



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

**EXOSOMAS DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES: LA TERAPIA CELULAR
AVANZADA DEL MAÑANA.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ESTEFANÍA RODRÍGUEZ GARCÍA



CIUDAD DE MÉXICO

AÑO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: EVA DELIA CALDERÓN GARCIDUEÑAS

VOCAL: Profesor: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

SECRETARIO: Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO

1er. SUPLENTE: Profesor: SONIA MAYRA PEREZ TAPIA

2° SUPLENTE: Profesor: ARACELI MENDIETA RERGIS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**BASES DE DATOS ELECTRÓNICOS DE RECURSOS DIGITALES BRINDADOS
POR LA BIBLIOTECA DIGITAL UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

MASS EVA DELIA CALDERÓN GARCIDUEÑAS

SUSTENTANTE:

ESTEFANÍA RODRÍGUEZ GARCÍA

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO.....	5
CAPÍTULO 1. CÉLULAS MADRE.....	6
1.1 GENERALIDADES	6
1.2 CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS, FETALES Y ADULTAS	7
1.2.1 CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS	7
1.2.2 CÉLULAS MADRE FETALES.....	10
1.2.4 CÉLULAS MADRE ADULTAS	12
1.3 CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS MADRE POR SU POTENCIA.....	14
1.3.1 CÉLULAS MADRE TOTIPOTENTES	14
1.3.2 CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES	15
1.3.3 CÉLULAS MADRE MULTIPOTENTES	16
1.4 EL NICHO.....	16
1.4.1 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN.....	18
1.5 LA MÉDULA ÓSEA.....	26
1.5.1 CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS.....	28
1.5.2 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	31
CAPÍTULO 2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	32
2.1 HISTORIA.....	32
2.2 GENERALIDADES	32
CAPÍTULO 3. EXOSOMAS Y CULTIVO CELULAR.....	43
3.1 BIOGÉNESIS.....	43
3.2 COMPOSICIÓN	45
CAPÍTULO 4. OBTENCIÓN DE EXOSOMAS	52
4.1 ULTRACENTRIFUGACIÓN	53
4.2 EXCLUSIÓN POR TAMAÑO	54
4.3 PRECIPITACIÓN.....	55
4.4 POR AFINIDAD INMUNOLÓGICA	56
CAPÍTULO 5. CALIDAD Y CONTROL	58
5.1 WESTERN BLOTTING.....	58

5.2 CITOMETRÍA DE FLUJO	59
5.3 ANÁLISIS DE SEGUIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS	60
5.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	61
5.5 SALAS GMP	62
CAPÍTULO 6. APLICACIONES CLÍNICAS	66
6.1 PATOLOGÍAS RENALES.....	67
6.2 PATOLOGÍAS HEPÁTICAS	68
6.3 PATOLOGÍAS PULMONARES	69
6.4 HERIDAS CUTÁNEAS	70
6.5 PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES	71
6.6 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.	72
6.6.1 ALZHEIMER.....	72
VISIÓN A FUTURO	77
CONCLUSIONES.....	79
Referencias.....	81

INTRODUCCIÓN

Las células madre han sido por años la esperanza de la medicina regenerativa. En un principio se esperaba que las células madre, ayudadas por su impresionante capacidad de autorenovación y diferenciación, fuesen la clave para tratar enfermedades como la cardiopatía isquémica, afecciones cerebrovasculares o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). A medida que aumenta la información respecto a las células madre, se conocen las ventajas y desventajas de trabajar con un tipo u otro de células madre, por ejemplo, se pensaba que las células madre embrionarias resultarían primordiales para la terapia basada en células por su potencial pluripotente, pero los problemas éticos que conlleva trabajar con células derivadas de embriones y la falta de seguridad por la posible formación de tumores frenó la investigación con estas células. En 2006 se crearon células madre pluripotentes a partir de células adultas, a las cuales llamaron células madre pluripotentes inducidas (iPSC), con este gran avance se demostró que se pueden devolver las propiedades de autorrenovación y diferenciación de una célula madre a una célula adulta y así eliminar el problema ético que frenó la investigación con células embrionarias. Pero las iPSC contienen genes relacionados con cáncer, como el gen c-Myc, que tiene el potencial de convertir a algunas células en cancerosas, además, plantearon que podrían ocurrir mutaciones durante la reprogramación, debido a esto, se ha frenado la investigación con estas células para su uso en la clínica.

En los últimos años ha cambiado el paradigma para la terapia basada en células, pues en lugar de utilizar como tratamiento la aplicación de células madre en el tejido dañado y que éstas se diferencien a células de dicho tejido para repararlo, hoy, después de muchos estudios y un profundo análisis de estos, muchos científicos concuerdan que los resultados obtenidos se deben principalmente a la acción paracrina de las células madre. Se observó que al administrar células madre a un tejido dañado, son pocas aquellas que se

diferencian para reparar el tejido, al contrario, las células madre en ciertas condiciones secretan moléculas con propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, anti-apoptóticas y pro-angiogénicas, las cuales proporcionan el microambiente propicio para que las células propias del tejido y las células inmunes presentes, dirijan una orquesta de señales cuyo fin es reparar al tejido dañado para recuperar la homeostasis tisular.

En el presente trabajo se describirán los tipos de células madre, por su potencia y su forma de obtención, así como las propiedades de las mismas, haciendo hincapié en las células madre mesenquimales. Después, se profundizará en todo lo relacionado con los exosomas, la biogénesis de los mismos, su composición y métodos de obtención, finalizando con las aplicaciones clínicas para conocer el amplio campo de estudio y aplicación de las vesículas bioactivas más prometedoras hasta el momento.

OBJETIVO

Recopilar y analizar la información presente en las bases de datos electrónicas acerca de los exosomas de las células madre mesenquimales, para conocer su aplicación en estudios clínicos que puedan convertirse en tratamientos viables para padecimientos crónico-degenerativos que hasta el momento no cuentan con curación.

CAPÍTULO 1. CÉLULAS MADRE

1.1 GENERALIDADES

Las células madre son la materia prima para el desarrollo de un ser vivo, la formación de órganos y tejidos, así como para la reparación de los mismos. Se definen como células indiferenciadas, inmaduras, autorrenovables y con una gran capacidad de diferenciación [1]. Una célula indiferenciada no tiene la capacidad de realizar tareas especializadas de tejido. Por ejemplo, no pueden transportar oxígeno a los tejidos como lo hacen los glóbulos rojos o no pueden producir insulina como las células β del páncreas, pero pueden producir células especializadas para realizar estas tareas gracias a su capacidad de diferenciación. El proceso de diferenciación y autorrenovación son fundamentales y característicos de las células madre, ambos se llevan a cabo por medio de la división celular asimétrica. La división celular asimétrica consiste en que, cuando una célula madre se divide, una de las células hijas mantendrá el linaje de célula madre mientras que la otra se diferenciará a una célula más especializada dependiendo del microambiente en el que se encuentren las células madre. Esto permite que se mantenga un número de células madre constante y se puedan producir células especializadas cada vez que el órgano o tejido lo necesite [2].

Aunque la autorrenovación es asombrosa, no ocurre todo el tiempo ni es igual en todos los tejidos, puede pasar mucho tiempo sin que las células madre se dividan lo que conoce como estado quiescente. Señales internas y externas activan el proceso de diferenciación, estas señales incluyen sustancias químicas secretadas por otras células, interacciones célula-célula con células vecinas y ciertas moléculas presentes en el microambiente. Gracias a estas señales se mantiene un equilibrio entre el estado quiescente y la división celular [3]. Así, en órganos como el intestino y la médula ósea, las células madre se dividen regularmente para reparar y reemplazar tejido desgastado

o dañado [4] [5], mientras que en otros órganos como el páncreas y el corazón las células madre solo se dividen en condiciones especiales.

1.2 CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS, FETALES Y ADULTAS

Las células madre se dividen, según su origen, en células madre embrionarias, células fetales y células madre adultas.

1.2.1 CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Las células madre embrionarias se obtienen a partir de la masa celular interna del blastocisto, un embrión de 150 células aproximadamente producidas por división celular. El blastocisto se forma de 3 a 5 días después de la fecundación del óvulo; está formado por una cavidad blastocística con líquido también llamada blastocoel, una capa externa de células llamada trofotodermo, del cual se formará el tejido extraembrionario, y la masa celular interna. Este último es un conjunto de células las cuales proliferan y se diferencian para formar a un organismo [6].

Los blastocistos humanos se pueden obtener de embriones donados por clínicas de fertilización *in vitro* con previo consentimiento informado de la donante. Cuando los embriones creados con fines reproductivos no se implantaron en el útero y son donados para la investigación, es necesario seleccionar a las células de la masa celular interna por métodos inmunológicos y purificar a las células madre embrionarias humanas. En el laboratorio, las células madre embrionarias se colocan en medios de cultivo de fibroblastos cuya mitosis ha sido suprimida con rayos gamma, los cuales cuentan con todos los factores necesarios para que estas proliferen [7].

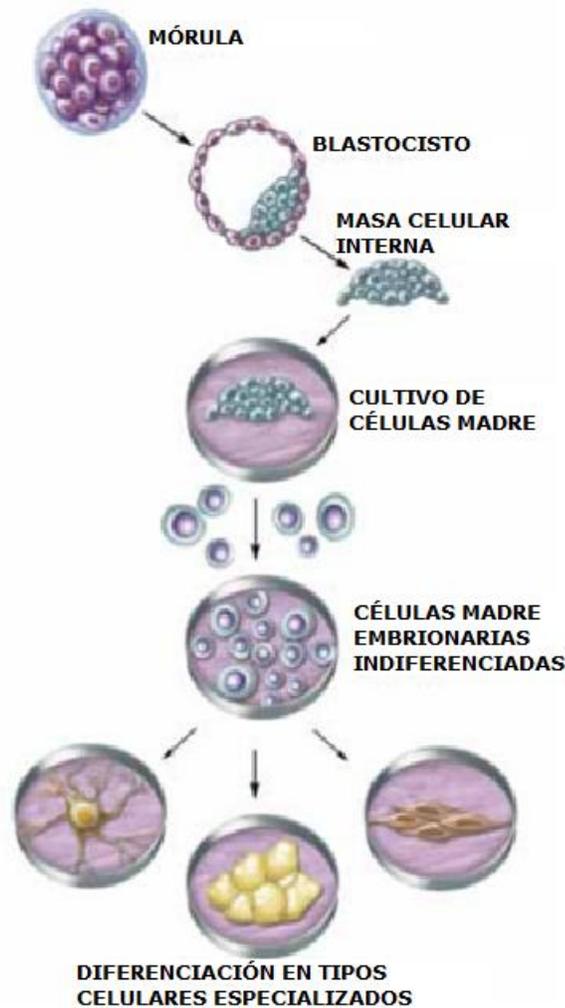


Figura 1. Esquema demostrativo de la obtención de las células madre embrionarias y su posterior diferenciación. Imagen tomada y editada de: *Understanding stem cells. An overview of the science and issues from the national academies.*

Una gran cualidad de las células madre embrionarias es que pueden autorrenovarse a largo plazo, es decir, se dividen y aumentan en número por largos periodos de tiempo, de meses a años, sin diferenciarse a células especializadas. Además, son capaces de generar las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo, pero no pueden generar tejido extraembrionario como placenta, amnios, saco vitelino, alantoides y corion [8].

Para que las células madre embrionarias se diferencien son necesarios factores de diferenciación y ciertas condiciones de cultivo. Por ejemplo, para diferenciar *in vitro* a las células madre embrionarias humanas en progenitores de células Beta pancreáticas, se utiliza activina A, ciclopamina, factor de crecimiento de queratinocitos / factor de crecimiento de fibroblastos (KGF / FGF7), Noggin, Wnt3A, heregulina-1 β , entre otros [9]. Así, utilizando factores de diferenciación y condiciones de cultivo específicos, se pueden generar diversos tipos de células diferenciadas como hepatocitos, células dendríticas, células hematopoyéticas, progenitores epiteliales del timo y progenitores de cardiomiocitos. Debido a esta capacidad de diferenciación e ilimitada autorrenovación, las células madre embrionarias se han considerado como una herramienta prometedora para el estudio de enfermedades, para la medicina regenerativa y para probar fármacos; sin embargo, su uso genera dilemas éticos [10]. Algunas personas como embriólogos y médicos consideran que la vida de un individuo inicia con la fecundación del óvulo, por lo tanto, el embrión utilizado para la investigación es una persona. Otros argumentan que, si el embrión no se ha implantado en el útero, o lo que es lo mismo, se encuentra en etapa de preimplantación, no es más que un grupo de células que no posee estado moral de individuo [11]. Por estas razones el trabajo con células madre embrionarias genera polémica, aún si puede ser un recurso para buscar tratamiento a enfermedades como la cardiopatía isquémica, afecciones cerebrovasculares o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), que, según la OMS, se encuentran dentro de las primeras cinco enfermedades que causaron más muertes en el mundo en 2016 [12].

Otro gran problema que ha frenado la inclusión de las células madre embrionarias humanas a la clínica es que son propensas a anomalías genéticas y epigenéticas, el riesgo de tumorigenicidad resulta peligroso para el tratamiento basado en células así que se utilizan principalmente para probar

fármacos, aun así, la estabilidad génica de las células en cultivo debe ser verificada periódicamente. [13]

1.2.2 CÉLULAS MADRE FETALES

Las células madre fetales incluyen a las células madre derivadas de la gelatina de Wharton, de la sangre de cordón umbilical, de la placenta y del líquido amniótico [14]. Este tipo de células madre son de gran interés para la medicina regenerativa puesto que su obtención es fácil, sin riesgo para la donante y sin preocupaciones éticas ya que se obtienen a partir de desechos médicos o, en el caso del líquido amniótico, por procesos como amniocentesis, amniorreducción o por cesárea programada, donde la primera es una prueba prenatal común [15].

El cordón umbilical humano está formado por el epitelio amniótico, tres secciones de gelatina de Wharton que rodean a una vena y dos arterias. La gelatina de Wharton funciona como soporte vascular y más importante aún, evita que los vasos del cordón umbilical se compriman durante el movimiento del feto dentro del útero, garantizando así una fuente de alimento constante [16].

La gelatina de Wharton se considera como una gran fuente de células mesenquimales puesto que solo se compone de estas, donde 1 de cada 300 células es una célula madre mesenquimal. Comparándolo con la médula ósea, donde además de albergar muchos tipos de células, 1 de cada 10 000 a 100 000 células es una célula madre mesenquimal, se puede decir que la gelatina de Wharton es, en cuestión de dosis y facilidad de obtención, mejor fuente que la médula ósea. [17]

En la sangre de cordón umbilical se pueden encontrar células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales y células madre multipotentes no hematopoyéticas las cuales expresan SSEA-4, OCT₄, SOX₂,

y NANOG [18]. Las células aisladas de la gelatina de Wharton y las células madre mesenquimales de sangre de cordón umbilical comparten propiedades como la diferenciación, baja aparición de problemas injerto contra huésped, alta tasa de proliferación y largo mantenimiento de los telómeros, lo que se traduce en un mayor número de pasajes antes de la senescencia celular [19].

La placenta es un órgano temporal que se forma en la interfaz fetomaternal, está formada por amnios, placas coriónicas y decidua, funciona como una barrera; en ella se encuentran las células epiteliales amnióticas humanas, células madre mesenquimales de placenta y en las vellosidades de la placenta se encuentran las células progenitoras mesenquimatosas multipotentes perivasculares. Las células madre mesenquimales de la placenta tienen la misma propiedad de adherencia al plástico y de expansión, de hecho, se expanden más rápido in vitro que las células madre mesenquimales adultas, además de ser más inmunosupresoras y menos inmunogénicas. [20] Se obtienen por separación mecánica y posterior digestión enzimática. Han demostrado ser eficaces para limitar el daño tisular al inhibir la proliferación de linfocitos, antagonizar la maduración de células dendríticas, evitar la liberación de citocinas inflamatorias y promover el cambio de los macrófagos de tipo 1 proinflamatorios (M1) a tipo 2 inmunoreguladores M2. [21].

En el líquido amniótico el feto se moverá libremente dentro del útero, este recubre al feto y actúa como vehículo para el intercambio de sustancias químicas de la madre con el feto. Está compuesto principalmente por agua y electrolitos, pero también contiene sustancias químicas como glucosa, lípidos, proteínas, hormonas y enzimas, además de sustancias suspendidas y células que se derivan del tejido extraembrionario, embrionario y fetal. En el líquido amniótico se encuentran células madre de líquido amniótico (AFS Cells), se caracterizan por la expresión del antígeno de superficie c-kit (CD117). Aunque las células AFS se definen como multipotentes, expresan marcadores de células madre pluripotente; Oct 4 y NANOG, y pueden diferenciarse en células

de las tres capas embrionarias, aunque las células del segundo y tercer trimestre están más comprometidas con el linaje mesodérmico en comparación de las células del primer trimestre. Han demostrado que no generan tumores cuando se administran sin diferenciar en modelos de ratas inmunodeficientes, por este motivo algunos autores definen su fenotipo celular como intermedio, entre células madre embrionarias y células madre mesenquimales [22].

Las células AFS se pueden obtener por procedimientos de rutina como la amniocentesis a la segunda semana de gestación, por amniorreducción a la tercer semana o a través de una cesárea programada. Se sabe que se encuentran en mayor número a mitad de la gestación, se pueden aislar por selección inmunológica a través de citometría de flujo, seleccionando a las células CD117⁺ que son aproximadamente el 1% del total de células del líquido amniótico [23]. Las células AFS clonales se expanden rápidamente en cultivo, manteniendo una longitud de telómeros constante, indicando una alta tasa de proliferación [24].

1.2.4 CÉLULAS MADRE ADULTAS

Las células madre presentes en un organismo, desde que nace hasta que muere, reciben el nombre de células madre adultas o células madre somáticas. Estas células son capaces de renovarse y diferenciarse como cualquier célula madre, pero a diferencia de las células madre embrionarias, pueden generar células específicas de su linaje para renovar tejidos o reparar daño. Se sabe que en todos los tejidos existen células madre, pero no en todos se puede obtener la misma cantidad ni con la misma facilidad [25], como la médula ósea, que contiene al menos tres poblaciones de células madre; las células madre hematopoyéticas (HSC por sus siglas en inglés Hematopoietic Stem Cells), células madre mesenquimales (MSC por sus siglas en inglés Mesenchymal Stem Cells) y células progenitoras endoteliales (EPC Endothelial

Progenitor Cells) [26], en el presente trabajo se explicará con mayor detalle sobre las HSC y las MSC. Otro ejemplo son las células satélite presentes en las fibras musculares, estas células cumplen con la función de crecimiento y reparación del músculo esquelético [27], células madre gástricas presentes en el estómago, las células madre epidérmicas en piel, etc. Cabe señalar que las células madre somáticas excluyen a las células germinales, como son el óvulo y el espermatozoide.

Las células madre adultas pueden dar lugar a:

1.- Diferentes células de un mismo linaje. Por ejemplo, las HSC son capaces de generar todos los linajes de la sangre, como son eritrocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, productos de la especialización de células madre mieloides, así como células T, células B, megacariocitos y plaquetas, productos de la especialización de células madre linfoides.

2.- Un solo tipo de célula como las células satélite que se diferencian en mioblastos, estos en miocitos, que posteriormente se especializan a fibras musculares contráctiles. Son relativamente raras de encontrar puesto que ocupan porcentajes pequeños en los tejidos que albergan. Por ejemplo, las células satélite comprenden el 5% de las células nucleadas presentes en las fibras musculares, mientras que, en el corazón de ratón, por cada 30 000 a 40 000 cardiomiocitos hay 1 célula madre cardiaca.

Dependiendo de donde se encuentren, las células madre adultas presentarán poca actividad proliferativa o se renovarán constantemente. Se cree que la baja actividad proliferativa sirve para minimizar errores en el ADN cuando ocurre la división celular, ya que las células madre adultas son las células de respaldo de los tejidos, además de que se conserva la capacidad proliferativa de las células madre. En tejidos como hígado, páncreas y pulmón,

las células madre adultas mantienen un estado quiescente en situación de homeostasis, pero cuando el tejido presenta daño, aumenta la actividad proliferativa. Por otro lado, en la epidermis y el epitelio intestinal se renuevan constantemente, así como la sangre [28], el cual se considera como el tejido que más se regenera produciendo 1×10^{12} células diariamente [29].

1.3 CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS MADRE POR SU POTENCIA.

La potencia de las células madre se refiere a la capacidad variable para generar distintos tipos de células especializadas. Gracias a que las células se diferencian en células especializadas, cada célula resultante cumplirá con una función específica.

Las células madre se clasifican en tres grandes grupos según su potencia: células madre totipotentes, células madre pluripotentes y células madre multipotentes

1.3.1 CÉLULAS MADRE TOTIPOTENTES

Una célula madre totipotente tiene la capacidad de generar un organismo completo, para esto debe ser capaz de crear [30]:

- I. tejido embrionario, el cual se compone de las tres capas embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo).
- II. tejido extraembrionario, conformado por placenta, amnios, saco vitelino, alantoides y corion.

Las únicas células consideradas totipotentes son el cigoto, la primera célula formada por la fecundación del óvulo; los blastómeros, producto de las primeras divisiones de cigoto; y las células de la mórula.

1.3.2 CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

Por otro lado, las células madre pluripotentes pueden generar tejido embrionario, pero no pueden crear tejido extraembrionario. Las células madre embrionarias son un ejemplo de células pluripotentes [31].

En 2006 Shinya Yamanaka reportó otro tipo de célula madre pluripotente, el cual recibió el nombre de célula madre pluripotente inducida (iPS Cell). En el experimento inicial tomó células de la piel de ratón adulto y las infectó con un virus, el cual transportaba 24 genes. Después de una exhaustiva selección, Yamanaka determinó que, de esos 24 genes, 4 genes: Oct3 / 4, Sox2, Klf4 y c-Myc eran los necesarios para retroceder a una célula diferenciada adulta a un estado similar al de la célula madre embrionaria; solo un año más tarde derivó células madre pluripotentes inducidas humanas haciéndose acreedor a la mitad del premio nobel de medicina o fisiología en el 2012 el cual compartió con el británico John Gurdon. Las iPS cells son capaces de autorrenovarse y diferenciarse en casi cualquier tejido, con excepción del tejido extraembrionario como las células madre embrionarias [32].

El descubrimiento de estas células puso a volar la imaginación de médicos y científicos, se pensaba que al tomar células adultas de un paciente, se podrían regresar al estado de célula pluripotente y, de esta forma, crear las células del tejido necesario para tratar al paciente con la gran ventaja que serían células propias (trasplante autólogo), eliminando así la enfermedad de tejido contra huésped, la necesidad de inmunosupresión y los problemas éticos que representa trabajar con células madre embrionarias o fetales [33], pero no se ha resuelto el principal problema que trae consigo el uso de las células madre pluripotentes en la clínica: la formación de teratomas. Hoy en día se utilizan iPS Cells principalmente para el modelado de enfermedades, para probar la eficacia de fármacos, así como medir su toxicidad [34].

1.3.3 CÉLULAS MADRE MULTIPOTENTES

Las células madre multipotentes tienen la capacidad de diferenciarse en los diferentes tipos de células dentro de un mismo linaje, por ejemplos las células madre hematopoyéticas dan lugar a macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, plaquetas, eritrocitos, linfocitos T y B, célula NK y plasmocitos, otro ejemplo son las células madre mesenquimales, que se encuentran en todo el cuerpo y dependiendo de la capa germinal de la que deriven pueden especializarse a células de hueso, cartílago, tendones, ligamentos, músculo y médula ósea. Las células madre multipotentes son más especializadas que las células madre pluripotentes, pero aún conservan las características de autorrenovación y diferenciación que caracteriza a las células madre, además, tienen la gran ventaja de que su obtención no genera problemas éticos y que en algunos casos son fáciles de obtener, por ejemplo, a través de una liposucción, de desechos médicos como las antes mencionadas células madre derivadas de la gelatina de Wharton, de sangre de cordón umbilical, de placenta, sangre periférica movilizada con el factor de crecimiento de granulocitos y aunque es un método invasivo, del aspirado de médula ósea [35].

1.4 EL NICHOS

Las células madre se localizan en un lugar específico que ayuda a mantener la homeostasis y el equilibrio entre actividad e inactividad. Este lugar, mejor conocido como "nicho", es un microambiente de tejido capaz de albergar y mantener a una o más células madre. Se ha propuesto que otras células ayudan a mantener este microambiente, por ejemplo, el nicho de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea, esta soportado por células endoteliales, osteoblastos y células madre mesenquimales, entre otras [36]. Por medio de factores solubles, biofísicos y mecánicos, vías de señalización, interacciones célula-célula e interacciones célula-matriz extracelular, se

regulan los estímulos de diferenciación y de apoptosis, se evita una producción excesiva de células madre para evitar la formación de teratomas, así como la activación periódica de las células madre para producir progenitoras o células de amplificación de tránsito. Dependiendo del órgano de origen de las células madre, se ejercerán diferentes vías de señalización las cuales ayudarán al mantenimiento de las células madre o a la diferenciación de estas [28].

Las interacciones célula-célula son de suma importancia para mantener el nicho y la homeostasis celular, se dan a través de proteínas, por ejemplo, la N-cadherina se encarga la unión entre las células madre hematopoyéticas y los osteoblastos, la M-cadherina une a las células satélite y a la fibra muscular, estas interacciones influyen en la división celular de las células madre y, por lo tanto, afectan la proliferación. El otro tipo de interacción es entre células madre y la matriz extracelular, la cual destaca por ser un entorno vital para el desarrollo, la función y la reparación de un tejido. La matriz extracelular es una red tridimensional que engloba a todos los órganos, tejidos y células que componen a un organismo, gracias a que es un entorno dinámico, biofísico, mecánico, bioquímico y específico de cada tejido, ayuda a la supervivencia, proliferación, diferenciación, y movilización de las células madre. Se compone por proteínas como colágeno, elastina, lamininas, fibronectina, entre otras, donde el colágeno y la elastina, principalmente, forman la estructura de la matriz extracelular, mientras que las lamininas, fibronectinas y otras proteínas interactúan con macromoléculas de la matriz extracelular y con moléculas de adhesión de las células adyacentes, como las integrinas, para modular señales de proliferación, autorenovación o localización de las células madre [37].

En la matriz extracelular también se encuentran factores que, dependiendo de su gradiente de concentración, activarán las vías de señalización que modularán la autorrenovación y proliferación de las células madre. Entre los factores se encuentran citocinas como el factor de células madre (SCF),

tirosina cinasa-3 similar a FMS, trombopoyetina (TPO), factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), la familia TGF- β , el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o biomoléculas como ácido retinoico, óxido nítrico, activina- A, entre otros.

1.4.1 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

Las vías de señalización también forman parte de esta compleja regulación de la actividad de las células madre por el nicho, las más destacadas son:

-Wnt / β -catenina: La β -catenina está involucrada no solo en esta vía, también en la adhesión célula-célula. Cuando el ligando Wnt no se une al receptor Frizzled (FZD), la β -catenina se encuentra tanto en las uniones célula-célula, ayudado por la E-cadherina y la actina asociada al citoesqueleto, así como en el citoplasma celular; ahí, un complejo de destrucción formado por la proteína Axin, la proteína APC (ademásomatous polyposis coli), la caseína cinasa 1a (CK1a) y la glucógeno sintasa cinasa 3 β (GSK3 β) fosforila a la β -catenina secuencialmente en el dominio N-terminal, esta serie de fosforilaciones permite que la ubiquitina ligasa reconozca a la β -catenina, finalmente la ubiquitina promoviéndola su degradación por el proteasoma. La vía se activa cuando Wnt se une al complejo transmembrana formado por FZD y el co-receptor LRP5-LRP6, cuando esto ocurre varias proteínas se unen al co-receptor LRP6 incluida Axin, esta unión no permite la fosforilación de la β -catenina, por lo que aumentará su concentración citoplasmática. Al aumentar la cantidad de la β -catenina, esta se trasladará al núcleo donde regulará la expresión de genes diana. Los genes diana codifican principalmente para proteínas involucradas en la proliferación [38] (figura 2).

En médula ósea esta vía regula la autorrenovación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas, así como el desarrollo óseo promoviendo la

diferenciación osteoblástica e inhibiendo la diferenciación de las células madre mesenquimales a adipocitos y condrocitos [39]. En las HSC, esta vía es importante para la autorrenovación de las células madre del intestino y las células madre neurales, además, gracias a la interferencia biológica entre esta vía y la vía Notch se define el destino de las células madre de folículo piloso en la piel [37].

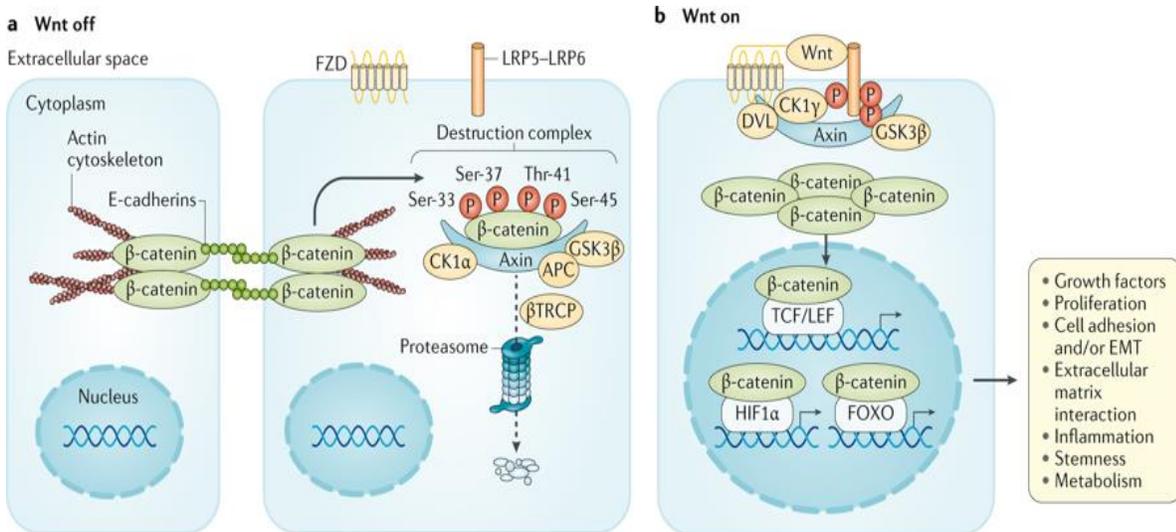


Figura 2. Vía de señalización Wnt/ β -catenina. Del lado izquierdo, con el título: a Wnt off, se observa la vía apagada, sin el ligando Wnt, lo que conlleva a la destrucción de la β -catenina por parte del proteasoma. Del lado derecho, con el título: b Wnt on, se observa la vía activa, donde el ligando Wnt se une al complejo FZD/LRP5-LRP6 inhibiendo la destrucción de la β -catenina, esto permite el aumento en la concentración intracelular de β -catenina, y su posterior traslado al núcleo, activando genes diana de proliferación. Imagen tomada de: *Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.*

-BMP: Las proteínas morfogénicas óseas forman parte de la superfamilia de proteínas del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). La vía se lleva a cabo a través de dos receptores tipo 1 y dos receptores tipo 2, los cuales son receptores transmembrana con un dominio intracelular de serina / treonina cinasa. Cuando la proteína morfogénica ósea (BMP) se une a los receptores tipo 2, estos fosforilan a los receptores tipo 1 activándolos, posteriormente estos reclutan y fosforilan a las R-SMAD específicas de la vía (SMAD1, SMAD5, SMAD8) los cuales pueden formar trímeros con SMAD4 y translocarse al núcleo donde regulan la expresión génica mediante su unión

con cofactores como Runx2, Dlx5 y Osx. En la ruta no dependiente de SMAD, el TAK1 fosforilado recluta a TAB1 para iniciar la vía de señalización, en la cual, finalmente, MAPK fosforila a Runx2, Dlx5 y Osx para promover su actividad transcripcional. [40] (figura 3)

Esta vía de señalización es crítica durante la embriogénesis principalmente para la formación del mesodermo y el desarrollo cardíaco. También ayuda a mantener la homeostasis del tejido adulto mediando procesos como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis, ejemplo de esto es su papel crucial en la reparación de fracturas, formación de cartílago y remodelación vascular, así como la regulación de la proliferación de HSC en médula ósea, promoviendo la autorrenovación de las células madre del folículo piloso y la diferenciación de las células madre neurales (NSC) en células de astrocitos, mientras que la inhibición de esta vía promueve la diferenciación de las NSC hacia neuronas [41].

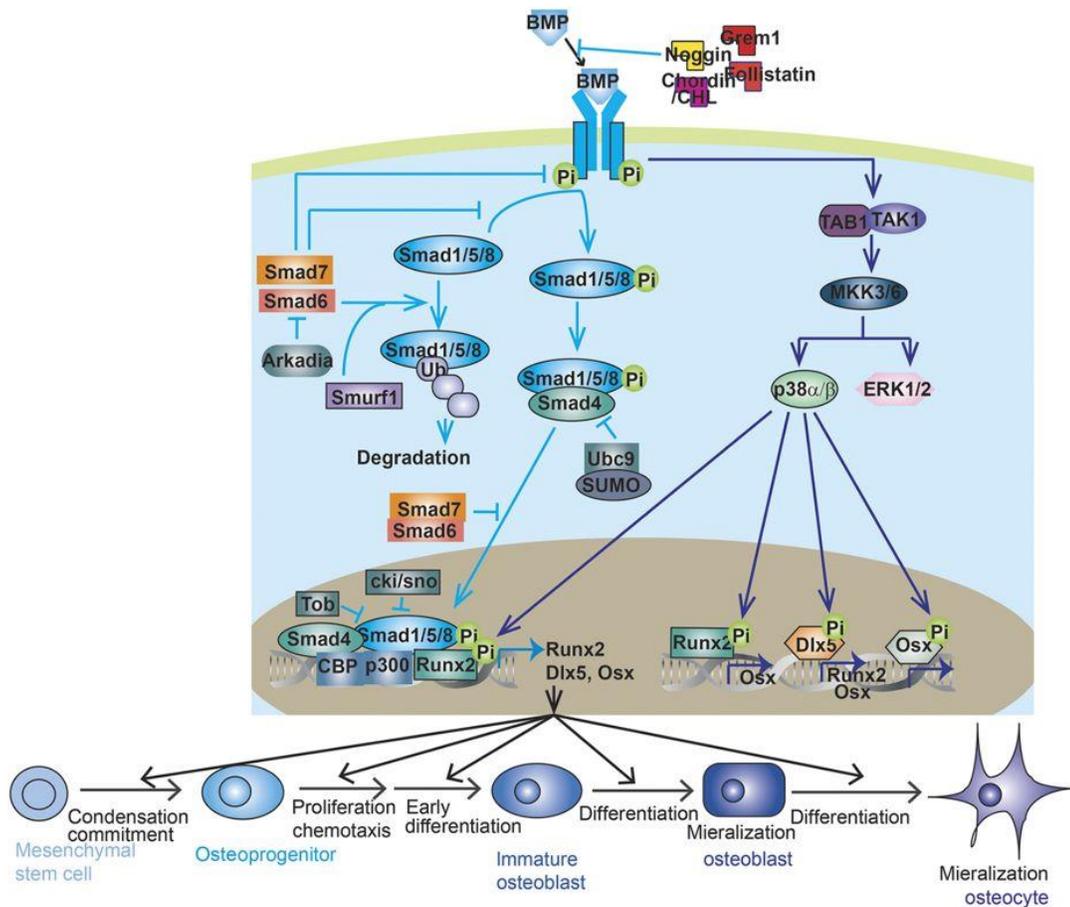


Figura 3. Vía de señalización BMP. BMP se une al receptor tipo 2, el cual fosforila al receptor tipo 1, y este fosforila a Smad1/5/8, el cual forma un trímero con Smad4, y se translocará al núcleo para regular genes diana a través de cofactores como Runx2, Dlx5 y Osx. En la vía no dependiente de Smad, por medio de la fosforilación de TAK1 y TAB1, se activa una cascada de señalización que concluye en la activación por medio de fosforilaciones de los cofactores Runx2, Dlx5 y Osx y posterior regulación de la expresión de genes por parte de estos cofactores. Imagen tomada de: *TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. Bone Research.*

-Notch: Esta vía tiene lugar en la interacción célula-célula por medio de receptores Notch (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4) y cinco ligandos de la familia Delta - Serrate - Lag. El receptor Notch contiene una región extracelular donde se encuentra el dominio de unión a ligando, además de una porción transmembrana y una porción intracelular denominado ICN la cual generará las respuestas posteriores a la activación de la vía. Al producirse la interacción ligando-receptor, da como resultado una escisión proteolítica en el sitio S2 del dominio extracelular mediada por la desintegrina y metaloproteinasas, seguido por la escisión S3 en la porción transmembrana

mediada por la γ -secretasa. Después de las escisiones S2 y S3, el ICN se libera de la membrana plasmática y se transloca al núcleo, ahí desplaza a los represores transcripcionales que están unidos al factor de transcripción de la familia Re1A RBPJ (recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region) en vertebrados cuando la vía está inactiva. Una vez unido al factor de transcripción de la familia Re1A RBPJ, se reclutan co-activadores y se promueve la transcripción de genes unidos por el complejo RBPJ. Cuando la vía se encuentra inactiva, en la región extracelular, la región reguladora negativa (NRR) bloquea el sitio de escisión S2, evitando así que se lleve a cabo la señalización por medio del ICN [42]. (figura 4)

La activación de esta vía está implicada en la autorrenovación de las células madre hematopoyéticas y de las células madre neurales, así como en la diferenciación de las células madre gástricas en células epiteliales gástricas, la diferenciación de las células progenitoras epiteliales, de las HSC y de las células madre de la pulpa dental [43].

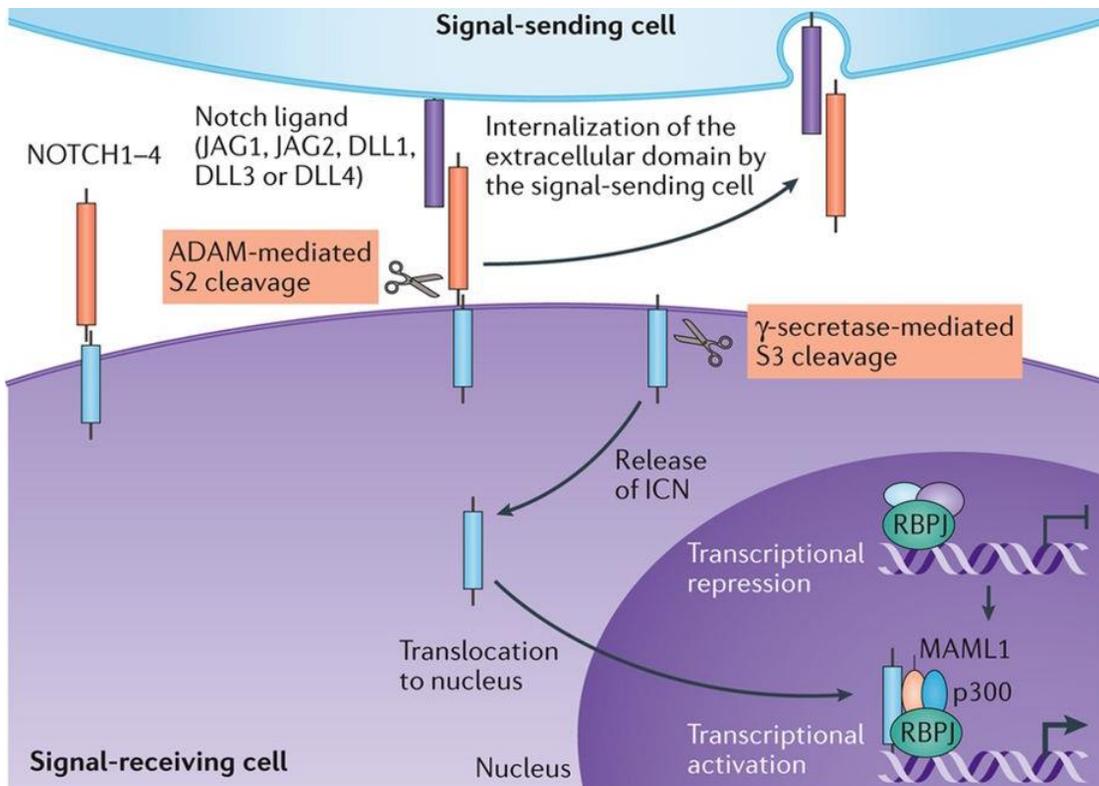


Figura 4. Vía de señalización Notch. Se presenta la cascada de señalización a través del contacto célula-célula. Después de la unión ligando-receptor, se llevan a cabo dos escisiones en los sitios S2 y S3, en ese orden, esto permite que el dominio intracelular de Notch (ICN) se transloque al núcleo, desplazando a los represores transcripcionales, permitiendo así la transcripción de los genes diana. Imagen tomada de: *Notch as a tumour suppressor. Nature Reviews Cancer.*

-SHH: Cuando esta vía se encuentra apagada, es decir, cuando la proteína Sonic Hedgehog (SHH) no está unida al receptor de superficie transmembrana Patched 1 (PTCH1), este último no permitirá que la proteína Smoothened (Smo) se ancle a la membrana plasmática. Si la proteína Smo no se une a la membrana plasmática la vía se encontrará bloqueada puesto que la activación de Smo es esencial para la señalización posterior. Además de la represión de Smo por PTCH1, la segunda proteína de mayor importancia, la proteína Gli (Gli1, Gli2, Gli3), se encontrará bloqueada por una serie de fosforilaciones por parte de cinasas como PKA, CK1 y GSK3 β , creando a la forma reprimida de Gli (GliR) por ciertos cortes en la proteína, asimismo la proteína Gli se encontrará unida al complejo (Costal 2) Cos 2/KiF7 y a SuFu los cuales secuestran a la

proteína Gli promoviendo también la formación de GliR. GliR viajará al núcleo e inhibirá la transcripción de los genes diana [44].

La vía SHH comienza cuando la proteína Sonic Hedgehog (Shh) perteneciente a la familia HH, se une al receptor de superficie transmembrana Patched 1 (PTCH1) esto permitirá que la proteína transmembrana Smo se ancle a la membrana plasmática y se active por medio de una fosforilación. Posteriormente, Smo reclutará al complejo Cos 2 /KiF7, KiF7 bloqueando la función de SuFu, liberando a la proteína Gli, y evitando el corte que promueve la formación de GliR. La proteína Gli se mantendrá activa al no cortarse y viajará al núcleo para promover la transcripción de los genes diana como Ptc, Wg y Dpp. [45] (figura 5)

La vía de señalización SHH se activa en los tejidos adultos principalmente después de una lesión promoviendo la proliferación celular en el páncreas exocrino, la próstata y la vejiga, ya que activa genes proliferativos de células madre como MYC, ciclina D1, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF2) y BMI1 [46]. Es vista como una de las vías más importantes en la embriogénesis [45]. La aberración en la regulación y transducción de esta vía se ha relacionado con defectos de nacimiento, de regeneración de tejidos, de renovación de células madre y de crecimiento de cáncer. También es importante en la diferenciación de los progenitores de las neuronas motoras ya que se ha demostrado que la inhibición de la vía SHH detiene su diferenciación [47], así como en la homeostasis ósea puesto que se activa después de una fractura promoviendo la diferenciación, proliferación y formación de los osteoclastos así como en la vascularización [48].

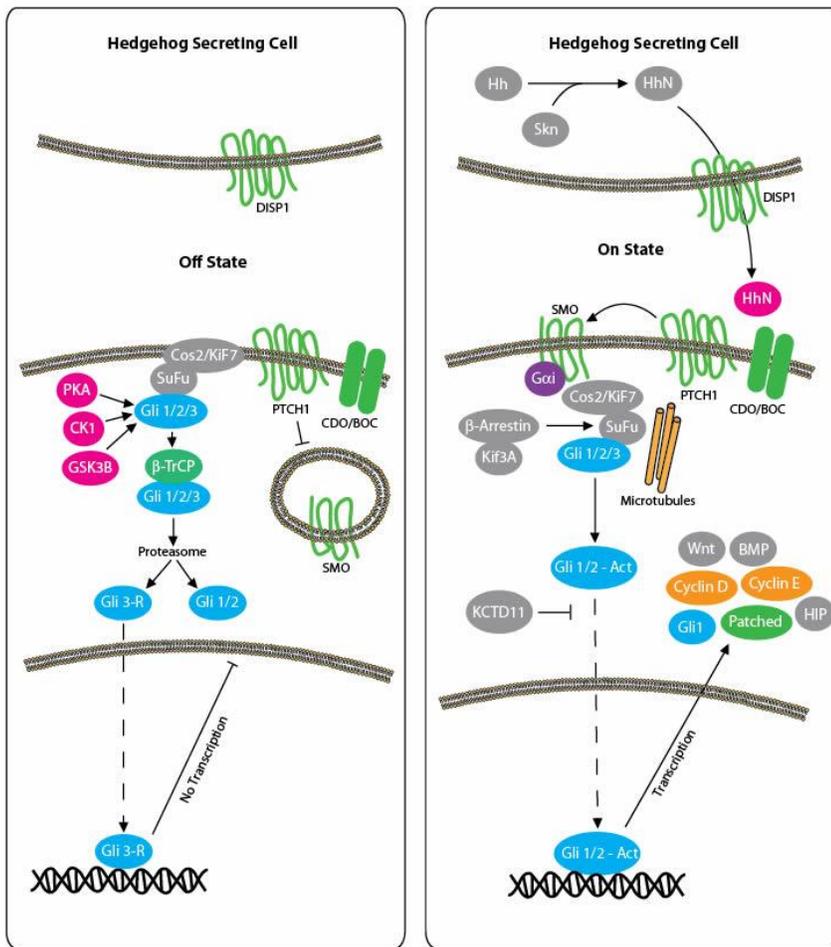


Figura 5. Vía de señalización SHH. Lado izquierdo OFF STATE: Cuando esta vía se encuentra apagada, el receptor PTCH1 (patch 1) no permite que la proteína Smo (Smoothened) se ancle a la membrana plasmática, además la proteína Gli se mantiene secuestrada por el complejo Cos2/Kif7 y SuFu, Gli se fosforila por ciertas cinasas como PKA y CK1 promoviendo cortes en la proteína, creando la forma reprimida de la proteína Gli, GliR. Lado derecho ON STATE: Cuando el ligando SHH se une a la proteína PTCH1, este libera la represión de Smo permitiendo que se ancle a la membrana plasmática, que se active por medio de una fosforilación y que reclute a SuFu junto con el complejo Cos2/Kif7 liberando a la proteína Gli sin escindir manteniendo su forma activa. Gli activa viajará al núcleo para promover la transcripción de los genes diana. Imagen tomada de: **Novus Biologicals a biotechnne brands**, <https://www.novusbio.com/hedgehogpathway.html> 22 de mayo del 2019.

La información anterior se resume en la siguiente tabla:

Tabla 1. Resumen de las vías de señalización destacadas presentes en el nicho. Células madre hematopoyéticas (HSC); Células madre intestinales (ISC); Células madre neurales (NSC); Células madre mesenquimales (MSC); Células madre del folículo piloso (HFSC); Células madre gástricas (GSC); Células madre de la pulpa dental (DPSC)

VÍA DE SEÑALIZACIÓN	LA ACTIVACIÓN DE ESTA VÍA PROMUEVE:		
	Autorrenovación	Diferenciación	Otra
WNT / B-CATENINA	- HSC, ISC, NSC	- De HSC a células sanguíneas maduras. - De MSC a osteoblastos.	- Desarrollo óseo inhibiendo la diferenciación de MSC a adipocitos y a condrocitos.
BMP	- HSC, HFSC	- De MSC a condrocitos.	- Embriogénesis. - Formación del mesodermo.
NOTCH	- HSC, NSC	- De GSC a células epiteliales gástricas. - De HSC y de DPSC	
SHH	-HSC	- De MSC a osteoclastos	- Promueve la diferenciación

Gracias a la comprensión de las células madre y sus nichos se han podido desarrollar nichos artificiales para crear entornos similares y con esto, tener mejor control en los cultivos y mejor conocimiento de las vías de señalización necesarias para mantener por más tiempo a las células madre en cultivo. También y aún más interesante, se podrían crear terapias específicas dirigidas al nicho [49].

1.5 LA MÉDULA ÓSEA

La médula ósea es un sitio altamente dinámico, siendo el principal órgano hematopoyético y un tejido linfoide primario en el adulto. Constituye del 4% al 6% del peso corporal. Los huesos humanos están compuestos por hueso cortical o compacto, el cual rodea al hueso trabecular o esponjoso (figura 4).

Dentro de los espacios que se forman en el hueso trabecular se encuentra la médula ósea, será medula ósea roja en aquellos huesos que producen células sanguíneas, y médula amarilla en los demás huesos. Ambas médulas están irrigadas por numerosos vasos sanguíneos que reciben el nombre de sinusoides. [50]

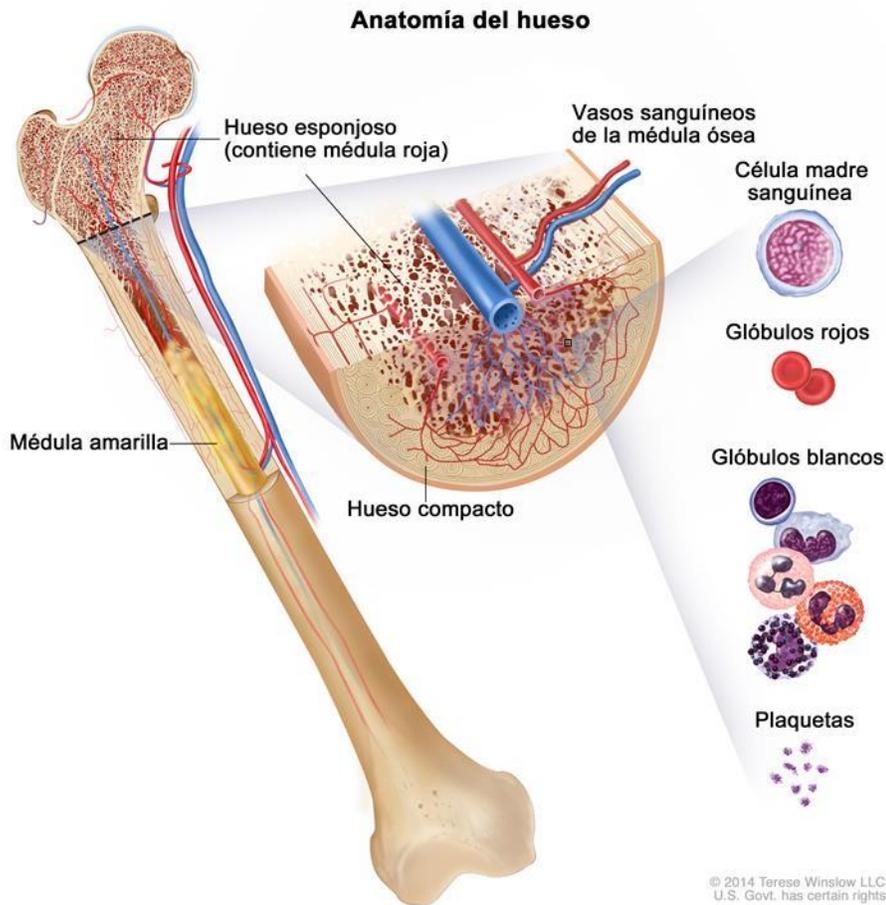


Figura 6. Imagen ilustrativa de la ubicación de la médula ósea. Imagen tomada de: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/cancer-de-la-medula-osea>. El día 17 de mayo de 2019.

La medula roja es altamente hematopoyética, se encuentra en el hueso esponjoso, principalmente en las vértebras, las caderas y en los huesos largos. La médula roja está compuesta por un componente hematopoyético (parénquima) y un componente vascular (estroma). El parénquima contiene células madre hematopoyéticas y a los descendientes celulares de éstas, además de megacariocitos. El estroma contiene todas las células no

hematopoyéticas, incluidas las células madre mesenquimales, las cuales apoyan al correcto desarrollo de las células sanguíneas maduras [51]. La médula amarilla está compuesta mayormente por adipocitos, se encuentra principalmente en las cavidades centrales de los huesos largos, estas cavidades reciben el nombre de cavidad medular. Al nacer, toda la médula se compone de médula roja y a medida que pasan los años, ésta se va sustituyendo por médula amarilla. Los adipocitos de la médula amarilla sirven como fuente de energía en tiempos de inanición severa [50].

La función primaria de la médula ósea es la hematopoyesis, que etimológicamente significa formación de sangre (*hema*, "sangre"; *poiesis*, "formación"). La médula ósea comienza la producción sanguínea a partir del cuarto mes de gestación y continúa trabajando durante toda la vida de la persona. La sangre es el tejido que más se regenera en el cuerpo, este se compone de glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y factores solubles. La médula ósea produce diariamente cerca de 200 000 millones de eritrocitos y 10 000 millones de leucocitos a través del proceso hematopoyético, por lo cual se considera a la médula ósea como un tejido altamente activo. [51].

1.5.1 CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

Las células madre hematopoyéticas (HSC) son las responsables de la hematopoyesis, proceso por el cual se formarán las células sanguíneas de un organismo durante toda su vida. Cada célula sanguínea cumple con una función importante en el organismo, los eritrocitos transportan oxígeno y CO₂, las plaquetas regulan la coagulación sanguínea y los granulocitos junto con los monocitos son indispensables para librar batallas contra los invasores que día a día atacan al cuerpo, como bacterias, virus, hongos y parásitos [52]. Además de tener diferentes funciones, el tiempo de vida media de cada una también es variable, por ejemplo, los eritrocitos viven 120 días aproximadamente, mientras que los neutrófilos viven aproximadamente de 24 a 48 horas, por lo

tanto, es de suma importancia que la hematopoyesis se desarrolle de forma continua y controlada. Las propiedades de autorrenovación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas son estrictamente controladas tanto positiva como negativamente a través de factores intrínsecos y extrínsecos, donde el nicho de las HSC en la médula ósea es uno de los reguladores de mayor importancia [53] (Figura 7).

Las células madre hematopoyéticas son pequeñas células similares a linfocitos, de forma esférica, con poco citoplasma y con pocos organelos celulares, se les reconoce por marcadores inmunofenotípicos tales como Lineage⁻ CD34⁺ CD38⁻ c-kit⁺ y carecen de marcadores de células diferenciadas como de granulocitos, monocitos o de eritrocitos. Las primeras HSC que aparecen en el organismo con la capacidad de regenerar a todo el sistema sanguíneo se encuentran en la región aorta-gonadal-mesonefros durante la embriogénesis, aunque se sabe que la hematopoyesis primitiva tiene lugar en el saco vitelino, tras la aparición de los primeros eritrocitos que suministran oxígeno al embrión, esto convierte a la placenta en un importante reservorio de HSC. Cuando se forman los vasos sanguíneos, las HSC migran al hígado fetal donde se autorrenovarán aumentando en número y se diferenciarán para dar lugar a las diferentes células sanguíneas, con el paso del tiempo las HSC migrarán y se alojarán en la médula ósea por medio de quimioatrayentes tales como CXCL12 secretado por las células estromales de la médula ósea que atraerán a las HSC que expresen CXCR4, entre otras moléculas de adhesión [54]. Las HSC se conocen por ser una población celular rara, puesto que en humanos del 0.005% - 0.01% de las células nucleadas presentes en la médula ósea son células madre hematopoyéticas, esto quiere decir que 1 de cada 10,000 células en la médula ósea es una célula madre hematopoyética, también se encuentran en cantidades más pequeñas en el bazo, el hígado, el músculo y la grasa [53]. En la médula ósea, las células madre hematopoyéticas se encuentran en condiciones de hipoxia relativa, un estado

favorable para la quiescencia celular, donde ciertas señales específicas dadas por factores internos y externos provocarán la activación de las HSC para que se diferencien o se autorrenueven [50].

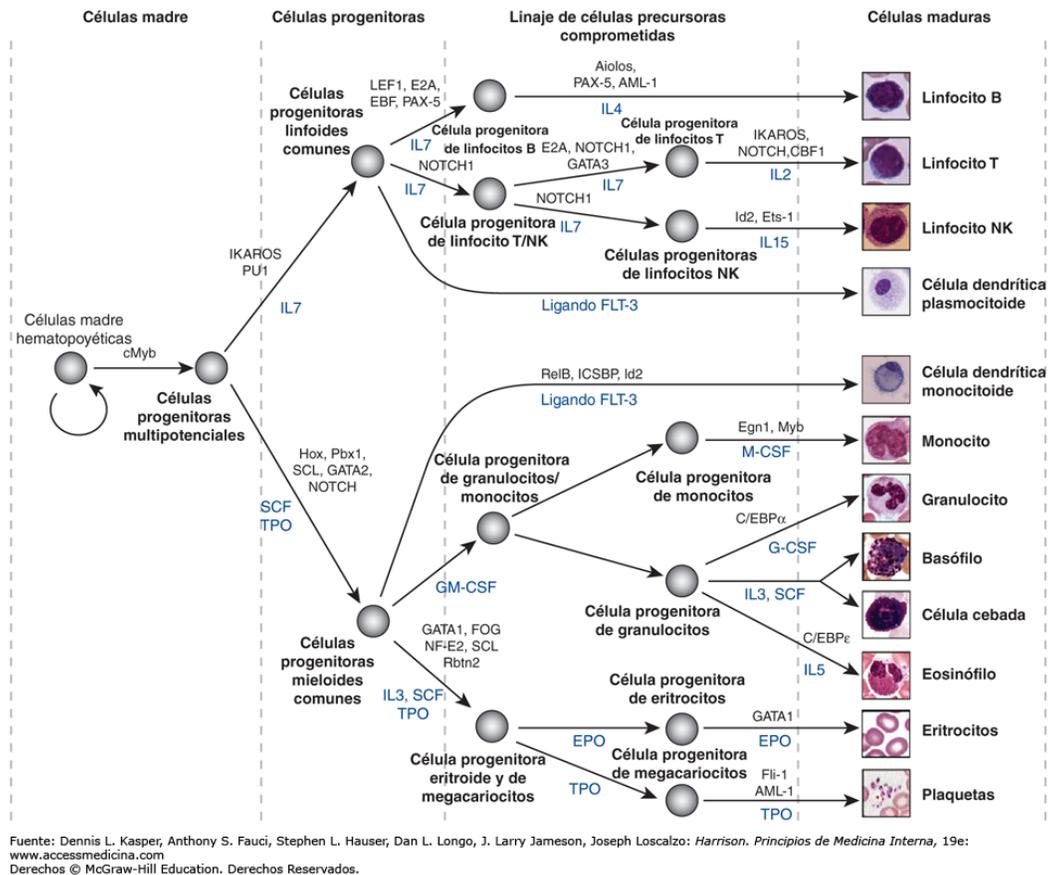


Figura 7 Esquema de la hematopoyesis incluyendo los factores, las vías y las citocinas necesarios para la diferenciación desde las HSC hasta las diferentes células maduras. Imagen obtenida de *Harrison: Principios de medicina interna, 19 edición*.

Las HSC han sido de gran ayuda en el trasplante de médula ósea, desde que en 1968 se informó del éxito de un trasplante alogénico para un paciente pediátrico con síndrome de inmunodeficiencia grave [55]. Desde entonces se han reportado trasplantes tanto autólogo como alogénicos exitosos. Ambos trasplantes tienen sus pros y sus contras, por ejemplo, en el trasplante autólogo no se produce la enfermedad de injerto contra huésped pues, dado que las células infundidas son propias del paciente no se genera reacción

inmunitaria; para este tratamiento la médula ósea se obtiene del paciente, se purifican las células madres, se criopreservan y se reinfunden en el paciente en el momento adecuado. El porcentaje de éxito del trasplante autólogo resulta del 80%. Por otro lado, en el trasplante alogénico se pretende que el donador sea un miembro de la familia compatible con el HLA del paciente, el hecho de que las células no sean del paciente puede generar la enfermedad de injerto contra huésped (GvDH por sus siglas en inglés), por lo que se inmunosuprime al paciente antes y después del tratamiento, este tipo de trasplante es exitoso de un 60% a 70% dependiendo del emparejamiento donante-receptor [55]. El trasplante de médula ósea se utiliza en enfermedades como mieloma múltiple, un tipo de cáncer de la médula ósea donde se producen células plasmáticas anormales, linfoma de Hodgkin donde se forman células malignas en el sistema linfático, leucemia y otros tipos de neoplasias malignas [56].

Las células madre hematopoyéticas pueden aislarse a partir de aspirado de médula ósea, de sangre de cordón umbilical y de sangre periférica movilizada por el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), aunque por cuestión de dosis se sigue prefiriendo a la médula ósea [57].

1.5.2 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales se identificaron por primera vez en la médula ósea, se sabe que en ese tejido son las responsables de mantener el nicho de las células madre hematopoyéticas, además, se diferencian en adipocitos, condrocitos y osteoblastos, estas últimas también son importantes en el mantenimiento de las HSC. Se revisarán en profundidad en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO 2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

2.1 HISTORIA

En 1968 Friedenstein y colaboradores describieron a las células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea de ratón como células similares a fibroblastos adherentes al plástico [58], así comenzó la investigación de estas células. Aunque en ese entonces Friedenstein no les dio el nombre por el que se les conoce ahora, en su trabajo publicado en la revista *Transplantation* llamado "*Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues*", las mencionaba como células precursoras para los tejidos osteogénicos o células madre osteogénicas. En trabajos posteriores las cultivó y obtuvo colonias, siendo el primero en aislar a las células madre mesenquimales, además se dio cuenta que las células derivadas de estas colonias no solo se diferenciaban *in vitro* en osteocitos, también en condrocitos y adipocitos, y por último fue de los primeros en pensar que estas células modificaban el microambiente de los tejidos hematopoyéticos [59]. Tiempo después en 1991 se propuso el nombre de células madre mesenquimales por Caplan ya que se dio cuenta que estas células son capaces de diferenciarse en muchos tipos de células del tejido conectivo.

2.2 GENERALIDADES

El mesénquima según la Real Academia Española se define como el tejido conectivo embrionario a partir del cual se forman los tejidos musculares y conectivos del cuerpo, así como los vasos sanguíneos y linfáticos [60]. Todos los anteriores derivan del mesodermo, una de las tres capas germinales en la embriogénesis, motivo por el cual, las células madre mesenquimales se pueden diferenciar en cualquier tipo de células de dicho linaje como grasa

(adipocitos), cartílago (condrocitos), células de hueso (osteoblastos), cardiomiocitos, miocitos, entre otros.

Las células mesenquimales son células madre multipotentes, adherentes al plástico, no hematopoyéticas. Dado que el mesénquima es prácticamente omnipresente en el cuerpo, estas células se han encontrado en casi todos los tejidos adultos incluida la médula ósea, el tejido adiposo, pulpa dental, músculo liso, músculo esquelético y cardíaco, hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, páncreas, periostio, membrana sinovial, dermis, pericitos, hueso trabecular, pulmón, sangre periférica movilizada, ligamento periodontal, líquido amniótico, la gelatina de Wharton, en sangre de cordón umbilical y en la placenta [61].

Debido a sus múltiples fuentes de obtención, el Congreso de la *International Society of Cellular Therapy* estableció en 2006 los criterios mínimos para considerar a una célula como célula madre mesenquimal, entre los que se incluyen [62]:

- a. Permanecer adherentes al plástico en condiciones de cultivo estándar.
- b. La expresión de CD166, CD105, CD73 y CD90, así como niveles variables de STRO-1, CD29, CD44, CD71, CD271 Y GD2.
- c. Carecer de la expresión de antígenos hematopoyéticos, CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19, y MHC tipo II.
- d. Diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos in vitro.

Es importante hacer hincapié en la falta de MHC II y de las moléculas coestimuladoras CD40, CD40L, CD80 y CD86 además de la baja expresión de MHC I ya que esto garantiza que el trasplante de células madre mesenquimales provenientes de un ser humano diferente al paciente, llamado trasplante alogénico, se realice sin inmunosupresión ni la aparición de la enfermedad de injerto contra huésped [63].

La función principal de las moléculas codificadas a partir del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es unir péptidos antigénicos y presentarlos a los linfocitos T, para que sean reconocidos a través del receptor antigénico T (TCR). Existen dos tipos de moléculas, las de clase I y las de clase II, estas difieren estructural y funcionalmente. Las moléculas de clase I están formadas por una cadena transmembrana llamada α (alfa) unida no covalentemente a una pequeña proteína extracelular llamada β 2-microglobulina, la proteína α forma un espacio llamado hendidura peptídica donde se unen péptidos derivados de proteínas del citosol, sean propios o de algún patógeno, como es el caso de infección por virus, bacterias y parásitos que entran y se albergan en las células [64]. Estos son degradados y los péptidos pequeños resultantes se cargan en las moléculas de clase I, los cuales serán llevados posteriormente a la superficie celular, si los antígenos son propios no se dañará a la célula, pero si se detecta algo extraño, las células T CD8⁺ o citotóxicas destruirán a la célula para eliminar al virus o patógeno que se encuentra en el interior de estas [65]. Las moléculas de clase II están formadas de dos cadenas transmembranales, una alfa y una beta, los extremos de ambas cadenas formarán la hendidura peptídica donde se unirán péptidos derivados de proteínas presentes en las vesículas, sean propias o de algún patógeno que haya sido endocitado, así cuando las células presentadoras de antígeno (APC), como las células dendríticas o los macrófagos, endocitan a algún cuerpo extraño, las proteínas serán cortadas hasta ser fragmentos de una longitud de hasta 25 aminoácidos. Posteriormente el péptido se cargará en la hendidura peptídica y el complejo molécula clase II-péptido migrará a la superficie celular. Las APC se dirigirán a los tejidos linfáticos secundarios donde se presentarán dichos antígenos a las células T CD4⁺ las cuales, por medio de moléculas como IL-2 o IFN gamma, activarán a los linfocitos T CD8⁺ y aumentarán la expresión de las moléculas del MHC propio para dar aviso de la invasión y que la respuesta se intensifique [66]. Las moléculas clase I están presentes en todas las células nucleadas del

organismo, al contrario, solo las células presentadoras de antígeno cuentan con moléculas clase II [67].

En el alotrasplante se reconocen dos vías de rechazo al injerto, la vía directa que depende de la presentación de las moléculas clase II ajenas por parte de las APC del donante a los linfocitos T CD4⁺ del receptor y la vía indirecta donde los antígenos presentados por las APC del receptor son las moléculas del HLA del donante entre otras moléculas altamente antigénicas. Se sabe que las células T con aloreactividad directa son de entre el 1 al 10% del total de las células T, por lo que es de esperar que la magnitud de la respuesta ante antígenos provenientes de moléculas del HLA sea marcadamente más intensa que la generada por otros antígenos extraños. Por estas razones se considera que la vía directa es la ruta dominante en el rechazo agudo de injertos [68].

A las células madre mesenquimales se les ha dado el título de inmunoprivilegiadas porque, al no tener moléculas de clase II, evaden a los linfocitos T CD4⁺ quienes, al no poder unirse con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, no pueden dar aviso del tejido ajeno al cuerpo. A esto se suma su gran inmunomodulación, gracias a mecanismos de contacto célula-célula y factores secretados, las células madre mesenquimales tienen la capacidad de fomentar cambios funcionales de monocitos/macrófagos, células dendríticas, células T, células B, y células Natural Killer (NK) [69] (figura 8).

Los macrófagos/monocitos presentan dos fenotipos, el M1 o proinflamatorio y el M2 o antiinflamatorio. El cultivo de macrófagos con MSC aumenta los niveles de CD206, la producción y secreción de IL-10, la citoquina de mayor poder antiinflamatorio, siendo estos indicadores del fenotipo M2, esto por la liberación del antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1RA) por parte de las MSC que se sabe promueve el cambio de los macrófagos al

fenotipo antiinflamatorio, además de aumentar la capacidad fagocítica mejorando la tolerancia a señales de inflamación [70]. Sumado a esto las MSC secretan IL-6 y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), disminuyendo los niveles de IL-12, citocina proinflamatoria secretada por las APCs, Factor de Necrosis Tumoral Alpha (TNF- α) se secreta principalmente por macrófagos activados provocando la posterior activación de la respuesta inmune, IL-1 α citocina proinflamatoria, así como disminución del HLA-DR disminuyendo la cantidad de moléculas del MHC tipo II y así evitando la presentación de antígeno por los macrófagos a los linfocitos T CD4⁺ [71].

Por otra parte, las células dendríticas (CD) fagocitan antígenos, activando posteriormente a células NK, linfocitos T y B. Cuando se cultivan en un entorno proinflamatorio junto con las MSC, se observa una disminución de moléculas del MHC de clase II y de moléculas coestimuladoras como CD40 y CD80/86 dirigiendo a la célula dendrítica a un fenotipo inmaduro (iCD), también disminuye la producción del TNF- α y IL-12, además de aumentar la producción de IL-10 generando un ambiente antiinflamatorio [71].

Las MSC suprimen a las células T activadas, sean CD4⁺, CD8⁺, T $\gamma\delta$ o CD4⁺CD8⁺. Las MSC provocan un cambio de Th1 proinflamatorio a Th2 antiinflamatorio además de facilitar la formación de Treguladoras CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ [72] a través de la liberación del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) y la liberación del ligando-18 de quimiocinas CC (CCL-18) inducible por parte de los monocitos por la IL-10, quienes también liberan TGF- β 1. Gracias a esto se inhibe la producción de INF- γ , TNF- β , IL-1 β e IL-6 por parte de las células Th1, promoviendo la producción y secreción de IL-2 e IL-10 de las células en Th2. También en cultivo se ha demostrado que pueden convertir a las Th17 de IL-17A⁺ a Treg IL-17A⁻ FoxP3⁺ inhibiendo la producción de IL-17, IL-17F, IL-21, IL-22 y disminuyendo la expresión del receptor CCR6, un receptor que ayuda a las Th17 a migrar a los

sitios de inflamación por quimiotaxis [73]. Las células madre mesenquimales secretan de forma constitutiva indoleamina-2,3-dioxigenasa o IDO el cual agota triptófano, aminoácido necesario para la expansión de las células T, sin él, aumenta la secreción de IL-4 en las células Th2 disminuyendo la producción de INF- γ (interferón gamma) por las células Th1. Las MSC producen Galectina 1 y semáfora-3^a que inhiben la proliferación de las células T deteniéndolas en la fase G1 [74].

Las células B también cuentan con un estado regulador Breg el cual se desencadena por la producción de IL-1RA el cual por un lado inhibe la diferenciación de las células B en plasmocitos y por el otro lado dirige la diferenciación de las células B hacia células B reguladoras las cuales secretan IL-10 ayudando a la conversión de los linfocitos T CD4⁺ en Treg CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ [70]. Y finalmente las células madre mesenquimales también pueden inhibir fuertemente la proliferación de las células NK por la secreción de Prostaglandina E2 (PGE2), IDO, TGF- β 1, IL-6 y óxido nítrico (NO) [74].

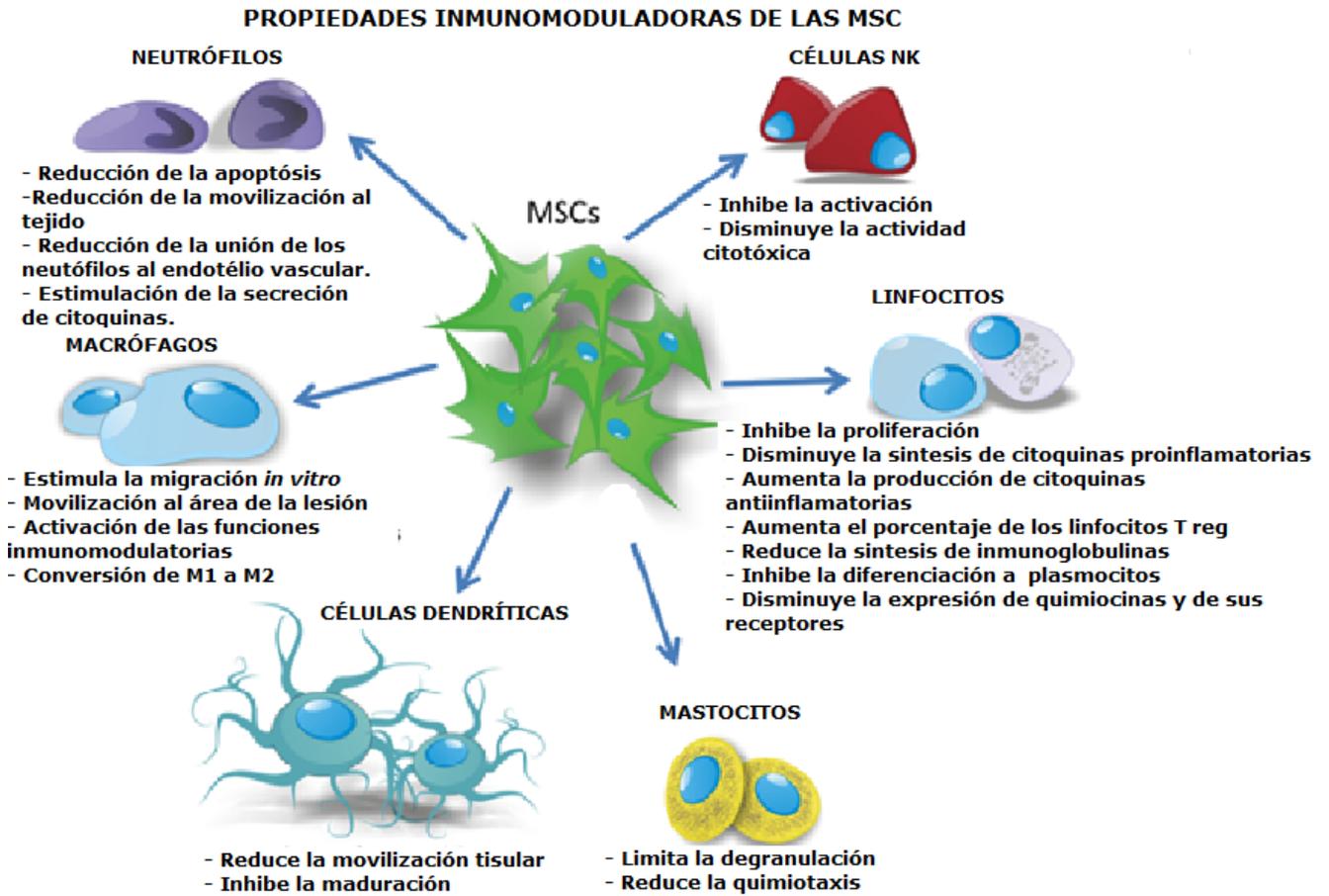


Figura 8. Resumen esquematizado de las propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales a las células inmunes. Imagen obtenida y editada de: Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. World Journal of Stem Cells, 2014.

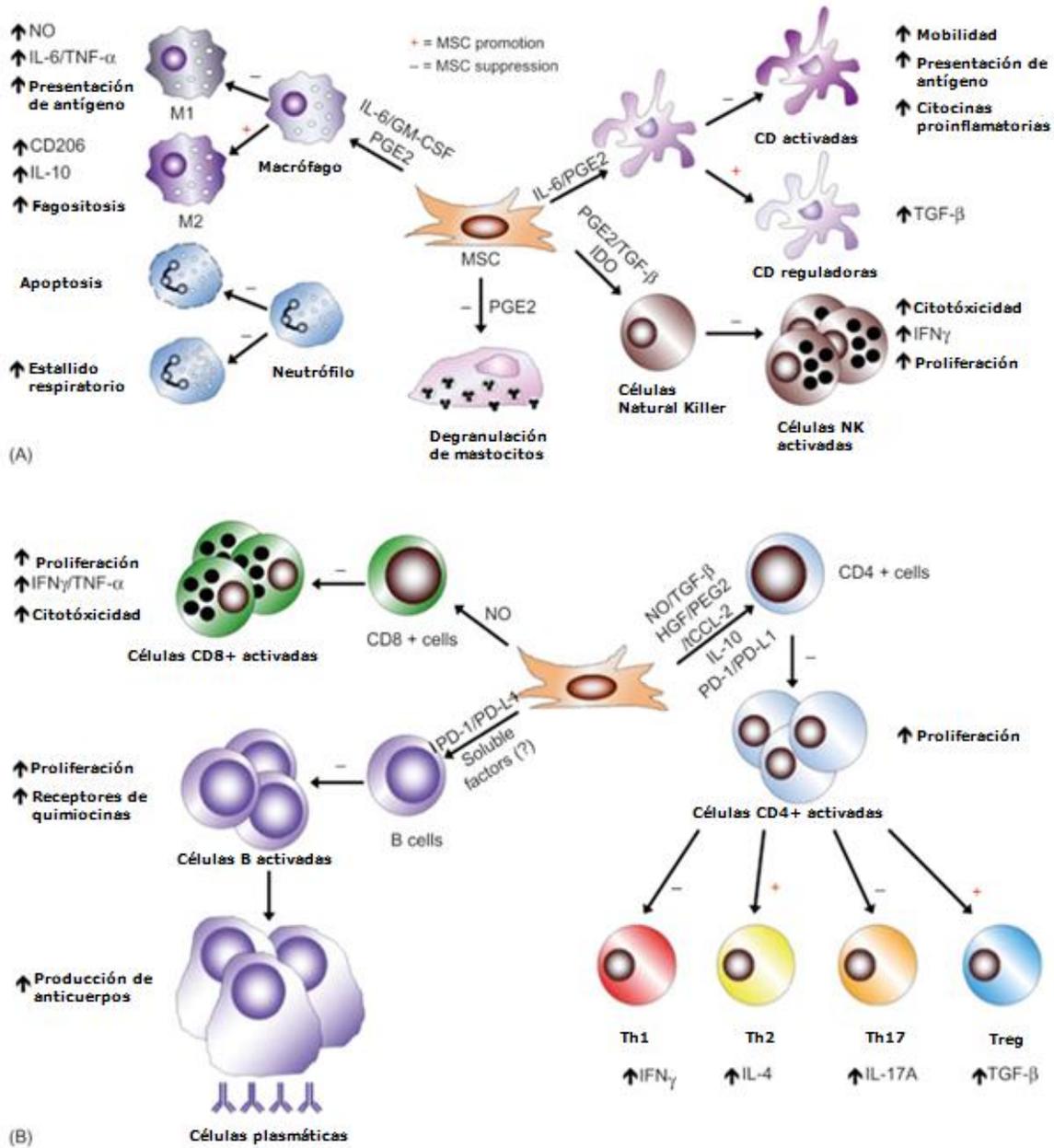


Figura 9. La inmunosupresión de las células inmunes (A) innatas y (B) adaptativas de las células madre mesenquimales mostrando los diversos mecanismos moleculares. Imagen obtenida y editada de: *Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy*, *World Journal of Stem Cells* 2014.

La acción inmunomoduladora de las células madre mesenquimales no se limita a los factores solubles que secretan, aunque en gran medida se consideran los más importantes para dicha acción. Las células madre mesenquimales cuentan con moléculas que les ayudan a migrar a los sitios de

inflamación y a unirse con las células T ayudando a disminuir su actividad proinflamatoria; para esto, moléculas de adhesión como las moléculas ICAM-1 y VCAM-1 están presentes en la superficie celular. ICAM-1, también llamada CD54, (intercelular adhesion molecule - 1) es crucial para unirse a células endoteliales y linfocitos T, así como las moléculas VCAM-1 (vascular cells adhesion molecule - 1) o CD 10 [75], también se pueden encontrar moléculas pertenecientes a la familia B7 como la molécula B7-DC también llamado ligando programado de muerte 2 (PD-L2) cuya expresión y secreción está regulado por INF- γ y TNF- α , el cual suprime la activación de los linfocitos CD4+ disminuyendo la secreción de IL-2 y aumentando la expresión de FOXP3 promoviendo un estado regulador [76]. En la membrana plasmática también se encuentra B7-H1 (CD274) también conocido como el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) el cual está regulado por moléculas como INF- γ , su expresión suprime la activación de linfocitos T; B7-H4 otra molécula de la familia B7, produce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento, la secreción de citoquinas proinflamatorias y el desarrollo de la citotoxicidad de las células T. Por último, en la membrana plasmática de las MSC se encuentran moléculas como ephrinB2 y EPHB2 quienes, tras unirse con EPBHB4 y ephrinB1 respectivamente, que son moléculas presentes en la membrana plasmática de linfocitos T, promueven la secreción de IDO, TGF- β , e iNOS por parte de las MSC y disminuyen la secreción de TNF- α , IL-2 e IL-17 por parte de los linfocitos T [77].

Las células madre mesenquimales también han resultado benéficas para la angiogénesis gracias a la secreción de factores proangiogénicos como bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico), TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), angiopoyetina-1, PGF (factor de crecimiento placentario), IL-6, MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos-1), EGF (factor de crecimiento

epidérmico), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) [78].

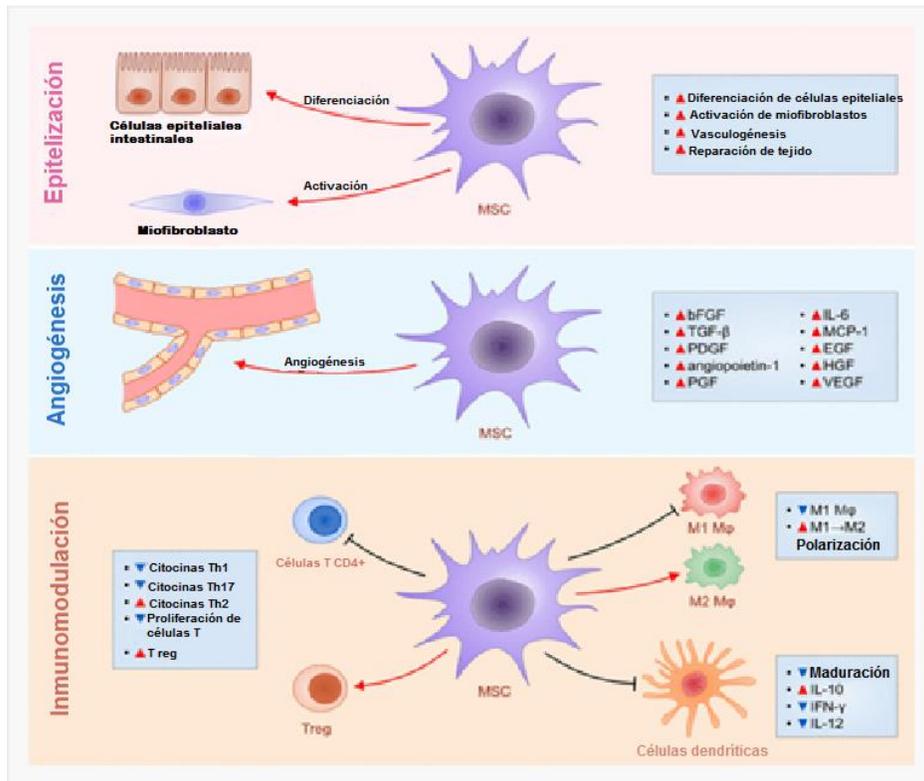


Figura 10. Habilidad de diferenciación, angiogénesis e inmunomodulación de las células madre mesenquimales mostrando los factores secretados, las células afectadas y las principales consecuencias de la secreción de dichos factores. Imagen tomada y traducida de: *Molecular and Cellular Mechanisms Involved in Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy of Inflammatory Bowel Diseases, Stem Cell Reviews and Reports*

Por su potencial inmunomodulador y angiogénico, sumando su capacidad de proliferación y diferenciación, se pensó en las células madre mesenquimales como el material de reparación de tejidos y órganos al reemplazar a las células dañadas por células nuevas y funcionales proporcionadas por la diferenciación de MSC [79] (figura 10), pero se ha probado que las células madre mesenquimales no sobreviven mucho tiempo en el huésped ya sean administradas por vía intravenosa, o directa en el tejido. Al administrar células madre mesenquimales radiomarcadas por vía intravenosa en un modelo

animal, se ha demostrado que la mayor parte de la radioactividad permanece en el parénquima pulmonar [80], siendo esto un gran problema para la clínica puesto que las MSC no llegan al sitio de lesión. En otro estudio, al administrar MSC por vía intraarterial se elimina el paso por el pulmón aumentando las probabilidades de que las MSC lleguen al sitio de lesión, pero resulta ser un procedimiento peligroso ya que en un estudio de isquemia cerebral transitoria en ratas, se demostró que al administrar MSC por vía intraarterial se lograban encontrar MSC en el tejido cerebral en comparación de la administración vía intravenosa donde no se observaron señales de MSC, pero la vía intraarterial incrementa el riesgo de lesión cerebral [81]. Por otro lado, la aplicación directa tampoco arroja buenos resultados al injerto de MSC puesto que, si bien se presenta una mejora en los padecimientos tratados, las células alogénicas injertadas en el tejido del receptor no sobreviven mucho tiempo y el porcentaje de células injertadas resulta bajo, por ejemplo a bebés con osteogénesis imperfecta se les administró MSC alogénicas, se comprobó la efectividad de estas células puesto que se aumentó la densidad ósea y se redujeron las fracturas, pero se encontró que menos del 2% de las MSC del donante lograron injertarse [82]. En otro estudio inyectaron en miocardio isquémico MSC de ratones transgénicos cuyas MSC presentaban β – galactosidasa, obteniendo como resultado un aumento en el factor de células madre miocárdicas y en la angiogénesis, pero no se observó mitogénesis de las células del huésped ni se observaron cardiomiocitos β – galactosidasa positivos [83]. También se ha informado que menos del 1% de las MSC sobreviven más de una semana después de la administración IV [84]. Por estos resultados se cree que el injerto de MSC no es el principal mecanismo de acción de estas células, más bien son los factores de crecimiento, las citoquinas y demás sustancias secretadas por las células madre mesenquimales.

CAPÍTULO 3. EXOSOMAS Y CULTIVO CELULAR

Las células se comunican a través de una serie de moléculas, las cuales viajan solas como varios factores de crecimiento o citoquinas, o viajan empaquetadas en forma de vesículas extracelulares, estas últimas son estructuras derivadas de la célula, formadas por una bicapa lipídica que rodea a los factores bioactivos [85]. Dentro del grupo de vesículas extracelulares se encuentran las microvesículas, los exosomas y los cuerpos apoptóticos, entre ellos varían en su formación, en su tamaño y en la carga que llevan. Se sabe que diferentes células secretan vesículas extracelulares, como las células dendríticas, las células endoteliales, células epiteliales, células madre adultas, células madre embrionarias, células madre mesenquimales y células tumorales, también se han encontrado en diferentes fluidos como en la sangre, la orina, la saliva, o la leche materna [86]. Estas vesículas se han conservado como un medio de comunicación celular a lo largo de la evolución, demostrando así su gran importancia no solo en humanos, también en otras especies [85].

Las microvesículas tienen un diámetro de entre 100 a 1000 nm, estas se desprenden de la membrana plasmática de las células formando una evaginación cuyo contenido es cargado directamente del citosol. Los cuerpos apoptóticos se forman tras la muerte de las células, tienen un diámetro de entre 50 a 500 nm, en su interior se pueden encontrar proteínas, ARN y ADN. Por otro lado, los exosomas presentan un diámetro de entre 30 nm a 120 nm, con una densidad de entre 1.13 a 1.19 g/mL.

3.1 BIOGÉNESIS

La creación de un exosoma es un proceso de maduración que se lleva a cabo gracias a señales intrínsecas y extrínsecas del medio local y la posterior regulación de vías de señalización celular. Comienza tras la aparición de una vesícula endocítica formada por la invaginación de la membrana plasmática de

la célula, esta vesícula madura a endosoma temprano y éste a endosoma tardío. En el endosoma tardío se forman y se acumulan en su interior vesículas intraluminales. Los endosomas tardíos que en su interior contienen vesículas intraluminales pueden dirigirse hacia dos caminos, o se fusionan con lisosomas para ser degradados o el endosoma tardío se unirá a la membrana y liberará a las vesículas intraluminales, las cuales ahora adoptarán el nombre de exosomas (Figura 11). Una vez liberados, los exosomas pueden ser internalizados por células diana a través de la fusión directa de membrana, endocitosis o fagocitosis, o pueden ser movilizados a través de los fluidos [87].

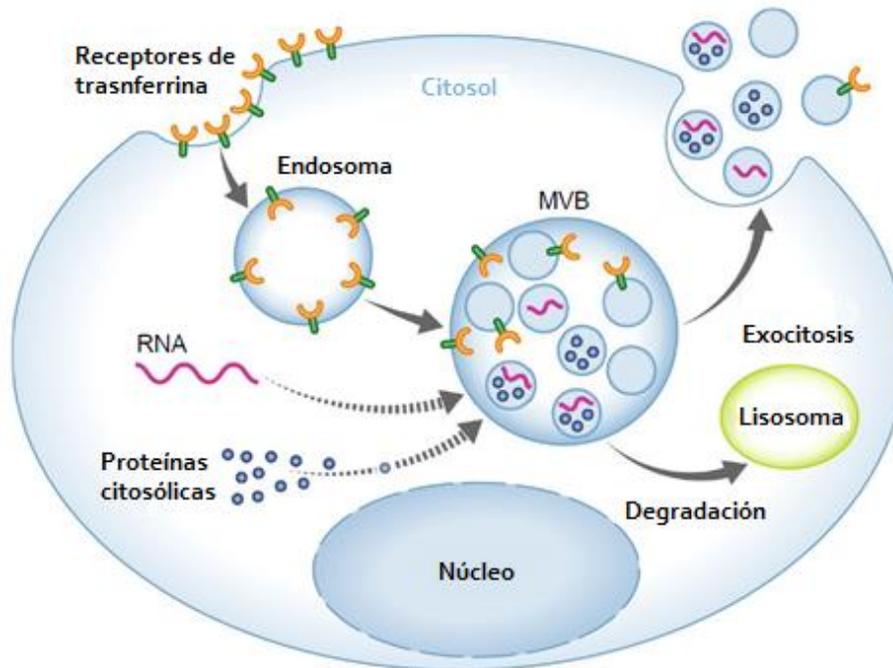


Figura 11. Esquema de la biogénesis y liberación de los exosomas. La imagen muestra la formación de un endosoma, el cual representa al endosoma temprano y su maduración hasta endosoma tardío, en la luz del endosoma tardío se acumularán las vesículas intraluminales las cuales cuentan con una membrana rica en tetraspaninas como CD9 y CD82, TSG101 o tumor susceptibility gene 101 y Hsp70 también llamada proteína de shock térmico. Imagen tomada de: *Mesenchymal stem cell exosomes: a two-edged sword in cancer therapy.*

3.2 COMPOSICIÓN

Para identificar a los exosomas de entre las demás vesículas extracelulares se han identificado marcadores que están presentes en todos los exosomas independientemente de su tipo celular de origen. Se sabe que la membrana plasmática de los exosomas es rica en tetraspaninas, las cuales son glicoproteínas de superficie que forman microdominios adherentes, principalmente CD9 y CD82, aunque también se encuentran CD81 y CD63 [88]. Además la membrana plasmática de los exosomas cuenta con proteínas de fusión, transporte de membrana y tráfico de vesículas como la flotillina, anexinas y proteínas Ras como Rab-5B. Asimismo, se encuentran proteínas relacionadas con la formación de los cuerpos multivesiculares pertenecientes a ESCRT como TSG101 de "tumor susceptibility gene 101" el cual es un regulador del tráfico vesicular y es una de las proteínas encargadas del control de la carga proteica en los exosomas [89] y Alix, una proteína multifuncional involucrada en la endocitosis y la biogénesis de los cuerpos multivesiculares, además está involucrada en la concentración y la clasificación de las proteínas que se cargan en las vesículas intraluminares de los cuerpos multivesiculares [90]. Sumado a esto, los exosomas también presentan grandes cantidades de lípidos en su membrana, como colesterol, esfingomielina y esfingolípidos, lo que indica que, si la membrana tiene subdominios enriquecidos con estos lípidos, podrían ser importantes en la señalización y la clasificación de la carga de los exosomas. En la membrana también se pueden encontrar integrinas, receptores del factor de crecimiento, proteínas de choque térmico como hsp70 y hsp90, y proteínas citoesqueléticas como tubulina y actina [91], estas últimas también están presentes en el cuerpo multivesicular y es gracias a estas proteínas que los cuerpos multivesiculares pueden migrar hacia la membrana plasmática de la célula para fusionarse y liberar a los exosomas [88].

Antes se pensaba que el contenido de los exosomas era al azar, pero investigaciones recientes demuestran lo contrario, el hecho de que la composición molecular de los exosomas no sea reflejo de sus células de origen indica que existen mecanismos que regulan la clasificación de la carga en los exosomas, por ejemplo, se ha propuesto que la ubiquitinización de proteínas puede ser un mecanismo clave para la carga de estas dentro del exosoma y también para la formación misma de las vesículas intraluminares en los cuerpos multivesiculares [92]. El mecanismo mejor descrito para la formación de exosomas y la carga de proteínas es a través de la vía ESCRT, o también llamado complejo de clasificación endosómica necesarios para el transporte, este está formado por 5 complejos, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III Y Vps4 [93].

La vía ESCRT comienza con ESCRT-0, un complejo de dos subunidades, donde ambas reconocen proteínas ubiquitinadas en la membrana de los endosomas, ESCRT-0 se une a ESCRT-I y este a ESCRT-II, ambos reconocen proteínas ubiquitinadas creando la invaginación de la membrana del endosoma donde las proteínas ubiquitinadas se agrupan y quedan rodeadas por los miembros del complejo ESCRT, es entonces cuando ESCRT-II activa y recluta a ESCRT-III. El complejo ESCRT-III no presenta afinidad a proteínas ubiquitinadas por lo que sirve para disociar al resto de los complejos y al mismo tiempo recluta enzimas desubiquitinadoras, AMSH (associated molecular with SH3 domain or STAM) y UBPY quienes recuperan la ubiquitina de las proteínas de membrana cargadas, terminando la unión de estas proteínas con el complejo ESCRT-0, ESCRT-I y ESCRT-II. Mientras tanto ESCRT-III recluta a Vps4, el cual le ayudará a disociarse de la membrana, formando así a las vesículas intraluminares [93] (Figura 11).

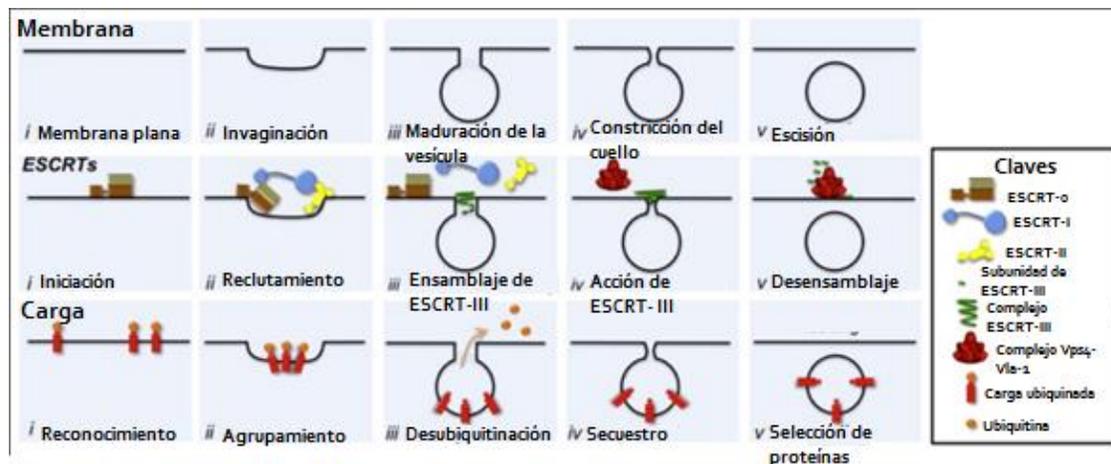


Figura 12. Esquema ilustrativo de la biogénesis de las vesículas intraluminares por la vía ESCRT, se observa la vía desde su iniciación con el reconocimiento de las proteínas ubiquitinadas hasta la escisión de las vesículas de la membrana plasmática de los endosomas mostrando las diferentes fases desde el punto de vista del complejo ECRT y de las proteínas cargadas. Imagen tomada y traducida de: *The ESCRT pathway, Developmental Cell Review*.

El material genético cargado en los exosomas es de suma importancia para su acción sobre las células receptoras, se ha observado que los RNAm cargados en los exosomas están enriquecidos en fragmentos 3'UTR y para los miRNA se han encontrado EXOmotivos específicos ubicados en los fragmentos 3'UTR los cuales se sabe que se unen a la ribonucleoproteína heterogénea A2B1 presente de forma ubicua en los exosomas, se desconocen los detalles de estos mecanismos y al momento esto se encuentra en investigación [91]. Es de suma importancia definir dichos mecanismos puesto que se cree que los miRNA, los mRNA y otros tipos de RNA no codificantes son los principales efectores de los exosomas.

En el presente trabajo se decidió centrar la atención en los exosomas de células madre mesenquimales debido a que, como se mencionó anteriormente, las características y propiedades potencialmente terapéuticas de estas células se deben a la modulación paracrina. Se sabe que las células madre mesenquimales son altamente eficientes para producir exosomas a comparación de diversos tipos celulares, siendo esto de gran provecho no solo para la investigación, también para su aplicación clínica [94]. En un estudio

estadístico publicado en abril del 2019 [94] se determinó, mediante un meta-análisis de concurrencia realizado en el sitio Web of Science, que entre las áreas populares para investigación relacionadas con exosomas, de las más mencionadas fueron estudios *in vivo* con células madre mesenquimales indicando que esta área de investigación está siendo de gran interés.

Los exosomas de células madre mesenquimales, al igual que los demás exosomas, cuentan con una carga que incluyen proteínas, RNA y DNA, de entre estos, como se mencionó anteriormente, los diferentes tipos de RNA que contienen los exosomas, específicamente los miRNA han sido el foco de atención de los investigadores. Los miRNA son pequeñas secuencias de ARN monocatenario de aproximadamente 21 – 23 nucleótidos de longitud, estas secuencias no son codificantes y tienen en su extremo 5' una uridina. Los miRNA son parcialmente complementarios a regiones 3' no codificantes de ciertos RNAm, al unirse con estos reprimen la traducción modulando la expresión genética al reducir la producción de proteínas [95], además de los miRNA también se describen los siRNA, estas estructuras son prácticamente iguales a los miRNA, tienen longitudes similares de entre 21 y 25 nucleótidos de longitud, pero su complementación con la región 3' no codificante de los RNAm es perfecta, esto produce la degradación del complejo RNAm-siRNA a través de una maquinaria nucleolítica, reduciendo la producción de proteína específica [96]. Un estudio reciente comparó los miRNA presentes en células madre mesenquimales de dos diferentes fuentes, del tejido adiposo y de la médula ósea, concluyeron que la carga de miRNA entre los exosomas y sus células de origen era similar en algunos miRNA mientras que otros se encontraban presentes en mayor cantidad en los exosomas, demostrando así que la carga de los exosomas está controlada bajo ciertos mecanismos, además se dieron cuenta que la carga de miRNA presente en los exosomas de ambos tipos celulares variaba, siendo esto prueba de que la carga en los exosomas es diferente según la célula de origen y el estrés al que esta esté

sometida. En el siguiente cuadro se presentan los cinco miRNA que representan la mayor cantidad (el 43% del total de las lecturas de miRNAS) en los exosomas de cada una de las células madre mesenquimales estudiadas y las propiedades que se les han atribuido [97].

Tabla 2. Se presentan los 5 microRNA principales de células madre mesenquimales del tejido adiposo y 5 de médula ósea, también se presentan funciones biológicas de algunos de los miRNA en los que se han visto implicados. Información obtenida de: Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species, Stem Cell Res Ther. 2015; 6(1): 127

MSC DE TEJIDO ADIPOSEO	FUNCIÓN BIOLÓGICA IMPLICADA	MSC DE MÉDULA ÓSEA	FUNCIÓN BIOLÓGICA IMPLICADA
MIR-486-5P	Senescencia replicativa	miR-143-3p	Función inmune moduladora de las MSC
MIR-10A-5P	Regulador de la diferenciación de MSC	miR-10b-5p	Promueve la migración de MSC de médula ósea de ratón
MIR-10B-5P	Promueve la migración de MSC de médula ósea de ratón	miR-486-5p	
MIR-191-5P		miR-22-3p	Regulador de la diferenciación de MSC
MIR-222-3P		miR-21-5p	

Se han encontrado otros miRNA en exosomas de MSC de diferente fuente, con acción terapéutica, como miR-125a y miR-30 de exosomas de MSC umbilicales, quienes han demostrado promover la angiogénesis inhibiendo DLL4, un inhibidor angiogénico en células endoteliales [98], aunque en un ambiente tumorigénico se encontró que miR-16-5p y miR-100 tienen acciones antiangiogénicas atacando al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [99], también se ha demostrado que miR-181c de exosomas de MSC de cordón

umbilical disminuye la inflamación por quemaduras suprimiendo la vía de señalización 4 tipo toll [100] y que los miRNA de exosomas de MSC son importantes para que los macrófagos cambien a un perfil inmunomodulador M2 a través de miR-146a de exosomas provenientes de MSC pretratadas con IL-1 β . Así, gracias a la inhibición de señalización de diferentes vías atacando a proteínas específicas, se ha demostrado que los exosomas de MSC tienen un gran poder para modular diferentes vías importantes para la regeneración de tejidos, angiogénesis, inmunomodulación, antiapoptosis, antifibrosis.

Debido a la gran importancia de determinar qué proteínas y material genético está implicado en la acción de los exosomas, se han creado dos bases de datos, el primero, "exocarta", contiene al menos 938 entradas de proteínas para células madre mesenquimales y en el segundo, "vesiclepedia", se han registrado entradas de 92 897 proteínas de exosomas provenientes de diferentes células. El mapeo del proteoma de los exosomas de células madre mesenquimales reveló que las proteínas comunes, enzimas y moléculas de señalización presentes en estas vesículas extracelulares están involucradas en procesos biológicos como la comunicación celular, la estructura celular, la inflamación, la biogénesis de los exosomas, el desarrollo, reparación y regeneración de tejidos, el metabolismo, e inmunomodulación, de este último se pueden mencionar adenosina, arginina, ácido aspartámico, colesterol, etc., los cuales han sido encontrados en exosomas de MSC cebadas [101].

Existen múltiples ventajas de utilizar exosomas de células mesenquimales en lugar de células vivas, por ejemplo, anteriormente se mencionó que la principal desventaja de utilizar MSC administradas por vía intravenosa era el paso por los pulmones, donde desafortunadamente la mayoría de estas quedan atrapadas. Utilizando exosomas de células madre mesenquimales por administración intravenosa, gracias a su tamaño, pueden circular a través de la sangre sin obstruir la microvasculatura [102], y llegando prácticamente a todo el cuerpo, de hecho se ha probado que la administración de exosomas de

MSC por vía intravenosa atraviesa la barrera hematoencefálica proporcionando una alternativa para el tratamiento de patologías donde el blanco terapéutico requiera atravesar esta barrera [103], además los exosomas de MSC eliminan la preocupación en el tratamiento con células vivas de que estas muten a células potencialmente cancerígenas, los riesgos por rechazo celular y toxicidad de las células madre mesenquimales al ser infundidas en la terapia [104]. Gracias al tamaño de los exosomas, estos pueden circular a través de todo el cuerpo sin ningún problema, prueba de esto es que se han encontrado en todos los fluidos corporales. En ensayos de biodistribución recientes han revelado que la distribución de los exosomas dependerá de la fuente celular de obtención, así como de la vía de administración. Se realizó un estudio con exosomas de MSC de diferentes fuentes administradas por vía intravenosa observando que, los exosomas se acumulan principalmente en el bazo, el hígado, los pulmones y el tracto gastrointestinal. Respecto a la vía de administración se observó que, tras la administración intraperitoneal y subcutánea, los exosomas se acumulaban preferentemente en el páncreas y el tracto gastrointestinal [105]. Además, se sabe que los exosomas se pueden acumular en los tejidos lesionados y en tumores inhibiendo modestamente la proliferación en estos [106]. Sumado a esto se sabe que la absorción de los exosomas por las células depende de la acidez intracelular y microambiental, y por fortuna, al ocurrir un daño tisular, se presenta acidosis tisular en el sitio lesionado lo cual facilita la absorción de exosomas en sitios específicos.

CAPÍTULO 4. OBTENCIÓN DE EXOSOMAS

Para obtener exosomas de células madre mesenquimales es necesario cultivar a las células madre para posteriormente extraer y purificar a los exosomas del medio de cultivo. Para esto se requiere escoger la fuente de obtención de las células madre mesenquimales donde la fuente preferida para los más de 200 estudios in vivo reportados de exosomas derivados de MSC es la médula ósea con un 51% de menciones, seguido por el cordón umbilical y tejido placentario con un 23% y finalmente el tejido adiposo con un 13% (figura 13) [107], después se debe elegir el método de purificación adecuado, el cual debe de ser lo menos costoso, rápido y dar el producto más puro posible. De entre los más elegidos se encuentra la ultracentrifugación con un 72% y los métodos de precipitación 23% (figura 14) [107].

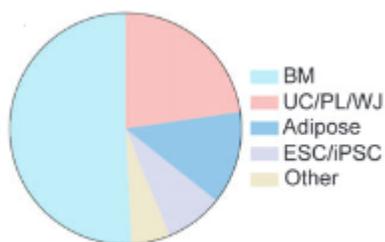


Figura 13. Gráfico que muestra la proporción de estudios in vivo con exosomas de MSC que utilizan médula ósea (BM), tejido derivado de la placenta y cordón umbilical (UC/PL/WJ), tejido adiposo (Adipose), células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas (ESC/iPSC) y otras, como fuente de obtención de exosomas. Imagen obtenida de *Human Mesenchymal Stromal Cells from Different Sources Diverge in Their Expression of Cell Surface Proteins and Display Distinct Differentiation Patterns*.

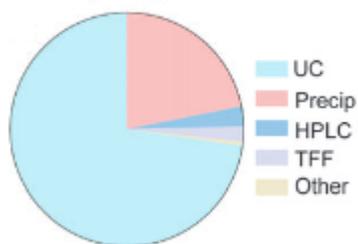


Figura 14. Gráfico que muestra la proporción de estudios in vivo con exosomas de MSC que utilizan ultracentrifugación (UC) precipitación (Precip), Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), Filtración de flujo tangencial (TFF) u otros, como método de aislamiento de exosomas. Imagen obtenida de *Human Mesenchymal Stromal Cells from Different Sources Diverge in Their Expression of Cell Surface Proteins and Display Distinct Differentiation Patterns*.

Para la obtención de exosomas se han reportado cuatro métodos principalmente, los cuales se presentan a continuación.

4.1 ULTRACENTRIFUGACIÓN

El método más utilizado es el de ultracentrifugación (figura 15) con un 72% de uso dentro de los más de 200 estudios preclínicos reportados. Este método se basa en centrifugar el medio de cultivo o el fluido biológico a diferentes velocidades para separar diferentes partes de la muestra, realizando toda la operación a 4°C [108]. Normalmente se comienza con una fuerza centrífuga relativamente baja de 300xg para eliminar las células, se toma el sobrenadante y este se somete a una fuerza centrífuga mayor (de 10,000xg a 20,000xg) para eliminar restos celulares grandes y orgánulos rotos, posteriormente el sobrenadante se somete de 100,000xg a 150,000xg para recolectar los exosomas del pellet y ser resuspendido normalmente en PBS. No se tiene un tiempo establecido para cada centrifugación, pero oscila para la primera (300xg) de entre 10 y 15 min, para la segunda (10,000xg a 20,000xg) 40 min, para la última (100,000xg a 150,000xg) de 70 a 75min. Algunos estudios añaden una centrifugación de 2,000xg por 15 a 20 min después de la primera centrifugación [109].

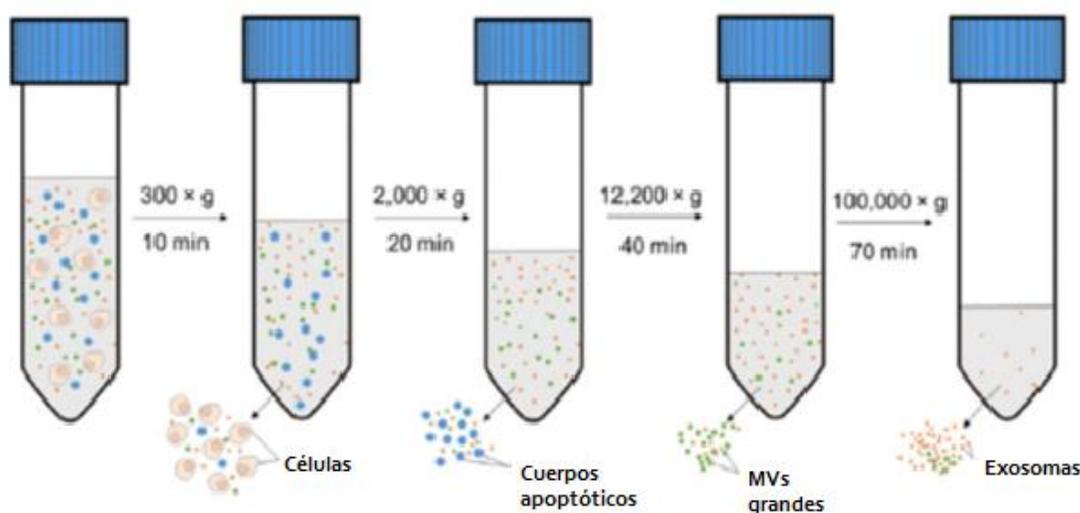
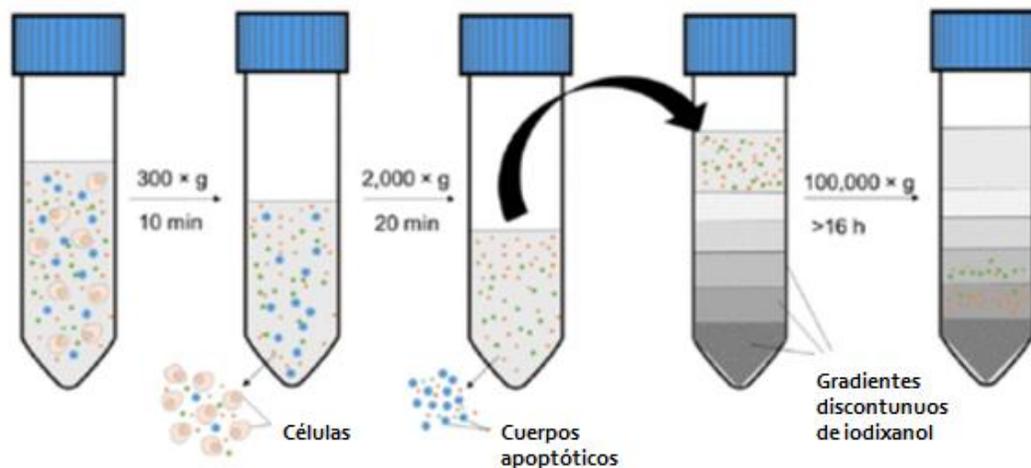


Figura 15. Ejemplo de protocolo de ultracentrifugación mostrando en cada fase el contenido que se elimina. Imagen obtenida y traducida de: *Advances in technologies for purification and enrichment of extracellular vesicles*. 2019.

Derivado del anterior, se utilizan gradientes de densidad para separar a los exosomas de proteínas contaminantes, aumentando la pureza de los

exosomas obtenidos (figura 16) aunque la desventaja de este método es que se utilizan fuerzas centrifugas de hasta 100,000xg por más de 16 horas en un gradiente discontinuo de iodixanol, para que la muestra logre fraccionarse [110]. Entre los beneficios de este método incluyen la rentabilidad, la pureza y mayor rendimiento comparándolo con otros métodos, pero es necesario tener muestras grandes, es un método muy tardado y por la fuerza de centrifugación puede causar daño exosómico [111]. Aun así, el método de ultracentrifugación es considerado como el estándar de oro para obtener exosomas.



*Figura 16. Ejemplo de centrifugación por gradiente de densidad utilizando un gradiente discontinuo de iodixanol. Imagen tomada y traducida de: **Advances in technologies for purification and enrichment of extracellular vesicles**. 2019.*

4.2 EXCLUSIÓN POR TAMAÑO

Los métodos de separación por tamaño incluyen la ultrafiltración y la cromatografía por exclusión de tamaño. En la ultrafiltración se utilizan filtros, como en la filtración convencional, y se utiliza un método de caracterización de filtros llamado corte de peso molecular (MWCO), el cual ayuda a describir la distribución del tamaño de poro y la capacidad de retención de las membranas [112], así se logran separar los diversos componentes de una muestra aprovechando el tamaño de las partículas y el MWCO de la membrana

(tamaño de poro de 30-200 nm, donde aquellas partículas que sean más pequeñas que MWCO pasaran a través de la membrana, quedando en el filtrado. El principal problema es la obstrucción del filtro y, por lo tanto, la pérdida de exosomas que quedan atrapados. Aunque esto se puede solucionar utilizando filtros con MWCO mayores e ir cambiando de filtro con menor MWCO, se seguirían perdiendo exosomas y el método resultaría poco eficiente y con bajo rendimiento, además, aunque este método se considera más rápido que la ultracentrifugación, y no requiere el uso de equipo especial, sigue sin cumplir con las expectativas de pureza puesto que a través de la membrana pueden atravesar diferentes proteínas y vesículas que no sean exosomas [109].

Por otro lado, en la cromatografía por exclusión de tamaño se separan partículas y macromoléculas utilizando una fase estacionaria porosa, donde las partículas pequeñas quedan atrapadas provocando una elución tardía y aquellas de mayor tamaño eluyen fácilmente. Este método se utiliza comúnmente en conjunto con la ultracentrifugación después de la última centrifugación donde el sedimento se resuspende y se purifica aún más por este método [109]. Si bien este método no provoca daño a los exosomas como la ultracentrifugación, es un método tardado y poco eficiente [111].

4.3 PRECIPITACIÓN

Otro tipo de método es el de precipitación por polietilenglicol, el cual es un polímero hidrofílico que se une a las moléculas de agua provocando la precipitación de exosomas, posteriormente se centrifuga a una velocidad baja [113]. Aunque este método sea rápido y sencillo de realizar, resulta en un bajo rendimiento y una baja pureza puesto que no solo se precipitarán exosomas, también otras vesículas extracelulares y proteínas [111]. Algunas empresas venden kits basados en este método, pero resultan costosos.

4.4 POR AFINIDAD INMUNOLÓGICA

El último método, el de afinidad, es aquel que utiliza anticuerpos contra CD81, CD63, CD9, presentes en la membrana plasmática de los exosomas [114]. Este cuenta con la gran ventaja de ser un método que ofrece una gran pureza y aislamiento específico de exosomas, ya que incluso se pueden separar a los exosomas de otras vesículas celulares, pero esto resulta en altos costos y bajo rendimiento porque es necesario que los exosomas presenten los marcadores a los cuales es afín el anticuerpo utilizado y la captura de exosomas se limitará al anticuerpo utilizado, además es necesario un pretratamiento para que la muestra no tenga células que se puedan unir a la placa [113].

Tabla 3. Resumen de las técnicas de obtención de exosomas señaladas anteriormente, mostrando los principios del aislamiento, las ventajas y desventajas de cada técnica.

TÉCNICAS DE AISLAMIENTO	PRINCIPIO DE AISLAMIENTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
TÉCNICA DE CENTRIFUGACIÓN DE ULTRA ALTA VELOCIDAD	El método consiste en varios pasos de centrífugos diseñados para eliminar células, vesículas grandes, escombros, precipitar y aislar exosomas en función de la densidad y el tamaño.	Estándar de oro para separar exosomas y ser más ampliamente utilizado.	Caro y engorroso, que requiere mucho tiempo, alto costo del equipo. Los exosomas pueden dañarse por la centrifugación a alta velocidad
TÉCNICAS DE AISLAMIENTO BASADAS EN EL TAMAÑO	Contiene principalmente dos: ultrafiltración y cromatografía de exclusión por tamaño. Ambos se basan exclusivamente en las diferencias de diámetro entre exosomas y otras vesículas extracelulares	La estructura y la integridad de los exosomas separados por estos métodos generalmente no se ven afectados por la fuerza de corte	Se requiere un tiempo de funcionamiento relativamente largo, lo que limita la aplicación en el tratamiento de múltiples muestras biológicas
TÉCNICAS DE CAPTURA DE INMUNOAFINIDAD	Las placas con anticuerpos específicos se pueden combinar con proteínas de membrana específicas de exosomas	Este método es adecuado para la separación de exosomas con la misma expresión de proteínas de	Alto coste del reactivo. Este método no es adecuado para la separación masiva de exosomas, y los

	mediante el empleo de diversos métodos inmunológicos	membrana, y también para la determinación cualitativa y cuantitativa de exosomas.	exosomas separados pueden perder su actividad.
PRECIPITACIÓN DE POLÍMEROS	La solubilidad de los exosomas se reduce en gran medida el utilizar polímeros que excluyen el agua, como el PEG.	El proceso es relativamente fácil de operar sin requerir equipo especializado o un tiempo de ejecución prolongado. Se han desarrollado una serie de kits de extracción de exosomas basados en PEG para un rápido aislamiento y purificación de exosomas, como ExoQuik.	Las proteínas y materiales poliméricos costosos y otros materiales no exosómicos pueden coprecipitar, lo que resulta en exosomas de baja pureza.

CAPÍTULO 5. CALIDAD Y CONTROL

Para asegurarse que al finalizar la extracción y purificación de exosomas, estos se encuentran en la fracción seleccionada, se utilizan diversos métodos de rastreo y análisis para reconocer proteínas específicas de exosomas (como CD9, CD63, TSG101, Alix), el tamaño de las vesículas obtenidas, las cuales deben oscilar entre los 30nm y los 120nm, además de la concentración de estas.

5.1 WESTERN BLOTTING

La técnica más utilizada para el rastreo de proteínas es la de Western Blotting, la cual se basa en transferir proteínas a membranas microporosas para posteriormente ser observadas (figura 17). Este sirve como un análisis de proteínas para reportar la presencia o ausencia de algunas proteínas específicas. Para este método es necesario lisar a los exosomas, seguido por la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para separar a las proteínas por peso molecular, después las proteínas se transfieren a membranas microporosas comúnmente de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF) por medio de una corriente eléctrica, donde se obtendrá una copia exacta del gel de SDS-PAGE, posteriormente se añade un anticuerpo primario cuyo antígeno será la proteína seleccionada presente en una banda específica de la membrana, en el caso de los exosomas, se buscan comúnmente a las tetraspaninas CD9, CD63, al gen de susceptibilidad tumoral 101 (TSG101) y/o a la proteína Alix. Posteriormente se añade un anticuerpo secundario el cual estará conjugado con una enzima como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, esta ayudará a visualizar si se encuentra la proteína que se está buscando o no, y la cantidad de dicha proteína [115].

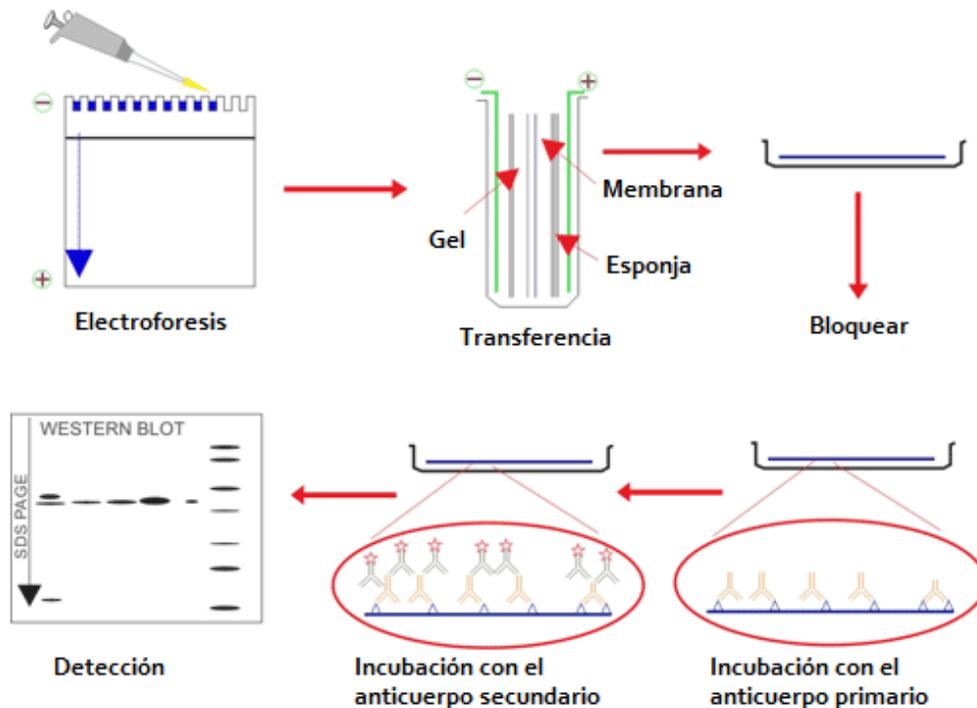


Figura 17. Técnica de Western Blotting, se observan los pasos a seguir para la transferencia de proteínas desde el gel de SDS-PAGE hasta la membrana porosa para posteriormente añadir los anticuerpos primarios y secundarios para detectar a las proteínas. Imagen obtenida de: CUSABIO Your Good partner in biology research, wester Blotting (WB) Protocol. <https://www.cusabio.com/m-244.html>

5.2 CITOMETRÍA DE FLUJO

Otra manera de detectar marcadores específicos de exosomas en vesículas extracelulares es a través de la citometría de flujo. La técnica de citometría de flujo va avanzando constantemente, ya que algunos aparatos llegan a medir partículas de entre 100 y 200nm a comparación con la mayoría que tienen límites de detección de entre 300 y 500nm, aún con esto, los límites de detección no son suficientes para poder observar exosomas [109], por lo que es recomendado inmovilizar a los exosomas en perlas llamadas "immunobeads" las cuales son esferas de látex con anticuerpo específicos para los antígenos presentes en la superficie de los exosomas [116], al inmovilizar a los exosomas en la superficie de las perlas se puede proceder a exponer a estas vesículas a un anticuerpo conjugado con fluorescencia, cuyo antígeno se encuentra presente en la superficie de los exosomas y es específico para estos,

como los mencionados anteriormente (CD9, CD63, TGS101, Alix) para posteriormente ser observado por medio de un microscopio epifluorescente antes de la citometría de flujo, así, cuando la muestra pasa a través del láser del citómetro de flujo, se emitirá una señal fluorescente que se detectará. Esta técnica permite no solo detectar exosomas a través de marcadores de membrana, también es una herramienta que permite cuantificar o clasificar a los exosomas en función de los marcadores en su superficie [109].

Las dos técnicas mencionadas anteriormente son las más utilizadas para detectar la presencia de exosomas, pero no son las únicas, también se puede utilizar inmunoadsorción integrada, perfil termoforético o análisis proteómico basado en espectrometría de masas, pero en el presente trabajo no ahondaremos en estas.

También se realizan análisis físicos de exosomas basados en su tamaño, las dos técnicas más utilizadas para esto es el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) y microscopía electrónica de transmisión.

5.3 ANÁLISIS DE SEGUIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS

La primera técnica, el NTA, nos permite conocer el tamaño de las partículas aisladas y su concentración, para esto, utiliza dispersión de luz y el movimiento Browniano de las partículas dentro de la cámara. Se hace incidir un rayo láser a través de la muestra, la luz del rayo láser se dispersa a medida que interactúa con las partículas y esa luz dispersada se recoge con un microscopio que tiene una cámara, esta cámara captura el movimiento de las partículas en un video para que un software NTA analice el movimiento browniano captado de las partículas para estimar su tamaño y concentración (figura 18). A diferencia del citómetro de flujo, el NTA permite determinar tamaños de partícula desde 10nm hasta 1000nm de diámetro. Este método se puede utilizar con marcadores fluorescentes o sin ellos, la diferencia es que al utilizarlos solo censará a aquellas partículas marcadas [117].

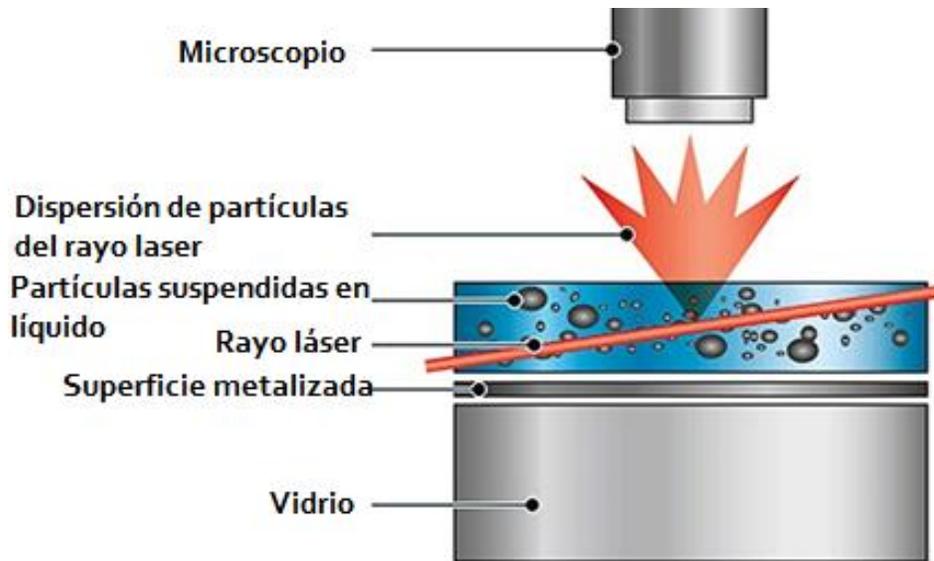


Figura 18. Análisis de seguimiento de nanopartículas NTA. Imagen ilustrativa del mecanismo del funcionamiento de la técnica. Imagen tomada de AZONANO Nanoparticle tracking análisis NTA measurements. <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=4062>

5.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Por otro lado, la microscopía electrónica de transmisión nos permite evaluar la morfología de los exosomas a través de imágenes de alta resolución de las partículas, producidas por un haz de electrones que pasa a través de la muestra sin interactuar con las partículas presentes en ella, estos electrones son detectados por una pantalla fluorescente creando áreas oscuras o sombras produciendo la imagen [109]. Para esto la muestra debe estar en una capa delgada para que los exosomas no estén encimados y tener una lectura clara. Esta técnica nos permite valorar la morfología de los exosomas lo cual resulta útil para saber si en la extracción se dañaron las vesículas extracelulares o no, para estar seguros de que los exosomas son viables, también nos permiten conocer el tamaño de las vesículas [118] la cual debe oscilar entre 30nm y 120 nm de diámetro (figura 19)

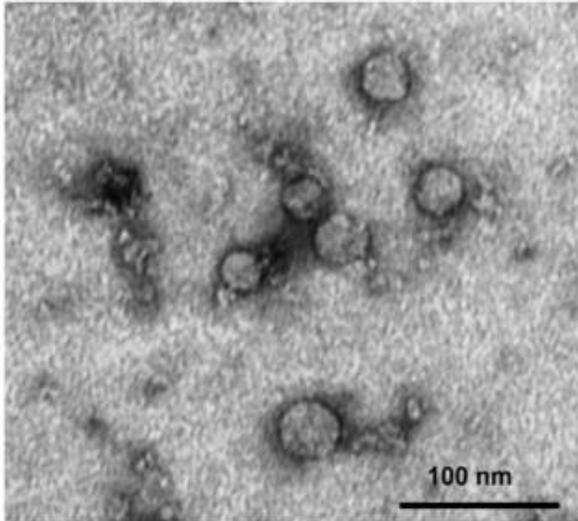


Figura 19. Imagen de exosomas obtenido por la técnica de microscopía electrónica de transmisión, en la imagen se describe la técnica de aislamiento de exosomas (centrifugación diferencial seguido por ultrafiltración y cromatografía de exclusión por tamaño). Imagen tomada de *Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell Subsets*, 2015.

Además de las antes mencionadas, también se puede utilizar técnicas como la microscopía de electrones de barrido (técnica muy similar a la TEM) y detección de pulso resistivo sintonizable (tRPS) para obtener el tamaño de las vesículas extracelulares después de las técnicas de aislamiento y purificación. Es importante realizar estos controles antes de continuar con los protocolos experimentales, así sean preclínicos o clínicos para tener la certeza de estar trabajando con el componente biológico adecuado y poder otorgarle a este las propiedades clínicas encontradas.

5.5 SALAS GMP

La fabricación de medicamentos de terapias celulares avanzadas se debe realizar en un lugar que garantice la inocuidad de estos, puesto que la principal vía de administración sigue siendo la vía intravascular. Desde el cultivo y expansión de las células madre mesenquimales, hasta la recolección y purificación de los exosomas deberán realizarse en un área con la menor

cantidad de partículas en el aire y libre de microbios y pirógenos, a este lugar se le conoce como sala blanca [119].

Las normas GMP de “Good manufacturing Practices” o buenas prácticas de manufactura, hablan sobre las salas blancas, y estas están atadas a la ISO 14644: 2015 la cual tiene su similar en Estados Unidos por la “Food and Drug Administration” de título “Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing — Current Good Manufacturing Practice” [119], en la Unión Europea por el Consejo (a la fecha) sobre Garantías y Uso Racional de Medicamentos y Productos Sanitarios en el documento titulado “Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products” [120] y en México por la NOM-059-SSA1-2015 Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos [121]. En ellas se explica detalladamente los criterios y cuidados que debe tener una sala blanca para evitar la contaminación por microbios, partículas y pirógenos de los productos que ahí se trabajen. Entre los puntos que se manejan incluyen gestión de registros, calificación del personal, saneamiento, limpieza, equipos de verificación, validación de procesos y tramitación de reclamaciones.

Las salas blancas se utilizan para la producción de medicamentos celulares personalizados, expansión celular, protocolos de investigación con células madre y terapia celular avanzada, por lo que toda investigación que incluya alguno de estos debe de realizarse forzosamente en una sala blanca para que dicha investigación pueda ser aplicada en la clínica. Los medicamentos de terapia avanzada son medicamentos de uso humano basado en genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería tisular) e incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico. Estos constituyen nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuye a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces [119].

Con respecto a las salas blancas, estas se clasifican por su grado de limpieza de aire en A, B, C y D, cada una de estas contiene límites máximos de partículas por m³ en operación y en reposo (tabla 4) de tal modo que de un cuarto D, se pase a uno C, de un C a un B y de un B a un A, conforme se vaya acercando al A, el tamaño de partículas en el aire por cada m³ y las UFC/m³ deberá disminuir gracias a un sistema de filtros, a la descontaminación microbiológica (tabla 5) y a la presión positiva del cuarto de mayor limpieza (de 10 a 15 Pa), la cual no permitirá que entre aire contaminado de una sala adyacente menos limpia a la sala de mayor limpieza [120].

Tabla 4 Grados de limpieza del aire de las salas blancas y número máximo de partículas permitidas por grados. Cuadro traducido de "Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products"

GRADO	NÚMERO MÁXIMO DE PARTÍCULAS DE TAMAÑO IGUAL O SUPERIOR AL INDICADO EN LA TABLA PERMITIDO/M ³			
	En reposo		En funcionamiento	
	0,5 µm	5 µm	0,5 µm	5 µm
A	3 520	20	3 520	20
B	3 520	29	352 000	2 900
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000
D	3 520 000	29 000	Sin definir	Sin definir

Tabla 5 Límites de contaminación microbiana en operación por cada grado. Traducido de "Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products"

GRADO	MUESTRA DE AIRE UFC/M ³	PLACAS DE SEDIMENTACIÓN (90 MM DE DIÁMETRO) UFC/4H	PLACAS DE CONTACTO (55 MM DE DIÁMETRO) UFC/PLACA
A	<1	<1	<1
B	10	5	5
C	100	50	25
D	200	100	50

Anexado a esto, en la ISO 14644 se encuentra no solo la limpieza del aire, también las especificaciones para los ensayos, los métodos de ensayo, el diseño, construcción y puesta en marcha, el funcionamiento, terminología

dispositivos de separación, contaminación molecular de aire, clasificación de limpieza de superficies, contaminación química y la clasificación por concentración de nanopartículas la estructura de producción en la cual se incluye el diseño de instalaciones con estándares homogéneos, elaboración de fichas técnicas, supervisión del desarrollo de las instalaciones entre otras, las cuales no veremos a profundidad en el presente trabajo [120].

CAPÍTULO 6. APLICACIONES CLÍNICAS

Como se ha mencionado anteriormente, los exosomas y factores secretados resultan ser los efectores biológicos detrás de las propiedades inmunomoduladoras, proangiogénicas, antiangiogénicas, antiapoptóticas, antiinflamatorias y antifibrosis que se adjudicaban a las células madre mesenquimales, proporcionando la opción de realizar una terapia celular libre de células [122]. Por esta razón, se piensa que en aquellas patologías en las cuales las células madre mesenquimales han demostrado una acción terapéutica, se pueden utilizar exosomas extraídos de cultivos de MSC, donde estas células se han sometido a una serie de factores y condiciones propicias para que los exosomas que secreten, cuenten con el arsenal necesario para combatir la situación y estabilizar la homeostasis del tejido en cuestión [123].

Hasta el mes de septiembre del 2019 se han registrado en el sitio clinicaltrials.gov, 4 estudios clínicos relacionados con exosomas de células madre mesenquimales (tabla 6) de los cuales tres se iniciaron ese año, demostrando que la búsqueda por una posible aplicación clínica de los exosomas de células madre mesenquimales está comenzando [101].

Tabla 6. Se presentan los cuatro estudios clínicos que involucran exosomas de células madre mesenquimales, sus números de registro y características principales de cada estudio.

NOMBRE DEL ESTUDIO	NÚMERO DE REGISTRO	ENFERMEDAD	TIPO DE MSC DE DONDE SE EXTRAEN LOS EXOSOMAS	FECHA DE INICIO Y FECHA ESTIMADA DE CONCLUSION	NÚMERO DE PACIENTES	LUGAR
PHASE 1 STUDY OF THE EFFECT OF CELL-FREE CORD BLOOD DERIVED MICROVESICLES ON B-CELL MASS IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS (T1DM) PATIENTS.	NCT02138331	Diabetes mellitus tipo 1	Derivadas de sangre de cordón umbilical	Abril 2014 – septiembre 2014	20 pacientes con DMT1 + 20 pacientes para el grupo control	El Cairo, Egipto.
MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVES EXOSOMES PROMOTE HEALING OF LARGE AND REFRACTORY MACULAR HOLES.	NCT03437759	Agujeros maculares	Derivadas de cordón umbilical humano	Marzo 2017 – diciembre 2019	44 participantes (aceptados voluntarios sanos)	Tianjin, China.

SAFETY AND EFFICACY OF ALLOGENIC MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED EXOSOME ENRICHED BY MIR-124 ON DISABILITY OF PATIENTS WITH ACUTE ISCHEMIC STROKE: A RANDOMIZED, SINGLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED, PHASE 1, 2 TRIAL.	NCT03384433	Trastornos cerebrovasculares	No se específica	Abril 2019 – diciembre 2021	5 pacientes	Isfahán, Irán.
PHASE I STUDY OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS-DERIVED EXOSOMES WITH KRASG12D SIRNA FOR METASTATIC PANCREAS CANCER PATIENTS HARBORING KRASG12D MUTATION.	<u>NCT03608631</u>	Adenocarcinoma pancreático metastásico	No se específica	Marzo 2020 – marzo 2022	28 pacientes	Texas, Estados Unidos.

Las evidencias preclínicas presentadas se resumirán en una tabla (tabla 7) presentada al finalizar este capítulo.

6.1 PATOLOGÍAS RENALES.

Patologías renales como la lesión renal aguda, la lesión renal crónica y la lesión por isquemia-reperfusión renal, son lesiones en los riñones provocados principalmente por necrosis de los túbulos renales, apoptosis de las células, inflamación y fibrosis [124].

La lesión renal aguda, que ocurre por un deterioro rápido de los riñones provocando la necrosis y el desprendimiento de las células epiteliales tubulares, puede ser reversible o irreversible según se trate en la etapa inicial o cuando se presente necrosis tubular aguda final respectivamente [125]. En el caso de la enfermedad renal crónica, se caracteriza por ser una enfermedad de evolución larga y progresiva provocando la lesión y pérdida de las nefronas [126]. Ambas enfermedades aumentan el nivel de creatinina sérica y de nitrógeno ureico en sangre (BUN) [126] [125]. Se ha demostrado que la administración de exosomas de MSC de cordón umbilical humano en modelos de ratones, 24h después de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino, gracias

a sus propiedades proangiogénicas, antiinflamatorias, antiapoptóticas e inmunomoduladoras, mejora la lesión renal y protege contra la lesión tubular disminuyendo la apoptosis, esto debido a la activación de genes antiapoptóticos como BCL-XL, BCL-2 y LTA y disminuyendo proteínas proapoptóticas como Bax. También aumenta la proliferación celular de las células tubulares epiteliales activando vías de señalización extracelular, esto se observa por un aumento de las células que presentan el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), incrementa la fagocitosis aumentando genes relacionados con la fagocitosis como ATG5 y ATG7. También se sabe que una de las causas de necrosis es la estenosis de la arteria renal, el cual es un estrechamiento o bloqueo de la arteria renal que suministra sangre a los riñones, provocado principalmente por colesterol alto. Al administrar exosomas de MSC se disminuye la inflamación renal por la disminución de TNF- α , IL-6 e IL-1 β secretados por las venas renales y aumenta la secreción de IL-10 [123], de igual manera se ha demostrado que estos efectos se mejoran pretratando a las MSC con melatonina [127].

6.2 PATOLOGÍAS HEPÁTICAS

La aplicación de exosomas de MSC en fibrosis hepática por hepatitis viral, abuso de alcohol o uso de drogas es, junto con la lesión hepática por isquemia-reperfusión, de los padecimientos más estudiados en cuanto a enfermedades hepáticas [104]. En modelos de daño hepático agudo y crónico inducido por tetracloruro de carbono en ratas, tras la administración de exosomas de MSC, se observa un efecto hepatoprotector gracias a estas vesículas bioactivas, mejorando la fibrosis por la inhibición de la transición epitelial-mesenquimatosa la cual ocurre cuando los hepatocitos regresan a un estado mesenquimatoso para producir fibroblastos y aumentar la producción de colágeno, la producción de colágeno también queda inhibida por la inactivación de la vía de señalización TGF- β 1/SMAD2 disminuyendo el colágeno I/III, TGF- β 1 y la fosforilación de SMAD2, disminuye la apoptosis al aumentar la

expresión del gen antiapoptótico BCL-XL y STAT3 y aumenta la proliferación de hepatocitos observado por el aumento del antígeno nuclear de proliferación celular [104] [128]. Esto se observa por medio de la disminución en la liberación de aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa, enzimas las cuales, en caso de daño hepático se liberan para metabolizar aminoácidos. También se observa la disminución de las puntuaciones de necrosis y el alivio del estrés oxidativo en la lesión hepática por isquemia reperusión, la cual inicia con isquemia en el tejido, seguida de la activación de las células de Kupffer, las cuales liberan IL-6 y TNF- α , moléculas que provocan el aumento de la infiltración excesiva de neutrófilos activos, causando un aumento en el estrés oxidativo, aumentando también la inflamación y por lo tanto la pérdida de hepatocitos por necrosis y apoptosis [129]. Se sabe que tras la administración de exosomas de MSC se disminuye el estrés oxidativo y la inflamación [130] al disminuir el número de neutrófilos infiltrados, disminuyendo los niveles de TNF- α , INF- γ , IL-6, IL-18 e IL-1 β [123].

6.3 PATOLOGÍAS PULMONARES

Las pruebas de los exosomas de MSC en modelos experimentales de enfermedades pulmonares como la fibrosis pulmonar idiopática, el asma e incluso la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en modelos animales han dado resultados prometedores. Las propiedades anti-fibróticas e inmunomoduladoras de los exosomas mediados a través de miRNA como miR199a, miR196a-5p, pero sobre todo miR630 quien suprime genes pro-fibróticos en los fibroblastos de pulmón, ayudando a evitar la formación de colágeno. Además, la aplicación de exosomas de células madre mesenquimales atenúa la fibrosis pulmonar idiopática suprimiendo la diferenciación miofibroblástica inducida por TGF- β de fibroblastos de pulmón a través del factor básico de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) [131]. El uso de exosomas de MSC también inhibe la apoptosis de las células epiteliales alveolares y promueve la reparación de estas células lesionadas por medio del

FGF-2 [131]. Son pocos los estudios que centran su atención a padecimientos pulmonares, por ejemplo, solo uno trata el asma donde prueban vesículas extracelulares de células madre mesenquimales en un modelo de ratón de asma clínica refractaria severa, en el cual se observó una mejoría por la inhibición de las células CD4+ Th2 y Th17 infiltradas en los pulmones asmáticos y la disminución de las interleucinas IL-4, IL-5 e IL-7 sí como un aumento de las células CD4+ productoras de IL-10. Se ve disminuida la afluencia de eosinófilos, neutrófilos inflamatorios, macrófagos y linfocitos, además se atenúa la presentación de las células dendríticas disminuyendo la activación de los TCD4 vírgenes y se aumenta la proliferación y las propiedades inmunosupresoras de las Treg, y así atenuar la hiperreactividad mediada por Th2/Th17 [132].

6.4 HERIDAS CUTÁNEAS

La regeneración de heridas cutáneas también está abierta a investigación con exosomas de MSC, principalmente para quemaduras que según la OMS representa un problema de salud pública a nivel mundial presentando un promedio de 180 000 muertes al año y en 2014 se reportaron casi 11 millones de personas en todo el mundo con alguna quemadura que requirió atención médica y lamentablemente son los niños los más vulnerables a quemaduras [133]. Para la curación de heridas son necesarias las propiedades proangiogénicas, proliferativas, de migración celular y remodelación de tejidos con las que cuentan los exosomas de MSC [134], su mecanismo de acción está basado en la activación de vías de señalización (STAT3, por ejemplo) a través de diferentes moléculas (IL-6, HGF, IGF1, SDF-1, VEGF) que permitirán la proliferación de las células cutáneas y la reepitelización gracias a la migración de fibroblastos y queratinocitos [135]. Se sabe que una de las moléculas que los exosomas introducen a las células epiteliales es Wnt4, el cual activa la vía de señalización Wnt/ β -catenina, la activación de esta vía por un lado activa la vía AKT inhibiendo la apoptosis de las células de la piel y por otro lado estimula

los efectos pro-angiogénicos en las células endoteliales al reducir el nivel de Bax (proteína proapoptótica) mejorando la cicatrización, también por su poder inmunoregulador, ayudan a modular la proliferación y diferenciación de linfocitos Treg, mejoran la conversión de los macrófagos al fenotipo M2 antiinflamatorio [136]. También resulta de gran importancia la formación de nuevos vasos sanguíneos, y se ha demostrado que los exosomas de MSC CD34+ están enriquecidos con miRNA pro-angiogénicos como miR-126 y miR-130a. El uso de exosomas de MSC también ha demostrado ayudar en la cicatrización de heridas en ratones diabéticos, aumentando la migración de fibroblastos al ser tratados con estas vesículas extracelulares [136].

6.5 PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES

Todas las vías antes mencionadas y los factores que contribuyen a los efectos antiapoptóticos, proangiogénicos y antiinflamatorios ayudan también al tratamiento de enfermedades cardiovasculares que, según la OMS son la principal causa de muerte en todo el mundo [137], como el infarto al miocardio y el daño por isquemia-reperfusión (I/R) miocárdica. Se ha demostrado que la administración de exosomas de células madre mesenquimales de tejido adiposo protege al miocardio isquémico del daño I/R miocárdica a través de la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina. De igual manera se ha demostrado que gracias a microRNAs como miR-21, se aumenta la supervivencia celular y la angiogénesis en un modelo de infarto al miocardio de rata; por medio de miR-22 los exosomas de MSC de medula ósea pretratados en condiciones isquémicas disminuyeron el tamaño del infarto y la fibrosis miocárdica al atacar a Mecp2, la proteína de unión a CpG2; y miR-122 inhibe al modulador de apoptosis regulado por p53 (PUMA). El micro RNA miR-122 interacciona también con BCL-xL y p53 para activar proteínas antiapoptóticas, lo que resulta principalmente importante para tratar el infarto al miocardio ya que esta enfermedad se caracteriza por una pérdida progresiva de las células cardíacas, provocando insuficiencia cardíaca. Al tratar modelos

de isquemia miocárdica, los exosomas de MSC mejoran la viabilidad del miocardio y promueven la remodelación, además a través de la secreción de VEGF promueve la angiogénesis al internalizarse a las células endoteliales microvasculares. Aunque aún falta mucha investigación al respecto, los resultados hasta ahora publicados son muy prometedores para tratar enfermedades cardiovasculares.

6.6 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.

6.6.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Una aplicación interesante que se ha estado investigando es la aplicación de los exosomas para tratar la enfermedad de Alzheimer. Esta enfermedad neurodegenerativa se ha considerado intratable, presentándose como el tipo de demencia más común. Se caracteriza por la sobreproducción o la incorrecta eliminación del péptido beta-amiloide ($A\beta$) en el cerebro, este péptido forma placas extracelulares produciendo un proceso neuroinflamatorio del SNC, las deposiciones del péptido beta-amiloide inducen una hiperfosforilación de las proteínas tau, las cuales son proteínas que estabilizan a los microtúbulos axonales a través de su interacción con la tubulina. Cuando la tau se hiperfosforila, se inhabilita, evitando su interacción con la tubulina y por ende impide que se estabilicen los microtúbulos, además, se observan agregados de la proteína tau llamados ovillos neurofibrilares [138]. La consecuencia de esto es la pérdida de la memoria, principalmente la memoria de corto plazo, además de la comprensión, el lenguaje, la atención, el razonamiento y el juicio [139]. En esta enfermedad la microglía resulta muy importante ya que tiene doble función, puede encontrarse en un estado proinflamatorio al aumentar citocinas como $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$ provocando la acumulación de $A\beta$ y causando neurodegeneración, por otro lado, la microglía en un estado antiinflamatorio aumenta la producción de citocinas $TGF-\beta$ e $IL-10$ disminuyendo la inflamación y favoreciendo la eliminación de $A\beta$ [140]. Al administrar exosomas de MSC de médula ósea estos actúan como lo haría la microglía en su estado

antiinflamatorio, asimismo, aumentan los niveles de neprilisina, una enzima que se encarga de degradar al péptido A β , y de la enzima que degrada la insulina (IDE) gracias a las cuales se eliminan las deposiciones de A β , se sabe que los exosomas secretados de MSC de tejido adiposo humano contienen grandes cantidades de neprilisina [141], lo cual nos recuerda que las MSC provenientes de diferentes fuentes de obtención varían en su función y propiedades por cargar diferentes miRNA y proteínas.

Tabla 7. Resumen de los artículos preclínicos citados para la terapia de diversos padecimientos con exosomas de células madre mesenquimales

ÓRGANO	PATOLOGÍA	MSC UTILIZADAS	DOSIS DE EXOSOMAS DE MSC	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	RESULTADO FISIOLÓGICO	RESULTADOS A NIVEL MOLECULAR	CONTROL	REFERENCIAS
RIÑÓN	IKA inducido por cisplatino	MSC de cordón umbilical humano	200 µg en ambos riñones 24h después de la inyección de cisplatino	Inyección a través de la cápsula renal	↓ apoptosis de células renales ↓ estrés oxidativo ↑ proliferación celular tubular	↓ proteína Bax ↓ caspasas 3 ↓ 8-OH-dG ↓ MDA (malondialdehído) ↑ GSH (Glutación) ↑ BCL-2 ↑ PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación)	Exosomas de fibroblastos de pulmón	Zhou Y, Xu H, Xu W, Wang B, Wu H, Tao Y, Zhang B, Wang M, Mao F, Yan Y, Gao S, Gu H, Zhu W, Qian H. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. <i>Stem Cell Research & Therapy.</i> 2013;4(2):34.
	Nefrotoxicidad por cisplatino	MSC de cordón umbilical humano	200 µg en ambos riñones antes de su exposición con cisplatino	Inyección a través de la cápsula renal	↓ apoptosis de células renales ↓ respuesta inflamatoria ↑ autofagia	↑ BCL-2 ↑ BCL-XL ↓ IL-1β y TNF-α ↑ ATG5 y ATG7 ↑ células PCNA ⁺	Exosomas de fibroblastos de pulmón	Wang B, Jia H, Zhang B, Wang J, Ji C, Zhu X, Yan Y, Yin L, Yu J, Qian H, Xu W. Pre-incubation with huMSC-exosomes prevents cisplatin-induced nephrotoxicity by activating autophagy. <i>Stem Cell Research & Therapy.</i> 2017;8(1):75.
HÍGADO	Fibrosis hepática inducida por CCL ₄	MSC de cordón umbilical	250 µg en 330 µL de PBS	Inyección directamente en los lóbulos izquierdo y derecho.	↓ fibrosis - Inhibe EMT	↓ niveles séricos de ácido hialurónico ↓ ARNm de colágeno I/III (después de 3 semanas) ↓ ARNm de TGF-β1 ↓ fosforilación de Smad2	Inyección de PBS	Tingfen Li, Yongmin Yan, Bingying Wang, Hui Qian, Xu Zhang, Li Shen, Mei Wang, Ying Zhou, Wei Zhu, Wei Li y Wenrong Xu. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. <i>Stem cells and development</i> vol. 22,6 (2013): 845-54.
	Daño hepático inducido por CCL ₄ , Paracetamol (APAP) y H ₂ O ₂	MSC derivadas de tejido fetal	0.4 µg de exosomas	Inyección intraesplénica	↓ células apoptóticas ↑ proliferación celular	↓ AST y ALT ↑ células PCNA ⁺ ↓ caspasa 3/7 ↑ Bcl-xL ↓ fosforilación de Smad2	Inyección de PBS	Cheau Yih Tan, Ruenn Chai Lai, Winnie Wong, Yock Young Dan, Sai-Kiang Lim, and Han Kiat Ho. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. <i>Stem cell research & therapy</i> vol. 5,3 76. 2014,
	Lesión hepática inducido por CCL ₄ paracetamol (APAP) y H ₂ O ₂	MSC de médula ósea de ratas Wistar macho	50 µg de fracción rica en exosomas	No se especifica	↑ recuperación celular ↓ citotoxicidad ↓ estrés oxidativo ↑ proliferación de hepatocitos	↓ actividad de ROS ↓ AST / ALT ↑ células PCNA ⁺ ↓ 8-OH-dG	PBS	Apeksha Damania, Deepika Jaiman, Arun Kumar Teotia, Ashok Kumar. Mesenchymal stromal cell-derived exosome-rich fractionated secretome confers a hepatoprotective effect in liver injury. <i>Stem cell research & therapy</i> vol. 9,1 31.2018

PULMÓN	Cultivo de fibroblastos pulmonares de sujetos con fibrosis pulmonar idiopática pretratados con TGF-β1	MSC humanas derivadas de médula ósea	10 µg de EV (vesículas extracelulares)	No aplica	Inhíbe diferenciación miofibroblástica	↓ α-SMA ↓ colágeno III ↓ fibronectina	Vesículas extracelulares derivados de fibroblastos	Tzu-Pin Shentu, Tse-Shun Huang, Mateja Cernelc-Kohan, Jov Chan, Simon S. Wong, Celia R. Espinoza, Chunting Tan, Irene Gramaglia, Henri van der Heyde, Shu Chien, and James S. Hagood "Thy-1 dependent uptake of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles blocks myofibroblastic differentiation" <i>Scientific reports</i> vol. 7, 1 18052. 2017
	Modelo de asma alérgico en ratones hembra C57BL/6 inducido por ovoalbúmina	MSC de tejido adiposo humano	37 µg de EV (proteína total)	Vía intravenosa	↓ deposición de fibra de colágeno en el parénquima pulmonar y en las vías respiratorias	↓ TGF β1 ↓ # eosinófilos ↓ IL-4 e IL-5 ↓ células T CD3 ⁺ / CD4 ⁺ en BALF	Solución salina	Ligia Lins de Castro, Debora Gonçalves Xisto, Jamil Zola Kitoko Fernanda Ferreira Cruz, Priscilla Christina Olsen, Patricia Albuquerque Garcia Redondo, Tatiana Paula Teixeira Ferreira, Daniel Jay Weiss, Marco Aurélio Martins, Marcelo Marcos Morales, and Patricia Rieken Macedo Rocco "Human adipose tissue mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles act differentially on lung mechanics and inflammation in experimental allergic asthma." <i>Stem cell research & therapy</i> vol. 8, 1 151. 2017,
	Inflamación de las vías respiratorias alérgicas inducidas por <i>Aspergillus</i>	MSC de médula ósea de ratones C57B1/6 y MSC humanos	La cantidad de EV lanzado por 3x10 ⁶ MSC	Vía intravenosa (vena de la cola)	↓ hiperreactividad de las vías respiratorias.	↓ # neutrófilos, eosinófilos y macrófagos en BALT ↓ IL-4, IL-5, IL-17, IL-10, IL-12 ↓ atrayente queratinocítico	Solución salina tamponada con fosfatos	Fernanda F. Cruz, Zachary D. Bora, Meagan Goodwin, Dino Sokocovic, Darcy E. Wagner, Amy Coffey, Mariana Antunes, Kristen L. Robinson, S. Alex Mitsialis, Stella Kourembanas, Kristen Thane, Andrew M. Hoffman, David H. McKenna, Patricia RM Rocco, y Daniel J. Weiss "Systemic Administration of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell Extracellular Vesicles Ameliorates Aspergillus Hyphal Extract-Induced Allergic Airway Inflammation in Immunocompetent Mice" <i>Stem cells translational medicine</i> vol. 4, 11 (2015): 1302-16.
PIEL	Herida cutánea	MSC de tejido adiposo humano	Diferentes dosis (0 µg, 25 µg, 50 µg y 100 µg), óptima 50 µg exosomas	Intravenosa y cutánea. Óptima intravenosa	Promueve la cicatrización de herida	↑ migración y proliferación de fibroblastos ↑ número de fibroblastos PCNA ⁺ ↑ colágeno I / III ↑ elastina	Inyección PBS	Li Hu, Juan Wang, Xin Zhou, Zehuan Xiong, Jiajia Zhao, Ran Yu, Fang Huang, Handong Zhang y Lili Chen "Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing by optimizing the characteristics of fibroblasts." <i>Scientific reports</i> vol. 6 32993. 2016,
	Herida cutánea, quemadura de segundo grado	MSC cordón umbilical humano	200 µg de exosomas	Vía subcutánea	↑ proliferación celular ↑ reepilización Inhíbe apoptosis -Activa vía Wnt/β-Catenina para acelerar la cicatrización	↑ # cel. PCNA ⁺ ↑ colágeno I / III ↑ expresión de CK19 (marcador epitelial) ↓ Bax ↑ Bcl-2	Inyección PBS	Bin Zhang Mei WangAihua Gong Xu Zhang Xiaodan Wu Yanhua Zhu Hui Shi Lijun Wu Wei Zhu Hui Qian Wenrong Xu. "HucMSC Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing." <i>Regenerative Medicine STEM CELLS</i> Volume 33, Issue 7

CORAZÓN	Lesión por isquemia reperusión miocárdica	MSC huES9	0.4 µg de exosomas	Vía intravenosa (vena de la cola)	↓ adelgazamiento del área del infarto ↑ extensión de tejido viable ↑ contractilidad y relajación ↓ inflamación	↑ β- Catenina y genes ciclina D1, Ciclina D3, N-cadherina ↑ ATP/ADP ↑ NADH / NAD+ ↓ estrés oxidativo ↓ fosforilación de Akt y GSK3 ↓ infiltración de neutrófilos y macrófagos	Solución salina	Fatih Arslan, Ruenn, Chai Lai, Mirjam B. Smeets, Lars Akerod, Andre Choo, Eissa NE Aqoor, Leo Timmers, Harold V. van Rijen, Gerard Pasterkamp, Sai Kiang Lim, Dominique P. de Kleijn "Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury" Stem Cell Research Volume 10, Issue 3, May 2013, Pages 301-312
	Infarto al miocardio	MSC de médula ósea de ratas transfectadas con vector para sobreexpresar CXCR4	100 4 µL de exosomas por pocillo	No aplica	↓ apoptosis -Promueve angiogénesis -Reduce el tamaño del infarto	↑ IGF-1α ↑ fosforilación de Akt ↑ niveles de procaspasa 3 ↓ caspasa 3 activa ↑ VEGF	Solución salina	Kai Kang, Ruilian Ma, Wenfeng Cai, Wei Huang, Christian Paul, Jialiang Liang, Yuhua Wang, Tiejun Zhao, Ha Won Kim, Meifeng Xu, Ronald W. Millard, Zhili Wen y Yigang Wang "Exosomes Secreted from CXCR4 Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Promote Cardioprotection via Akt Signaling Pathway following Myocardial Infarction" Stem cells international vol. 2015 (2015): 659890.
	Lesión isquémica miocárdica aguda	MSC de cordón umbilical humano	400 µg de exosomas	Intravenoso (vena de la cola)	↑ función cardíaca ↓ fibrosis cardíaca ↓ apoptosis ↑ proliferación celular ↑ angiogénesis	↑ Bcl-2 ↓ Bax ↑ estructuras tubulares ↑ migración de células	Inyección PBS	Yuan Yuan Zhao, Xiaoxian Sun, Wenming Cao, Jie Ma, Li Sun, Hui Qian, Wei Zhu and Wenrong Xu "Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Relieve Acute Myocardial Ischemic Injury" Stem cells international vol. 2015 (2015): 761643.

VISIÓN A FUTURO

Se espera que el tratamiento con exosomas de células madre mesenquimales pueda ser considerado como una opción viable para muchas más enfermedades que las antes descritas. Para entonces, se deben de tratar problemas como la estandarización de los protocolos para su obtención y purificación, así como aclarar la cuestión de las dosis y comenzar con los ensayos clínicos, ya que, como se ha demostrado en todos los ensayos preclínicos, los exosomas de células madre mesenquimales, por su tamaño y su composición pueden llegar a cualquier rincón del organismo donde se necesiten, inclusive atravesar la barrera hematoencefálica, la cual es uno de los grandes problemas al buscar tratamiento para enfermedades neurodegenerativas. Al ser un producto producido por el organismo no genera toxicidad ni efectos adversos, otorgando al paciente la opción de ser tratado con medicina "más orgánica" o más natural, dándole la seguridad de que al tratar su enfermedad no se le están formando otras, como comúnmente ocurre con los medicamentos convencionales. También, gracias al amplio conocimiento de los tipos de células madre mesenquimales y sabiendo que cada una responde de cierta manera a factores externos, podemos crear medicamentos personalizados, según lo que necesite el paciente para tratar su enfermedad, garantizando la recuperación del paciente y no solo tratar los síntomas de su padecimiento.

Dado el crecimiento exponencial en el número de publicaciones cuyo título incluye "exosome" y "MSC" o "Mesenchymal Stem Cells" en el sitio Pubmed, donde en el 2009 únicamente contaba con una publicación y hoy, 10 años después, en lo que va del 2019, lleva más de 450 publicaciones, se ha determinado en un metaanálisis que el área de estudio de los exosomas de células madre mesenquimales va en crecimiento y aún tiene mucho que dar [94], ya que, según la poca (o mucha) evidencia experimental en los últimos

años acerca de los exosomas de células madre mesenquimales, los colocan como la posible y muy probable medicina regenerativa del futuro (y como avanza su investigación, considero, que es un futuro no muy lejano).

CONCLUSIONES

En los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo para conocer y comprender las armas de las células madre mesenquimales con las cuales mantienen la homeostasis en el cuerpo y se han ideado formas de mejorarlas, de tal manera que se ha eliminado la presencia de las células y nos hemos quedado con los mejores vehículos para transportar no solo moléculas señalizadoras, también material genético, que, dependiendo de las condiciones a las que han sido sometidas las MSC, generarán una respuesta u otra. Esto es gracias a que las MSC tienen la capacidad de controlar su medio para que las células que las rodean, incluyéndolas, cambien de un estado proinflamatorio a uno antiinflamatorio o regulador, de un estado quiescente cuando el tejido está en homeostasis, a uno activo cuando se presenta un daño. Se ha visto a lo largo de esta recopilación, que se pueden utilizar exosomas de células madre mesenquimales para ejercer la acción que harían estas células madre en sitios de difícil acceso puesto que atraviesan incluso la barrera hematoencefálica, brindando una opción para tratar enfermedades como el Alzheimer.

Los exosomas de células madre mesenquimales son la materia prima para crear en un futuro tratamientos personalizados, ya que en la actualidad, gracias a todo el conocimiento de ingeniería genética y manipulación celular, los exosomas están siendo modificados para que carguen moléculas o miRNAs específicos para bloquear o activar vías de señalización determinadas, se les han añadido marcadores para que se mejore su internalización por células diana específicas, esto hace más importante aún conocer los mecanismos de acción a nivel molecular de las patologías, para poder saber cómo atacarlas con ayuda de estas moléculas bioactivas.

Aún se necesita mucha investigación tanto preclínica como clínica, conocer a detalle los mecanismos de acción de estas vesículas extracelulares, para así

entender a la perfección como es que ejercen sus efectos inmunoreguladores, anti apoptóticos, anti fibróticos, pro angiogénicos, entre otros ya mencionados, para poder llevarlos a aquellos pacientes que lo necesiten. Hasta el momento, los exosomas de células madre mesenquimales representan una opción prometedora para, en un futuro, tratar enfermedades que hoy en día no cuentan con un tratamiento definitivo.

Referencias

- [1] «NIH Stem Cell Information Home Page. In Stem Cell Information [World Wide Web site],» MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2016. [En línea]. Available: <https://stemcells.nih.gov/info/basics/1.htm>. [Último acceso: 02 03 2019].
- [2] S. Gómez López, R. G. Lerner y C. Petritsch, «Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer,» *Cellular and molecular life sciences*, vol. 71, nº 4, p. 575–597, 2014.
- [3] I. J. Cho, P. P. Lui, J. Obajdin, F. Riccio, W. Stroukov, T. Louise Willis, F. Spagnoli y F. M. Watt, «Mechanisms, Hallmarks, and Implications of Stem Cell Quiescence,» *Stem Cell Reports*, vol. 12, nº 6, pp. 1190-1200, 2019.
- [4] D. Wei-Min Tan y N. Barker, «Intestinal Stem Cells and Their Defining Niche,» *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 107, pp. 77-107 |, 2014.
- [5] S. M. Cullen, A. Mayle, L. Rossi y M. A. Goodell, «Hematopoietic Stem Cell Development: An Epigenetic Journey,» *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 107, pp. 39-75, 2014.
- [6] E. Posfai, O. H. Tam y J. Rossant, «Mechanisms of Pluripotency In Vivo and In Vitro,» *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 107, pp. 1-37, 2014.
- [7] C. K. Bradley, J. Schaft, T. K. Roy, B. Dumevska y T. T. Peura, «Derivation of Human Embryonic Stem Cell Lines from Vitri-fied Human Blastocysts,» de *Human Embryonic Stem Cell Protocols*, New York, NY, Humana Press, 2014, pp. 1-23.
- [8] «NIH Stem Cell Information Home Page,» National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2016. [En línea]. Available: <https://stemcells.nih.gov/glossary.htm#embryonicsc>. [Último acceso: 13 10 2019].
- [9] A. D. Agulnick, D. M. Ambruzs, M. A. Moorman, A. Bhoumik, R. M. Cesario, J. K. Payne, J. R. Kelly, C. Haakmeester, R. Srijemac, A. Z. Wilson, J. Kerr, M. A. Frazier, E. J. Kroon y K. A. D'Amour, «Insulin-Producing Endocrine Cells Differentiated In Vitro From Human Embryonic Stem Cells Function in Macroencapsulation Devices In Vivo,» *STEM CELLS Translational Medicine*, vol. 4, nº 10, 2015.
- [10] D. Ilic y C. Ogilvie, «Concise Review: Human Embryonic Stem Cells—What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going?,» *STEM CELLS*, vol. 35, nº 1, 2016.
- [11] G. Debabrata, M. Nalin, P. Asmita y S. Jayasree, «Ethical issues in biomedical use of human embryonic stem cells (hESCs),» *Journal of Reproductive Health and Medicine*, vol. 2, nº 2, pp. S37-S47, 2016.

- [12] «ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD,» 24 MAYO 2018. [En línea]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. [Último acceso: 13 MARZO 2019].
- [13] O. Simonson E., A. Domogatskaya, P. Volchkov y S. Rodin, «The safety of human pluripotent stem cells in clinical treatment.,» *Journal Annals od Medicine*, vol. 47, nº 5, pp. 370-380, 2015.
- [14] S. Subramaniam, E. Antoniadou, P. d. Coppi y A. L. David, «In Utero Therapy for Congenital Disorders Using Amniotic Fluid Stem Cells,» de *Perinatal Stem Cells*, Elsevier, 2018, pp. 3-20.
- [15] F. Lesage, S. Zia, J. Jiménez, J. Deprest y J. Toelen, «The amniotic fluid as a source of mesenchymal stem cells with lung-specific characteristics,» *Prenatal Diagnosis*, vol. 37, nº 11, 2017.
- [16] N. Mottet, Y. Chaussy, F. Arbez-Gindre y D. Riethmuller, «Fisiología y patologías del cordón umbilical,» *EMC - Ginecología-Obstetricia*, vol. 53, nº 4, pp. 1-12, 2017.
- [17] A. Keating, J. T. Walkes y J. E. Davies, «Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells,» *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 6, nº 7, pp. 1620-1630, 2017.
- [18] M. Adamiak, Z. Madeja y E. K. Zuba-Surma, «Cord Blood Stem Cells,» de *Adult Stem Cell Therapies: Alternatives to Plasticity*, New York NK, Humana Press, 2014, pp. 35-52.
- [19] T. Li, M. Xia, Y. Gao, Y. Chen y Y. Xu, «Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy,» *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 25, nº 9, p. 1293–1306, 2015.
- [20] M. Pozzobon, C. Franzin, M. Piccoli y P. De Coppi, «Fetal stem cells and skeletal muscle regeneration: a therapeutic approach.,» *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 6, nº 222, pp. 1-6, 2014.
- [21] S. Bollini y C. Balbi, «Fetal and Perinatal Stem Cells in Cardiac Regeneration: Moving Forward to the Paracrine Era.,» *Placenta*, vol. 59, pp. 96-106, 2017.
- [22] L.-S. Spitzhorn, M. S. Rahman, L. Schwindt, H.-T. Ho, W. Wruck, M. Bohndorf, S. Wehrmeyer, A. Ncube, I. Beyer, C. Hagenbeck, P. Balan, T. Fehm y J. Adjaye, «Isolation and Molecular Characterization of Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells Obtained from Caesarean Sections,» *Stem Cells international*, vol. 2017, nº 5932706, 2017.
- [23] S. P. Loukogeorgakis y P. De Coppi, «Concise Review: Amniotic Fluid Stem Cells: The Known, the Unknown, and Potential Regenerative Medicine Applications,» *Stem Cells*, vol. 35, pp. 1663-1673, 2017.
- [24] S. P. Loukogeorgakis y P. De Coppi, «Stem cells from amniotic fluid – Potential for regenerative medicine,» *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, vol. 31, pp. 45-57, 2016.

- [25] N. Gurusamy, A. Alsayari, S. Rajasingh y J. Rajasingh, «Adult Stem Cells for Regenerative Therapy,» de *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Elsevier, 2018, pp. 1-22.
- [26] S. J. Morrison y D. T. Scadden, «The bone marrow niche for haematopoietic stem cells,» *Nature*, vol. 505, p. 327–334, 2014.
- [27] X. Xu, K. J. Wilschut, G. Kouklis, H. Tian, R. Hesse, C. Garland, H. Sbitany, S. Hansen, R. Seth, P. D. Knott, W. Y. Hoffman y J. H. Pomerantz, «Human Satellite Cell Transplantation and Regeneration from Diverse Skeletal Muscles,» *Stem Cell Reports*, vol. 5, nº 1, pp. 419-434, 2015.
- [28] A. Rezza, R. Sennett y M. Rendl, «Adult Stem Cell Niches: Cellular and Molecular Components,» *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 107, pp. 333-372, 2014.
- [29] C. R Marlein y S. A Rushworth, «Bone Marrow,» *eLS. John Wiley & Sons Ltd.*, 2018.
- [30] C. L. Baker y M. F. Pera, «Capturing Totipotent Stem Cells,» *Cell Stem Cell*, vol. 22, nº 1, pp. 25-34, 2018.
- [31] D. Cyranoski, «How human embryonic stem cells sparked a revolution,» *Nature*, 2018. [En línea]. Available: <https://www.nature.com/articles/d41586-018-03268-4>. [Último acceso: junio 2019].
- [32] M. Scudellari, «A decade of iPSCs,» *NATURE*, vol. 534, pp. 310-312, 2016.
- [33] T. Takebe, R.-R. Zhang, H. Koike, M. Kimura, E. Yoshizawa, M. Enomura, N. Koike, K. Sekine y H. Taniguchi, «Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant,» *Nature Protocols*, vol. 9, p. 396–409, 2014.
- [34] M. Scudellari, «How iPSC cells changed the world,» *NATURE*, vol. 534, nº 7607, 2016.
- [35] A. Sobhani, N. Khanlarkhani, M. Baazm, F. Mohammadzadeh, A. Najafi, S. Mehdinejadi y F. Sargolzaei Aval, «Multipotent Stem Cell and Current Application,» *Acta Médica Iranica*, vol. 55, nº 1, pp. 6 - 23, 2017.
- [36] N. Asada, S. Takeishi y P. S. Frenette, «Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche,» *International Journal of Hematology*, vol. 106, nº 1, p. 45–54, 2017.
- [37] A. Singh, C. B. Yadav, N. Tabassum, A. K. Bajpeyee y V. Verma, «Stem cell niche: Dynamic neighbor of stem cells,» *European Journal of Cell Biology*, 2018.
- [38] M. J. Perugorria, P. Olaizola, I. Labiano, A. Esparza-Baquer, M. Marzioni, J. J. G. Marin, L. Bujanda y J. M. Banales, «Wnt– β -catenin signalling in liver development, health and disease,» *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 16, pp. 121-136, 2019.
- [39] A. Stoddart, J. Wang, C. Hu, A. A. Fernald, E. M. Davis, J. X. Cheng y M. M. Le Beau, «Inhibition of WNT signaling in the bone marrow niche prevents the development of MDS in the Ap^{cdel}/+ MDS mouse model,» *Blood*, vol. 129, nº 22, pp. 2959 - 2970, 2017.

- [40] M. Wu, G. Chen y Y.-P. Li, «TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease.,» *Bone Research*, vol. 4, nº 16009, 2016.
- [41] R. N.Wang, J. Green, Z. Wang, Y. Deng, M. Qiao, M. Peabody, Q. Zhang, J. Ye, Z. Yan, SahityaDenduluri, O. Idowu, M. Li, C. Shen, A. Hub, R. C. Haydon, R. Kang, J. Mok y M. J. Lee, «Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases,» *Genes & Diseases*, vol. 1, nº 1, pp. 87-105, 2014.
- [42] C. S. Nowell y F. Radtke, «Notch as a tumour suppressor,» *Nature reviews Cancer*, vol. 17, pp. 145-159, 2017.
- [43] S. W. Lane, D. A. Williams y F. M. Watt, «Modulating the stem cell niche for tissue regeneration,» *Nature biotechnology*, vol. 32, nº 8, p. 795–803, 2014.
- [44] A. A. Salybekov, A. K. Salybekova, R. Pola y T. Asahara, «Sonic Hedgehog Signaling Pathway in Endothelial Progenitor Cell Biology for Vascular Medicine,» *International Journal of Molecular Science*, vol. 19, nº 10, p. 3040, 2018.
- [45] E. Yao y P.-T. Chuang, «Hedgehog signaling: From basic research to clinical applications,» *Journal of the Formosan Medical Association*, vol. 114, nº 7, pp. 569-576, 2015.
- [46] J. Briscoe y P. P. Thérond, «The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease,» *Nature Reviews Moleccular Cell Biology*, vol. 14, pp. 416-429, 2013.
- [47] P. J. Yao, R. S. Petralia y M. P. Mattson, «Sonic Hedgehog Signaling and Hippocampal Neuroplasticity,» *Trends in Neurosciences*, vol. 39, nº 12, pp. 840-850, 2016.
- [48] J. Yang, P. Andre, L. Ye y Y.-Z. Yang, «The Hedgehog signalling pathway in bone formation,» *International Journal Of Oral Science*, vol. 7, nº 2, pp. 73-79, 2015.
- [49] M. Quarta, J. O. Brett, R. DiMarco, A. D. Morree, S. C. Boutet, R. Chacon, M. C. Gibbons, V. A. Garcia, J. Su, J. B. Shrager, S. Heilshorn y T. A. Rando, «An artificial niche preserves the quiescence of muscle stem cells and enhances their therapeutic efficacy,» *Nature Biotechnology*, vol. 34, p. 752–759, 2016.
- [50] T. Derrickson, «Sistema esquelético: tejido óseo,» de *Principios de Anatomía y Fisiología*, Editorial médica panamericana, 2013, pp. 183-188.
- [51] C. Vega Ramirez, «Tejido Hematopoyético,» de *Histología básica. Fundamentos de biología celular y del desarrollo humano*, médica Panamericana, 2015, pp. 322-323.
- [52] L. Junqueira y J. Carneiro, «Hematopoyesis,» de *Histología Básica*, Editorial medica panamericana, 2015, pp. 234-249.
- [53] R. Henschler, «Hematopoietic Stem Cells,» *Encyclopedia of Immunotoxicology.*, 2016.

- [54] P. E. Boulais y P. S. Frenette, «Making sense of hematopoietic stem cell niches,» *Blood*, vol. 125, nº 17, pp. 2621-2629, 2015.
- [55] B. Brenner, «Hematopoietic Stem Cell Transplantation—50 Years of Evolution and Future Perspectives,» *Rambam Maimonides Med J.*, vol. 5, nº 4, 2014.
- [56] K. Khaddour y P. Mewawalla, «Hematopoietic Stem Cell Transplantation.,» 2019. [En línea]. Available: <https://www.ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/books/NBK536951/>.
- [57] K. Hübel, «Mobilization and Collection of HSC,» de *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*, Springer Open, 2019, pp. 117-122.
- [58] A. J. Friedenstein, K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova y G. P. Frolova, «Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.,» *Transplantation*, vol. 6, nº 2, pp. 230-247, 1968.
- [59] A. Andrzejewska, B. Lukomska y M. Janowski, «Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost,» *Stem Cells*, 2019.
- [60] 2. e. REAL ACADEMIA ESPAÑOLA: Diccionario de la lengua española, «REAL ACADEMIA ESPAÑOLA,» 7 6 2019. [En línea]. Available: <https://dle.rae.es/?id=P2L6g99>.
- [61] P. J. Mishra y D. Banerjee, «Activation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells,» de *Signal Transduction Immunohistochemistry*, New York, NY, Humana Press, 2017, pp. 201-209.
- [62] J. A. Guadix, J. L. Zuñiga y P. Gálvez Martin, «Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular,» *Medicina clínica*, 2016.
- [63] M. Sharma, C. Ross y S. Srivastava, «Ally to adversary: mesenchymal stem cells and their transformation in leukaemia,» *Cancer cell international*, vol. 19, nº 139, 2019.
- [64] Delves y P. J., «Interacción primaria con el antígeno.,» de *Riott: Inmunología: Fundamentos*, México D.F., Editorial Médica Panamericana, 2015, pp. 113-133.
- [65] Actor y J. K., «T Lymphocytes: Ringleaders of Adaptive Immune Function,» de *Introductory Immunology. Basic Concepts for Interdisciplinary Applications*, 2019, pp. 45-62.
- [66] O. Rojas-Espinosa, «Inducción de la respuesta inmunitaria,» de *Inmunología de memoria*, Ciudad de México, Editorial Médica Panamericana, 2017, pp. 152-185.
- [67] C. M. Lina y R. G. Gillb, «Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms.,» *Current opinion in organ transplantation*, vol. 21, nº 1, pp. 40-44, 2016.
- [68] S. DeWolf y M. Sykes, «Alloimmune T cells in transplantation,» *The Journal of clinical investigation*, vol. 127, nº 7, p. 2473–2481, 2017.

- [69] A. R. R. Weiss y M. H. Dahlke, «Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs,» *Frontiers in immunology*, vol. 10, nº 1191, 2019.
- [70] P. L. Crawford, F. Djouad, K. Toupet, C. Bony, M. Franquesa, M. J. Hoogduijn, C. Jorgensen y D. Noël, «Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation,» *STEM CELLS*, vol. 34, nº 2, 2015.
- [71] J. D. Glenn y K. A. Whartenby, «Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy,» *World Journal of Stem Cells*, vol. 6, nº 5, p. 526–539, 2014.
- [72] V. Pistoia y L. Raffaghello, «Mesenchymal stromal cells and autoimmunity,» *International Immunology*, vol. 29, nº 2, p. 9–58, 2017.
- [73] H. J. Lee, S. N. Kim, M. S. Jeon, T. Yi y S. U. Song, «ICOSL expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes induction of regulatory T cells,» *Scientific Reports*, vol. 7, nº 44486, 2017.
- [74] D. K. Lee y S. U. Song, «Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications,» *Cellular Immunology*, vol. 326, pp. 68-76, 2018.
- [75] Y. Rubtsov, K. Goryunov, A. Romanov, Y. Suzdaltseva, G. Sharonov y V. Tkachuk, «Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1,» *Stem Cells International*, 2017.
- [76] L. C. Davies, N. Heldring, N. Kadri y K. L. Blanc, «Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression,» *Stem Cells*, vol. 35, nº 3, p. 766–776, 2017.
- [77] T. M. Nguyen, A. Arthur, J. D. Hayball y S. Gronthos, «EphB and Ephrin-B Interactions Mediate Human Mesenchymal Stem Cell Suppression of Activated T-Cells,» *Stem Cells and Development*, vol. 22, nº 20, 2013.
- [78] B. S. Markovic, T. Kanjevac, C. R. Harrell, M. Gazdic, C. Fellabaum, N. Arsenijevic y V. Volarevic, «Molecular and Cellular Mechanisms Involved in Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy of Inflammatory Bowel Diseases,» *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 14, nº 2, pp. 153-165, 2017.
- [79] P. Contreras-Kallens, C. Terraza, K. Oyarce, T. Gajardo, C. Campos-Mora, M. T. Barroilhet, C. Alvarez, R. Fuentes, F. Figueroa, M. Khoury y K. Pino-Lagos, «Mesenchymal stem cells and their immunosuppressive role in transplantation tolerance,» *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1417, nº 1, 2017.
- [80] L. Meseguer-Olmo, A. J. Montellano, T. Martínez, C. M. Martínez, B. Revilla-Nuin, M. Roldán, C. Fuente Mora, M. D. López-Lucas y T. Fuente, «Intraarticular and intravenous administration of 99mTc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells (99mTc-AH-MSCs): In vivo imaging and biodistribution,» *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 46, pp. 36-42, 2017.

- [81] B. Argibay, J. Trekker, U. Himmelreich, A. Beiras, A. Topete, P. Taboada, M. Pérez-Mato, A. Vieites-Prado, R. Iglesias-Rey, J. Rivas, A. M. Planas, T. Sobrino y J. Castillo, «Intraarterial route increases the risk of cerebral lesions after mesenchymal cell administration in animal model of ischemia,» *Scientific Reports*, vol. 7, nº 40758, pp. 1-17, 2017.
- [82] R. M. Samsonraj, M. Raghunath, V. Nurcombe, J. H. Hui, A. J. van Wijnen y S. M. Cool, «Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine,» *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 6, nº 12, pp. 2173-2185, 2017.
- [83] L. Li, X. Chen, W. E. Wang y C. Zeng, «How to Improve the Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cell in Ischemic Heart?,» *Stem Cells International*, vol. 2016, nº 9682757, 2016.
- [84] F. J. Vizoso, N. Eiro, S. Cid, J. Schneider y R. Perez Fernandez, «Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 9, nº 1852, 2017.
- [85] J. Rovira, F. Diekmann, J. M. Campistol y M. J. Ramírez-Bajo, «Therapeutic application of extracellular vesicles in acute and chronic renal injury.,» *Nefrología*, vol. 37, nº 2, pp. 126-137, 2017.
- [86] P. Wu, B. Zhang, H. Shi, H. Qian y W. Xu, «MSC-Exosome: A novel cell-free therapy for cutaneous regeneration,» *International Society for Cellular Therapy*, vol. 20, pp. 291-301, 2018.
- [87] F. Vakhshiteh, F. Atyabi y S. N. Ostad, «Mesenchymal stem cell exosomes: a two-edged sword in cancer therapy,» *International Journal of Nanomedicine*, vol. 14, p. 2847–2859, 2019.
- [88] A. E. Vitha, A. W. Kollefrath, C.-Y. C. Huang y F. Gracia Godoy, «Characterization and Therapeutic Uses of Exosomes: A New Potential Tool in Orthopedics,» *Stem Cells and Development*, vol. 28, nº 2, 2019.
- [89] «UNIPROT,» 3 07 2019. [En línea]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q99816>. [Último acceso: 20 07 2019].
- [90] «Uniprot,» 03 07 2019. [En línea]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8WUM4>. [Último acceso: 20 07 2019].
- [91] C. Villarroya-Beltri, F. Baixauli, C. Gutiérrez-Vázquez, F. Sánchez-Madrid y M. Mittelbrunn, «SORTING IT OUT: REGULATION OF EXOSOME LOADING,» *Seminars in cancer biology*, vol. 28, pp. 3-13, 2014.
- [92] S. P. Li, Z. X. Lin, X. Y. Jiang y X. Y. Yu, «Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools,» *Nature*, vol. 39, nº 4, p. 542–551, 2018.
- [93] N. P. Hessvik y A. Llorente, «Current knowledge on exosome biogenesis and release,» *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 75, nº 2, p. 193–208, 2018.

- [94] b. Wang, D. Xing, Y. Zhu, S. Dong y B. Zhao, «The State of Exosomes Research: A Global Visualized Analysis,» *Bio Med Research International*, vol. 2019, nº 1495130, 2019.
- [95] A. Vishnoi y S. Rani, «MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview.,» de *MicreRNA profiling. methods in molecular biology*, vol. 1509, New York, NY, Humana Press, 2017, pp. 1-10.
- [96] R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, V. W. Rodwell y Wein, «estructura y función del ácido nucléico,» de *Harper: bioquímica ilustrada*, McGraw-Hill, 2013, p. 352.
- [97] S. R. Baglio, K. Rooijers, D. Koppers Lalic, F. J. Verweij, M. Pérez Lanzón, N. Zini, B. Naaijken, F. Perut, H. W. M. Niessen, N. Baldini y D. M. Pegtel, «Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species,» *Stem cell research & therapy*, vol. 6, nº 1, 2015.
- [98] X. Liang, L. Zhang, S. Wang, Q. Han y R. C. Zhao, «Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a.,» *J Cell Sci*, vol. 129, nº 11, pp. 2182-9, 2016.
- [99] K. Pakravan, S. Babashah, M. Sadeghizadeh, S. J. Mowla, M. Mossahebi Mohammadi, F. Ataei, N. Dana y M. Javan, «MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling axis in breast cancer cells.,» *Cellular oncology (Dordrecht)*, vol. 40, nº 5, pp. 457-470, 2017.
- [100] X. Li, L. Liu, J. Yang, Y. Yu, J. Chai, L. Wang, L. Ma y H. Yin, «Exosome Derived From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Mediates MiR-181c Attenuating Burn-induced Excessive Inflammation.,» *EBioMedicine*, vol. 8, pp. 72-82, 2016.
- [101] K. Yin, S. Wang y R. Chunhua Zhau, «Exosomes from mesenchymal stem / stromal cells: a new therapeutic paradigm,» *Biomarker Research*, vol. 7, nº 8, 2019.
- [102] T. Zhao, F. Sun, J. Liu, T. Ding, J. She, F. Mao, W. Xu, H. Qian y Y. Yan, «Emerging Role of Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes in Regenerative Medicine,» *Current Stem Cell Research & Therapy*, vol. 14, nº 6, 2019.
- [103] S. B. Hong, H. Yang, A. Manaenko, J. Lu, Q. Mei y Q. Hu, «Potential of Exosomes for the Treatment of Stroke.,» *Cell Transplant*, vol. 28, nº 6, pp. 662-670, 2019.
- [104] L. G, C. Z, Z. M y L. Y, «Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases.,» *Experimental & molecular medicine.*, vol. 49, nº 6, 2017.
- [105] O. P. W. Karolinska, J. Z. Nordin, A. O'Loughlin, Y. Gustafsson, G. Corso, I. Mäger, P. Vader, Y. Lee, H. Sork, Y. Seow, N. Heldring, L. Alvarez-Erviti, C. E. Smith, K. L. Blanc y P. Macchiarini, «Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting,» *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 4, nº 1, 2015.

- [106] D. Jafari, S. Malih, S. S. Eslami, R. Jafari, L. Darzi, P. Tarighi y A. Samadikuchaksaraei, «The relationship between molecular content of mesenchymal stem cells derived exosomes and their potentials: Opening the way for exosomes based therapeutics,» *Biochimie*, vol. 165, pp. 76-89, 2019.
- [107] K. C. Elahi, G. Klein, M. Avci-Adali, K. D. Sievert, S. MacNeil y W. K. Aicher, «Human Mesenchymal Stromal Cells from Different Sources Diverge in Their Expression of Cell Surface Proteins and Display Distinct Differentiation Patterns,» *Stem Cells International*, p. 5646384, 2016.
- [108] H. Cheng, H. Fang, R. D. Xu, M. Q. Fu, L. Chen, X. Y. Song, J. Y. Qian, Y. Z. Zou, J. Y. Ma y J. B. Ge, «Development of a rinsing separation method for exosome isolation and comparison to conventional methods.,» *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol. 23, nº 12, pp. 5074-5083, 2019.
- [109] L. M. Doyle y M. Z. Wang, «Review. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis,» *Cells*, vol. 8, nº 7, p. 727, 2019.
- [110] P. Zhang, J. C. Yeo y C. T. Lim, «Advances in Technologies for Purification and Enrichment of Extracellular Vesicles,» *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation*, 2019.
- [111] Y. Yanghoubo, A. A. Movassaghpour, M. Zumani, M. Talebi, A. Mehdizadeh y M. Yousefi, «Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived-exosomes in diseases treatment,» *Life sciences*, vol. 233, nº 16733, 2019.
- [112] «Synder filtration,» [En línea]. Available: <https://synderfiltration.com/learning-center/articles/membranes/molecular-weight-cut-off/>. [Último acceso: 21 08 2019].
- [113] X.-X. Yang, C. Sun, L. Wang y X.-L. Guo, «New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes,» *Journal of Controlled Release*, vol. 308, pp. 119-129, 2019.
- [114] R. Hou, Y. Li, Z. Sui, H. Yuan, Y. Kaiguang, Z. Liang, L. Zhang y Y. Zhang, «Advances in exosome isolation methods and their applications in proteomic analysis of biological samples,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 411, nº 21, pp. 5351-5361, 2019.
- [115] B. T. Kurien y R. H. Scofield, «Western Blotting: An Introduction.,» de *Western Blotting. Methods in Molecular Biology*, vol. 1312, Nueva York, NY, Humana Press, 2015, pp. 17-30.
- [116] BioVision Incorporated, «Biovision,» [En línea]. Available: <https://www.biovision.com/documentation/datasheets/M1030.pdf>. [Último acceso: 27 08 2019].
- [117] MALVERN PANALYTICAL, «MALVERN PANALYTICAL a spectris Company,» 2012. [En línea]. Available: <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis>. [Último acceso: septiembre 2019].

- [118] H. Silva Pereyra y O. A. Patrón Soberon, «Laboratorio nacional de investigaciones en nanociencias y nanotecnología,» [En línea]. Available: http://www.linan-ipicyt.mx/Microscopio_HR-TEM.html. [Último acceso: 29 08 2019].
- [119] U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Office of Regulatory Affairs (ORA), «Guidance for Industry. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing — Current Good Manufacturing Practice,» 2014. [En línea]. Available: <https://www.fda.gov/media/71026/download>. [Último acceso: agosto 2019].
- [120] European Commission, «Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products,» 2017. [En línea]. Available: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2017_11_22_guidelines_gmp_for_atmps.pdf. [Último acceso: agosto 2019].
- [121] Secretaría de Salud, MIKEL ANDONI ARRIOLA PEÑALOSA, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, «NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.,» 2013. [En línea]. Available: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/normatividad/vigente/SALUD/NOM-059-SSA1-2013.pdf>. [Último acceso: agosto 2019].
- [122] T. Zhao, F. Sun, J. Liu, T. Ding, J. She, F. Mao, W. Xu, H. Qian y Y. Yan, «Emerging role os mesenchymal stem cell-derived exosomes in regenerative medicine,» *Current stem cell research & therapy*, vol. 14, nº 6, 2019.
- [123] K. Yin, S. Wang y R. C. Zhao, «Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: a new therapeutic paradigm,» *Biomarker Research*, vol. 7, nº 8, 2019.
- [124] B. Bochon, M. Kozubska, G. Surygała, A. Witkowska, R. Kuźniewicz, W. Grzeszczak y G. Wystrychowski, «Mesenchymal Stem Cells—Potential Applications in Kidney Diseases,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, nº 10, p. 2462, 2019.
- [125] C. W. Yun y S. H. Lee, «Potencial and therapeutic efficacy of cell-based therapy using mesenchymal stem cells for acute/chronic kidney disease,» *international journal of molecular sciences*, vol. 20, nº 7, p. 1619, 2019.
- [126] P. Draws y M. Rahman, «Chronic Kidney Disease,» *Annals of international Medicine*, vol. 162, nº 11, 2015.
- [127] F. A. Alzahrani, «Melatonin improves therapeutic potential of mesenchymal stem cells-derived exosomes against renal ischemia-reperfusion injury in rats,» *American journal of translational research*, vol. 11, nº 5, p. :2887–2907, 2019.

- [128] C. Y. Tan, R. C. Lai, W. Wong, Y. Y. Dan, S.-K. Lim y H. K. Ho, «Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models,» *Stem cell research & therapy*, vol. 5, nº 3, p. 76, 2014.
- [129] K. Nong, W. Wang, X. Niu, B. Hu, C. Ma, Y. Bai, B. Wu, Y. Wang y K. Ai, «Hepatoprotective effect of exosomes from human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stromal cells against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats,» *Cytotherapy*, vol. 18, nº 12, pp. 1548-1559, 2016.
- [130] A. Damania, D. Jaiman, A. K. Teotia y A. Kumar, «Mesenchymal stromal cell-derived exosome-rich fractionated secretome confers a hepatoprotective effect in liver injury,» *Stem cell research & therapy*, vol. 9, nº 1, p. 31, 2018.
- [131] Y. Fujita, T. Kadota, J. Araya, T. Ochiya y K. Kuwano, «Clinical application of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle-based therapeutics for inflammatory lung diseases,» *Journal of clinical medicine*, vol. 7, nº 10, p. 355, 2018.
- [132] F. F. Cruz, Z. D. Borg, M. Goodwin, D. Sokocevic, D. E. Wagner, A. Cofey, M. Antunes, K. L. Robinson, S. A. Mitsialis, S. Kourembanas, K. Thane, A. M. Hoffman, D. H. McKenna y P. Rocco, «Systemic Administration of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell Extracellular Vesicles Ameliorates Aspergillus Hyphal Extract-Induced Allergic Airway Inflammation in Immunocompetent Mice,» *Stem cells translational medicine*, vol. 4, nº 11, pp. 1304-1316, 2019.
- [133] OMS, «Organización mundial de la salud,» 06 marzo 2018. [En línea]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/burns>. [Último acceso: 15 09 2019].
- [134] P. Goodarzi, B. Larijani, S. Alavi-Moghadam, A. Tayanloo-Beik, F. Mohamadi-Jahani, N. Ranjbaran, M. Payab, K. Falahzadeh, M. Mousavi y B. Arjmand, «Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes for Wound Regeneration,» *Cell Biology and Translational Medicine*, vol. 4, pp. 119-131, 2018.
- [135] A. Shabbir, A. Cox, L. Rodriguez-Menocal, M. Salgado y E. V. Badiavas, «Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro,» *Stem cells and development*, vol. 24, nº 14, pp. 1635-1647, 2015.
- [136] S. Rani y T. Ritter, «The Exosome - A Naturally Secreted Nanoparticle and its Application to Wound Healing,» *Advanced Materials*, vol. 28, nº 27, 2015.
- [137] OMS, «Organización mundial de la salud,» 2014. [En línea]. Available: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/. [Último acceso: 14 09 2019].
- [138] J. Weller y A. Budson, «Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment,» *F1000 Research*, vol. 7, nº F1000 Faculty Rev-1161, 2018.
- [139] A. Kumar y J. W. Tsao, «Alzheimer disease,» StatPearls Publishing, 18 08 2019. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>. [Último acceso: 26 09 2019].

- [140] L. Chuen Liew, T. Katsuda, L. Gailhouste, H. Nakagama y T. Ochiya, «Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a glimmer of hope in treating Alzheimer's disease,» *International Immunology*, vol. 29, nº 1, pp. 11-19, 2017.
- [141] T. Katsuda, R. Tsuchiya, N. Kosaka, Y. Yoshioka, K. Takagaki, K. Oki, F. Takeshita, Y. Sakai, M. Kuroda y T. Ochiya, «Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes,» *Scientific Reports Nature Research*, vol. 3, nº 1197, 2013.
- [142] «New York State Stem Cell Science. Department of Health, Wadsworth Center,» 14 03 2019. [En línea]. Available: <https://stemcell.ny.gov/faqs/what-difference-between-totipotent-pluripotent-and-multipotent>.
- [143] I. Ullah, R. B. Subbarao y G. J. Rho, «Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective,» *Bioscience reports*, vol. 35, nº 2, 2015.
- [144] R. Barker, «Clinical trials,» Universidad de Cambridge , 13 03 2018. [En línea]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01898390>. [Último acceso: 2 04 2019].
- [145] D. Balboa, J. Saarimäki - Vire y T. Otonkoski, «Concise Review: Human Pluripotent Stem Cells for the Modeling of Pancreatic β -Cell Pathology,» *STEM CELLS*, vol. 37, nº 1, pp. 33-41, 2019.
- [146] Actor y J. K., de *Introductory Immunology (Second Edition)*.
- [147] C. Villarroya-Beltri, F. Baixauli, C. Gutiérrez-Vázquez, F. Sánchez-Madrid y M. Mittelbrunn, «SORTING IT OUT: REGULATION OF EXOSOME LOADING,» *Seminars in cancer biology*, vol. 28, pp. 3-13, 2014.
- [148] «Clinical Trials,» National Library of Medicine, [En línea]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=MSC+exosome&cntry=&state=&city=&dist=>. [Último acceso: 27 09 2019].
- [149] F. Gao, S. M. Chiu, D. A. Motan, Z. Zhang, L. Chen, H. L. Ji, H. F. Tse, Q. L. Fu y Q. Lian, «Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects,» *Cell Death & Disease*, vol. 7, nº 1, 2016.
- [150] G. A. Pimentel Parra y B. Murcia Ordoñez, «Células madre, una nueva alternativa médica,» *Perinatología y Reproducción Humana*, vol. 31, nº 1, pp. 1-52, 2017.