / \mu\text{l}</math>)</p> <p>Western-blot, espectrometría de masas y ensayo de proteínas Bio-Rad</p>	<p>73 proteínas en el día 0</p> <p>- 52% caracterizadas por un péptido</p> <p>- 37% descritas extracelularmente pero desprovisto de péptido</p> <p>- 11% no habían sido descritas extracelularmente ni presentaba un péptido</p> <p><math>0,12 \pm 0,04</math>, <math>0,15 \pm 0,06</math>; <math>0,12 \pm 0,02 \mu\text{g} / \mu\text{l}</math></p> <p>La significancia estadística se asumió a un nivel de <math>p &lt; 0.05</math>.</p>	<p>El secretoma de células hMADS está representado por proteínas secretadas a través de vías no clásicas y proteínas intracelulares, cuya presencia en el medio extracelular es probable debido a la secreción de exosomas.</p> <p>Hasta la fecha, la función exacta de los exosomas in vivo no se entiende completamente. Un gran número de tipos de células, incluidos los reticulocitos, las células inmunitarias, las plaquetas, las células epiteliales, las células dendríticas y otros parece segregar exosomas ya sea como un mecanismo para extruir algunas proteínas y / o para comunicarse entre células y / o para desempeñar funciones inmunes.</p>

## 5. Consideraciones en propiedad intelectual

Las denominadas redes digitales, fruto de la combinación de la informática y las telecomunicaciones, no sólo son una novedosa herramienta para la transmisión de datos e información, sino que marcaron el inicio de una nueva sociedad, la denominada sociedad de la información, lo que está causando alteraciones en las relaciones económicas, políticas, sociales y culturales, y está incidiendo definitivamente en el desarrollo de las naciones: “estas superautopistas de la información -o más exactamente, redes de inteligencia distribuida- permitirán compartir la información, conectar y comunicar a la comunidad global...la Infraestructura Global de la Información es el prerequisite esencial para el desarrollo sostenido”.

La tecnología digital que permite la transmisión de información a costos más bajos y de manera más veloz, comparados con los medios tradicionales, hace posible la comunicación interactiva entre millones de usuarios conectados a la red. En razón a que gran parte de la información que circula a través de las redes digitales, está constituida por obras protegidas por el derecho de autor, la comunidad internacional ha volcado su atención sobre las adecuaciones que debe emprender el derecho de autor, de manera que sea el sistema apto para responder a los desafíos que las tecnologías de la comunicación y la información le han planteado, con el fin de garantizar la libre circulación de bienes culturales, su divulgación y acceso, y a la vez, asegurar a los autores y demás titulares de derechos una protección adecuada a sus obras y a las inversiones en su producción.

Se hace imperativa una respuesta legislativa, acorde con el marco internacional que al efecto ha establecido el Tratado de la Organización Mundial de la Propiedad intelectual “OMPI” de 1996 sobre Derecho de Autor -TODA- para la adecuada protección de las obras en el entorno digital.

### *Implicaciones para el derecho de autor de nuevas creaciones y de nuevos derechos*

Todos estos avances de la tecnología digital tienen sus implicaciones para el derecho de autor, que aún no se acaban de conocer con certeza, en razón a la dinámica misma de la tecnología. El libro es quizás uno de los sectores más afectados por las nuevas tecnologías y que ha traído mayores repercusiones para el derecho de autor, en razón a que otros sectores ya habían experimentado y solucionado los problemas derivados de su divulgación a través de soportes intangibles, mientras que el libro todavía no lo ha hecho.

Existen los sistemas anti-copia, que justamente impiden copiar una obra; los sistemas de acceso, para garantizar la seguridad y adecuado acceso a la información y a los contenidos protegidos, como la criptografía, la firma digital, el sobre electrónico; los sistemas de marcado y tatuaje, en los que se inscribe cierta información en un código digital, como la marca de agua.

En relación con este tema, la normativa internacional a través de los Tratados Internet ha establecido la obligación para los Estados miembros de proporcionar protección jurídica adecuada y recursos jurídicos efectivos contra la acción de eludir las medidas tecnológicas efectivas que sean utilizadas por los autores en relación con el ejercicio de sus derechos en virtud del presente Tratado o del Convenio de Berna y que, respecto de sus obras, restrinjan actos que no estén autorizados por los autores concernidos o permitidos por la Ley.

En este propósito de garantizar una efectiva protección de las obras en el entorno digital, la gestión colectiva de derechos de autor adecuada a este mundo digital podrá, mediante la aplicación de dispositivos de identificación y rastreo de obras, controlar su uso de las obras a través de las transmisiones digitales.

El derecho de autor, como derecho de propiedad sui generis, tiene una función social que se ha expresado a través de los casos en que se restringe su ejercicio exclusivo, en aras de alcanzar propósitos de orden educativo, cultural y de información.

Los casos de libre utilización pretenden crear un equilibrio entre el derecho de autor y el derecho a la cultura, a la educación, a la información, los cuales deben enmarcarse dentro de parámetros internacionales, conocidos como usos honrados, en razón a que su uso masivo a nivel universal causaría graves perjuicios a la producción y comercialización de bienes intelectuales. Estos casos de libre utilización deben ser expresamente establecidos en la ley y son de interpretación restrictiva.

Esto significa que la libre utilización de obras en el entorno digital con fines de enseñanza y las establecidas para las bibliotecas deberán revisarse para establecer si deben ser ampliadas en el entorno digital o no, para adecuarse a los parámetros internacionales señalados por el TODA en su artículo 10, según los cuales debe tratarse de casos especiales, que no atenten contra la normal explotación de la obra y no causen un perjuicio injustificado a los intereses del autor. En qué casos la digitalización, el almacenamiento o la transmisión digital de fondos bibliográficos, o de material educativo, está permitida y en qué casos no lo está.

Desde las técnicas analógicas ya se anotaba que no se justificaba más como caso de restricción al derecho exclusivo del autor. Evidentemente las técnicas digitales agravan la situación puesto que, como lo afirma André Lucas se aumenta la oferta y mejora la calidad hasta tal punto que es de temer que, gracias a la difusión de las técnicas digitales, al autor no le quede ya nada que explotar, agregamos: si no se controla su explotación a través de los mismos medios tecnológicos que pueden permitir un seguimiento riguroso de la explotación de obras. Mantener la copia privada como libre



reproducción no tiene justificación alguna en el ámbito digital, donde tendría un impacto mucho más negativo para la economía, en razón a que su difusión sería muy superior.

Sujetos del Derecho de Autor en el ámbito Universitario: En consecuencia, con lo anterior, el autor de una obra artística o literaria, dentro del ámbito universitario, será la persona natural que realice el aporte intelectual para su creación, pudiendo ser varias, frente a lo que se presentaría, una coautoría. Debemos tener presente, de acuerdo a la normativa y la doctrina, que autor podría ser, dentro de este contexto universitario, el estudiante, el profesor, el director, el tutor, el monitor, el investigador, u otro interviniente de la comunidad académica, que realiza un verdadero aporte intelectual, que se concreta en una real creación, traspasando el lindero de la simple idea, la cual carece de protección legal, y se tiene como principio: Las ideas no se protegen. El inciso 2º del artículo 6º de la Ley 23 de 1982, dispone que: Las ideas o contenido conceptual de las obras literarias, artísticas y científicas no son objeto de apropiación. Esta ley protege exclusivamente la forma literaria, plástica o sonora, como las ideas del autor son descritas, explicadas, ilustradas o incorporadas en las obras literarias, científicas y artísticas. El artículo 7º de la Decisión Andina 351 de 1993 de la CAN establece que: “No son objeto de protección las ideas contenidas en las obras literarias y artísticas, o el contenido ideológico o técnico de las obras científicas, ni su aprovechamiento industrial o comercial.” Los anteriores artículos ratifican el principio de no protección de las ideas. Por otra parte, la Universidad o IES, podrá tener la calidad de titular de los derechos patrimoniales de autor, respecto de obras creadas o gestadas en su entorno. Sin embargo, ello no quiere decir que la Universidad Privada será, per se, propietaria o titular de los derechos patrimoniales sobre todas las obras creadas internamente; para ello, debe existir un adecuado proceso o trámite jurídico contractual, que efectivice la respectiva transferencia como lo veremos más adelante. Para Universidades Públicas, existe una disposición especial referida a entidades públicas, a las cuales se otorga un tratamiento automático de transferencia, en los siguientes términos establecidos por el artículo 91 de la Ley 23 de 1982: Los derechos de autor sobre las obras creadas por empleados o funcionarios públicos, en cumplimiento de las obligaciones constitucionales y legales de su cargo, serán de propiedad de la entidad pública correspondiente. Se exceptúan de esta disposición las lecciones o conferencias de los profesores. Los derechos morales serán ejercidos por los autores, en cuanto su ejercicio no sea incompatible con los derechos y obligaciones de las entidades públicas afectadas. Así las cosas, podemos evidenciar dos clases de titularidad: 1. Titularidad Originaria, aquella que nace en cabeza del autor de la obra por el simple hecho de creación de la obra; en ese momento surgen en cabeza de esa persona natural el poder de disposición de los derechos patrimoniales. 2. Titularidad Derivada, aquella que ha surgido o devenido de un acuerdo jurídico a una persona natural o jurídica diferente

a su autor - creador originario-. La titularidad derivada puede devenir entonces por diferentes vías: a- Por acto entre vivos a través de un contrato. b- Por causa de muerte a través de la sucesión. c- Por transferencia OPE LEGIS o de pleno derecho, es la que ocurre a favor de las entidades públicas cuando la obra es creada por un servidor público o persona vinculada a la administración pública, en ejercicio de sus funciones legales, contractuales o reglamentarias.

Objeto del derecho de autor: El derecho de autor recae sobre las obras. Por obras podemos entender toda creación intelectual original –no copiada-, de naturaleza artística o literaria susceptible de ser reproducida o divulgada en cualquier forma. Si bien, la Ley 23 de 1982 no nos entrega una definición de obra, si da una ejemplificación de lo que puede constituir una obra, en los siguientes términos marcados por el artículo 2 de la misma norma: Los derechos de autor recaen sobre las obras científicas, literarias y artísticas las cuales se comprenden todas las creaciones del espíritu en el campo científico, literario y artístico, cualquiera que sea el modo o forma de expresión y cualquiera que sea su destinación, tales como: los libros, folletos y otros escritos; las conferencias, alocuciones, sermones y otras obras de la misma naturaleza; las obras dramáticas o dramático musicales; las obras coreográficas y las pantomimas; las composiciones musicales con letra o sin ella; las obras cinematográficas, a las cuales se asimilan las obras expresadas por procedimiento análogo a la cinematografía, inclusive los videogramas; las obras de dibujo, pintura, arquitectura, escultura, grabado, litografía; las obras fotográficas a las cuales se asimilan las expresadas por procedimiento análogo a la fotografía; las obras de arte aplicadas; las ilustraciones, mapas, planos, croquis y obras plásticas relativas a la geografía, a la topografía, a la arquitectura o a las ciencias, y, en fin, toda producción del dominio científico, literario o artístico que pueda reproducirse, o definirse por cualquier forma de impresión o de reproducción, por fonografía, radiotelefonía o cualquier otro medio conocido o por conocer. Consecuente con lo anterior, las creaciones artísticas y literarias en el ámbito universitario son innumerables, pero a manera de ejemplo podemos mencionar algunas como: escritos, artículos, libros, manuales, cuentos, novelas, poemas, canciones, melodías, tesis, investigaciones escritas, software, dibujos, maquetas, bosquejos, cursos, guías, ponencias, cartillas, videos, multimedia, películas, cortometrajes, largometrajes, fotografías, diseños, entre otras, que deben tener un aseguramiento jurídico, para su correcta gestión y negociación. Uno de los principales inconvenientes o problemas que se presentan, en relación con las anteriores obras, y al interior de la Universidades, es el relacionado con la determinación correcta de la autoría y, lo que es más complejo, el establecimiento legal de la titularidad, que permitiría realizar una correcta transferencia, gestión y negociación, como lo indicaremos.

## 6. Resultados

### *Artículo original con su bibliografía version 2*

#### **Descripción de los protocolos para el análisis del secretoma de células madre mesenquimales humanas de médula ósea (BM-MSCS), pulpa dental (DPSCS) y cordón umbilical (UC-MSCS)**

##### **Resumen:**

Las células madre mesenquimales son células multipotentes que se estudian activamente ya que su secretoma posee propiedades que se explotan para ser usado en el tratamiento de distintas afecciones patológicas, como lo son las enfermedades degenerativas y defectos óseos, por lo tanto, es importante estudiar la caracterización de este. El objetivo de esta revisión es describir los protocolos para la evaluación del secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental y cordón umbilical. Par tal fin se realizó una búsqueda electrónica de la literatura hasta la fecha en las bases de datos PUBMED/MEDLINE, teniendo en cuenta palabras claves y estrategias de búsqueda para cada temática. Adicional a la búsqueda electrónica se realizaron búsquedas manuales. Se seleccionaron todos los artículos en texto completo publicados sin restricción de idioma, lugar, fecha y período de publicación. Se incluyeron estudios in vitro. A partir de esta revisión se pudo concluir que los resultados evidenciados en el procedimiento de la preparación del medio condicionado tienen una gran influencia sobre la calidad del secretoma. Se describió un protocolo para la evaluación del secretoma de las células madre mesenquimales de cordón umbilical, médula ósea y pulpa dental, en donde se evidencia que cada tipo de MSCs requiere una preparación diferente. Existen diferentes métodos reportados en la literatura científica para caracterizar el secretoma sintetizado por las MSC, sin embargo, no se conoce cuál es el mejor método para detectar *in vitro* el mayor número de factores solubles, microvesículas y exosomas derivados de las MSC.

**Palabras clave:** Células madre mesenquimales, secretoma, protocolo, células madre mesenquimales de médula ósea, células madre mesenquimales de pulpa dental, células madre mesenquimales de cordón umbilical.

**Introducción:** Durante los últimos años se ha realizado un esfuerzo creciente para analizar el secretoma de las células madre mesenquimales mediante diferentes enfoques, que buscan caracterizar factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas secretadas por las células madre para profundizar en los mecanismos involucrados en procesos inmunomoduladores, antiinflamatorios, neoangiogénicos, de viabilidad celular, diferenciación y reclutamiento celular, así como la regulación del comportamiento celular en general en distintos estadios y condiciones (Salem & Thiermermann, 2010).

Las células madre mesenquimales (MSC) también contribuyen a los procesos de reparación en diferentes afecciones patológicas, incluidas las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que solo una pequeña proporción de células madre mesenquimales (MSC) trasplantadas pueden sobrevivir e incorporarse en los tejidos del huésped. (Tan *et al.*, 2014). Las células madre mesenquimales son células multipotentes que se estudian activamente ya que su secretoma posee propiedades que se explotan para ser usado en el tratamiento de distintas afecciones patológicas, como lo son las enfermedades degenerativas y defectos óseos, por lo tanto, es importante estudiar la caracterización de este. Las células madre tienen la capacidad de auto-renovarse y dar lugar a células de varios linajes. Por lo tanto, representan un importante paradigma de la terapia basada en células para una variedad de enfermedades. En términos generales, hay dos tipos principales de células madre, embrionarias y no embrionarias. (Wang S *et al.*, 2012).

Las células madre mesenquimales de la médula ósea (BM-MSCs), las células madre pluripotentes similares a la pulpa dental recientemente identificadas (DPPSC) y la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano (WJ-MSCs) son nuevas fuentes de células madre con uso prospectivo en regeneración celular y terapia. Estas células son auto renovables, se pueden diferenciar en varias líneas, y pueden potenciar las respuestas inmunes (Mennan *et al.*, 2013). En diversos estudios se ha demostrado que las células madre mesenquimales pueden ser aisladas a partir de fuentes como la sangre del cordón umbilical, sangre periférica, tejido adiposo, folículo capilar, ligamento periodontal y pulpa dental, entre otros (Barry & Murphy, 2004) y pueden ser usadas en varias terapias basadas en células y enfoques de ingeniería de tejidos. Durante los procesos de regeneración tisular se evidencia la participación de distintos factores solubles secretados por las células madre modulando

actividades biológicas como la respuesta inmune, la síntesis de matriz extracelular, factores solubles y el comportamiento de las células del huésped. (Vijay *et al.*, 2016).

La mayor parte de lo que se conoce, y de hecho el "dogma" con respecto a las MSC adultas, proviene de la médula ósea. En muchos aspectos, la pulpa dental puede considerarse similar a la médula ósea. Ambos son tejidos "blandos" altamente vascularizados e inervados que están rodeados de minerales. Tanto en la médula ósea como en la pulpa dental, las MSC son capaces de diferenciarse en células que generan el mineral. En la médula ósea, esta función es realizada por los osteoblastos, mientras que en los dientes es realizada por los odontoblastos, que se derivan de las células madre de la pulpa dental (DPSC). Sin embargo, es importante destacar que las DPSC tienen una diferenciación más restringida que las células de la médula ósea *in vivo*. Por lo tanto, la pulpa dental puede proporcionar un sistema modelo simple para estudiar las células madre mesenquimales que es fácilmente accesible y tiene una estructura definida. (Sharpe PT *et al.*, 2016).

En cuanto a las células madre de cordón umbilical se ha demostrado que la sangre del cordón umbilical (UCB) se considera más adecuada porque está libre de complicaciones éticas y es fácil de aislar mediante métodos no invasivos. UCB produce grandes rendimientos de MSC y posee actividades inmunosupresoras, por lo que es útil en entornos alogénicos (Oh W *et al.*, 2008., Reinisch A *et al.*, 2007 ). Así, su aplicación se ha intentado en un amplio espectro de enfermedades. Recientemente hemos demostrado la eficacia terapéutica de las UCB-MSc en varios modelos de enfermedad (Kim D.S *et al.*, 2009 ., Kim J.Y *et al.*, 2010 ., Kim S.M *et al.*, 2011., Chang Y.S *et al.*, 2011., Kim J.Y. *et al.*, 2012)

Las investigaciones realizadas en la última década sugieren que los beneficios terapéuticos mediados por las células madre mesenquimales (MSCs) se deben principalmente a su secretoma; por estas razones se ha propuesto como una posible herramienta terapéutica para el tratamiento de varias enfermedades (Texeira *et al.*, 2017).

Es crítico tener en cuenta que la expresión del secretoma *in vitro* probablemente sea muy diferente de lo que se esperaría *in vivo*, donde las células dentro de diferentes microambientes exhibirían perfiles de expresión de secretoma únicos. Por el contrario, como los microambientes son altamente dinámicos, a su vez impactarían la cinética de la expresión del secretoma. (Sudhir *et al.*, 2012).

**Método:** Para la búsqueda de información se elaboró una tabla de contenido con las cuatro temáticas que se incluyeron en la revisión; a cada una de las temáticas se le establecieron variables, palabras claves y términos MeSH a partir de los cuales se estructuraron los algoritmos finales de búsqueda y se definieron de la siguiente manera: para la temática 1 ((Secretome) OR (Soluble factors) OR (Secretory) OR (Vesicles) OR (Mesenchymal stem cell secretome) OR (Secretory Vesicles) OR (Microvesicle) OR (Mesenchymal stem Cell- Derived Microparticles)) AND (Mesenchymal stem cells) OR (Mesenchymal stromal cells) OR (Stem cells) OR (Progenitor cells); temática 2 ((Conditioned media) OR (conditioned medium) OR (Growth factors) OR (Paracrine activities) AND (Mesenchymal stem cells) OR (Mesenchymal stromal cells) OR (Stem cells) OR (Progenitor cells)); temática 3 ((Secretome) OR (Soluble factors) OR (Secretory) OR (Vesicles) OR (Mesenchymal stem cell secretome) OR (Secretory Vesicles) OR (Microvesicle) OR (Mesenchymal stem Cell-Derived Microparticles) AND (Mesenchymal stem cells) OR (Human bone marrow mesenchymal stem cells) or (Human apical papilla stem cells) OR (SCAPs) OR (Wharton's jelly mesenchymal stem cells) OR (Mesenchymal Stromal Cells) OR (Progenitor Cells)); temática 4 ((Methods) OR (Protocol) OR (Protocol analysis) AND (Soluble factors) OR (proteins) OR (exosomes) OR (microvesicles) OR (secretory vesicles) OR (Growth factors) OR (chemokines) AND (Mesenchymal stem cells) OR (Human bone marrow mesenchymal stem cells) or (Human apical papilla stem cells) OR (SCAPs) OR (Wharton's jelly mesenchymal stem cells) OR (Mesenchymal Stromal Cells) OR (Progenitor Cells)). Se aplicó cada estrategia de búsqueda en la base de datos PubMed, se preseleccionaron los artículos por título o abstract, los cuales fueron obtenidos en texto completo para realizar la selección final de artículos por temática finalmente se seleccionaron 25 artículos, de cada artículo fueron extraídos los siguientes datos: Autor(es), país, tipo de estudio, sitio anatómico origen o tipo stemcells (fuente de células madres), grupo(s) de estudio o intervención, indicador de resultados, instrumentos de medición, resultados descriptivos, diferencias estadísticas, conclusiones.

### ***Generalidades del secretoma de las células madres mesenquimales.***

Las células madre mesenquimales (MSCs) se estudian intensamente porque exhiben propiedades biológicas únicas *in vivo* que se explotan para el tratamiento de traumas, así

como de muchas afecciones patológicas, especialmente defectos óseos en particular defectos de tamaño crítico, enfermedades degenerativas y autoinmunidad (Baglio *et al.*, 2015).

Las MSC derivadas de tejidos de adultos son las más comúnmente utilizadas, pero la capacidad de proliferación de las MSC para adultos es muy limitada, lo que dificulta la ampliación de estas para aplicaciones terapéuticas. Por lo tanto, se requiere una fuente alternativa para promover la regeneración de órganos y tejidos a partir de las células estromales mesenquimales para la aplicación clínica. Las células estromales mesenquimales de tejidos embrionarios extra son una opción ideal para las células madre mesenquimales, ya que pueden superar la limitación proliferativa que presentan las MSC adultas. (Sabapathy *et al.*, 2014). En términos generales, hay dos tipos principales de células madre, embrionarias y no embrionarias. Las células madre embrionarias (ESC) se derivan de la masa celular interna del blastocisto y pueden diferenciarse en células de las tres capas germinales. Sin embargo, la formación de teratomas y la controversia ética dificultan su investigación y aplicación clínica. Por otro lado, las células madre no embrionarias, en su mayoría células madre adultas, ya están algo especializadas y tienen un potencial de diferenciación limitado. Se pueden aislar de varios tejidos y actualmente son las células de semilla más utilizadas en medicina regenerativa. Recientemente, otro tipo de células madre no embrionarias, conocido como célula madre pluripotente inducida (iPSC) ha surgido como un gran avance en biología regenerativa. (Wang S *et al.*, 2012).

Las MSC son precursores multipotentes que tienen la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células en condiciones de inducción. Las MSC son atractivas para aplicaciones terapéuticas porque pueden secretar moléculas bioactivas con propiedades inmunomoduladoras. Estas células se pueden aislar a partir de varias fuentes, como tejido adiposo, dermis, sangre periférica y médula ósea (Fraser *et al.* 2006 ; Cao y Dong 2005 ; Pittenger *et al.* 1999). Incluso cuando las MSC mostraron resultados prometedores *in vitro* En los estudios y en ensayos preclínicos y clínicos, no se conoce bien el mecanismo responsable de los resultados obtenidos en diferentes patologías o enfermedades. (Amable *et al.*, 2014).

El uso de terapias sin células, como aquellas basadas en el secretoma de origen en MSCs en medicina regenerativa, proporciona ventajas clave sobre las aplicaciones basadas en células

madre: la aplicación del secretoma resuelve varias consideraciones de bioseguridad potencialmente asociadas con el trasplante de poblaciones heterogéneas de células viables que podrían proliferar en distintos sitios del individuo receptor. De acuerdo a las buenas prácticas clínicas, el secretoma originado por MSCs puede evaluarse por su seguridad, dosis y potencia de una manera análoga a los agentes farmacéuticos convencionales; el almacenamiento se puede realizar sin la aplicación de agentes crioconservantes potencialmente tóxicos durante un largo período sin perder la potencia del producto, entre otras. (Vizoso *et al.*, 2017).

El secretoma se define como el conjunto de factores liberados activa o pasivamente de las células y contiene, proteínas solubles (por ejemplo, citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento), lípidos, ácidos nucleicos libres y vesículas extracelulares (EV), entre otros. Estos últimos pueden subdividirse aún más en función de su tamaño, densidad, marcadores de superficie y origen en cuerpos apoptóticos, micropartículas y exosomas. Especialmente los exosomas se han centrado recientemente en la investigación basada en su alta capacidad para interactuar con las células diana y su capacidad para modificar selectivamente la señalización celular.(Beer *et al.*, 2017).

El secretoma de las células troncales es una fuente rica de proteínas como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que ha atraído la atención en los últimos años debido a sus múltiples implicaciones en medicina regenerativa (Arai *et al.*, 2004). Los resultados iniciales hacia la aplicación del secretoma de células troncales para el tratamiento de distintas enfermedades son prometedores (Van *et al.*, 2012).

Los componentes solubles del secretoma se pueden separar de la fracción de microvesículas mediante centrifugación, filtración, metodologías basadas en precipitación de polímeros, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño (Vishnubhatla *et al.*, 2014).

Además, el concepto que los factores de crecimiento y las citoquinas son una parte importante del secretoma celular, ahora parece que la mayoría, si no todas las células, secretan grandes cantidades de micro y nano-vesículas, ya sea de forma constitutiva o mediante señales de activación. La composición bioquímica, la compleja biogénesis de estas



vesículas y, en particular, su papel fisiológico, solo se han desentrañado parcialmente. (Baglio *et al.*, 2013). La elucidación de las vías moleculares que median la expresión del secretoma de MSC es un paso crucial para mejorar nuestra comprensión del perfil de factores secretados y su utilidad clínica. Aunque se requieren investigaciones adicionales para delinear completamente los mecanismos de señalización involucrados en la expresión del secretoma de MSC, una amplia gama de vías de señalización han sido implicadas en la reparación cardíaca mediada por paracrina por parte de las MSC. (Gnecchi *et al.*, 2008).

Los protocolos más avanzados han demostrado la posible ingeniería tisular periodontal y craneofacial utilizando diferentes combinaciones de células tipo MSCs de orígenes dentales y no dentales juntas en combinación con factores de crecimiento (Ashri *et al.*, 2015).

### ***Medios condicionados de las células madre mesenquimales.***

De acuerdo a la selección realizada se eligieron 4 artículos que arrojaron diferentes tipos de medios condicionados para las células madre mesenquimales entre ellos se encuentran: Medio condicionado NORMÓXICO + Suero, Medio condicionado HIPÓXICO + Suero, Medio condicionado NORMÓXICO sin suero, Medio condicionado HIPÓXICO sin suero (Chen *et al.*, 2014), DMEM (Medio condicionado Eagle modificado por Dulbecco), DMEM sin suero (Shen *et al.*, 2015), DMEM sin suero complementado con medio adipogénico, DMEM sin suero + PBS washing (estrategia de lavado con buffer fosfato salino) (Clabaut *et al.*, 2015), medio adipogénico (Yang *et al.*, 2014).

### ***Descripción del secretoma de las células madres mesenquimales de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical.***

El secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental y cordón umbilical contiene microvesículas que liberan micropartículas como proteínas (transducción de señales y proteínas efectoras, receptores, citoesqueleto), lípidos, ácidos nucleicos (ARNm, microARN o miARN y ADN), citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Baglio *et al.*, 2015; Vizoso *et al.*, 2017). Además de su potencial de diferenciación, estas células también pueden secretar un panel de factores de crecimiento y citoquinas con efectos directos en una variedad de mecanismos, como la supresión del sistema inmunitario, la inhibición de la

apoptosis, el aumento de angiogénesis y la estimulación de células adyacentes a los tejidos. (Shen *et al.*, 2015)

Hay suficiente evidencia para demostrar que la única vía importante por la cual las MSCs participan en la reparación y regeneración de tejidos es a través de su secretoma. Al mismo tiempo, un gran número de investigaciones se ha centrado en la caracterización del secretoma del MSCs incluyendo tanto factores solubles como factores liberados en vesículas extracelulares, por ejemplo, exosomas y microvesículas (Vijay *et al.*, 2016).

El término exosoma generalmente se refiere a una clase específica de vesícula extracelular unida a membrana lipídica caracterizada por un diámetro de 40 a 150 nm y una densidad de 1,09 a 1,18 g / ml. La evidencia creciente indica que las MSCs producen cantidades masivas de exosomas en comparación con otras células, y está demostrando que muchas de las propiedades regenerativas acreditadas previamente a las células madre están mediadas a través de exosomas secretados (Vizoso *et al.*, 2017). En particular, los exosomas han recibido mucha atención en investigación, ya que son una subclase de (nano) vesículas que se derivan de compartimentos intracelulares especializados conocidos como endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares (MVB). Existen muchos otros tipos de vesículas que presumiblemente se derivan de la membrana plasmática y se ha alcanzado un consenso para nombrar colectivamente estas vesículas de membrana extracelular (Baglio *et al.*, 2013).

Las Microvesículas liberados a partir de un tipo de célula dada pueden interactuar a través de ligandos de receptores específicos con otras células que transfieren proteínas, lípidos reactivos biológicos y receptores. (Schorey JS *et al.* 2008.; Morel O *et al.*, 2004 ). Recientemente se ha demostrado que los MV también pueden transferir ARNm y microARN (miARN) que pueden explicar los cambios epigenéticos en las células diana. (Ratajczak J *et al.* 2006., Deregibus MC *et al.*, 2007., Valadi H *et al.*; 2007 ). Las microvesículas (MV) se forman por brotes directos de la membrana plasmática y son más grandes que los exosomas (100 a 1000 nm). Las microvesículas muestran una gran cantidad de fosfatidilserina, colesterol, proteínas asociadas con balsas lipídicas, y están enriquecidas en colesterol, esfingomielina y ceramida. La formación de microvesículas depende tanto de la activación del citoesqueleto como de la concentración intracelular de calcio (Monsel *et al.*, 2016). Tanto los exosomas como las microvesículas son liberados constitutivamente por múltiples tipos de células, ya

sea por estímulos fisiológicos o en respuesta a una lesión y contienen múltiples componentes celulares que pueden conducir la comunicación de célula a célula a través de la transferencia de moléculas bioactivas que incluyen proteínas asociadas a endosomas, proteínas de membrana, lípidos y material genético (por ejemplo, ARNm y microARN) (Monsel *et al.*, 2016).

Se han identificado varios factores candidatos, que median los efectos terapéuticos del secretoma de las MSCs en la regeneración tisular, incluido el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), derivado de plaquetas factor de crecimiento (PDGF-BB), proteína 4 similar a la angiopoyetina y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Kalinina *et al.*, 2015). El grupo funcional más grande del secretoma de MSCs está compuesto por proteínas, entre ellas se encuentran: fibrilina 2, glypican 1, transcetolasa, reticulocalbina 2, peroxiredoxina 3, activista proteasoma subunidad 2 (PA28 beta), ADAMTS, Inhibidor de alfa (globulina) H2, Repeticiones como EGF y dominios tipo Discoidin I 3, ribonucleasa, familia RNasa A, 4 adrenomedullin, tirosina-proteína fosfatasa tipo no receptor sustrato 1 (SIPRA) (Kalinina *et al.*, 2015).

### ***Métodos para analizar factores solubles secretados por células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical.***

El proceso para analizar el secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea inició con la recolección de la muestra, posteriormente aislandolas (por aspiración) sobre solución de Ficoll-Hypaque. Las células mononucleares se aislaron por centrifugación, posteriormente las células que fueron separadas se lavaron, se sembraron a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en un medio esencial mínimo (a-MEM) suplementado con suero bovino fetal al 10%. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub> con un cambio de medio de cultivo dos veces por semana. Después del cultivo, se encontró que la frecuencia de aislamiento era del 100%, la expansión de las células se analizó mediante el método de exclusión con azul tripán. En cada pasaje, se cultivaron células madre mesenquimales durante 7 días; las células se disociaron con tripsina-EDTA, se contaron y se volvieron a sembrar con la densidad celular inicial (2000 células/cm<sup>2</sup>). El medio de cultivo se reemplazó dos veces por semana.

El número de PDT (tiempo de duplicación de la población) se calculó en función del número total de células en cada pasaje; La PDT se calculó para cada pasaje dividiendo el logaritmo del valor de aumento de doblaje obtenido al final del pasaje por el logaritmo de 2. Este procedimiento se repitió hasta que la célula dejó de proliferar. En este punto, se contó el número de células para calcular la PDT final. El tiempo de duplicación de la población (PDT) se examinó mediante la fórmula:  $(t - t_0) \cdot \log_2 / \log (N - N_0)$ , donde  $t - t_0$  es el tiempo de cultivo (h), N es el número de células recolectadas y  $N_0$  es el número de celdas en la inicial. Seguido a esto, se realizó un ensayo para identificar formación de colonias por unidad de fibroblastos (CFU-F) mediante la siembra de células en una placa de cultivo e incubando en humidificado 5% de CO<sub>2</sub> a 37 ° C, el medio de cultivo se intercambiaba cada 3 días. Posterior a dos semanas, las placas se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) Se fijaron con metanol al 100% y se tiñeron con cristal violeta al 3%. Por último, se realizó un conteo del número de colonias (Hye *et al.*, 2013).

Por otro lado, se halló un protocolo para analizar el secretoma de las células madre mesenquimales de pulpa dental el cual parte de la recolección de la muestra (dientes con o sin raíces maduras) (Huang *et al.*, 2010).. Los dientes recién extraídos se almacenaron en un medio de cultivo celular sin suero y se transportaron al laboratorio para su procesamiento, El tejido pulpar y la papila apical se extrajeron de los dientes, se seccionaron y se digirieron en una solución de 3 mg/ml de colagenasa tipo I y 4 mg/ml dispasa durante 30–60 minutos a 37°C. Las mezclas digeridas se pasaron a través de un filtro de células de 70 mm para obtener suspensiones de una sola célula. Las células se sembraron en placas de seis pozos y se cultivaron con un medio esencial suplementado con 15-20% de suero bovino fetal, 2 mM L -glutamina, 100 mM de ácido L-ascórbico-2-fosfato, 100 U/ml de penicilina-G, 100 mg/ml de estreptomina y 0,25 mg/ml de fungizona y se mantuvieron en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las unidades de formación de colonias de células fibroblásticas se observaron normalmente dentro de 1 a 2 semanas después de la siembra celular y se pasaron a una proporción de 1: 3 cuando alcanzaron una confluencia del 80%. Las poblaciones heterogéneas de DPSCs y SCAP se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido hasta el segundo pasaje. Las células se descongelaron y se expandieron para experimentación en el pasaje 3. Se resuspendieron alícuotas celulares de SCAP y DPSCs en solución salina tamponada con fosfato (PBS) FBS al

0,1%, que contenía concentraciones de saturación (dilución 1: 100) de los siguientes anticuerpos IgG1 de ratón conjugados, k anticuerpos anti-monoclonales humanos: CD14-PE, CD34-PE, CD45-FITC, CD73-PE, CD90-FITC y CD105-PE durante 1 hora a 48°C. Las suspensiones celulares se lavaron dos veces y se resuspendieron en FBS al 0,1% = PBS para su análisis en un citómetro de flujo utilizando el software CellQuest Pro (BD Biosciences) (Huang *et al.*, 2010).

Para el análisis del secretoma de células madre mesenquimales de cordón umbilical se obtuvieron las muestras y las células mononucleares se aislaron con un gradiente Ficoll Hystopaque, seguido a esto se sembraron a una densidad de 250,000 células / cm<sup>2</sup>. Después de 4 días, se eliminaron las células no adherentes y se añadió medio fresco a los cultivos. Posteriormente se expandieron en medio esencial alfa-mínimo ( $\alpha$ -MEM) que contenía 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina y 10% de suero bovino fetal (FBS) o lisado de plaquetas al 5% (PL) y 10 U/ml de heparina en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub> a 37 ° C. La expresión de marcadores de superficie de MSC típicos se analizó mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), y se evaluó la capacidad de las MSC para experimentar diferenciación osteogénica mediante tinción con rojo de alizarina tras la inducción con ácido ascórbico, dexametasona y glicerofosfato  $\beta$ . Los exosomas se recolectaron de aproximadamente  $3,2 \times 10^7$  células en pasajes tempranos (pasajes 2-3). Una vez que los cultivos de MSC alcanzaron una confluencia del 70%, las células se cultivaron durante 24 a 48 horas en  $\alpha$ -MEM que contenía FBS o PL con exosoma agotado. El FBS y el PL agotados en el exosoma se obtuvieron por centrifugación durante la noche a 70.000  $\times g$  a 4 ° C. Los exosomas se aislaron como se describió anteriormente. Brevemente, el medio condicionado con MSC se centrifugó dos veces a 500  $\times g$  durante 10 minutos, dos veces a 2000  $\times g$  durante 15 minutos y dos veces a 10.000  $\times g$  durante 30 minutos. El sobrenadante se transfirió luego a tubos Ultra-Clear y se centrifugó a 70,000  $\times g$  durante 1 hora a 4 ° C en un rotor SW32Ti. El sedimento que contenía el exosoma se lavó con PBS y se centrifugó a 70.000  $\times g$  durante 1 hora. Luego, el sedimento se resuspendió cuidadosamente en 200  $\mu$ l de PBS y se usó inmediatamente o se almacenó a -80 ° C. Para el análisis de microscopía de barrido láser confocal, las células se sembraron en portaobjetos recubiertos de resina, fijados con paraformaldehído al 4%, permeabilizados con Triton-X 100

al 0,1% y bloqueados con FBS al 10% con PBS (30 minutos). Los portaobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios contra CD63 o EEA1 y luego con anticuerpo de conejo anti-ratón isotiocianato de fluoresceína (FITC) (DAKO, Heverlee, Bélgica) para 30 minutos a temperatura ambiente. LysoTracker red (Molecular Probes, Bleiswijk, Países Bajos) se incubó con células vivas antes de la fijación. Todas las tinciones se obtuvieron con un microscopio Leica DMRB. Las imágenes se obtuvieron mediante exploración secuencial con el conjunto de orificios a 1AE (estándar). Los fluoróforos se excitaron utilizando líneas láser de 488 nm (FITC) y 561 nm (Blaglio *et al.*, 2015).

**Conclusiones:** Los resultados evidencian que el procedimiento de la preparación del medio condicionado tiene una gran influencia sobre la calidad del secretoma (diferenciación y proliferación de células). Se describió un protocolo para la evaluación del secretoma de las células madre mesenquimales de cordón umbilical, médula ósea y pulpa dental, en donde se evidencia que cada tipo de MSCs requiere una preparación diferente. Existen diferentes métodos reportados en la literatura científica para caracterizar el secretoma sintetizado por las células madre mesenquimales, sin embargo, de acuerdo con nuestro conocimiento no se conoce cuál es el mejor método para detectar *in vitro* el mayor número de factores solubles, microvesículas y exosomas derivados de las células madre mesenquimales. Aunque la información obtenida hasta la fecha no brinda un conocimiento completo, se espera que con el desarrollo de próximas investigaciones se aclaren diversos aspectos biológicos para implementar su uso en medicina regenerativa.

## Referencias Bibliograficas

1. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. PLoS One. 2014 Aug 12;9(8):e104662.
2. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell 2004;118(2):149-161.

3. Ashri NY, Ajlan SA, Aldahmash AM. Dental pulp stem cells. Biology and use for periodontal tissue engineering. *Saudi Med J*. 2015 Dec;36(12):1391-9.
4. Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, Verweij FJ, Pérez Lanzón M, Zini N et al., Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Jul 1; 6:127.
5. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr; 36(4):568-84.
6. Beer L.; Mildner M.; Ankersmit H.J. Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: When regulatory affairs meet basic science. *Ann. Transl. Med*. 2017, 5, 170.
7. Cao C , Dong Y , Dong Y .Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells.*Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2005 Aug;19(8):642-7.
8. Chang Y.S.; Choi, S.J.; Sung, D.K.; Kim, S.Y.; Oh, W.; Yang, Y.S.; Park, W.S. Intratracheal transplantation of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells dose-dependently attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Cell Transpl* 2011, 20, 1843–1854.
9. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R, Xie J, Liu X, Qi S. Conditioned medium from hypoxic bone marrow- derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One*. 2014 Apr 29;9(4): e96161. ECollection
10. Clabaut A, Grare C, Léger T, Hardouin P, Broux O. Variations of secretome profiles according to conditioned medium preparation: The example of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Electrophoresis*. 2015 Oct; 36(20):2587-93. Epub 2015 Aug 21.
11. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2440-8.
12. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006 Apr;24(4):150-4.
13. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008 Nov 21;103(11):1204-19.
14. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010 Feb; 16(2):605-15.

15. Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, Butenko I, Pobeguts O, Efimenko A, Ageeva L, Sharonov G, Ischenko D, Alekseev D, Grigorieva O, Sysoeva V, Rubina K, Lazarev V, Govorun V. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Nov 11; 6: 221.
16. Kim J.Y.; Kim, D.H.; Kim, J.H.; Lee, D.; Jeon, H.B.; Kwon, S.J.; Kim, S.M.; Yoo, Y.J.; Lee, E.H.; Choi, S.J.; et al. Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid-beta plaques. *Cell Death Differ* 2012, 19, 680–691.
17. Kim D.S.; Kim, J.H.; Lee, J.K.; Choi, S.J.; Kim, J.S.; Jeun, S.S.; Oh, W.; Yang, Y.S.; Chang, J.W. Overexpression of CXC chemokine receptors is required for the superior glioma-tracking property of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2009, 18, 511–519.
18. Kim J.Y.; Kim, D.H.; Kim, D.S.; Kim, J.H.; Jeong, S.Y.; Jeon, H.B.; Lee, E.H.; Yang, Y.S.; Oh, W.; Chang, J.W. Galectin-3 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid- $\beta$ 42 neurotoxicity in vitro. *FEBS Lett* 2010, 584, 3601–3608.
19. Kim S.M.; Kim, D.S.; Jeong, C.H.; Kim, D.H.; Kim, J.H.; Jeon, H.B.; Kwon, S.J.; Jeun, S.S.; Yang, Y.S.; Oh, W.; et al. CXC chemokine receptor 1 enhances the ability of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells to migrate toward gliomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2011, 407, 741–746.
20. MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
21. Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A, Balain B, Richardson J, Roberts S. Isolation and Characterisation of Mesenchymal Stem Cells from Different Regions of the Human Umbilical Cord. *Biomed Res Int.* 2013;916136. Epub 2013 Jul 25.
22. Monsel A, Zhu YG, Gudapati V, Lim H, Lee JW. Mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for acute lung injury and other inflammatory lung diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2016 Jul; 16(7):859-71. Epub 2016 Apr 12.
23. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol.* 2004 May;11(3):156-64.
24. Oh, W.; Kim, D.S.; Yang, Y.S.; Lee, J.K. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cell. Immunol* 2008, 251, 116–123.
25. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7
26. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors:



- evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006 May;20(5):847-56.
27. Reinisch, A.; Bartmann, C.; Rohde, E.; Schallmoser, K.; Bjelic-Radisic, V.; Lanzer, G.; Linkesch, W.; Strunk, D. Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Regen. Med* 2007, 2, 371–382.
  28. Sabapathy V, Sundaram B, V M S, Mankuzhy P, Kumar S. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth. *PLoS One*. 2014 Apr 15;9(4):e93726.
  29. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010 Mar 31; 28(3):585-96.
  30. Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*. 2008 Jun;9(6):871-81.
  31. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development*. 2016 Jul 1;143(13):2273-80.
  32. Shen C, Lie P, Miao T, Yu M, Lu Q, Feng T, Li J, Zu T, Liu X, Li H. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Mol Med Rep*. 2015 Jul; 12(1):20-30. Epub 2015 Mar 4.
  33. Tan X, Gong YZ, Wu P, Liao DF, Zheng XL. Mesenchymal stem cell-derived microparticles: a promising therapeutic strategy. *Int J Mol Sci*. 2014 Aug
  34. Teixeira F, Carvalho M, Panchalingam K, Rodrigues A, Mendes-Pinheiro B, Anjo S, Manadas B, Behie L, Sousa N, Salgado A. Impact of the Secretome of Human Mesenchymal Stem Cells on Brain Structure and Animal Behavior in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Feb; 6(2): 634–646.
  35. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654-9.
  36. Van Velthoven CT, Kavelaars A, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatr. Res*.2012.71(4):474–481.
  37. Vijay B, Murali K, Ramesh B, Anjan K, Radhika P, Rajarshi P. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*. 2016 Jan; 18(1): 13–24.
  38. Vishnubhatla I, Corteling R, Stevanato L, Hicks, C, Sinde, J. The development of stem cell-derived exosomes as a cell-free regenerative medicine. *J. Circ. Biomark*. 2014; z3:2-1.

39. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 25; 18(9).
40. Wang S , Qu X , Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *JHematolOncol.* 2012 Apr 30;5:19.
41. Yang C, Lei D, Ouyang W, Ren J, Li H, Hu J, Huang S. Conditioned media from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells efficiently induced the apoptosis and differentiation in human glioma cell lines in vitro. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:109389.

### ***Artículo con correcciones de estilo.***

### **Descripción de los Protocolos para el Análisis del Secretoma de Células Madre Mesenquimales Humanas de Médula Osea (BM-MSCS), Pulpa Dental (DPSCS) y Cordón Umbilical (UC-MSCS)**

**Resumen:** Las células madre mesenquimales son células multipotentes que se estudian activamente **porque** su secretoma posee propiedades **que se utilizan** en el tratamiento de distintas afecciones patológicas como ~~lo son~~ las enfermedades degenerativas y defectos óseos. **Por** lo tanto, es importante estudiar la caracterización de este. El objetivo de esta **revisión** es describir los protocolos para la evaluación del secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental y cordón umbilical. Par tal fin se realizó una búsqueda electrónica de ~~la~~ literatura hasta la fecha en las bases de datos **PUBMED y MEDLINE**, teniendo en cuenta palabras **claves, estrategias** de búsqueda para cada temática y búsquedas manuales. Se seleccionaron todos los artículos en texto completo publicados sin restricción de idioma, lugar, **fecha, período** de publicación **y se** incluyeron estudios **estudios in vitro**. A partir de esta revisión se pudo concluir que los resultados evidenciados en el procedimiento de la preparación del medio condicionado tienen una gran influencia sobre la calidad del secretoma. Se describió un protocolo para la evaluación **de este en** las células madre mesenquimales de cordón umbilical, médula ósea y pulpa dental, ~~en~~ donde se evidencia que cada tipo de MSCs requiere una preparación diferente. Existen diferentes métodos reportados en la literatura científica para caracterizar el secretoma sintetizado por las MSC; sin embargo, no se conoce cuál es el mejor método para detectar *in vitro* el mayor número de factores solubles, microvesículas y exosomas derivados de las MSC.

**Palabras clave:** células madre mesenquimales, secretoma, protocolo, células madre mesenquimales de médula ósea, células madre mesenquimales de pulpa dental, células madre mesenquimales de cordón umbilical.

## Introducción

Durante los últimos años se ha **intensificado el esfuerzo** para analizar el secretoma de las células madre mesenquimales mediante diferentes enfoques que buscan caracterizar factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas secretadas por las células madre para profundizar en los mecanismos involucrados en procesos inmunomoduladores, antiinflamatorios, neoangiogénicos, de viabilidad celular, diferenciación y reclutamiento celular, así como la regulación del comportamiento celular en general en **distintas etapas** y condiciones (Salem & Thiermermann, 2010).

Las células madre mesenquimales (MSC) también contribuyen a los procesos de reparación en diferentes afecciones patológicas, incluidas las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que solo una pequeña proporción de células madre mesenquimales (MSC) trasplantadas pueden sobrevivir e incorporarse en los tejidos del huésped (Tan *et al.*, 2014). **Estas** son células multipotentes que se estudian activamente ya que su secretoma posee propiedades que **se utilizan** en el tratamiento de distintas afecciones patológicas como ~~lo son~~ las enfermedades degenerativas y defectos óseos; por lo tanto es importante estudiar la caracterización de este. Las células madre tienen la capacidad de auto-renovarse y dar lugar a células de varios linajes **que** representan un importante paradigma de **dicha** terapia ~~basada en células~~ para una variedad de enfermedades **y en** términos generales, hay dos tipos principales de células madre, embrionarias y no embrionarias. (Wang S *et al.*, 2012).

Las células madre mesenquimales de la médula ósea (BM-MSCs), las células madre pluripotentes similares a la pulpa dental recientemente identificadas (DPPSC) y la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano (WJ-MSCs) son nuevas fuentes de células madre con uso prospectivo en regeneración celular y terapia. Estas **células** son auto renovables, se pueden diferenciar en varias líneas y pueden potenciar las respuestas inmunes (Mennan *et al.*, 2013). En diversos estudios se ha demostrado **que** pueden ser aisladas a partir de fuentes como la sangre del cordón umbilical, sangre periférica, tejido adiposo, folículo capilar,

ligamento periodontal y pulpa dental entre otros (Barry & Murphy, 2004). También pueden ser usadas en varias terapias basadas en células y enfoques de ingeniería de tejidos. Durante los procesos de regeneración tisular se evidencia la participación de distintos factores solubles secretados por las células madre modulando actividades biológicas como la respuesta inmune, la síntesis de matriz extracelular, factores solubles y el comportamiento de las células del huésped. (Vijay *et al.*, 2016).

La mayor parte de lo que se conoce ~~y de hecho el "dogma"~~ con respecto a las MSC adultas proviene de la médula ósea y en muchos aspectos la pulpa dental puede considerarse similar a la primera. Ambos son tejidos blandos altamente vascularizados e inervados que están rodeados de minerales. Tanto en la médula ósea como en la pulpa dental, las MSC son capaces de diferenciarse en células que generan el mineral. En la primera, esta función es realizada por los osteoblastos, mientras que en los dientes es realizada por los odontoblastos, que se derivan de las células madre de la pulpa dental (DPSC). Sin embargo, es importante destacar que las DPSC tienen una diferenciación más restringida que las células de la médula ósea *in vivo*. Por lo tanto, la pulpa dental puede proporcionar un sistema modelo simple para estudiar las células madre mesenquimales que es fácilmente accesible y tiene una estructura definida (Sharp PT *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que la sangre del cordón umbilical (UCB) es más adecuada porque está libre de complicaciones éticas y es fácil de aislar mediante métodos no invasivos. UCB produce grandes rendimientos de MSC y posee actividades inmunosupresoras, por lo que es útil en entornos alogénicos (Oh W *et al.*, 2008., Reinisch A *et al.*, 2007). Así, su aplicación se ha intentado en un amplio espectro de enfermedades y la eficacia terapéutica de las UCB-*MSC es evidente* en varios modelos de enfermedad (Kim D.S *et al.*, 2009. Kim J.Y *et al.*, 2010. Kim S.M *et al.*, 2011., Chang Y.S *et al.*, 2011., Kim J.Y. *et al.*, 2012)

Las investigaciones realizadas en la última década sugieren que los beneficios terapéuticos mediados por las células madre mesenquimales (MSCs) se deben principalmente a su secretoma y se ha propuesto como una posible herramienta terapéutica para el tratamiento de varias enfermedades (Texeira *et al.*, 2017). Es necesario tener en cuenta que la expresión del secretoma *in vitro* probablemente sea muy diferente de lo que se esperaría *in vivo*, donde las células dentro de diferentes microambientes exhibirían perfiles de expresión de

secretoma únicos y como los microambientes son altamente dinámicos, a su vez impactarían la cinética de la expresión del secretoma. (Sudhir *et al.*, 2012).

## **Métodos**

Para la búsqueda de información se elaboró una tabla de contenido con las cuatro temáticas que se incluyeron en la revisión; a cada una ~~de las temáticas~~ se le establecieron variables, palabras claves y términos MeSH a partir de los cuales se estructuraron los algoritmos finales de búsqueda y se definieron de la siguiente manera: para la temática 1 *(Secretome) OR (Soluble factors) OR (Secretory) OR (Vesicles) OR (Mesenchymal stem cell secretome) OR (Secretory Vesicles) OR (Microvesicle) OR (Mesenchymal stem Cell- Derived Microparticles) AND (Mesenchymal stem cells) OR (Mesenchymal stromal cells) OR (Stem cells) OR (Progenitor cells)*; temática 2 *(Conditioned media) OR (conditioned medium) OR (Growth factors) OR (Paracrine activities) AND (Mesenchymal stem cells) OR (Mesenchymal stromal cells) OR (Stem cells) OR (Progenitor cells)*; temática 3 *((Secretome) OR (Soluble factors) OR (Secretory) OR (Vesicles) OR (Mesenchymal stem cell secretome) OR (Secretory Vesicles) OR (Microvesicle) OR (Mesenchymal stem Cell-Derived Microparticles) AND (Mesenchymal stem cells) OR (Human bone marrow mesenchymal stem cells) or (Human apical papilla stem cells) OR (SCAPs) OR (Wharton's jelly mesenchymal stem cells) OR (Mesenchymal Stromal Cells) OR (Progenitor Cells)*; temática 4 *(Methods) OR (Protocol) OR (Protocol analysis) AND (Soluble factors) OR (proteins) OR (exosomes) OR (microvesicles) OR (secretory vesicles) OR (Growth factors) OR (chemokines) AND (Mesenchymal stem cells) OR (Human bone marrow mesenchymal stem cells) or (Human apical papilla stem cells) OR (SCAPs) OR (Wharton's jelly mesenchymal stem cells) OR (Mesenchymal Stromal Cells) OR (Progenitor Cells)*. Se aplicó cada estrategia de búsqueda en la base de datos PubMed, se preseleccionaron los artículos por título o *abstract*, los cuales fueron obtenidos en texto completo para realizar la selección final de artículos por temática. Se seleccionaron 25 artículos y de cada uno fueron extraídos los siguientes datos: autor(es), país, tipo de estudio, sitio anatómico origen o tipo *stem cells* (fuente de células madres), grupo(s) de estudio o intervención, indicador de resultados, instrumentos de medición, resultados descriptivos, diferencias estadísticas, conclusiones.

## **Generalidades del secretoma de las células madres mesenquimales**

Las células madre mesenquimales (MSCs) se estudian intensamente porque exhiben propiedades biológicas únicas *in vivo* que se explotan para el tratamiento de traumas, así como de muchas afecciones patológicas, especialmente defectos óseos en particular defectos de tamaño crítico, enfermedades degenerativas y autoinmunidad (Baglio *et al.*, 2015).

Las MSC derivadas de tejidos de adultos son las más comúnmente utilizadas, pero la capacidad de proliferación de las MSC para adultos es muy limitada, lo que dificulta la ampliación de estas para aplicaciones terapéuticas. Por lo tanto, se requiere una fuente alternativa para promover la regeneración de órganos y tejidos a partir de las células estromales mesenquimales para la aplicación clínica. Las células estromales mesenquimales de tejidos embrionarios extra son una opción ideal para las células madre mesenquimales ya que pueden superar la limitación proliferativa que presentan las MSC adultas. (Sabapathy *et al.*, 2014). En términos generales, hay dos tipos principales de células madre, embrionarias y no embrionarias. Las células madre embrionarias (ESC) se derivan de la masa celular interna del blastocisto y pueden diferenciarse en células de las tres capas germinales. Sin embargo, la formación de teratomas y la controversia ética dificultan su investigación y aplicación clínica. Por otro lado, las células madre no embrionarias, en su mayoría células madre adultas, ya están algo especializadas y tienen un potencial de diferenciación limitado.

Se pueden aislar de varios tejidos y actualmente son las células de semilla más utilizadas en medicina regenerativa. Recientemente, otro tipo de células madre no embrionarias **conocidas** como célula madre pluripotente inducida (iPSC) **han** surgido como un gran avance en biología regenerativa (Wang S *et al.*, 2012).

Las MSC son precursores multipotentes que tienen la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células en condiciones de inducción **porque** son **eficaces** para aplicaciones terapéuticas **debido a que** pueden secretar moléculas bioactivas con propiedades inmunomoduladoras. Estas células se pueden aislar a partir de varias fuentes, como tejido adiposo, dermis, sangre periférica y médula ósea (Fraser *et al.* [2006](#) ; Cao y Dong [2005](#) ; Pittenger *et al.* [1999](#)). Incluso cuando las MSC mostraron resultados prometedores *in vitro* En los estudios y en ensayos preclínicos y clínicos, no se conoce bien el mecanismo responsable de los resultados obtenidos en diferentes patologías o enfermedades. (Amable *et al.*, 2014).

El uso de terapias sin células como aquellas basadas en el secretoma de origen en MSCs en medicina regenerativa proporcionan ventajas clave sobre las aplicaciones basadas en células madre: la aplicación del secretoma resuelve varias consideraciones de bioseguridad potencialmente asociadas con el trasplante de poblaciones heterogéneas de células viables que podrían proliferar en distintos sitios del individuo receptor. De acuerdo a las buenas prácticas clínicas, el secretoma originado por MSCs puede evaluarse por su seguridad, dosis y potencia de una manera análoga a los agentes farmacéuticos convencionales; el almacenamiento se puede realizar sin la aplicación de agentes crioconservantes potencialmente tóxicos durante un largo período sin perder la potencia del producto, entre otras. (Vizoso *et al.*, 2017).

El secretoma se define como el conjunto de factores liberados activa o pasivamente de las células y contiene proteínas solubles (~~por ejemplo~~, citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento), lípidos, ácidos nucleicos libres y vesículas extracelulares (EV) entre otros. Estos últimos pueden subdividirse aún más en función de su tamaño, densidad, marcadores de superficie y origen en cuerpos apoptóticos, micropartículas y exosomas. Especialmente los exosomas se han centrado recientemente en la investigación basada en su alta capacidad para interactuar con las células diana y su capacidad para modificar selectivamente la señalización celular (Beer *et al.*, 2017).

El secretoma de las células troncales es una fuente rica de proteínas como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que ha atraído la atención en los últimos años debido a sus múltiples implicaciones en medicina regenerativa (Arai *et al.*, 2004). Los resultados iniciales hacia la aplicación del secretoma de células troncales para el tratamiento de distintas enfermedades son prometedores (Van *et al.* 2012).

Los componentes solubles del secretoma se pueden separar de la fracción de microvesículas mediante centrifugación, filtración, metodologías basadas en precipitación de polímeros, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño (Vishnubhatla *et al.*, 2014).

El concepto de los factores de crecimiento y las citoquinas son una parte importante del secretoma celular y se cree que la mayoría secretan grandes cantidades de micro y nanovesículas, ya sea de forma constitutiva o mediante señales de activación. La composición

bioquímica, la compleja biogénesis de estas vesículas y, en particular, su papel fisiológico, solo se han **descubierto** parcialmente. (Baglio *et al.*, 2013). La elucidación de las vías moleculares que median la expresión del secretoma de MSC es un paso crucial para mejorar **la** comprensión del perfil de factores secretados y su utilidad clínica. Aunque se requieren investigaciones adicionales para delinear completamente los mecanismos de señalización involucrados en la expresión del secretoma de MSC, una amplia gama de vías de señalización han sido implicadas en la reparación cardíaca mediada por paracrina por parte de las MSC. (Gnocchi *et al.*, 2008). Los protocolos más avanzados han demostrado la posible ingeniería tisular periodontal y craneofacial utilizando diferentes combinaciones de células tipo MSCs de orígenes dentales y no dentales juntas en combinación con factores de crecimiento (Ashri *et al.*, 2015).

### **Medios condicionados de las células madre mesenquimales**

De acuerdo a la selección realizada se eligieron **cuatro** artículos que arrojaron diferentes tipos de medios condicionados para las células madre mesenquimales entre ellos se encuentran: Medio condicionado NORMÓXICO + Suero, Medio condicionado HIPÓXICO + Suero, Medio condicionado NORMÓXICO sin suero, Medio condicionado HIPÓXICO sin suero (Chen *et al.*, 2014), DMEM (Medio condicionado **Eagle** modificado por Dulbecco), DMEM sin suero (Shen *et al.*, 2015), DMEM sin suero complementado con medio adipogénico, DMEM sin suero + PBS **washing** (estrategia de lavado con buffer fosfato salino) (Clabaut *et al.*, 2015), medio adipogénico (Yang *et al.*, 2014).

### **Descripción del secretoma de las células madres mesenquimales de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical**

El secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental y cordón umbilical contiene microvesículas que liberan micropartículas como proteínas (transducción de señales y proteínas efectoras, receptores, citoesqueleto), lípidos, ácidos nucleicos (ARNm, microARN o miARN y ADN), citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Baglio *et al.*, 2015; Vizoso *et al.*, 2017). Además de su potencial de diferenciación, estas **células** también pueden secretar un panel de factores de crecimiento y citoquinas con efectos directos en una variedad de mecanismos como la supresión del sistema inmunitario, la inhibición de la apoptosis, el aumento de angiogénesis y la estimulación de células adyacentes a los tejidos.



(Shen *et al.*, 2015). Hay suficiente evidencia para demostrar que la única vía importante por la cual las MSCs participan en la reparación y regeneración de tejidos es **por medio** de su secretoma. Al mismo tiempo, un gran número de investigaciones se ha centrado en la caracterización del secretoma del MSCs incluyendo tanto factores solubles como factores liberados en vesículas extracelulares, por ejemplo, exosomas y microvesículas (Vijay *et al.*, 2016).

El término exosoma generalmente se refiere a una clase específica de vesícula extracelular unida a membrana lipídica caracterizada por un diámetro de 40 **nm** a 150 nm y una densidad de 1,09 g / ml a 1,18 g / ml. La evidencia creciente indica que las MSCs producen cantidades masivas de exosomas en comparación con otras células y está demostrando que muchas de las propiedades regenerativas acreditadas previamente a las células madre están mediadas a través de exosomas secretados (Vizoso *et al.*, 2017). En particular, los exosomas han recibido mucha atención en investigación ya que son una subclase de (nano) vesículas que se derivan de compartimentos intracelulares especializados conocidos como endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares (MVB). Existen muchos otros tipos de vesículas que presumiblemente se derivan de la membrana plasmática y se ha alcanzado un consenso para nombrar colectivamente estas vesículas de membrana extracelular (Baglio *et al.*, 2013).

Las **microvesículas liberadas** a partir de un tipo de célula dada pueden interactuar a través de ligandos de receptores específicos con otras células que transfieren proteínas, lípidos reactivos biológicos y receptores. (Schorey JS *et al.* 2008.; Morel O *et al.*, 2004 ). Recientemente se ha demostrado que los MV también pueden transferir ARNm y microARN (miARN) **lo que** explica los cambios epigenéticos en las células diana. (Ratajczak J *et al.* 2006., Deregibus MC *et al.*, 2007., Valadi H *et al.*; 2007 ). Las microvesículas (**MV**) se forman por brotes directos de la membrana plasmática y son más grandes que los exosomas (100 **nm** a 1000 nm). **Estas** muestran una gran cantidad de fosfatidilserina, colesterol, proteínas asociadas con balsas lipídicas, y están enriquecidas en colesterol, esfingomielinina y ceramida. La formación ~~de~~ **microvesículas** depende tanto de la activación del citoesqueleto como de la concentración intracelular de calcio (Monsel *et al.*, 2016). Tanto los exosomas como las microvesículas son liberados constitutivamente por múltiples tipos de células **ya sea** por estímulos fisiológicos o en respuesta a una lesión y contienen múltiples componentes celulares que pueden conducir

la comunicación de célula a célula **por medio** de la transferencia de moléculas bioactivas que incluyen proteínas asociadas a endosomas, proteínas de membrana, lípidos y material genético (por ejemplo, ARNm y microARN) (Monsel *et al.*, 2016).

Se han identificado varios factores candidatos, que median los efectos terapéuticos del secretoma de las MSCs en la regeneración tisular incluido el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), derivado de plaquetas factor de crecimiento (PDGF-BB), proteína 4 similar a la angiopoyetina y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Kalinina *et al.*, 2015). El grupo funcional más grande del secretoma de MSCs está compuesto por proteínas, entre ellas, ~~se encuentran:~~ fibrilina 2, glypican 1, transcetolasa, reticulocalbina 2, peroxiredoxina 3, activista proteasoma subunidad 2 (PA28 beta), ADAMTS, Inhibidor de alfa (globulina) H2, Repeticiones como EGF y dominios tipo Discoidin I 3, ribonucleasa, familia RNasa A, 4 adrenomedullin, tirosina-proteína fosfatasa tipo no receptor sustrato 1 (SIPRA) (Kalinina *et al.*, 2015).

### **Métodos para analizar factores solubles secretados por células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical**

El proceso para analizar el secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea inició con la recolección de la muestra **y** aislandolas (por aspiración) sobre solución de *Ficoll-Hypaque*. Las células mononucleares se aislaron por centrifugación, ~~posteriormente las células que fueron separadas~~ se lavaron **y** se sembraron a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en un medio esencial mínimo (a-MEM) suplementado con suero bovino fetal al 10%. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub> con un cambio de medio de cultivo dos veces por semana. Después del cultivo se encontró que la frecuencia de aislamiento era del 100%, la expansión de las células se analizó mediante el método de exclusión con azul tripán. En cada pasaje, se cultivaron células madre mesenquimales durante **siete** días; ~~las células~~ se disociaron con tripsina-EDTA, se contaron y se volvieron a sembrar con la densidad celular inicial (2000 células/cm<sup>2</sup>). El medio de cultivo se reemplazó dos veces por semana.

El número de PDT (tiempo de duplicación de la población) se calculó en función del número total de células en cada pasaje; **la** PDT se calculó para cada pasaje dividiendo el logaritmo del

valor de aumento de doblaje obtenido al final del pasaje por el logaritmo de **dos**. Este procedimiento se repitió hasta que la célula **no proliferó más** y **se llevó a cabo un conteo del** número de células para calcular la PDT final. El tiempo de duplicación de la población (PDT) se examinó mediante la fórmula:  $(t - t_0) \cdot \log_2 / \log (N - N_0)$ , donde  $t - t_0$  es el tiempo de cultivo (h), N es el número de células recolectadas y  $N_0$  es el número de celdas en la inicial. Seguido a esto, se realizó un ensayo para identificar formación de colonias por unidad de fibroblastos (CFU-F) mediante la siembra de células en una placa de cultivo e incubando en humidificado 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. **El** medio de cultivo se intercambió cada 3 días **y después de** dos semanas **se lavaron las placas** dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijaron con metanol al 100% y se tiñeron con cristal violeta al 3%. Por último, se realizó un conteo del número de colonias (Hye *et al.*, 2013).

**Se** halló un protocolo para analizar el secretoma de las células madre mesenquimales de pulpa dental el cual parte de la recolección de la muestra (dientes con o sin raíces maduras) (Huang *et al.*, 2010). Los dientes recién extraídos se almacenaron en un medio de cultivo celular sin suero y se transportaron al laboratorio para su procesamiento. El tejido pulpar y la papila apical se extrajeron de los dientes, se seccionaron y se digirieron en una solución de 3 mg/ml de colagenasa tipo I y 4 mg/ml dispasa durante 30 **minutos a** 60 minutos a 37 °C. Las mezclas digeridas se pasaron a través de un filtro de células de 70 mm para obtener suspensiones de una sola célula. **Estas** se sembraron en placas de seis pozos y se cultivaron con un medio esencial suplementado con 15% a 20% de suero bovino fetal, 2 mM L - glutamina, 100 mM de ácido L-ascórbico-2-fosfato, 100 U/ml de penicilina-G, 100 mg/ml de estreptomycin y 0.25 mg/ml de fungizona y se mantuvieron en 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Las unidades de formación de colonias de células fibroblásticas se observaron normalmente dentro de 1 a 2 semanas después de la siembra celular y se pasaron a una proporción de 1:3 cuando alcanzaron una confluencia del 80%.

Las poblaciones heterogéneas de DPSCs y SCAP se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido hasta el segundo pasaje. Las células se descongelaron y se expandieron para experimentación en el pasaje 3. Se resuspendieron alícuotas celulares de SCAP y DPSCs en solución salina tamponada con fosfato (PBS) FBS al 0.1%, que contenía concentraciones de saturación (dilución **1:100**) de los siguientes anticuerpos IgG1 de ratón conjugado, k

anticuerpos anti-monoclonales humanos: CD14-PE, CD34-PE, CD45-FITC, CD73-PE, CD90-FITC y CD105-PE durante 1 hora a 48 °C. Las suspensiones celulares se lavaron dos veces y se resuspendieron en FBS al 0.1% = PBS para su análisis en un citómetro de flujo utilizando el software CellQuest Pro (BD Biosciences) (Huang *et al.*, 2010).

Para el análisis del secretoma de células madre mesenquimales de cordón umbilical se obtuvieron las muestras, las células mononucleares se aislaron con un gradiente *Ficoll Hystopaque* y se sembraron a una densidad de 250,000 células / cm<sup>2</sup>. Después de cuatro días se eliminaron las células no adherentes, se añadió medio fresco a los cultivos y se expandieron en medio esencial alfa-mínimo (α-MEM) que contenía 100 U/ ml de penicilina, 100 µg /ml de estreptomicina y 10% de suero bovino fetal (FBS) o lisado de plaquetas al 5% (PL) y 10 U/ml de heparina en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. La expresión de marcadores de superficie de MSC típicos se analizó mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y se evaluó la capacidad de las MSC para experimentar diferenciación osteogénica mediante tinción con rojo de alizarina tras la inducción con ácido ascórbico, dexametasona y glicerofosfato β. Los exosomas se recolectaron de aproximadamente 3.2 × 10<sup>7</sup> células en pasajes tempranos (pasajes 2-3).

Una vez que los cultivos de MSC alcanzaron una confluencia del 70%, las células se cultivaron durante 24 horas a 48 horas en α-MEM que contenía FBS o PL con exosoma agotado. El FBS y el PL agotados en el exosoma se obtuvieron por centrifugación durante la noche a 70.000 xg a 4 °C. Los exosomas se aislaron como se describió anteriormente. Brevemente, el medio condicionado con MSC se centrifugó dos veces a 500 xg durante 10 minutos, dos veces a 2000 xg durante 15 minutos y dos veces a 10.000 xg durante 30 minutos. El sobrenadante se transfirió luego a tubos Ultra-Clear y se centrifugó a 70,000 × g durante 1 hora a 4 °C en un rotor SW32Ti. El sedimento que contenía el exosoma se lavó con PBS y se centrifugó a 70.000×g durante 1 hora. Luego el sedimento se resuspendió cuidadosamente en 200 µl de PBS y se usó inmediatamente o se almacenó a -80 °C. Para el análisis de microscopía de barrido láser confocal, las células se sembraron en portaobjetos recubiertos de resina, fijados con paraformaldehído al 4%, permeabilizados con Triton-X 100 al 0.1% y bloqueados con FBS al 10% con PBS (30 minutos).

Los portaobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios contra CD63 o EEA1 y luego con anticuerpo de conejo anti-ratón isotiocianato de fluoresceína (FITC) (DAKO, Heverlee, Bélgica) para 30 minutos a temperatura ambiente. LysoTracker red (Molecular Probes, Bleiswijk, Países Bajos) se incubó con células vivas antes de la fijación. Todas las tinciones se obtuvieron con un microscopio Leica DMRB. Las imágenes se obtuvieron mediante exploración secuencial con el conjunto de orificios a 1AE (estándar). Los fluoróforos se excitaron utilizando líneas láser de 488 nm (FITC) y 561 nm (Blaglio *et al.*, 2015).

## Conclusiones

Los resultados **muestran** que el procedimiento de la preparación del medio condicionado tiene una gran influencia sobre la calidad del secretoma (diferenciación y proliferación de células). Se describió un protocolo para la evaluación del secretoma de las células madre mesenquimales de cordón umbilical, médula ósea y pulpa dental en donde se evidencia que cada tipo de MSCs requiere una preparación diferente. Existen diferentes métodos reportados en la literatura científica para caracterizar el secretoma sintetizado por las células madre mesenquimales; sin embargo, de acuerdo con **la presente investigación**, no se conoce cuál es el mejor método para detectar *in vitro* el mayor número de factores solubles, microvesículas y exosomas derivados de las células madre mesenquimales. Aunque la información obtenida hasta la fecha no brinda un conocimiento completo, se espera que con el desarrollo de próximas investigaciones se aclaren diversos aspectos biológicos para implementar su uso en medicina regenerativa.

## Referencias

1. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. PLoS One. 2014 Aug 12; 9 (8):e104662.
2. ~~Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell 2004;118(2):149-161.~~
2. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell. 2004 Jul 23;118(2):149-61.

3. Ashri NY, Ajlan SA, Aldahmash AM. Dental pulp stem cells. Biology and use for periodontal tissue engineering. *Saudi Med J*. 2015 Dec; 36(12):1391-9.
4. ~~Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, Verweij FJ, Pérez Lanzón M, Zini N et al., Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Jul 1; 6:127.~~
4. Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, Verweij FJ, Pérez Lanzón M, Zini N, Naaijken B, Perut F, Niessen HW, Baldini N, Pegtel DM. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Jul 1; 6: 127
5. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr; 36(4):568-84.
6. ~~Beer L; Mildner M; Ankersmit H.J. Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: When regulatory affairs meet basic science. *Ann. Transl. Med*. 2017, 5, 170.~~
6. Beer L, Mildner M, Ankersmit HJ. Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: when regulatory affairs meet basic science. *Ann Transl Med*. 2017 Apr;5(7):170.
7. Cao C, Dong Y, Dong Y. Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2005 Aug; 19(8):642-7.
8. ~~Chang Y.S.; Choi, S.J.; Sung, D.K.; Kim, S.Y.; Oh, W.; Yang, Y.S.; Park, W.S. Intratracheal transplantation of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells dose-dependently attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Cell Transpl* 2011, 20, 1843–1854.~~
8. Chang YS, Choi SJ, Sung DK, Kim SY, Oh W, Yang YS, Park WS. Intratracheal transplantation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells dose-dependently attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Cell Transplant*. 2011;20(11-12):1843-54.
9. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R, Xie J, Liu X, Qi S. Conditioned medium from hypoxic bone marrow- derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One*. 2014 Apr 29;9(4): e96161. ECollection
10. Clabaut A, Grare C, Léger T, Hardouin P, Broux O. Variations of secretome profiles according to conditioned medium preparation: The example of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Electrophoresis*. 2015 Oct; 36(20):2587-93. Epub 2015 Aug 21.

11. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2440-8.
12. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006 Apr;24(4):150-4.
13. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008 Nov 21;103(11):1204-19.
14. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010 Feb;16(2):605-15.
15. Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, Butenko I, Pobeguts O, Efimenko A, Ageeva L, Sharonov G, Ischenko D, Alekseev D, Grigorieva O, Sysoeva V, Rubina K, Lazarev V, Govorun V. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Nov 11; 6: 221.
- ~~16. Kim J.Y.; Kim, D.H.; Kim, J.H.; Lee, D.; Jeon, H.B.; Kwon, S.J.; Kim, S.M.; Yoo, Y.J.; Lee, E.H.; Choi, S.J.; et al. Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid-beta plaques. *Cell Death Differ* 2012, 19, 680–691.~~
16. Kim JY, Kim DH, Kim JH, Lee D, Jeon HB, Kwon SJ, Kim SM, Yoo YJ, Lee EH, Choi SJ, Seo SW, Lee JI, Na DL, Yang YS, Oh W, Chang JW. Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid- $\beta$  plaques. *Cell Death Differ*. 2012 Apr;19(4):680-91.
- ~~17. Kim D.S.; Kim, J.H.; Lee, J.K.; Choi, S.J.; Kim, J.S.; Jeun, S.S.; Oh, W.; Yang, Y.S.; Chang, J.W. Overexpression of CXC chemokine receptors is required for the superior glioma tracking property of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2009, 18, 511–519.~~
17. Kim DS, Kim JH, Lee JK, Choi SJ, Kim JS, Jeun SS, Oh W, Yang YS, Chang JW. Overexpression of CXC chemokine receptors is required for the superior glioma-tracking property of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Apr; 18(3):511-9.
- ~~18. Kim J.Y.; Kim, D.H.; Kim, D.S.; Kim, J.H.; Jeong, S.Y.; Jeon, H.B.; Lee, E.H.; Yang, Y.S.; Oh, W.; Chang, J.W. Galectin-3 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid- $\beta$ 42 neurotoxicity in vitro. *FEBS Lett* 2010, 584, 3601–3608.~~

18. Kim JY, Kim DH, Kim DS, Kim JH, Jeong SY, Jeon HB, Lee EH, Yang YS, Oh W, Chang JW. Galectin-3 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta42 neurotoxicity in vitro. *FEBS Lett.* 2010 Aug 20;584(16):3601-8.
- ~~19. Kim S.M.; Kim, D.S.; Jeong, C.H.; Kim, D.H.; Kim, J.H.; Jeon, H.B.; Kwon, S.J.; Jeun, S.S.; Yang, Y.S.; Oh, W.; et al. CXC chemokine receptor 1 enhances the ability of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells to migrate toward gliomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2011, 407, 741–746.~~
19. Kim SM, Kim DS, Jeong CH, Kim DH, Kim JH, Jeon HB, Kwon SJ, Jeun SS, Yang YS, Oh W, Chang JW. CXC chemokine receptor 1 enhances the ability of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells to migrate toward gliomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Apr 22;407(4):741-6.
- ~~20. MA , Simonetti DW , Craig S , Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2; 284(5411):143-7.~~
20. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2; 284(5411):143-7.
21. Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A, Balain B, Richardson J, Roberts S. **Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord.** *Biomed Res Int.* 2013:916136.
22. Monsel A, Zhu YG, Gudapati V, Lim H, Lee JW. Mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for acute lung injury and other inflammatory lung diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2016 Jul; 16(7):859-71.
23. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol.* 2004 May;11(3):156-64.
- ~~24. Oh, W.; Kim, D.S.; Yang, Y.S.; Lee, J.K. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cell. Immunol* 2008, 251, 116–123.~~
24. Oh W, Kim DS, Yang YS, Lee JK. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cell Immunol.* 2008 Feb; 251(2):116-23.
- ~~25. Pittenger MF , Mackay AM , Beck SC , Jaiswal RK , Douglas R , Mosca JD , Moorman MA , Simonetti DW , Craig S , Marshak DR .Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2; 284(5411):143-7. **REPETIDA 20**~~
26. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence



for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006 May; 20(5):847-56.

- ~~27. Reinisch, A.; Bartmann, C.; Rohde, E.; Schallmoser, K.; Bjelic-Radisic, V.; Lanzer, G.; Linkesch, W.; Strunk, D. Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Regen. Med* 2007, 2, 371–382.~~
27. Reinisch A, Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Bjelic-Radisic V, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D. Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Regen Med*. 2007 Jul;2(4):371-82.
28. Sabapathy V, Sundaram B, V M S, Mankuzhy P, Kumar S. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth. *PLoS One*. 2014 Apr 15;9(4):e93726.
29. Salem HK, Thiernemann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010 Mar 31; 28(3):585-96.
30. Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*. 2008 Jun; 9(6):871-81.
31. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development*. 2016 Jul 1; 143(13):2273-80.
32. Shen C, Lie P, Miao T, Yu M, Lu Q, Feng T, Li J, Zu T, Liu X, Li H. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Mol Med Rep*. 2015 Jul; 12(1):20-30.
33. Tan X, Gong YZ, Wu P, Liao DF, Zheng XL. Mesenchymal stem cell-derived microparticles: a promising therapeutic strategy. *Int J Mol Sci*. 2014 Aug 18;15(8):14348-63.
34. Teixeira F, Carvalho M, Panchalingam K, Rodrigues A, Mendes-Pinheiro B, Anjo S, Manadas B, Behie L, Sousa N, Salgado A. **Impact of the secretome of human mesenchymal stem cells on brain structure and animal behavior in a rat model of parkinson's disease**. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Feb; 6(2): 634–46.
35. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654-9.
- ~~36. Van Velthoven CT, Kavelaars A, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatr. Res*. 2012.71(4):474–481.~~

36. van Velthoven CT, Kavelaars A, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatr Res.* 2012 Apr;71(4 Pt 2):474-81.
37. Vijay B, Murali K, Ramesh B, Anjan K, Radhika P, Rajarshi P. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy.* 2016 Jan; 18(1): 13–24.
38. Vishnubhatla I, Corteling R, Stevanato L, Hicks, C, Sinde, J. The development of stem cell-derived exosomes as a cell-free regenerative medicine. *J Circ Biomark.* 2014; 3:2
39. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 25;18(9). pii: E1852
40. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol.* 2012 Apr 30; 5:19.
41. Yang C, Lei D, Ouyang W, Ren J, Li H, Hu J, Huang S. Conditioned media from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells efficiently induced the apoptosis and differentiation in human glioma cell lines in vitro. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:109389.

### **Artículo Final.**

#### **Descripción de los Protocolos para el Análisis del Secretoma de Células Madre Mesenquimales Humanas de Médula Osea (BM-MSCS), Pulpa Dental (DPSCS) y Cordón Umbilical (UC-MSCS)**

**Resumen:** Las células madre mesenquimales son células multipotentes que se estudian activamente porque su secretoma posee propiedades que se utilizan en el tratamiento de distintas afecciones patológicas como las enfermedades degenerativas y defectos óseos. Por lo tanto, es importante estudiar la caracterización de este. El objetivo de esta revisión es describir los protocolos para la evaluación del secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental y cordón umbilical. Par tal fin se realizó una búsqueda electrónica de literatura hasta la fecha en las bases de datos *PUBMED* y *MEDLINE*, teniendo en cuenta palabras claves, estrategias de búsqueda para cada temática y búsquedas manuales. Se seleccionaron todos los artículos en texto completo publicados sin restricción de idioma, lugar, fecha, período de publicación y se incluyeron estudios *in vitro*. A partir de esta revisión se pudo concluir que los resultados evidenciados en el procedimiento de la preparación del medio condicionado tienen una gran influencia sobre la calidad del

secretoma. Se describió un protocolo para la evaluación de este en las células madre mesenquimales de cordón umbilical, médula ósea y pulpa dental, donde se evidencia que cada tipo de MSCs requiere una preparación diferente. Existen diferentes métodos reportados en la literatura científica para caracterizar el secretoma sintetizado por las MSC; sin embargo, no se conoce cuál es el mejor método para detectar *in vitro* el mayor número de factores solubles, microvesículas y exosomas derivados de las MSC.

**Palabras clave:** células madre mesenquimales, secretoma, protocolo, células madre mesenquimales de médula ósea, células madre mesenquimales de pulpa dental, células madre mesenquimales de cordón umbilical.

## **Introducción**

Durante los últimos años se ha intensificado el esfuerzo para analizar el secretoma de las células madre mesenquimales mediante diferentes enfoques que buscan caracterizar factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas secretadas por las células madre para profundizar en los mecanismos involucrados en procesos inmunomoduladores, antiinflamatorios, neoangiogénicos, de viabilidad celular, diferenciación y reclutamiento celular, así como la regulación del comportamiento celular en general en distintas etapas y condiciones (Salem & Thiermermann, 2010).

Las células madre mesenquimales (MSC) también contribuyen a los procesos de reparación en diferentes afecciones patológicas, incluidas las enfermedades cardiovasculares y el cáncer; sin embargo, muchos estudios han demostrado que solo una pequeña proporción (MSC) trasplantada puede sobrevivir e incorporarse en los tejidos del huésped (Tan *et al.*, 2014). Estas son células multipotentes que se estudian activamente ya que su secretoma posee propiedades que se utilizan en el tratamiento de distintas afecciones patológicas como las enfermedades degenerativas y defectos óseos; por lo tanto, es importante estudiar la caracterización de este. Las células madre tienen la capacidad de auto-renovarse y dar lugar a células de varios linajes que representan un importante paradigma de dicha terapia para una variedad de enfermedades y en términos generales, hay dos tipos principales de células madre, embrionarias y no embrionarias. (Wang S *et al.*, 2012).

Las células madre mesenquimales de la médula ósea (BM-MSCs), las células madre pluripotentes similares a la pulpa dental recientemente identificadas (DPPSC) y la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano (WJ-MSCs) son nuevas fuentes de células madre con uso prospectivo en regeneración celular y terapia. Estas son auto renovables, se pueden diferenciar en varias líneas y pueden potenciar las respuestas inmunes (Mennan *et al.*, 2013). En diversos estudios se ha demostrado que pueden ser aisladas a partir de fuentes como la sangre del cordón umbilical, sangre periférica, tejido adiposo, folículo capilar, ligamento periodontal y pulpa dental entre otros (Barry & Murphy, 2004). También pueden ser usadas en varias terapias basadas en células y enfoques de ingeniería de tejidos. Durante los procesos de regeneración tisular se evidencia la participación de distintos factores solubles secretados por las células madre modulando actividades biológicas como la respuesta inmune, la síntesis de matriz extracelular, factores solubles y el comportamiento de las células del huésped. (Vijay *et al.*, 2016).

La mayor parte de lo que se conoce con respecto a las MSC adultas proviene de la médula ósea y en muchos aspectos la pulpa dental puede considerarse similar a la primera. Ambos son tejidos blandos altamente vascularizados e innervados que están rodeados de minerales. Tanto en la médula ósea como en la pulpa dental, las MSC son capaces de diferenciarse en células que generan el mineral. En la primera, esta función es realizada por los osteoblastos, mientras que en los dientes es realizada por los odontoblastos, que se derivan de las células madre de la pulpa dental (DPSC). Sin embargo, es importante destacar que las DPSC tienen una diferenciación más restringida que las células de la médula ósea *in vivo*. Por lo tanto, la pulpa dental puede proporcionar un sistema modelo simple para estudiar las células madre mesenquimales que es fácilmente accesible y tiene una estructura definida (Sharp PT *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que la sangre del cordón umbilical (UCB) es más adecuada porque está libre de complicaciones éticas y es fácil de aislar mediante métodos no invasivos. UCB produce grandes rendimientos de MSC y posee actividades inmunosupresoras, por lo que es útil en entornos alogénicos (Oh W *et al.*, 2008., Reinisch A *et al.*, 2007). Así, su aplicación se ha intentado en un amplio espectro de enfermedades y la eficacia terapéutica de las UCB-MSC

es evidente en varios modelos de enfermedad (Kim D.S *et al.*, 2009. Kim J.Y *et al.*, 2010. Kim S.M *et al.*, 2011., Chang Y.S *et al.*, 2011., Kim J.Y. *et al.*, 2012)

Las investigaciones realizadas en la última década sugieren que los beneficios terapéuticos mediados por las células madre mesenquimales (MSCs) se deben principalmente a su secretoma y se ha propuesto como una posible herramienta terapéutica para el tratamiento de varias enfermedades (Texeira *et al.*, 2017). Es necesario tener en cuenta que la expresión del secretoma *in vitro* probablemente sea muy diferente de lo que se esperaría *in vivo*, donde las células dentro de diferentes microambientes exhibirían perfiles de expresión de secretoma únicos y como los microambientes son altamente dinámicos, a su vez impactarían la cinética de la expresión del secretoma. (Sudhir *et al.*, 2012).

### **Métodos**

Para la búsqueda de información se elaboró una tabla de contenido con las cuatro temáticas que se incluyeron en la revisión; a cada una se le establecieron variables, palabras claves y términos MeSH a partir de los cuales se estructuraron los algoritmos finales de búsqueda y se definieron de la siguiente manera: para la temática 1 (*Secretome*) OR (*Soluble factors*) OR (*Secretory*) OR (*Vesicles*) OR (*Mesenchymal stem cell secretome*) OR (*Secretory Vesicles*) OR (*Microvesicle*) OR (*Mesenchymal stem Cell- Derived Microparticles*) AND (*Mesenchymal stem cells*) OR (*Mesenchymal stromal cells*) OR (*Stem cells*) OR (*Progenitor cells*); temática 2 (*Conditioned media*) OR (*conditioned medium*) OR (*Growth factors*) OR (*Paracrine activities*) AND (*Mesenchymal stem cells*) OR (*Mesenchymal stromal cells*) OR (*Stem cells*) OR (*Progenitor cells*); temática 3 ((*Secretome*) OR (*Soluble factors*) OR (*Secretory*) OR (*Vesicles*) OR (*Mesenchymal stem cell secretome*) OR (*Secretory Vesicles*) OR (*Microvesicle*) OR (*Mesenchymal stem Cell-Derived Microparticles*) AND (*Mesenchymal stem cells*) OR (*Human bone marrow mesenchymal stem cells*) or (*Human apical papilla stem cells*) OR (*SCAPs*) OR (*Wharton's jelly mesenchymal stem cells*) OR (*Mesenchymal Stromal Cells*) OR (*Progenitor Cells*); temática 4 (*Methods*) OR (*Protocol*) OR (*Protocol analysis*) AND (*Soluble factors*) OR (*proteins*) OR (*exosomes*) OR (*microvesicles*) OR (*secretory vesicles*) OR (*Growth factors*) OR (*chemokines*) AND (*Mesenchymal stem cells*) OR (*Human bone marrow mesenchymal stem cells*) or (*Human apical papilla stem cells*) OR (*SCAPs*) OR (*Wharton's jelly mesenchymal stem cells*) OR (*Mesenchymal Stromal Cells*) OR (*Progenitor Cells*). Se aplicó cada estrategia de búsqueda en

la base de datos PubMed, se preseleccionaron los artículos por título o *abstract*, los cuales fueron obtenidos en texto completo para realizar la selección final de artículos por temática. Se seleccionaron 25 artículos y de cada uno fueron extraídos los siguientes datos: autor(es), país, tipo de estudio, sitio anatómico origen o tipo *stem cells* (fuente de células madres), grupo(s) de estudio o intervención, indicador de resultados, instrumentos de medición, resultados descriptivos, diferencias estadísticas, conclusiones.

### **Generalidades del secretoma de las células madres mesenquimales**

Las células madre mesenquimales (MSCs) se estudian intensamente porque exhiben propiedades biológicas únicas *in vivo* que se explotan para el tratamiento de traumas, así como de muchas afecciones patológicas, especialmente defectos óseos en particular defectos de tamaño crítico, enfermedades degenerativas y autoinmunidad (Baglio *et al.*, 2015).

Las MSC derivadas de tejidos de adultos son las más comúnmente utilizadas, pero la capacidad de proliferación de las MSC para adultos es muy limitada, lo que dificulta la ampliación de estas para aplicaciones terapéuticas. Por lo tanto, se requiere una fuente alternativa para promover la regeneración de órganos y tejidos a partir de las células estromales mesenquimales para la aplicación clínica. Las células estromales mesenquimales de tejidos embrionarios extra son una opción ideal para las células madre mesenquimales ya que pueden superar la limitación proliferativa que presentan las MSC adultas. (Sabapathy *et al.*, 2014). En términos generales, hay dos tipos principales de células madre, embrionarias y no embrionarias. Las células madre embrionarias (ESC) se derivan de la masa celular interna del blastocisto y pueden diferenciarse en células de las tres capas germinales. Sin embargo, la formación de teratomas y la controversia ética dificultan su investigación y aplicación clínica. Por otro lado, las células madre no embrionarias, en su mayoría células madre adultas, ya están algo especializadas y tienen un potencial de diferenciación limitado.

Se pueden aislar de varios tejidos y actualmente son las células de semilla más utilizadas en medicina regenerativa. Recientemente, otro tipo de células madre no embrionarias conocidas como célula madre pluripotente inducida (iPSC) han surgido como un gran avance en biología regenerativa (Wang S *et al.*, 2012).

Las MSC son precursores multipotentes que tienen la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células en condiciones de inducción porque son eficaces para aplicaciones terapéuticas debido a que pueden secretar moléculas bioactivas con propiedades inmunomoduladoras. Estas células se pueden aislar a partir de varias fuentes, como tejido adiposo, dermis, sangre periférica y médula ósea (Fraser *et al.* 2006 ; Cao y Dong 2005 ; Pittenger *et al.* 1999). Incluso cuando las MSC mostraron resultados prometedores *in vitro* En los estudios y en ensayos preclínicos y clínicos, no se conoce bien el mecanismo responsable de los resultados obtenidos en diferentes patologías o enfermedades. (Amable *et al.*, 2014).

El uso de terapias sin células como aquellas basadas en el secretoma de origen en MSCs en medicina regenerativa proporcionan ventajas clave sobre las aplicaciones basadas en células madre: la aplicación del secretoma resuelve varias consideraciones de bioseguridad potencialmente asociadas con el trasplante de poblaciones heterogéneas de células viables que podrían proliferar en distintos sitios del individuo receptor. De acuerdo a las buenas prácticas clínicas, el secretoma originado por MSCs puede evaluarse por su seguridad, dosis y potencia de una manera análoga a los agentes farmacéuticos convencionales; el almacenamiento se puede realizar sin la aplicación de agentes crioprotectores potencialmente tóxicos durante un largo período sin perder la potencia del producto, entre otras. (Vizoso *et al.*, 2017).

El secretoma se define como el conjunto de factores liberados activa o pasivamente de las células y contiene proteínas solubles (citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento), lípidos, ácidos nucleicos libres y vesículas extracelulares (EV) entre otros. Estos últimos pueden subdividirse aún más en función de su tamaño, densidad, marcadores de superficie y origen en cuerpos apoptóticos, micropartículas y exosomas. Especialmente los exosomas se han centrado recientemente en la investigación basada en su alta capacidad para interactuar con las células diana y su capacidad para modificar selectivamente la señalización celular (Beer *et al.*, 2017).

El secretoma de las células troncales es una fuente rica de proteínas como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que ha atraído la atención en los últimos años debido a sus múltiples implicaciones en medicina regenerativa (Arai *et al.*, 2004). Los resultados

iniciales hacia la aplicación del secretoma de células troncales para el tratamiento de distintas enfermedades son prometedores (Van *et al.* 2012). Sus componentes solubles se pueden separar de la fracción de microvesículas mediante centrifugación, filtración, metodologías basadas en precipitación de polímeros, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño (Vishnubhatla *et al.*, 2014).

El concepto de los factores de crecimiento y las citoquinas son una parte importante del secretoma celular y se cree que la mayoría secretan grandes cantidades de micro y nanovesículas, ya sea de forma constitutiva o mediante señales de activación. La composición bioquímica, la compleja biogénesis de estas vesículas y, en particular, su papel fisiológico, solo se han descubierto parcialmente. (Baglio *et al.*, 2013). La elucidación de las vías moleculares que median la expresión del secretoma de MSC es un paso crucial para mejorar la comprensión del perfil de factores secretados y su utilidad clínica. Aunque se requieren investigaciones adicionales para delinear completamente los mecanismos de señalización involucrados en la expresión del secretoma de MSC, unas amplias gamas de vías de señalización han sido implicadas en la reparación cardíaca mediada por paracrina por parte de las MSC. (Gnocchi *et al.*, 2008). Los protocolos más avanzados han demostrado la posible ingeniería tisular periodontal y craneofacial utilizando diferentes combinaciones de células tipo MSCs de orígenes dentales y no dentales juntas en combinación con factores de crecimiento (Ashri *et al.*, 2015).

### **Medios condicionados de las células madre mesenquimales**

De acuerdo a la selección realizada se eligieron cuatro artículos que arrojaron diferentes tipos de medios condicionados para las células madre mesenquimales entre ellos se encuentran: Medio condicionado NORMÓXICO + Suero, Medio condicionado HIPÓXICO + Suero, Medio condicionado NORMÓXICO sin suero, Medio condicionado HIPÓXICO sin suero (Chen *et al.*, 2014), DMEM (Medio condicionado *Eagle* modificado por Dulbecco), DMEM sin suero (Shen *et al.*, 2015), DMEM sin suero complementado con medio adipogénico, DMEM sin suero + PBS *washing* (estrategia de lavado con *buffer* fosfato salino) (Clabaut *et al.*, 2015), medio adipogénico (Yang *et al.*, 2014).

### **Descripción del secretoma de las células madres mesenquimales de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical**



El secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental y cordón umbilical contiene microvesículas que liberan micropartículas como proteínas (transducción de señales y proteínas efectoras, receptores, citoesqueleto), lípidos, ácidos nucleicos (ARNm, microARN o miARN y ADN), citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Baglio *et al.*, 2015; Vizoso *et al.*, 2017). Además de su potencial de diferenciación, estas también pueden secretar un panel de factores de crecimiento y citoquinas con efectos directos en una variedad de mecanismos como la supresión del sistema inmunitario, la inhibición de la apoptosis, el aumento de angiogénesis y la estimulación de células adyacentes a los tejidos. (Shen *et al.*, 2015). Hay suficiente evidencia para demostrar que la única vía importante por la cual las MSCs participan en la reparación y regeneración de tejidos es por medio de su secretoma. Al mismo tiempo, un gran número de investigaciones se ha centrado en la caracterización del secretoma del MSCs incluyendo tanto factores solubles como factores liberados en vesículas extracelulares, por ejemplo, exosomas y microvesículas (Vijay *et al.*, 2016).

El término exosoma generalmente se refiere a una clase específica de vesícula extracelular unida a membrana lipídica caracterizada por un diámetro de 40 nm a 150 nm y una densidad de 1.09 g / ml a 1.18 g / ml. La evidencia creciente indica que las MSCs producen cantidades masivas de exosomas en comparación con otras células y está demostrando que muchas de las propiedades regenerativas acreditadas previamente a las células madre están mediadas a través de exosomas secretados (Vizoso *et al.*, 2017). En particular, los exosomas han recibido mucha atención en investigación ya que son una subclase de (nano) vesículas que se derivan de compartimentos intracelulares especializados conocidos como endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares (MVB). Existen muchos otros tipos de vesículas que presumiblemente se derivan de la membrana plasmática y se ha alcanzado un consenso para nombrar colectivamente estas vesículas de membrana extracelular (Baglio *et al.*, 2013).

Las microvesículas liberadas a partir de un tipo de célula dada pueden interactuar a través de ligandos de receptores específicos con otras células que transfieren proteínas, lípidos reactivos biológicos y receptores. (Schorey *et al.* 2008.; Morel *et al.*, 2004). Recientemente se ha demostrado que los MV también pueden transferir ARNm y microARN (miARN) lo que explica los cambios epigenéticos en las células diana. (Ratajczak J *et al.* 2006., Deregibus MC

*et al.*, 2007., Valadi H *et al.*; 2007). Las microvesículas se forman por brotes directos de la membrana plasmática y son más grandes que los exosomas (100 nm a 1000 nm). Estas muestran una gran cantidad de fosfatidilserina, colesterol, proteínas asociadas con balsas lipídicas, y están enriquecidas en colesterol, esfingomiélin y ceramida. La formación depende tanto de la activación del citoesqueleto como de la concentración intracelular de calcio (Monsel *et al.*, 2016). Tanto los exosomas como las microvesículas son liberados constitutivamente por múltiples tipos de células por estímulos fisiológicos o en respuesta a una lesión y contienen múltiples componentes celulares que pueden conducir la comunicación de célula a célula por medio de la transferencia de moléculas bioactivas que incluyen proteínas asociadas a endosomas, proteínas de membrana, lípidos y material genético (por ejemplo, ARNm y microARN) (Monsel *et al.*, 2016).

Se han identificado varios factores candidatos, que median los efectos terapéuticos del secretoma de las MSCs en la regeneración tisular incluido el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), derivado de plaquetas factor de crecimiento (PDGF-BB), proteína 4 similar a la angiopoyetina y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Kalinina *et al.*, 2015). El grupo funcional más grande del secretoma de MSCs está compuesto por proteínas, entre ellas, fibrilina 2, glypican 1, transcetolasa, reticulocalbina 2, peroxiredoxina 3, activista proteasoma subunidad 2 (PA28 beta), ADAMTS, Inhibidor de alfa (globulina) H2, Repeticiones como EGF y dominios tipo Discoidin I 3, ribonucleasa, familia RNasa A, 4 adrenomedullin, tirosina-proteína fosfatasa tipo no receptor sustrato 1 (SIPRA) (Kalinina *et al.*, 2015).

### **Métodos para analizar factores solubles secretados por células madre mesenquimales de médula ósea, pulpa dental, y cordón umbilical**

El proceso para analizar el secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea inició con la recolección de la muestra y aislandolas (por aspiración) sobre solución de *Ficoll-Hypaque*. Las células mononucleares se aislaron por centrifugación, se lavaron y se sembraron a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en un medio esencial mínimo (a-MEM) suplementado con suero bovino fetal al 10%. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub> con un cambio de medio de cultivo dos

veces por semana. Después del cultivo se encontró que la frecuencia de aislamiento era del 100%, la expansión de las células se analizó mediante el método de exclusión con azul tripán. En cada pasaje, se cultivaron células madre mesenquimales durante siete días; se disociaron con tripsina-EDTA, se contaron y se volvieron a sembrar con la densidad celular inicial (2000 células/cm<sup>2</sup>). El medio de cultivo se reemplazó dos veces por semana.

El número de PDT (tiempo de duplicación de la población) se calculó en función del número total de células en cada pasaje; la PDT se calculó para cada pasaje dividiendo el logaritmo del valor de aumento de doblaje obtenido al final del pasaje por el logaritmo de dos. Este procedimiento se repitió hasta que la célula no proliferó más y se llevó a cabo un conteo del número de células para calcular la PDT final. El tiempo de duplicación de la población (PDT) se examinó mediante la fórmula:  $(t - t_0) \cdot \log_2 / \log (N - N_0)$ , donde  $t - t_0$  es el tiempo de cultivo (h), N es el número de células recolectadas y  $N_0$  es el número de celdas en la inicial. Seguido a esto, se realizó un ensayo para identificar formación de colonias por unidad de fibroblastos (CFU-F) mediante la siembra de células en una placa de cultivo e incubando en humidificado 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. El medio de cultivo se intercambiaba cada 3 días y después de dos semanas se lavaron las placas dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijaron con metanol al 100% y se tiñeron con cristal violeta al 3%. Por último, se realizó un conteo del número de colonias (Hye *et al.*, 2013).

Se halló un protocolo para analizar el secretoma de las células madre mesenquimales de pulpa dental el cual parte de la recolección de la muestra (dientes con o sin raíces maduras) (Huang *et al.*, 2010). Los dientes recién extraídos se almacenaron en un medio de cultivo celular sin suero y se transportaron al laboratorio para su procesamiento. El tejido pulpar y la papila apical se extrajeron de los dientes, se seccionaron y se digirieron en una solución de 3 mg/ml de colagenasa tipo I y 4 mg/ml dispasa durante 30 minutos a 60 minutos a 37 °C. Las mezclas digeridas se pasaron a través de un filtro de células de 70 mm para obtener suspensiones de una sola célula. Estas se sembraron en placas de seis pozos y se cultivaron con un medio esencial suplementado con 15% a 20% de suero bovino fetal, 2 mM L - glutamina, 100 mM de ácido L-ascórbico-2-fosfato, 100 U/ml de penicilina-G, 100 mg/ml de estreptomicina y 0.25 mg/ml de fungizona y se mantuvieron en 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Las unidades de formación de colonias de células fibroblásticas se observaron normalmente

dentro de 1 a 2 semanas después de la siembra celular y se pasaron a una proporción de 1:3 cuando alcanzaron una confluencia del 80%.

Las poblaciones heterogéneas de DPSCs y SCAP se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido hasta el segundo pasaje. Las células se descongelaron y se expandieron para experimentación en el pasaje 3. Se suspendieron alícuotas celulares de SCAP y DPSCs en solución salina tamponada con fosfato (PBS) FBS al 0.1%, que contenía concentraciones de saturación (dilución 1:100) de los siguientes anticuerpos IgG1 de ratón conjugado, k anticuerpos anti-monoclonales humanos: CD14-PE, CD34-PE, CD45-FITC, CD73-PE, CD90-FITC y CD105-PE durante 1 hora a 48 °C. Las suspensiones celulares se lavaron dos veces y se resuspendieron en FBS al 0.1% = PBS para su análisis en un citómetro de flujo utilizando el software CellQuest Pro (BD Biosciences) (Huang *et al.*, 2010).

Para el análisis del secretoma de células madre mesenquimales de cordón umbilical se obtuvieron las muestras, las células mononucleares se aislaron con un gradiente *Ficoll Hystopaque* y se sembraron a una densidad de 250 000 células / cm<sup>2</sup>. Después de cuatro días se eliminaron las células no adherentes, se añadió medio fresco a los cultivos y se expandieron en medio esencial alfa-mínimo ( $\alpha$ -MEM) que contenía 100 U/ ml de penicilina, 100  $\mu$ g /ml de estreptomina y 10% de suero bovino fetal (FBS) o lisado de plaquetas al 5% (PL) y 10 U/ml de heparina en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. La expresión de marcadores de superficie de MSC típicos se analizó mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y se evaluó la capacidad de las MSC para experimentar diferenciación osteogénica mediante tinción con rojo de alizarina tras la inducción con ácido ascórbico, dexametasona y glicerofosfato  $\beta$ . Los exosomas se recolectaron de aproximadamente  $3.2 \times 10^7$  células en pasajes tempranos (pasajes 2–3).

Una vez que los cultivos de MSC alcanzaron una confluencia del 70%, las células se cultivaron durante 24 horas a 48 horas en  $\alpha$ -MEM que contenía FBS o PL con exosoma agotado. El FBS y el PL agotados en el exosoma se obtuvieron por centrifugación durante la noche a 70 000 x *g* a 4 °C. Los exosomas se aislaron como se describió anteriormente. Brevemente, el medio condicionado con MSC se centrifugó dos veces a 500 x*g* durante 10 minutos, dos veces a 2000 x *g* durante 15 minutos y dos veces a 10 000 x *g* durante 30 minutos. El sobrenadante se transfirió luego a tubos Ultra-Clear y se centrifugó a 70 000 x *g* durante 1 hora a 4 °C en un

rotor SW32Ti. El sedimento que contenía el exosoma se lavó con PBS y se centrifugó a  $70000\times g$  durante 1 hora. Luego el sedimento se suspendió cuidadosamente en 200  $\mu$ l de PBS y se usó inmediatamente o se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para el análisis de microscopía de barrido láser confocal, las células se sembraron en portaobjetos recubiertos de resina, fijados con paraformaldehído al 4%, permeabilizados con Triton-X 100 al 0.1% y bloqueados con FBS al 10% con PBS (30 minutos).

Los portaobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios contra CD63 o EEA1 y luego con anticuerpo de conejo anti-ratón isotiocianato de fluoresceína (FITC) (DAKO, Heverlee, Bélgica) para 30 minutos a temperatura ambiente. LysoTracker red (Molecular Probes, Bleiswijk, Países Bajos) se incubó con células vivas antes de la fijación. Todas las tinciones se obtuvieron con un microscopio Leica DMRB. Las imágenes se obtuvieron mediante exploración secuencial con el conjunto de orificios a 1AE (estándar). Los fluoróforos se excitaron utilizando líneas láser de 488 nm (FITC) y 561 nm (Blaglio *et al.*, 2015).

## **Conclusiones**

Los resultados muestran que el procedimiento de la preparación del medio condicionado tiene una gran influencia sobre la calidad del secretoma (diferenciación y proliferación de células). Se describió un protocolo para la evaluación del secretoma de las células madre mesenquimales de cordón umbilical, médula ósea y pulpa dental en donde se evidencia que cada tipo de MSCs requiere una preparación diferente. Existen diferentes métodos reportados en la literatura científica para caracterizar el secretoma sintetizado por las células madre mesenquimales; sin embargo, de acuerdo con la presente investigación, no se conoce cuál es el mejor método para detectar *in vitro* el mayor número de factores solubles, microvesículas y exosomas derivados de las células madre mesenquimales. Aunque la información obtenida hasta la fecha no brinda un conocimiento completo, se espera que con el desarrollo de próximas investigaciones se aclaren diversos aspectos biológicos para implementar su uso en medicina regenerativa.

## **Referencias**

1. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. PLoS One. 2014 Aug 12; 9 (8):e104662.

2. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004 Jul 23; 118(2):149-61.
3. Ashri NY, Ajlan SA, Aldahmash AM. Dental pulp stem cells. Biology and use for periodontal tissue engineering. *Saudi Med J*. 2015 Dec; 36(12):1391-9.
4. Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, Verweij FJ, Pérez Lanzón M, Zini N, Naaijken B, Perut F, Niessen HW, Baldini N, Pegtel DM. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Jul 1; 6: 127
5. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr; 36(4):568-84.
6. Beer L, Mildner M, Ankersmit HJ. Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: when regulatory affairs meet basic science. *Ann Transl Med*. 2017 Apr;5(7):170.
7. Cao C, Dong Y, Dong Y. Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2005 Aug; 19(8):642-7.
8. Chang YS, Choi SJ, Sung DK, Kim SY, Oh W, Yang YS, Park WS. Intratracheal transplantation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells dose-dependently attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Cell Transplant*. 2011; 20(11-12):1843-54.
9. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R, Xie J, Liu X, Qi S. Conditioned medium from hypoxic bone marrow- derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One*. 2014 Apr 29;9(4): e96161. ECollection
10. Clabaut A, Grare C, Léger T, Hardouin P, Broux O. Variations of secretome profiles according to conditioned medium preparation: The example of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Electrophoresis*. 2015 Oct; 36(20):2587-93. Epub 2015 Aug 21.
11. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2440-8.
12. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006 Apr;24(4):150-4.
13. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008 Nov 21;103(11):1204-19.

14. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010 Feb; 16(2):605-15.
15. Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, Butenko I, Pobeguts O, Efimenko A, Ageeva L, Sharonov G, Ischenko D, Alekseev D, Grigorieva O, Sysoeva V, Rubina K, Lazarev V, Govorun V. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Nov 11; 6: 221.
16. Kim DS, Kim JH, Lee JK, Choi SJ, Kim JS, Jeun SS, Oh W, Yang YS, Chang JW. Overexpression of CXC chemokine receptors is required for the superior glioma-tracking property of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Apr; 18(3):511-9.
17. Kim JY, Kim DH, Kim DS, Kim JH, Jeong SY, Jeon HB, Lee EH, Yang YS, Oh W, Chang JW. Galectin-3 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta42 neurotoxicity in vitro. *FEBS Lett*. 2010 Aug 20;584(16):3601-8.
18. Kim JY, Kim DH, Kim JH, Lee D, Jeon HB, Kwon SJ, Kim SM, Yoo YJ, Lee EH, Choi SJ, Seo SW, Lee JI, Na DL, Yang YS, Oh W, Chang JW. Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid- $\beta$  plaques. *Cell Death Differ*. 2012 Apr;19(4):680-91.
19. Kim SM, Kim DS, Jeong CH, Kim DH, Kim JH, Jeon HB, Kwon SJ, Jeun SS, Yang YS, Oh W, Chang JW. CXC chemokine receptor 1 enhances the ability of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells to migrate toward gliomas. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Apr 22;407(4):741-6.
20. Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A, Balain B, Richardson J, Roberts S. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *Biomed Res Int*. 2013:916136.
21. Monsel A, Zhu YG, Gudapati V, Lim H, Lee JW. Mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for acute lung injury and other inflammatory lung diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2016 Jul; 16(7):859-71.
22. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol*. 2004 May;11(3):156-64.
23. Oh W, Kim DS, Yang YS, Lee JK. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cell Immunol*. 2008 Feb; 251(2):116-23.

24. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2; 284(5411):143-7.
25. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006 May; 20(5):847-56.
26. Reinisch A, Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Bjelic-Radisic V, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D. Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Regen Med*. 2007 Jul;2(4):371-82.
27. Sabapathy V, Sundaram B, V M S, Mankuzhy P, Kumar S. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth. *PLoS One*. 2014 Apr 15;9(4):e93726.
28. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010 Mar 31; 28(3):585-96.
29. Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*. 2008 Jun; 9(6):871-81.
30. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development*. 2016 Jul 1; 143(13):2273-80.
31. Shen C, Lie P, Miao T, Yu M, Lu Q, Feng T, Li J, Zu T, Liu X, Li H. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Mol Med Rep*. 2015 Jul; 12(1):20-30.
32. Tan X, Gong YZ, Wu P, Liao DF, Zheng XL. Mesenchymal stem cell-derived microparticles: a promising therapeutic strategy. *Int J Mol Sci*. 2014 Aug 18;15(8):14348-63.
33. Teixeira F, Carvalho M, Panchalingam K, Rodrigues A, Mendes-Pinheiro B, Anjo S, Manadas B, Behie L, Sousa N, Salgado A. Impact of the secretome of human mesenchymal stem cells on brain structure and animal behavior in a rat model of parkinson's disease. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Feb; 6(2): 634–46.
34. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654-9.
35. Van Velthoven CT, Kavelaars A, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatr Res*. 2012 Apr;71(4 Pt 2):474-81.



36. Vijay B, Murali K, Ramesh B, Anjan K, Radhika P, Rajarshi P. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*. 2016 Jan; 18(1): 13–24.
37. Vishnubhatla I, Corteling R, Stevanato L, Hicks, C, Sinde, J. The development of stem cell-derived exosomes as a cell-free regenerative medicine. *J Circ Biomark*. 2014; 3:2
38. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 25;18(9). pii: E1852
39. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 2012 Apr 30; 5:19.
40. Yang C, Lei D, Ouyang W, Ren J, Li H, Hu J, Huang S. Conditioned media from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells efficiently induced the apoptosis and differentiation in human glioma cell lines in vitro. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:109389.

## 7. Referencias bibliográficas.

1. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *PLoS One*. 2014 Aug 12; 9 (8):e104662.
2. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004 Jul 23; 118(2):149-61.
3. Ashri NY, Ajlan SA, Aldahmash AM. Dental pulp stem cells. Biology and use for periodontal tissue engineering. *Saudi Med J*. 2015 Dec; 36(12):1391-9.
4. Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, Verweij FJ, Pérez Lanzón M, Zini N, Naaijken B, Perut F, Niessen HW, Baldini N, Pegtel DM. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Jul 1; 6: 127
5. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr; 36(4):568-84.
6. Beer L, Mildner M, Ankersmit HJ. Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: when regulatory affairs meet basic science. *Ann Transl Med*. 2017 Apr;5(7):170.
7. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(174):249-82.
8. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004;22(4):625-34.
9. Cao C, Dong Y, Dong Y. Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2005 Aug; 19(8):642-7.
10. Chang YS, Choi SJ, Sung DK, Kim SY, Oh W, Yang YS, Park WS. Intratracheal transplantation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells dose-dependently attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Cell Transplant*. 2011; 20(11-12):1843-54.
11. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R, Xie J, Liu X, Qi S. Conditioned medium from hypoxic bone marrow- derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One*. 2014 Apr 29;9(4): e96161. ECollection
12. Clabaut A, Grare C, Léger T, Hardouin P, Broux O. Variations of secretome profiles according to conditioned medium preparation: The example of human mesenchymal

- stem cell-derived adipocytes. *Electrophoresis*. 2015 Oct; 36(20):2587-93. Epub 2015 Aug 21.
13. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2440-8.
  14. European Association of Science Editors. Directrices de la EASE (European Association of Science Editors) para autores y traductores de artículos científicos publicados en inglés. *European Science Editing*. 2018; 44(4): e1 – e16.
  15. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006 Apr;24(4):150-4.
  16. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008 Nov 21;103(11):1204-19.
  17. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010 Feb; 16(2):605-15.
  18. Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, Butenko I, Pobeguts O, Efimenko A, Ageeva L, Sharonov G, Ischenko D, Alekseev D, Grigorieva O, Sysoeva V, Rubina K, Lazarev V, Govorun V. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Nov 11; 6: 221.
  19. Kim DS, Kim JH, Lee JK, Choi SJ, Kim JS, Jeun SS, Oh W, Yang YS, Chang JW. Overexpression of CXC chemokine receptors is required for the superior glioma-tracking property of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Apr; 18(3):511-9.
  20. Kim JY, Kim DH, Kim DS, Kim JH, Jeong SY, Jeon HB, Lee EH, Yang YS, Oh W, Chang JW. Galectin-3 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta42 neurotoxicity in vitro. *FEBS Lett*. 2010 Aug 20;584(16):3601-8.
  21. Kim JY, Kim DH, Kim JH, Lee D, Jeon HB, Kwon SJ, Kim SM, Yoo YJ, Lee EH, Choi SJ, Seo SW, Lee JI, Na DL, Yang YS, Oh W, Chang JW. Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid- $\beta$  plaques. *Cell Death Differ*. 2012 Apr;19(4):680-91.
  22. Kim SM, Kim DS, Jeong CH, Kim DH, Kim JH, Jeon HB, Kwon SJ, Jeun SS, Yang YS, Oh W, Chang JW. CXC chemokine receptor 1 enhances the ability of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells to migrate toward gliomas. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Apr 22;407(4):741-6.

23. Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A, Balain B, Richardson J, Roberts S. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *Biomed Res Int*. 2013;916136.
24. Monsel A, Zhu YG, Gudapati V, Lim H, Lee JW. Mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for acute lung injury and other inflammatory lung diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2016 Jul; 16(7):859-71.
25. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol*. 2004 May;11(3):156-64.
26. Oh W, Kim DS, Yang YS, Lee JK. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cell Immunol*. 2008 Feb; 251(2):116-23.
27. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2; 284(5411):143-7.
28. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006 May; 20(5):847-56.
29. Reinisch A, Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Bjelic-Radisic V, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D. Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Regen Med*. 2007 Jul;2(4):371-82.
30. Sabapathy V, Sundaram B, V M S, Mankuzhy P, Kumar S. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth. *PLoS One*. 2014 Apr 15;9(4):e93726.
31. Salem HK, Thiernemann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010 Mar 31; 28(3):585-96.
32. Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*. 2008 Jun; 9(6):871-81.
33. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development*. 2016 Jul 1; 143(13):2273-80.
34. Shen C, Lie P, Miao T, Yu M, Lu Q, Feng T, Li J, Zu T, Liu X, Li H. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Mol Med Rep*. 2015 Jul; 12(1):20-30.
35. Shi Y, Hou L, Tang F, Jiang W, Wang P, Ding M, Deng H. Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid. *Stem Cells*. 2005 May;23(5):656-62.

36. Tan X, Gong YZ, Wu P, Liao DF, Zheng XL. Mesenchymal stem cell-derived microparticles: a promising therapeutic strategy. *Int J Mol Sci.* 2014 Aug 18;15(8):14348-63.
37. Teixeira F, Carvalho M, Panchalingam K, Rodrigues A, Mendes-Pinheiro B, Anjo S, Manadas B, Behie L, Sousa N, Salgado A. Impact of the secretome of human mesenchymal stem cells on brain structure and animal behavior in a rat model of parkinson's disease. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Feb; 6(2): 634–46.
38. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvalld JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):654-9.
39. Van Velthoven CT, Kavelaars A, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatr Res.* 2012 Apr;71(4 Pt 2):474-81.
40. Vijay B, Murali K, Ramesh B, Anjan K, Radhika P, Rajarshi P. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy.* 2016 Jan; 18(1): 13–24.
41. Vishnubhatla I, Corteling R, Stevanato L, Hicks, C, Sinde, J. The development of stem cell-derived exosomes as a cell-free regenerative medicine. *J Circ Biomark.* 2014; 3:2
42. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 25;18(9). pii: E1852
43. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol.* 2012 Apr 30; 5:19.
44. Wexler SA, C Donaldson, P Denning-Kendall, C Rice, B Bradley, JM Hows. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol.* 2003; 121:368–374.
45. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvalld J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* 2013 May 27;2.
46. Yang C, Lei D, Ouyang W, Ren J, Li H, Hu J, Huang S. Conditioned media from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells efficiently induced the apoptosis and differentiation in human glioma cell lines in vitro. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:109389.