



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**MODULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
FACTORES DE CRECIMIENTO EN CÉLULAS
TRONCALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

AGUILAR SANDOVAL DIANA MICHEL



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. KATIA JARQUÍN YÁÑEZ
Ciudad Universitaria, CD.MX., 2024**



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del Tutor

Dra.
Katia
Jarquín
Yáñez

2. Datos del sinodal 1

Dra.
Patricia
Rivas
Manzano

3. Datos del sinodal 2

M. en C
Jennifer
Alcántara
Blancarte

4. Datos del sinodal 3

M.C.
Sara Judith
Álvarez
Pérez

5. Datos del sinodal 4

Dr.
Genaro
Vázquez
Victorio

6. Datos del trabajo escrito

Modulación de la producción de factores de crecimiento en células troncales

66 p.
2024

MODULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN CÉLULAS TRONCALES

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	9
1.1 Células troncales y su clasificación.....	9
1.2 Células troncales mesenquimales derivadas de la Gelatina de Wharton (WJ- MSC)	11
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Secretoma de células troncales.....	13
2.2 Modulación de la composición del secretoma de MSC.....	15
2.3 Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) ..	19
2.4 Factores de crecimiento producidos por las MSC.....	21
2.5 Aplicación clínica del secretoma de células troncales	29
3.JUSTIFICACIÓN	31
4.HIPÓTESIS	31
5.OBJETIVO	31
5.1 Objetivos específicos	31
6.METODOLOGÍA	32
6.1 Obtención y cultivo de células troncales mesenquimales de la Gelatina de Wharton (WJ- MSC).....	32
6.2 Fenotipo de las WJ-MSC por citometría de flujo.....	32
6.3 Modulación <i>in vitro</i> : precondicionamiento con factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).....	33
6.4 Procesamiento y caracterización del secretoma de WJ-MSC: ensayo múltiple de factores de crecimiento humano, LEGENDplex de Biogen y citometría de flujo.....	33
Análisis estadístico.....	35
7.RESULTADOS	36
7.1 Fenotipo de las células troncales mesenquimales (WJ-MSC)	36
7.2 Caracterización del secretoma de WJ-MSC.....	37
8.DISCUSIÓN	40
9.CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS.....	50

ABREVIATURAS

MSC Células troncales mesenquimales

WJ-MSC Células troncales mesenquimales derivadas de gelatina de Wharton

FC Factores de crecimiento

Ang-2 Angiopoyetina-2 humana

EGF factor de crecimiento epidérmico humano

EPO eritropoyetina humana

bFGF factor de crecimiento de fibroblastos básico humano

G-CSF factor estimulante de colonias de granulocitos

GM-CSF factor estimulante de crecimiento de granulocitos macrófagos humano

HGF factor de crecimiento de hepático humano

M-CSF factor estimulante de colonias de monocitos humano

PDGF-AA factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA humano

PDGF-BB factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB humano

SCF factor de células troncales

TGF- α factor de crecimiento transformante-alfa

VEGF factor de crecimiento endotelial vascular

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNAM por brindarme las comodidades y experiencias durante mi estancia como estudiante.

A mi familia, mis padres y hermana, quienes me apoyaron durante todo el proceso y me cuidaron en los momentos más vulnerables y difíciles, sin ellos no sería la persona que soy hoy. Prometo enorgullecerlos en cada oportunidad que me de la vida.

A mi tutora, la Dra. Katia Jarquín Yáñez, a quién tuve el gusto de conocer y quién vio en mí todo el potencial que a veces yo no podía observar. Gracias por brindarme su apoyo, confianza y ser mi guía en cada paso, llevarme de la mano con tanta paciencia y enseñarme la pasión con la que se debe realizar la investigación y la docencia.

Al Dr. Andrés Castell Rodríguez, al Dr. Miguel Herrera Enríquez, a la Biól. Beatriz Hernández Téllez, a la Dra. Gabriela Piñón Zárate, a Sara Judith Álvarez Pérez, a quienes agradezco con todo el corazón por recibirme tan afectuosamente en el laboratorio, enseñarme y contagiarme de amor por lo que realizan y a quienes tengo el gusto de describir como mis amigos y compañeros.

A todos los miembros del Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos, por sus consejos, comentarios y amistad. En especial a mis colegas Iván Ávila Campos, Shaam, el cDr. José Luis, Vane, a mi hermana académica la cDra. Jennifer Alcántara Blancarte y a la señorita María Elena. Muchísimas gracias por volverse mi segundo hogar y el lugar seguro que se han convertido durante estos años donde me brindaron su apoyo incondicional, conocimiento y cariño.

A la Dra. Patricia Rivas Manzano y a la Dra. Rosario Ortiz Hernández, quienes fueron mis profesoras de histología y me enseñaron esta bella asignatura con tanta pasión que me fue imposible no admirarlas.

Agradecimiento al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LabNalCit) del Instituto de investigaciones Biomedicas. Agradecimiento por el apoyo recibido por el proyecto DGAPA-PAPIIT IN216723.

A mis mejores amigos, que se merecen mucho más que lo existente en este mundo, Adrián Cruz, Vanessa Mandujano, Emiliano Villarreal, Leonardo Novoa y Luis Tenorio, amigos desde el primer semestre de la carrera, no sé a quién agradecerle por haberme hecho coincidir con tan lindas, ocurrentes, amables y cálidas personas. Gracias por escucharme cientos de veces ensayar mis presentaciones. Crecer con ustedes, ha sido de lo más bonito de mi vida, ¡Gracias! Los “awo”.

Por último, pero no menos importante, a mi perrita Canela, quien se desveló y acurrucó a mi lado durante la redacción de cada renglón de este trabajo.

RESUMEN

Las células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton (WJ-MSC) se pueden obtener y aislar fácilmente del cordón umbilical al que se le considera un tejido de desecho postparto. Estas células cuentan con capacidades prometedoras en la medicina regenerativa. Presentan un amplio espectro de diferenciación celular, baja inmunogenicidad, no tumorigénicas, autorrenovables y conservan un fenotipo indiferenciado durante varios pases celulares. Dentro del enfoque terapéutico, son consideradas las células por excelencia en el tratamiento de múltiples lesiones y patologías. Algunos tratamientos proponen realizar un trasplante de células troncales en el sitio de la herida. Sin embargo, con esta técnica existen muchas desventajas como, por ejemplo; muchas de las células trasplantadas no suelen permanecer el tiempo necesario para la cicatrización, por lo que existe una baja tasa de supervivencia, no son capaces de migrar a otras regiones del cuerpo y la señalización que inicia tanto el reclutamiento como la activación de otros tipos celulares, no es sostenida. Recientemente, se ha identificado que los efectos beneficiosos de las WJ-MSC en sitios de lesión, se deben en realidad a los factores secretados por estas células, quienes inician y ejercen un efecto en la señalización celular mediante la comunicación paracrina. Con este nuevo enfoque, surge un nuevo concepto conocido como “Modulación del secretoma” el cual responde a la hipótesis de que las WJ-MSC crecen, proliferan y secretan *in vitro*, en respuesta a los estímulos circundantes del microambiente donde se encuentran. Las WJ-MSC producen y secretan múltiples factores paracrinos con actividades antiapoptóticas, antifibróticas, angiogénicas, quimioattractivas e inmunomoduladoras que son liberados de manera constitutiva al medio. Esta secreción, puede ser modulada con el objetivo de dirigirla hacia la secreción de un perfil proteico deseado y aplicable en terapias específicas, sin la necesidad de trasplantes celulares. Este campo de investigación está en expansión, por lo que aún no existe un protocolo estandarizado en la modulación del secretoma. No obstante, se juega con la manipulación de las variables que pueden cambiar el nicho de las WJ-MSC, como la hipoxia, el uso de agentes físicos, agentes farmacológicos o los mismos factores de crecimiento en diferentes concentraciones. En este estudio nos centramos en la modulación del secretoma por medio del uso de dos factores de crecimiento EGF y FGF que comúnmente son utilizados en el cultivo de WJ-MSC y que, además, durante los procesos de cicatrización de heridas se encuentran altamente expresados.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells from Wharton's jelly (WJ-MSC) can be easily obtained and isolated from the umbilical cord, considered a postpartum waste tissue. These cells exhibit promising capabilities in regenerative medicine. They display a broad spectrum of cell differentiation, low immunogenicity, non-tumorigenic properties, self-renewal, and maintain an undifferentiated phenotype over several cell passages. Within the therapeutic approach, they are considered the quintessential cells in treating multiple injuries and pathologies. Some treatments propose transplanting stem cells at the wound site. However, this technique has several disadvantages; for instance, many transplanted cells often do not remain for the necessary time for wound healing, leading to a low survival rate. They are unable to migrate to other body regions, and the signaling that initiates both the recruitment and activation of other cell types is not sustained. Recently, it has been identified that the beneficial effects of WJ-MSC at injury sites are actually due to factors secreted by these cells, initiating and exerting an effect on cellular signaling through paracrine communication. With this new approach, a new concept known as "Secretome modulation" emerges, responding to the hypothesis that WJ-MSC grow, proliferate, and secrete *in vitro* in response to surrounding stimuli within their microenvironment. WJ-MSC produce and secrete multiple paracrine factors with anti-apoptotic, anti-fibrotic, angiogenic, chemotactic, and immunomodulatory activities, constitutively released into the medium. This secretion can be modulated to direct it towards the secretion of a desired protein profile applicable in specific therapies, without the need for cellular transplants. This field of research is expanding, hence there is no standardized protocol for secretome modulation yet. Nevertheless, it involves manipulating variables that can alter the WJ-MSC niche, such as hypoxia, the use of physical agents, pharmacological agents, or growth factors in different concentrations. This study focuses on secretome modulation using two growth factors, EGF and FGF, commonly employed in WJ-MSC culture and are highly expressed during wound healing processes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Células troncales y su clasificación

Las células troncales son una población de células indiferenciadas presentes en organismos jóvenes y adultos, tienen la capacidad de autorrenovarse y de asistir en la renovación de otros tejidos al diferenciarse en una amplia variedad de linajes celulares. Las células troncales mesenquimales exhiben características *in vitro* como: la adherencia a superficies plásticas, morfología fibroblastoide y un inmunofenotipo positivo para CD73, CD90, CD105, CD44, HLA-ABC y negativo para CD45, CD19, CD34, CD11b y HLA-DR [1 y 2]. En los primeros días de gestación humana, existen células capaces de formar un organismo completo; conforme se avanza en el desarrollo embrionario, la capacidad de diferenciación celular se estrecha hasta donde la especialización celular lo permite, dicho de otra manera, la potencialidad de diferenciación se reduce a la par que se alcanza la formación completa de tejidos y órganos. Por lo anterior, se han caracterizado las etapas de potencialidad donde se encuentran células con diferentes capacidades de diferenciación y diferentes grados de especialización [1]. Las células troncales totipotenciales pueden formar cualquier tipo celular del organismo incluyendo la formación de estructuras embrionarias como la placenta, el cordón umbilical o el saco vitelino, de cualquiera de las tres capas germinales dentro del cigoto, ejemplo de estas células son el propio óvulo fecundado y las primeras cuatro células que se generan tras su división [3]. Aproximadamente cuatro días más tarde de la fecundación en humanos, el blastocisto o ahora embrioblasto, es pluripotente. Las células troncales pluripotentes (PSC) son capaces de formar cualquier capa germinal endodermo, ectodermo y mesodermo; exceptuando a las estructuras extraembrionarias. Un ejemplo de células pluripotentes son las células troncales embrionarias (ESC) [4]. Las células troncales multipotentes (MSC) tienen un espectro de diferenciación limitado a su propio linaje, es decir, pueden renovar a cualquier tipo celular de una misma capa germinal, ya sea del endodermo, ectodermo o mesodermo. Las MSC tienen ventajas asombrosas ya que se pueden aislar de tejidos jóvenes y adultos, por lo tanto, no presentan problemas éticos y legales en su manejo. Ejemplo de estas células son, las troncales hematopoyéticas (HSC) o las células troncales mesenquimales (MSC) [5]. Algunas células multipotentes presentan la habilidad de transformarse en tipos celulares no determinadas a una capa germinal, lo que habla de que su capacidad en la diferenciación es más compleja de lo que se pensaba [6 y 11]. Las células unipotentes presentan capacidades estrechas de diferenciación, lo hacen solo hacia un tipo de célula

dentro de un tejido específico, por ejemplo, las células satélite del músculo esquelético que se diferencian solo en células musculares [7]. Ver figura 1.

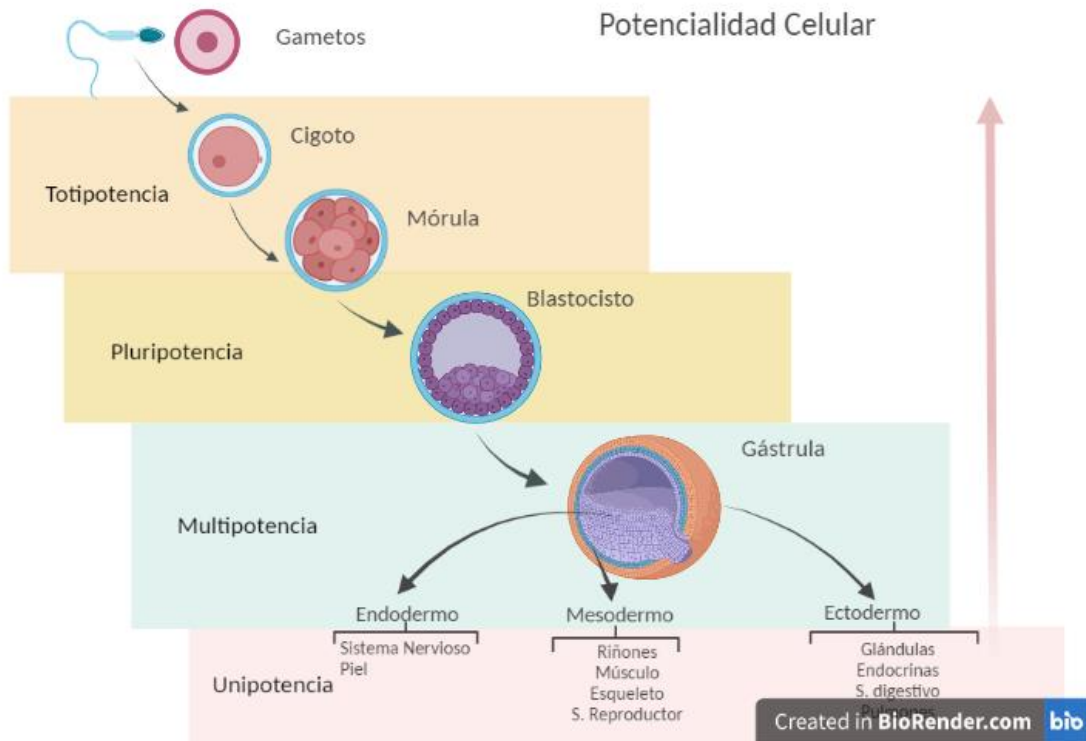


Figura 1. Potencialidad celular de las células troncales. La potencialidad celular está definida por la capacidad de diferenciación. La jerarquía de potencialidad está mediada por el desarrollo embrionario, siendo la totipotencia con la mayor capacidad de diferenciación celular, seguido por la pluripotencia, multipotencia y unipotencia. Imagen creada en BioRender.

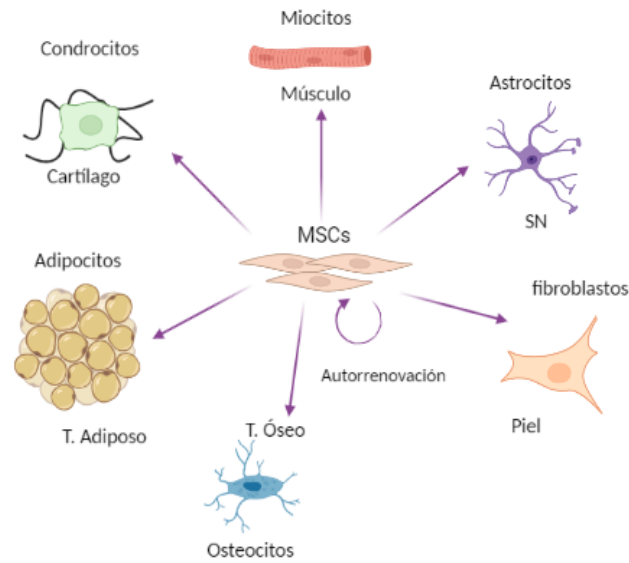
Created in BioRender.com 

Figura 2. Capacidad de diferenciación de las MSCs. Las MSCs se pueden diferenciar a múltiples linajes celulares de origen mesenquimal como el adipogénico, osteogénico, condrogénico, y miogénico, no obstante, se ha evidenciado su potencial de diferenciación a células de origen no mesenquimal como las células del tejido nervioso y en fibroblastos de la dermis en piel. Estos hallazgos respaldan el uso de las MSC para diversas aplicaciones experimentales y clínicas por su gran plasticidad y expansión en cultivo. Imagen creada en Biorender.

1.2 Células troncales mesenquimales derivadas de la Gelatina de Wharton (WJ-MS-C)

Las células troncales mesenquimales (MSC), son células troncales adultas autorrenovables y expandibles que, en cultivo, poseen una alta tasa de proliferación y la capacidad de preservar sus cualidades de troncalidad durante varios pases celulares [8]. Se encuentran en varios tejidos, incluida médula ósea, tejido adiposo, pulpa dental, placenta y cordón umbilical. Las MSC residen en su microambiente específico o nicho; rodeadas por diferentes tipos celulares como células epiteliales, endoteliales, progenitoras e inmunitarias. Tienen ventajas sobre otros tipos celulares como los privilegios inmunológicos, ya que su manejo reduce el riesgo al rechazo en trasplantes autólogos o alogénicos y esto se traduce en una disminución de complicaciones en la recuperación postquirúrgica [9,

32 y 33]. Sus características de autorrenovación a largo plazo y amplio espectro de diferenciación las ha colocado como las células por excelencia dentro de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos. Las MSC tienen la capacidad de diferenciarse en adipocitos, condrocitos, osteocitos, células hepáticas, neuronas, fibroblastos y varios tipos celulares más [10] ver figura 2. El cordón umbilical consta de una vena y dos arterias rodeadas por tejido conectivo mucoso conocido como gelatina de Wharton, que a su vez está cubierto por el epitelio amniótico [11] ver figura 3. En varios estudios se ha señalado que en la gelatina de Wharton uno de los principales componentes celulares, son las células troncales mesenquimales (WJ-MS), que expresan marcadores característicos de células troncales embrionarias (ESC) y troncales multipotentes (MSC), como Nanog y Oct3/4A [12].

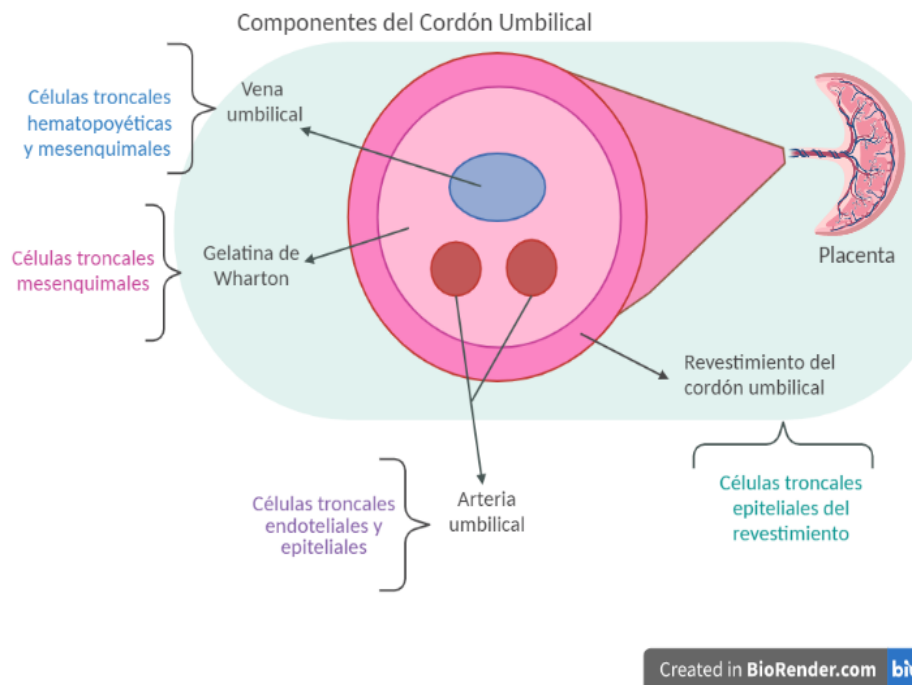


Figura 3. Estructura del cordón umbilical. El cordón umbilical está formado por tres vasos sanguíneos: dos arterias y una vena umbilical. Estas a su vez, están inmersas en un tejido que aporta soporte y protección conocido como gelatina de Wharton. Cada elemento del cordón umbilical contiene abundantes tipos celulares troncales de importancia clínica y que pueden ser fácilmente aislados y cultivados. Se encuentran células troncales hematopoyéticas, endoteliales, epiteliales y mesenquimales. Imagen creada en BioRender.

La gelatina de Wharton es una fuente ejemplar de MSC, ya que se pueden aislar y cultivar fácilmente del cordón umbilical, el cual es considerado un tejido de desecho en millones de nacimientos. Además, las WJ-MSC se han descrito como células que, al existir lesión migran al tejido dañado, activan y modulan al sistema inmune ya que expresan moléculas capaces de modular a las células NK, células dendríticas, y ocasionar la expansión de células Th1 y Th2, y células T reguladoras, así como el aumento en la secreción de las interleucinas IL-10 y IL-4; disminución en la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y del interferón gamma (IFN- γ) [13, 14 y 15]. Actualmente, las MSC representan un grupo importante en la investigación, pues son agentes inmunomoduladores y protectores de los tejidos. Los factores secretados de manera constitutiva se encuentran altamente regulados por factores mecánicos y químicos, lo que les permite la supervivencia celular creando nichos de autorrenovación [16 y 17].

2. ANTECEDENTES

2.1 Secretoma de células troncales

Las MSC han atraído gran interés en el campo de la medicina regenerativa pues poseen características extraordinarias y únicas en el tratamiento de múltiples enfermedades y lesiones. Se ha reportado que gran parte de la actividad regenerativa de las MSC, se debe en realidad a la acción paracrina resultante de las moléculas bioactivas secretadas en respuesta al contexto tisular. Desde esta perspectiva, el secretoma o sobrenadante se explora cada vez más en varios casos clínicos y de investigación básica. Se han utilizado injertos de MSC en tejidos diana para que éstas liberen sus moléculas de manera “*in situ*” y en otros casos se ha utilizado solo los medios condicionados, producto del cultivo de MSC, para dirigir la respuesta del tejido a una rápida recuperación. Ahora bien, se podría pensar que este secretoma es una mezcla constante de factores o metabolitos, pero en realidad, la liberación depende de los diversos estímulos presentes como: un ambiente inflamatorio, la hipoxia, la presencia de otro tipo celular subyacente o bien, la presencia misma de otros factores de crecimiento en el ambiente circundante [6, 18 y 19]. Las MSC producen una amplia variedad de moléculas bioactivas, como lo son: proteínas, péptidos, lípidos, vesículas extracelulares, ARN, citocinas, quimiocinas, moléculas inmunomoduladoras y factores de crecimiento; que se pueden concentrar y liofilizar sin que pierdan propiedades, esta es una ventaja novedosa sobre los tratamientos celulares que requieren tener cultivo celular constante y posterior congelación. Incluso, los secretomas derivados de MSC podrían ser colectados y suministrados de manera inyectada, colocados en conjunto con un andamio para su liberación controlada, o para estimular la diferenciación hacia el tipo de célula que se encuentra dañada [20, 21 y 22].

Dentro de los factores de crecimiento reportados para las MSC encontramos al factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) [23]; el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [24]; factor de crecimiento de hepático (HGF) [25]; factor de crecimiento transformante (TGF- β 1) [26]; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) [27]; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); factor estimulante de crecimiento de granulocitos macrófagos (GM-CSF); factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1); prostaglandina (PGE2); interleucinas, IL-10, IL-6, IL-8, entre otros. Desde hace tiempo se ha intentado caracterizar el secretoma producido por las MSC y así identificar a las moléculas clave que puedan sustituir a la terapia con células [18]. Estas moléculas o metabolitos liberados tienen efectos benéficos en la regeneración, pueden promover la migración, activación, proliferación, inhiben la muerte celular y la fibrosis [28], también promueven la angiogénesis, vascularización y el reclutamiento de células, ver Figura 4. La actividad paracrina de las MSC en contextos de lesiones aún está en estudio, pero cada vez, se responden más dudas sobre el efecto del secretoma en múltiples patologías [29 y 30].

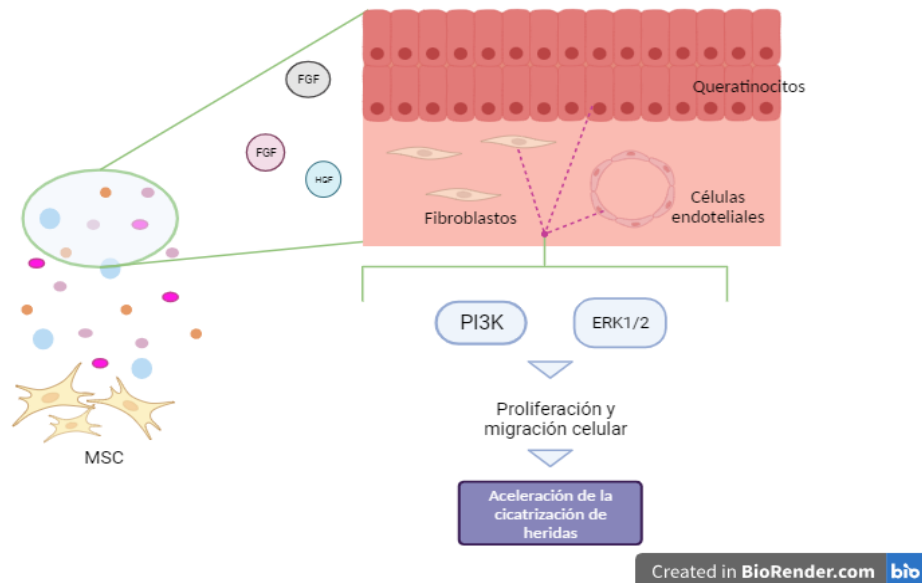


Figura 4. Secretoma o sobrenadante de MSC efecto en la regeneración tisular.

En el secretoma producido y liberado por estas células, se encuentran citocinas y factores de crecimiento como FGF, EGF y HGF que estimulan importantes procesos celulares proliferativos y migratorios, mediante la activación de vías de señalización que concluyen en la cicatrización de heridas como PI3K/ Akt y ERK1/2. Imagen creada en Biorender.com y modificada de Park et al, 2018 [265].

2.2 Modulación de la composición del secretoma de MSC

Las MSC son reconocidas por la gran cantidad de moléculas bioactivas que secretan, incluso, sus propiedades paracrinas son un sello distintivo y único de interés, por sus efectos terapéuticos y el mantenimiento de la homeostasis tisular. Es una necesidad, comprender como el microambiente que las rodea puede influir en la secreción, y así encontrar la modulación óptima de MSC. Existen factores importantes a considerar: la fuente de obtención de MSC, la edad del donante, la edad del cultivo (pase celular); tales factores, parecen ser clave en la obtención de un secretoma con características específicas [31, 32 y 33]. Como tal, la modulación de la composición del secretoma es posible, y se puede lograr precondicionando *in vitro* a las MSC. Los tratamientos que se han descrito en el precondicionamiento de las MSC engloban: cultivo con hipoxia, agentes farmacológicos, hormonas, citocinas y factores de crecimiento [32, 34-38].

2.2.1 Hipoxia

Habitualmente, la concentración normóxica utilizada en el cultivo celular es de (21% O₂); la concentración de oxígeno fisiológica en tejidos como sangre periférica y médula ósea es del 12% de O₂ [18]. El rango que determina un ambiente hipóxico para el cultivo celular oscila entre el 1% al 10% de O₂. Se ha demostrado que las condiciones de hipoxia en el cultivo de MSC, provoca un alza en la producción de varios factores de crecimiento y que el precondicionamiento hipóxico tiene resultados prometedores en la regeneración por parte de las MSC [39]. En la regeneración de fibras musculares, el cultivo de MSC en condiciones de hipoxia con 1% O₂, favoreció la migración y proliferación de células endoteliales y diferenciación de mioblastos en un modelo de isquemia de las patas traseras de ratón, movilizándolo la regeneración de fibras musculares esqueléticas mediante la proteína Wnt4 [40]. Tomar en cuenta la fuente de nutrientes y oxígeno es vital para el cultivo de MSC, pues el nicho *in vivo* es en realidad un microambiente hipóxico con una tensión de oxígeno entre el (0 al 5% O₂) por lo tanto se recomienda un cultivo bajo condiciones limitadas de oxígeno que imitan las condiciones fisiológicas locales donde residen las MSC [41]. A nivel molecular la hipoxia regula la transcripción de genes, en especial la familia de Wnt. La vía de señalización Wnt engloba toda una familia de más de 20 glucoproteínas secretadas, que forman una red de señales intracelulares canónicas y no canónicas [42]. La vía Wnt regula la expresión de genes relacionados con la proliferación, migración y diferenciación [40 y 43]. En la mayoría de los tejidos, un ambiente hipóxico conduce a la activación del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α por sus siglas en inglés), al activarse, se inicia también la transcripción de genes angiogénicos como el factor 1 derivado del

estroma (SDF-1 por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [44 y 45]. Las MSC producen una variedad de factores de crecimiento que tienden al incremento cuando son expuestas a la hipoxia, por ejemplo, las MSC de médula ósea con 1% de O₂ provocó un aumento de VEGF, FGF-2, HGF y IGF-1 [46]. El precondicionamiento por hipoxia tiene relevancia biológica, los factores de crecimiento angiogénicos y anti apoptóticos se pueden ver en MSC derivadas de pulpa dental, tejido adiposo y placenta [47]. En resumen, el precondicionamiento hipóxico de MSC tiene resultados positivos como, una mayor producción y secreción de factores de crecimiento, un efecto angiogénico en regeneración tisular y un aumento en la supervivencia y mantenimiento del fenotipo indiferenciado lo que permite la autorrenovación celular.

2.2.2 Agentes farmacológicos

Las MSC han sido usadas como terapia en múltiples patologías, pero aún no se ha logrado la estandarización del precondicionamiento del secretoma. Son muchos los fármacos que tienen un efecto terapéutico en la protección de órganos que han perdido su eficiencia. La investigación dentro de este campo tiene como objetivo, el entender los mecanismos de los agentes farmacológicos que asisten en situaciones de lesión. En un estudio de hipertensión arterial pulmonar, utilizaron la esfingosina-1-fosfato en el cultivo de MSC humanas, los resultados mostraron la expresión de genes que promueven la angiogénesis y vascularización en los pulmones dañados, así como, un incremento en la migración y remodelación cardiaca [48,55]. Así bien, la atorvastatina (ATV), que es un fármaco usado habitualmente para disminuir la cantidad de colesterol en sangre y prevenir infartos de miocardio entre otras enfermedades, también ha sido usado en la terapia con MSC, especialmente la ATV mejoró la expresión de CXCR4 y estimuló la migración de MSC *in vitro*. Posteriormente, las MSC pretratadas con ATV tuvieron una mejor supervivencia y aumento en la migración en un modelo de infarto agudo de miocardio [49]. El valproato (VPA) también ha sido usado en modelo de accidente cerebrovascular en ratas, para favorecer la migración de MSC a través de regular al alza el receptor CXCR4 y metaloproteinasa 9 [50]. El precondicionamiento de MSC derivadas de tejido adiposo humano con quelante de hierro deferoxamina (DFX) provocó un aumento en la expresión de factores neuroprotectores como el factor de crecimiento nervioso, citocinas con actividad antiinflamatoria como IL4 e IL5, HIF-1 α , VEGF y angiopoyetina-1 (Ang-1), en un modelo de neuropatía diabética [51]. En la mayoría de los casos las concentraciones del fármaco no superan los 400 μ M ni las 72 horas de precondicionamiento, ya que las concentraciones extremadamente altas, podrían afectar la actividad y supervivencia de las MSC [52, 58]. Una gran variedad de fármacos, son de interés por su rol como estimulantes de factores bioactivos con actividad angiogénica,

neuroprotectora y antiinflamatoria; por lo que aún son muchos los fármacos que faltan por investigar en preconditionamiento del secretoma.

2.2.3 Citocinas y factores de crecimiento

Al analizar los estudios experimentales sobre el preconditionamiento de las MSC con citocinas inflamatorias, se encontró que los factores producidos predominantes son aquellos que tienen un papel en la estimulación y regulación del sistema inmune. Algunos de los procesos incluyen la inflamación y la quimioatracción de la mayoría de las células inmunitarias [52]. Al hablar de una regulación del sistema inmune, implica la inhibición de las células NK y la supresión de la proliferación de células T [18,52-53]. Las MSC poseen propiedades inmunosupresoras, antiapoptóticas, antioxidantes e inmunomoduladoras, que se activan tras la respuesta a varios factores de señalización o por el contacto célula-célula [54-57]. Para entender el poder de las MSC sobre el sistema inmune hay que analizar la gran cantidad de datos clínicos en el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con el sistema inmune; al igual que los mecanismos celulares y moleculares en la interacción entre las MSC y las células inmunitarias [58,59]. Al igual que con el efecto de los fármacos en el preconditionamiento, también se ha observado una mejora en la migración por parte de las MSC. El cultivo de MSC preconditionadas con IL-1 β , muestra tener efectos autocrinos y paracrinos como elevar la expresión de otras citoquinas como IL-6, IL-8 e IL-23, también de varias quimiocinas como, CXCL5, CXCL6, CXCL10 y CXCL11 [58,60]. Por otra parte, el preconditionamiento con factor 1 derivado de células troncales (SDF-1), promueve la proliferación y migración en las MSC, protegiéndolas de la apoptosis [58,61]. TGF- β 1, es otro factor usado en el preconditionamiento de las MSC, y su efecto *in vitro*, condujo a una diferenciación hacia osteocitos a través de la vía SMAD/C/EBPs [62]. La proliferación y la migración celular es uno de los efectos más deseados en el preconditionamiento con TNF- α ; no obstante, las MSC estimuladas con este factor ocasionó la diferenciación osteogénica, al igual que TGF- β 1 [63]. La efectividad del pretratamiento con factores de crecimiento y citocinas en el cultivo de MSC, se debe al efecto protector que ejercen estos factores al activar vías de señalización que regulan la supervivencia celular y la proliferación. PI3K/AKT, es una vía de señalización que, río abajo, tiene incontables y muy importantes objetivos [64]. Xinaris y colaboradores modularon el secretoma de MSC con el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), el secretoma se aplicó en un modelo de lesión renal y los resultados fueron favorables, pues se evidenció un aumento en la tasa de proliferación celular y una disminución de la apoptosis en riñón, [65]. Es un hecho que los factores de crecimiento y sus receptores interactúan para activar la transducción de señales en múltiples procesos celulares. Por lo tanto, el preconditionamiento con factores de crecimiento o

citocinas pueden influir en el nicho celular *in vitro* y tener un efecto en el cultivo de MSC a través de la comunicación paracrina [66]. Si bien, existen varias estrategias en el preconditionamiento de MSC, aún queda mucho por investigar y estandarizar. Ver figura 5. La optimización de factores de crecimiento, y la combinación idónea en el preconditionamiento depende de muchos factores importantes a considerar como el tipo de lesión, el tejido en regeneración, el efecto de los factores liberados en el sitio de regeneración, hasta su efecto en las respuestas inmunitarias [28, 44, 67].

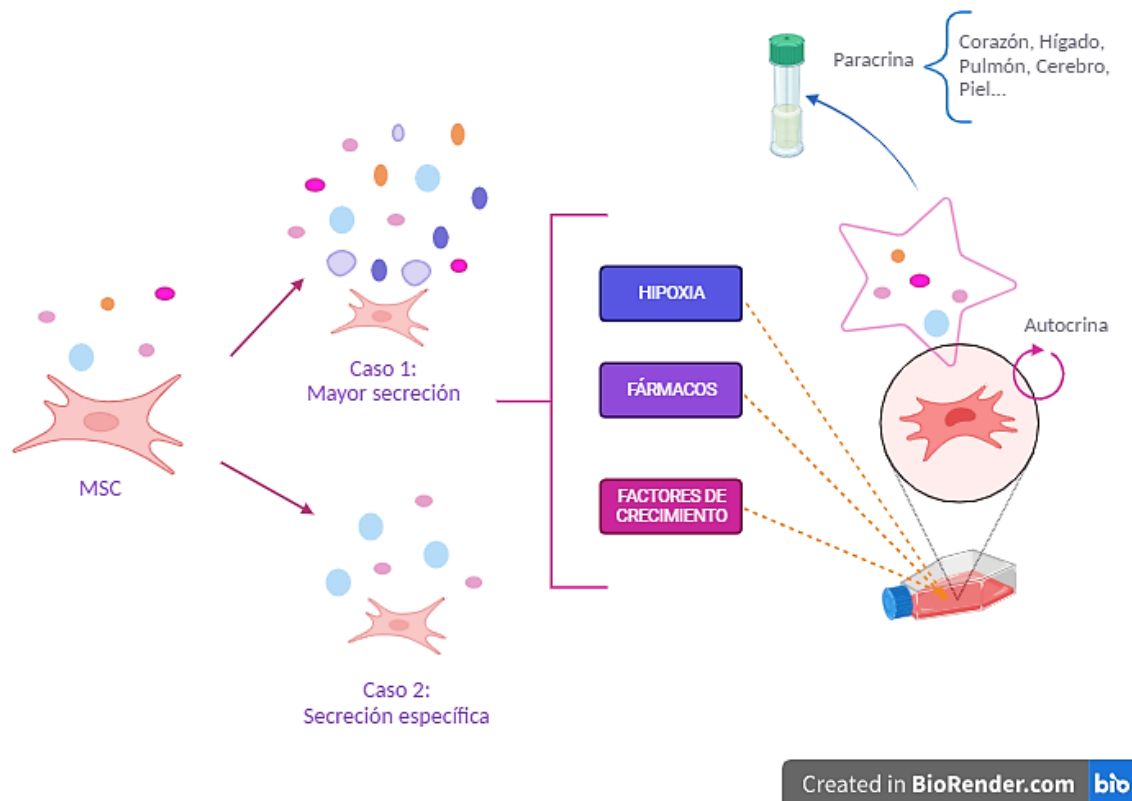


Figura 5. Estrategias en la Modulación del secretoma derivado de MSC.

Las MSC son células altamente sensibles, que secretan factores de crecimiento en respuesta a estímulos y fluctuaciones en el ambiente. Actualmente se estudian la hipoxia, los agentes farmacológicos y los factores de crecimiento como estrategias en la modulación del secretoma derivado de MSC para “dirigir” a las MSC hacia la secreción de un *perfil proteico específico* para el tratamiento de múltiples patologías. Las estrategias en la modulación continúan en investigación. Imagen creada en Biorender.com

2.3 Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)

El factor de crecimiento epidérmico (EGF), fue descubierto en 1962. Desde entonces, se ha definido como uno de los factores más importantes en la maduración de los tejidos epiteliales [68-69]. Es un importante mediador de la proliferación de muchos tipos celulares tanto *in vivo* como *in vitro*. También se ha reportado su papel en la migración celular dentro de un contexto de remodelación tisular, pues regula el crecimiento, la diferenciación celular y acelera el cierre de heridas [70]. EGF es un polipéptido de una sola cadena con 53 aminoácidos y es miembro del grupo 1 de la familia EGF, en donde también se encuentran TGF- α y HB-EGF, todos con la misma capacidad de unirse al receptor EGFR/ErbB1 de actividad de tirosina quinasa [71]. Específicamente EGF, sigue sorprendiendo por su papel en la biología celular y aplicación clínica en enfermedades; por lo que existe mucho interés en su organización y expresión génica [72]. EGF es un elemento que comúnmente se encuentra en fluidos como la saliva, orina, sangre, leche, entre otros [73]. La concentración de EGF en plasma sanguíneo en ratones ronda en 1ng/ml [74]. En el caso de los humanos, podemos encontrar niveles elevados de EGF en orina y en el riñón, pues es el principal productor de este factor [75]. El receptor de EGF, EGFR o ErbB1 se expresa en un amplio espectro de tejidos, tiene actividad tirosina quinasa que culminan en la activación de Ras/Raf/MEK/ERK/JAK y también de la vía PI3K/AKT/mTOR que conducen a la proliferación y diferenciación celular [76]. Los factores de crecimiento son necesarios durante el desarrollo embrionario, ya que incluso el crecimiento del embrión es dependiente de EGF y también la invasión del trofoblasto y el crecimiento postimplantación [77]. Dentro del contexto de la cicatrización de heridas, EGF y la presencia de otros factores de crecimiento, citocinas y componentes de la matriz extracelular forman un complejo que activamente se encargara de regresar al tejido a la homeostasis. En este nicho regenerativo, también se encuentran involucradas a las células troncales epidérmicas, precursores de fibroblastos, células madre del tejido adiposo y células del sistema inmune. La actividad celular en la reparación de tejidos se encuentra regulada y estimulada por varios factores de crecimiento como el EGF, FGF, PDGF, TGF y VEGF. Un error o deficiencia en las células progenitoras o la actividad de los factores tiene repercusiones negativas como una prolongación del tiempo de recuperación o la presencia de cicatrices hipertróficas, [78-83]. Durante la regeneración celular, es necesario reemplazar a las células dañadas, tal recambio, requiere de células troncales indiferenciadas que sean capaces de expandirse y diferenciarse hacia el linaje específico al cual estén sustituyendo. Sin embargo, la población de células troncales indiferenciadas residentes en cada tejido presentan un bajo número y a menudo se requiere de la presencia de otros factores de crecimiento con actividad protectora que mantenga y vigile la supervivencia de estas células [2,84]. EGF, se considera un

fuerte regulador del destino de las células troncales de varios tejidos, por ejemplo, en cerebro, corazón, médula ósea, intestino, piel entre otros más [85-89]. Un factor determinante en el efecto de los factores de crecimiento en el precondicionamiento de las MSC es la dosis, pues existen efectos dependientes de la sobreestimulación [87]. En un estudio realizado por Nelson y colaboradores, sobre los progenitores de células gliales, una concentración alta (100ng/ml) de EGF, provocó un aumento en la proliferación celular en comparación con las dosis bajas del factor [78,90]. Del mismo modo, el precondicionamiento con EGF desencadena la secreción en MSC de VEGF y HGF; así que EGF no solo es un factor necesario para la supervivencia de las MSC en cultivo, sino que su precondicionamiento ocasiona cambios en la actividad paracrina de las MSC, y que estas produzcan otros factores de crecimiento [86].

De manera sinérgica, EGF puede combinarse con otros factores, por ejemplo, con FGF, para desempeñar funciones diferentes pero que en conjunto forman una terapia combinada en la regeneración tisular [89,91]. Se ha señalado que el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), tiene la capacidad de incrementar la proliferación de las MSC y que promueve la conservación del fenotipo troncal multipotente *in vitro* e *in vivo* [92-93]. FGF, fue descubierto en 1999 y al igual que EGF, el FGF pertenece a una amplia familia en la que se encuentran 22 miembros, muchos de estos, altamente relacionados en la regulación del desarrollo embrionario. El tamaño de FGF se encuentra entre los 150 a 300 aminoácidos. Sus funciones son variadas, aunque destacan el crecimiento celular y el desarrollo de tejidos y recientemente se estudia su capacidad de inducir la diferenciación [94]. Dado que se trata de una familia muy amplia, se han descrito cuatro receptores de la familia FGFR; FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4 [95]. Al ser tantos receptores, es normal encontrarlos en muchos tejidos; por ejemplo, FGFR1 está altamente expresado en cerebro, riñón, pulmón, corazón, músculo esquelético y tejido adiposo. FGFR4, en hígado, pulmones, vesícula biliar, intestino delgado, páncreas, y glándulas suprarrenales [96-98]. Todos los receptores FGFR, tienen actividad de tirosina quinasa que se activan vías de señalización como MAPK y PI3K/AKT [99]. Se ha demostrado que bFGF es un factor con múltiples efectos implicados en la proliferación y diferenciación de muchos tipos celulares tanto de origen mesodérmico como del neuroectodermo [100]. Otras funciones bien conocidas de bFGF incluyen su rol en la proangiogénesis, inflamación a través de la activación de la caspasa 1, estimular la migración y proliferación en células endoteliales, musculares y fibroblastos y una mejora en la supervivencia celular pues también es considerado un factor con actividad antiapoptótico. Además, se ha reportado que la sobreexpresión de otros factores como VEGF, podría provocar la formación de defectos vasculares durante la cicatrización, esta desventaja no se ha reportado para bFGF [101-104]. Panagiota y colaboradores, utilizaron al bFGF en diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1.5, 5, 10 y 20 ng/ml) en el cultivo de MSC humanas, observaron que el

enriquecimiento ocasionó una mayor proliferación por parte de las MSC a 5ng/ml, así mismo, se identificó un cambio en la morfología de las MSC dependiente de la concentración, en donde, a mayor concentración se perdía su forma ahusada. También, la adición de bFGF en cultivo, provocó la inducción de HLA-DR en una baja densidad celular [92-105]. Tesarova y su equipo, verificaron que el medio enriquecido con bFGF mantiene las características inmunosupresoras de las MSC derivadas de cordón umbilical; y aumenta su proliferación, cuando son precondicionadas con 15 µg/mL de bFGF [106]. Otro estudio realizado en 2015 por Parivar y su equipo demostraron que, bFGF se puede combinar con otras citocinas para dirigir a las MSC hacia la diferenciación neural y que estas células puedan ser usadas en el tratamiento de enfermedades relacionadas al SNC [107]. Usar las características de ambos factores (EGF y FGF) podría ser la combinación perfecta en la cicatrización de heridas, aunque los efectos biológicos sean diferentes. Por ejemplo, Fu et al., evaluó los efectos biológicos de ambos factores en la cicatrización de heridas, y aunque ambos factores actúan a diferentes niveles en el proceso de regeneración, su combinación puede ser usada en distintas etapas de la cicatrización o bien, usarlos bajo circunstancias específicas, ya que EGF aumenta la velocidad de reepitelización y FGF podría usarse en lesiones que requieran una mayor granulación [108]. La viabilidad y eficacia del precondicionamiento en cultivo de las MSC se encuentra en estudio exhaustivo, desde los pases celulares, la selección de fuente de MSC, el uso de factores como FGF y EGF para mejorar la proliferación, así como características del paciente; como la edad del donante, el almacenamiento y la congelación del cultivo [92,109-112].

2.4 Factores de crecimiento producidos por las MSC

La mayoría de los procesos celulares importantes en la homeostasis tisular como la síntesis de matriz extracelular, comunicación célula-célula, migración celular, activación celular, proliferación, apoptosis, e incluso la diferenciación hacia linajes específicos dependen de la activación de vías de señalización que responden a una comunicación paracrina controlada [16]. Los factores de crecimiento (GF, por sus siglas en inglés) son una familia de polipéptidos que regulan una amplia variedad de procesos esenciales que mantienen y apoyan la regeneración celular. Se han reportado en estudios proteómicos anteriores, la presencia de más de 40 metabolitos: citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento presentes en el secretoma de MSC [61]. Todos estos factores de crecimiento tienen funciones específicas dentro de cada contexto tisular, algunos trabajan sinérgicamente con otros, su efecto depende del tejido diana, la dosis, y si son liberados individualmente o combinados [113].

2.4.1 Angiopoyetina-2

Las angiopoyetinas (Angs) son una familia de factores de crecimiento vascular, están relacionadas con la fisiología celular como supervivencia, proliferación y migración. También, las Angs regulan la maduración, estabilización y la remodelación vascular. Existen Ang1, Ang2, Ang3 y Ang4; cuyas actividades importantes están reguladas a través de los receptores tirosina quinasa Tie1 y Tie2, los receptores mejor caracterizados [114]. Angiopoyetina-1 (Ang1), es un factor de crecimiento angiogénico que utiliza a Tie2 como receptor para emitir señales, mientras que angiopoyetina 2 (Ang2) se describió inicialmente como un factor antagonista que utiliza el mismo receptor Tie2; recientemente se ha demostrado que Ang2 tiene actividad agonista. Ang2, utiliza la vía de señalización tirosina quinasa con dominios de homología Ig y EGF, esta vía es de las principales y más importantes en la angiogénesis y presenta diferencias importantes al VEGF. Ang2 tiene una longitud de 496 aminoácidos, su péptido señal de secreción es NH₂ y un dominio similar al fibrinógeno COOH-terminal, Ang2 interactúa con Tie2 con la misma afinidad que lo haría Ang1 lo que enciende su rol antagónico sin unirse a Tie1 [115-116]. Ang2 se enciende en condiciones de hipoxia, cáncer y por mediadores inflamatorios como la trombina. La actividad antagonista o agonista de Ang2 se determina por la presencia de Tie1. Ang2 es agonista (proangiogénico) cuando está presente Tie1 y es antagonista en presencia de Tie2. La función y rol de Ang2 depende de una variedad de factores como, la sobreexpresión de Ang2, la presencia de VEGF, Ang1 y Tie2, el tipo de célula diana, la concentración y algunas condiciones patológicas específicas como el crecimiento tumoral [114, 117]. En experimentos *in vivo*, se ha observado que las altas concentraciones de Ang2 pueden inducir una proliferación mayor en células endoteliales. Este factor es sumamente importante para el desarrollo embrionario, su presencia en etapas tempranas muestra un patrón de expresión puntual en la aorta dorsal y en las ramas aorticas, en células asociadas al endotelio como los pericitos, en células de músculo liso, ramas arteriales principales y en sitios de remodelación vascular, por lo tanto, se ha descrito como uno de los factores que se encuentra en abundancia en el secretoma de MSC derivadas de placenta y cordón umbilical [118-119].

2.4.2 Eritropoyetina (EPO)

La eritropoyetina es una glucoproteína encargada de regular la eritropoyesis, es decir, se encarga de la regulación de la proliferación de glóbulos rojos, previene apoptosis e induce la diferenciación en los precursores de eritrocitos. Esta proteína tiene un tamaño de 192 aminoácidos, que después de la modificación postraduccional resulta en una proteína madura de 165 aminoácidos [120]. EPO tiene interacción con su receptor EpoR, este receptor pertenece a la familia de receptores de citocinas. EPO inicia la cascada de señalización, cuando la hormona tiene contacto con EpoR que se encuentra

en la membrana celular, al interactuar con el receptor se conforma un homodímero con dos subunidades idénticas, activando una quinasa por transfosforilación que a su vez activan a las proteínas JAK quininas, específicamente a las JAK2. La JAK2 activada, fosforila los residuos tirosina que se encuentran en el dominio del receptor, estos residuos son sitios de anclaje de señalización intracelular necesarios para activar la transcripción STAT5, que a su vez modulan la expresión génica de la vía de señalización EPO/EpoR/JAK2/STAT5 [121-122]. La síntesis de EPO está regulada por la presencia de hipoxia a nivel de transcripción génica. Este factor es producido por todas las células, sin embargo, el riñón en el cuerpo humano adulto y el hígado durante el desarrollo fetal, son los principales órganos productores de eritropoyetina EPO actúa como hormona, pero también como factor de crecimiento, induce la diferenciación osteogénica y endotelial, promueve la angiogénesis y la secreción de un gran número de factores de crecimiento [123-124].

2.4.3 Factor estimulante de colonias macrófagos (M-CSF)

El factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF o CSF-1) está asociado a la supervivencia, proliferación y diferenciación de células del linaje de monocitos o macrófagos, o eso se pensaba en un inicio, que su papel era ser solo un factor de crecimiento hematopoyético [125]. M-CSF promueve la diferenciación de células madre hematopoyéticas hacia macrófagos. Sin embargo, M-CSF juega un papel en otros procesos como: el metabolismo óseo, la eliminación de lipoproteínas, fertilidad y en el sistema inmune. Varios tipos celulares producen M-CSF para combatir infecciones virales. Además, parece tener funciones importantes en la morfogénesis tisular a través de los macrófagos que tienen contacto con otros tipos celulares y afectar las funciones de los tejidos como cerebro y piel [126]. Su codificación depende de un único gen con glucosilaciones postraduccionales, por lo que podemos encontrar tres isoformas de M-CSF: como una glucoproteína en células, como proteoglicano asociado a MEC y como glucoproteína soluble [127-130]. Así como todos los factores de crecimiento, M-CSF cuenta con un receptor de tirosina quinasa conocido como M-CSFR [131]. M-CSF, parece encargarse principalmente de la regulación de macrófagos que se encuentran remodelando tejidos, este complejo proceso involucra la regulación del espesor dérmico, la fertilidad masculina y el desarrollo neuronal [126]. Es tal la importancia de este factor, que podemos afirmar que la mayoría de los macrófagos residentes en los órganos son dependientes del M-CSF local [132]. La regulación del M-CSF en circulación se controla a través de los receptores presentes en los macrófagos que residen en hígado y bazo. En los modelos de lesión tisular se ha comprobado que la infiltración de monocitos y la eliminación de células dañadas se debe al potencial terapéutico que ejerce la acción paracrina de M-CSF [133]. Se han descubierto

nuevas funciones del M-CSF, de las más reciente encontramos su función en la estimulación de progenitores de osteoclastos, y aunque no está clara la lista de células mesenquimales que producen M-CSF necesarias para la osteoclastogénesis, se sabe que este factor es clave en la resorción ósea. Además de su función en hueso, cerebro y piel, también desempeña funciones importantes en el tracto intestinal y la inmunidad tumoral [134-136].

2.4.4 *Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)*

G-CSF, conocido como factor estimulante de colonias de granulocitos, desempeña un papel crucial como regulador de la hematopoyesis y el sistema inmunitario innato. Su función principal consiste en estimular la proliferación, maduración y diferenciación de los neutrófilos y las células madre hematopoyéticas. Múltiples tipos celulares, como fibroblastos, macrófagos, células NK, células epiteliales y células madre, entre otros, producen G-CSF. Este factor se une a su receptor, G-CSFR, presente en la membrana celular de células T, células B y células endoteliales [136]. Además de su papel en la hematopoyesis, G-CSF se secreta ampliamente en etapas tempranas del desarrollo y se encuentra en tejidos como la placenta. En el ámbito reproductivo, el G-CSF se ha asociado con procesos clave como la receptividad del endometrio, la función ovárica y la implantación embrionaria [137-138]. Es utilizado comúnmente en la movilización de células madre de la médula ósea hacia la sangre periférica debido a su papel fundamental en la hematopoyesis [139]. Estudios han indicado que el G-CSF tiene la capacidad de estimular una respuesta inflamatoria y afectar a células T, promoviendo el cambio de TH1 a TH2, así como a células presentadoras de antígenos [140]. G-CSF es esencial para la producción de neutrófilos, derivados de células progenitoras en la médula ósea [141]. En individuos sanos, los niveles normales de G-CSF en sangre oscilan entre 30-163 pg/mL, pero durante una infección, estos niveles pueden aumentar significativamente, alcanzando valores de 30-3199 pg/mL [142-143]. La expresión de G-CSFR en células precursoras conduce a una mayor proliferación de células granulocíticas durante infecciones donde se observa un incremento en los niveles de G-CSF [144]. G-CSF ha sido ampliamente utilizado en diversos contextos clínicos e investigaciones, desde el tratamiento de infecciones en pacientes con pies diabéticos hasta la gestión de neutropenia en pacientes con cáncer. Recientemente, se ha explorado su uso en casos de infertilidad [138, 145-146]. Su producción responde a diversos estímulos, como la inflamación provocada por infecciones, donde factores como la interleucina-1 β y el TNF α desencadenan un aumento en su producción. Su síntesis está controlada por mecanismos trans y postranscripcionales, siendo regulada en parte por vías de señalización en respuesta al estrés, como la MAP quinasa [147-148].

2.4.5 Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF)

El factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) se consideraba inicialmente como un impulsor del crecimiento de células precursoras de la médula ósea hacia los granulocitos y macrófagos, siendo un factor de crecimiento hematopoyético. Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que el GM-CSF posee actividad proinflamatoria y desempeña un papel relevante en enfermedades autoinmunes [149]. Este factor se produce principalmente en células T y B activadas, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales, condrocitos, células de Paneth y células mesenquimales. En humanos, su producción es estimulada por IL-1 β e IL-12 en células T, mientras que, en fibroblastos y células endoteliales, por TNF- α e IL-1 [150-151]. El GM-CSF se une a su receptor presente en células mieloides y células endoteliales. Este receptor está compuesto por dos subunidades, α y β , donde la subunidad α muestra una afinidad baja hacia el GM-CSF, mientras que la subunidad β se relaciona con los receptores de IL-3 e IL-5 [152]. Su efecto, al igual que muchos factores de crecimiento, depende de la dosis y su subunidad β . En condiciones saludables, concentraciones bajas de GM-CSF activan la vía PI-3 a través de Ser585 de la cadena β . No obstante, en áreas de lesión tisular o inflamación, concentraciones elevadas de GM-CSF activan la vía Jak2/STAT5 a través de Tyr577, provocando un aumento en la proliferación y supervivencia celular [149, 153-154]. A pesar de su reconocido papel como factor de crecimiento hematopoyético, el GM-CSF despliega una gama de funciones. Actúa como un impulsor de citocinas proinflamatorias, facilita la presentación de antígenos, promueve la fagocitosis y la quimiotaxis en leucocitos [155-156].

2.4.6 Factor de crecimiento hepático (HGF)

El factor de crecimiento hepático (HGF) es de origen mesenquimatoso y desempeña un papel crucial al promover la migración y proliferación en diversas células en áreas de lesión tisular [157]. Se trata de una proteína compuesta por dos cadenas, α y β , con una longitud de 692 o 697 aminoácidos [158]. Más allá de su conocida función en la regulación del crecimiento y regeneración hepática, el HGF influye en una variedad sorprendente de células en casi todos los tejidos. Por ejemplo, en el páncreas, actúa sobre las células β pancreáticas; en el riñón, impacta en las células tubulares renales y los podocitos; en los pulmones, tiene efectos en las células epiteliales del bronquio y los alvéolos de tipo II; en el tejido nervioso, afecta a las neuronas del hipocampo y la corteza cerebral, así como a las neuronas motoras y sensoriales [158, 159]. El HGF desempeña actividades biológicas vitales, utilizando la vía de señalización c-Met/HGF para activar el dominio de tirosina quinasa del receptor, lo que conduce a la fosforilación y agrupamiento de residuos de tirosina quinasa en el extremo C. Entre las funciones destacadas del HGF se encuentra la remodelación y construcción de tejidos. Se

ha observado que las células madre mesenquimales (MSC) secretan niveles elevados de HGF, y este factor contribuye al mantenimiento de la plasticidad cuando se combina con el factor de células madre (SCF). Esta combinación retrasa el envejecimiento celular y mejora el potencial de diferenciación tanto *in vivo* como *in vitro*. Por esta razón, el HGF se utiliza comúnmente durante la expansión a largo plazo de las MSC en cultivo [158, 160-161].

2.4.7 Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-AA y PDGF-BB)

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) representa un importante mitógeno para varias células, incluyendo aquellas del músculo liso y los fibroblastos, constando de dos cadenas polipeptídicas estructuralmente similares, A y B. Estas isoformas ejercen efectos celulares al activar los receptores de proteína tirosina quinasa. Ambas cadenas, unidas por enlaces disulfuro, tienen una longitud de aproximadamente 100 aminoácidos [158]. Más allá de su implicación en el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas mediante la estimulación de la proliferación celular en diversos tipos celulares, el PDGF también participa en la remodelación y reorganización de los filamentos de actina, lo que afecta la migración celular [162-163]. Su expresión aumenta en respuesta a la baja concentración de oxígeno, así como a la estimulación por otros factores de crecimiento o citocinas [164-165]. Además, tiene un papel importante en la atracción y activación de macrófagos y neutrófilos, células cruciales en la sanación de heridas *in vivo*. En etapas posteriores de la cicatrización, el PDGF estimula la formación de colágeno, proteoglicanos, fibronectina y ácido hialurónico [166-169]. Aunque inicialmente se pensaba que las plaquetas eran las únicas células que secretaban PDGF, actualmente se sabe que los macrófagos activados, las células endoteliales, las células del músculo liso arterial, los fibroblastos y los queratinocitos epidérmicos son altamente secretoras de este factor de crecimiento. En sitios de lesión, el PDGF, específicamente la isoforma PDGF-AA, se encuentra elevado, especialmente en fibroblastos de heridas agudas y crónicas. Sin embargo, sigue siendo un enigma por qué la isoforma PDGF-AA persiste durante más tiempo en el proceso de cicatrización, mientras que la PDGF-BB predomina en etapas posteriores [162,170]. Los receptores de PDGF, en especial los receptores β , aumentan en fibroblastos y células del músculo liso en presencia de inflamación o lesiones cutáneas, manteniéndose en niveles bajos de expresión cuando el tejido está en reposo [171]. La disposición antiparalela de las subunidades del dímero PDGF-BB es similar a otras estructuras tridimensionales, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y el factor de crecimiento nervioso. PDGF interactúa con moléculas de matriz y proteínas solubles [162]. La interacción con la macroglobulina α_2 sucede solo en PDGF-BB y no en -AA. Los receptores de PDGF transmiten señales relacionadas, aunque no idénticas, siendo una

diferencia notable que solo el receptor β regula la formación de estructuras circulares de actina en sitios específicos de la célula [172]. Las isoformas de PDGF inducen complejos homodímeros o heterodímeros de receptores con efectos regulados y específicos, como la proliferación, quimiotaxis, migración y prevención de la apoptosis. Se ha observado que la aplicación local de la isoforma PDGF-BB provoca un aumento en el tejido de granulación, una fase proliferativa caracterizada por la presencia de fibroblastos, colágeno y elastina, lo que resulta en una aceleración del tiempo de cicatrización [173]. En otros casos, se ha mostrado que la isoforma BB aumentan la tasa de reepitelización y la neovascularización. Con respecto a su efecto en las células, PDGF-BB es popular por inducir la proliferación y diferenciación de fibroblastos. Su efecto es tan fuerte, que comúnmente se usa PDGF-BB como tratamiento para la cicatrización de heridas en personas con una baja capacidad de cicatrización como lo son los pacientes diabéticos [174].

2.4.8 Factor de células troncales (SCF)

Si bien es posible obtener y aislar MSC de varios tejidos, su cantidad es limitada. Por consiguiente, la expansión *in vitro* de estas células, preservando su fenotipo y manteniendo su naturaleza troncal, se vuelve crucial [175]. El factor de células troncales (SCF) o también conocido como ligando de *c-kit*, puede encontrarse tanto como proteína transmembranal como una proteína soluble. Tiene una función hematopoyética al unirse a su receptor (*c-kit*). El receptor *c-kit* o CD117 es un receptor de tipo tirosina quinasa tipo III, de la misma familia que los receptores de PDGF y flk-2 [176]. SCF presenta receptores en diversas células hematopoyéticas, incluyendo linfocitos B y T, así como en otros tipos celulares. En el plasma humano, el SCF circula a una concentración de aproximadamente 3.3 ng/ml, mientras que su receptor *c-kit* se encuentra en una proporción molar hasta 30 veces mayor [177-178]. Durante el desarrollo embrionario, SCF y *c-kit* son expresados en sitios hematopoyéticos como el saco vitelino, el hígado fetal y la médula ósea. Así mismo, SCF también se encuentra en tejidos adultos. Es producido por células endoteliales de la médula, fibroblastos y células troncales [179]. SCF es un factor que puede actuar en conjunto con otras citocinas como EPO, IL-3, GM-CSF y G-CSF. Su efecto es protector, promueve la supervivencia de células progenitoras, provoca la entrada de las células troncales en el ciclo celular y actúa especialmente en tejidos que han sufrido algún daño o infección, como atrayente de leucocitos y macrófagos a la zona de lesión [178]. SCF, en conjunto con IL-2, induce la diferenciación de células asesinas naturales (NK) y puede incrementar el número de precursores de células dendríticas en cultivos *in vitro*. Por estas razones, el SCF se considera un factor esencial y determinante en la proliferación, diferenciación y activación de mastocitos. Del mismo modo, SCF es un factor de mantenimiento de troncalidad para las MCS dentro del nicho celular [180].

2.4.9 Factor de crecimiento transformante-alfa (TGF- α)

El factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) es un polipéptido, que actúa gracias a la unión con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). TGF- α se produce en una gran variedad de células y tejidos embrionarios y adultos [181]. TGF- α , es producido por macrófagos, eosinófilos, queratinocitos, fibroblastos y células troncales. El papel de TGF- α en la cicatrización de heridas ha sido estudiado con mucho interés por ser un estimulante de varios receptores y actuar a través del mismo mecanismo molecular que EGF [182]. Aunque el TGF- α y el EGF se unen al receptor con una afinidad similar, se observan diferencias que no pueden atribuirse a la unión con el ligando. Más bien, estas discrepancias parecen estar relacionadas con la capacidad del receptor para recibir estímulos múltiples del ligando, lo que prolonga la señalización en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Por lo tanto, se plantea que el TGF- α podría prolongar la actividad del receptor durante un período más extenso en comparación con el EGF [183]. TGF- α trabaja sinérgicamente con EGF, ambos comúnmente usados en el tratamiento de cicatrización de heridas epiteliales. Estos factores de crecimiento regulan la motilidad celular en varios tipos celulares como córnea o queratinocitos epidérmicos [184-185]. TGF- α promueve proliferación, migración, angiogénesis y recientemente se ha señalado como uno de los principales factores que incrementa el desarrollo epitelial [186]. La cicatrización de heridas requiere de cuatro tipos celulares principales, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y queratinocitos. Una vez que se detecta una herida, los queratinocitos y las células que se encuentran en los bordes de la lesión estimulan la propagación de señales celulares que provocan una mayor migración celular y una posterior proliferación [187-188]. La vía de señalización crucial para controlar la proliferación y migración de queratinocitos se activa mediante el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual responde a la acción de ligandos como EGF y TGF- α . EGFR desempeña un papel fundamental en diferentes etapas del proceso de cicatrización, incluyendo la fase inflamatoria, la contracción de la herida, la multiplicación celular, la migración y la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). La producción de TGF- α puede estar asociada con diversas afecciones, como cáncer intestinal, carcinoma papilar de tiroides, cáncer de mama y del epitelio olfatorio. [189-191].

2.4.10 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es miembro importante de los factores de crecimiento que regulan la angiogénesis. También, es reconocido por tener un efecto mitógeno y antiapoptótico en células endoteliales. VEGF, tiene efecto en la migración y en la permeabilidad celular, secreción, entre otras funciones endoteliales. Forma una familia grande donde se incluyen

cinco miembros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento de placenta (PIGF), que regulan vasculogénesis, angiogénesis y linfangiogénesis [192-193]. VEGF, se une a dos receptores con actividad de tirosina quinasa, Flt-1 y KDR/Flk-1. La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes se estudia como modelo necesario para el entendimiento de varias vías de señalización usadas por VEGF y Ang en etapas tempranas embrionarias hasta en tejidos adultos [194]. El receptor de VEGF es muy interesante, actualmente se sabe que, en organismos no vertebrados, el gen receptor similar a VEGFR carece de actividad en la regulación de la migración y proliferación celular [195]. VEGF-A actúa durante la embriogénesis, y se ha visto que su función es vital para la formación de vasos sanguíneos en esta etapa, pues en ratones *knockout* se exhibe un fenotipo embrionario con la formación de vasos sanguíneos irregulares e inmaduros, lo que provoca letalidad en los roedores [196]. Los VEGFR, son similares estructuralmente hablando, a los receptores de PDGF. Sin embargo, a nivel de señalización son bastantes diferentes, los receptores PDGFR actúa sobre la subunidad p85 de PI3K y estimula PI3-Akt y Ras, mientras que VEGFR, pocas veces activa considerablemente esta vía [197-198]. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tiene la capacidad de inducir la osteogénesis de forma indirecta al desencadenar la liberación paracrina de factores de crecimiento osteogénicos, particularmente el VEGF-A. Este factor desempeña un papel crucial en procesos de reparación ósea como la osificación intramembranosa y endocondral. Además, VEGF regula el proceso de cicatrización de heridas interviniendo en la epitelización, la formación de colágeno y el equilibrio de células inflamatorias. Asimismo, en conjunto con otros factores como el FGF y el TGF- β , VEGF actúa como un factor de crecimiento colaborador. Estas citocinas angiogénicas coadyuvan en la angiogénesis y la recuperación de lesiones o heridas al facilitar la formación de nuevos vasos sanguíneos [198-199]. VEGF-A participa activamente en la angiogénesis embrionaria y en la restauración de heridas, VEGF-B participa en la angiogénesis embrionaria, VEGF-C y VEGF-D en la linfangiogénesis y en situaciones de angiogénesis patológica existen niveles altos de PIGF [199-201].

2.5 Aplicación clínica del secretoma de células troncales

Las células troncales mesenquimales o MSC tienen incontables ventajas, múltiples propiedades y una obtención y aislamiento relativamente eficaz. Las MSC actúan fuertemente a un nivel paracrina, su secretoma es un “coctel” resultante de la combinación de altos niveles de moléculas bioactivas liberadas en respuesta al ambiente. Esta mezcla de factores de crecimiento no es constante, en realidad depende de los estímulos presentes *in vivo* e *in vitro*. No se cuestionan los resultados positivos ni el rol complejo, durante la reparación de heridas por parte de las MSC.

Hasta hace poco las MSC habían sido investigadas en la mayoría de las lesiones de hueso y cartílago [202]. Desde entonces, muchos de los experimentos han buscado innovar en el empleo de las MSC para el tratamiento de una variedad de patologías. Las MSC son una herramienta terapéutica de enfermedades autoinmunes como el lupus [203]. Otro aprovechamiento del potencial de las MSC ha sido para tratar enfermedades cardiovasculares como el infarto de miocardio [61, 204-205], la esclerosis múltiple [206], cirrosis hepática [207], diabetes [208], lesiones pulmonares [209], enfermedades renales [210], en ortopedia y odontología [211], lesiones cutáneas [212], entre otras.

La evidencia del potencial regenerativo e inmunomodulador del secretoma de las MSC sigue en investigación preclínica, aunque, tal parece que ya se ha establecido que el uso del secretoma es seguro y viable en el método de obtención y su actividad paracrina, además de no presentar riesgos o efectos secundarios en los pacientes [213-215]. La aplicación clínica del cultivo de MSC para la obtención del secretoma aún continúa en estandarización.

Principalmente se investiga el preconditionamiento en cultivo de las MSC, el proceso de almacenamiento más eficiente y el mantenimiento del fenotipo troncal a lo largo de los pases celulares *in vitro* [216]. En retrospectiva, existen argumentos confiables para usar el secretoma derivado de MSC. Los efectos terapéuticos de las MSC se deben a la secreción de biomoléculas activas solubles. Como la citocina TGB- β producida por las MSC, que median la remodelación en el miocardio cuando este sufre de infarto [217]; o el factor de crecimiento de queratinocitos que junto con Angiopoietina derivada de las MSC forman una barrera protectora de daño que pudiera modificar la permeabilidad del epitelio alveolar y el endotelio [218]. También, otros factores importantes secretados por las MSC son interleucina-10 y prostaglandina-E2 con propiedades antiinflamatorias [216 y 219]. El injerto de MSC tiene bajo porcentaje de proliferación y mantenimiento *in situ*, aunque se realice con diferentes técnicas [220]. Por último, el uso del secretoma como herramienta libre de células, tiene el mismo efecto terapéutico que la terapia con células, pero sin todas las desventajas que lo acompañan. Si bien, aún falta mucho por investigar, la terapia libre de células a partir del secretoma producido por las MSC se dirige por buen camino [216 y 221].

3. JUSTIFICACIÓN

La eficiencia terapéutica de los injertos de MSCs en sitios de lesión o modelos *in vivo* es limitada, cuando existe un daño grave o irreversible la supervivencia celular es deficiente debido a procesos normales que regulan la reparación como son la inflamación, muerte o la diferenciación celular. Se conoce que los factores de crecimiento secretados por las MSCs son los responsables de iniciar y coordinar las cascadas de señalización que promueven la supervivencia, migración y proliferación celular. El interés fundamental, dentro de la ingeniería de tejidos es utilizar estos precursores clave de la renovación tisular que son producidos de manera constitutiva por las células y asisten en el proceso de regeneración. Conocer y modular la secreción de los factores de crecimiento que las MSCs producen mediante su precondicionamiento *in vitro* adquiere relevancia para aprovechar su potencial en la aplicación del secretoma como herramienta terapéutica o para el desarrollo de distintos dispositivos médicos sin aplicar terapias celulares.

4. HIPÓTESIS

EGF y FGF han sido usados como suplemento en el cultivo celular de MSC. Sin embargo, aún no se ha explorado su efecto en el precondicionamiento de células troncales. Por lo que sí las cultivamos con estos dos potentes factores de crecimiento, tendrá un efecto en la actividad biológica de las MSC *in vitro*.

5. OBJETIVO

Caracterizar la presencia y concentración de distintos factores de crecimiento como producto del precondicionamiento celular con EGF y FGF en el cultivo de MSC derivadas de la Gelatina de Wharton (WJ-MS).C).

5.1 Objetivos específicos

1. Cultivar MSC derivadas de la Gelatina de Wharton (WJ-MS).C).
2. Comprobar el fenotipo de las WJ-MS).C).
3. Obtener y caracterizar el secretoma de WJ-MS).C) bajo las siguientes condiciones de cultivo:
 - 2.1 WJ-MS).C) sin estímulo.
 - 2.2 WJ-MS).C) con estímulo de EGF y FGF.
 - 2.3 WJ-MS).C) con distinta fecha de almacenamiento.

6. METODOLOGÍA

6.1 Obtención y cultivo de células troncales mesenquimales de la Gelatina de Wharton (WJ-MSC)

Las WJ-MSC fueron obtenidas por cultivo primario del cordón umbilical en DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB y antibiótico penicilina y estreptomicina al 1% con cambio de medio cada 48 horas, hasta alcanzar una confluencia del 80%.

Procedimiento: (1) El fragmento de cordón umbilical se lava con HBSS y alcohol al 70% para retirar el exceso de plasma sanguíneo, (2) Al cordón umbilical se le retiran los vasos sanguíneos y se obtienen cortes más pequeños, menores a 5 mm, (3) se realizan dos lavados con solución salina Hanks suplementada con antibiótico (penicilina y estreptomicina al 1%) en tubo Falcon durante 30 minutos, (4) se retira la solución Hanks con antibiótico y se realizan dos lavados más, solo con Hanks de 30 seg, (5) los fragmentos se colocan por explante con la zona de la Gelatina de Wharton en contacto con el plástico, en cajas petri de 90mm de diámetro, (6) se añaden 5ml de medio de cultivo DMEM F12 a cada caja petri, suplementado con SFB al 10% y antibiótico (penicilina y estreptomicina al 1%), (7) el cambio de medio se realiza cada 48 horas y se incuban a 37°C hasta alcanzar el 80% de confluencia, (8) al alcanzar la confluencia se cosecha la monocapa celular mediante incubación con HBSS suplementado con tripsina 0.05%-EDTA 0.02% durante 3 minutos, (9) se inactiva tripsina con proporción 1:2 de DMEM-F12 y se centrifuga a 1800 rpm durante 5 minutos, (10) retener botón celular y resuspender en 1ml de medio DMEM-F12, (11) realizar conteo celular en cámara de Neubauer y sembrar células en nuevas cajas petri a 1×10^4 células/ml y adicionar 5 ml de medio DMEM F12, (12) realizar respectivos cambios de medio cada 48h hasta alcanzar pase 4 y confluencia del 100%.

6.2 Fenotipo de las WJ-MSC por citometría de flujo

Caracterizar a las WJ-MSC aisladas por explante por citometría de flujo utilizando anticuerpos para los marcadores de superficie CD73, CD90, CD105, CD44, HLA-ABC, HLA-DR, CD34, CD11b, CD19 y CD45. *Procedimiento:* (1) se cosechan las células y se resuspende en tubos de microcentrífuga a 1×10^4 células/ml por cada tubo, (2) centrifugar a 1200 rpm durante 1 min, decantar y lavar con 0.5 ml de PBS (*buffer* fosfato salino) en total 2 lavados, (3) resuspender en 50 μ l de PBS y teñir con 0.3 μ l de anticuerpo correspondiente, (4) incubar por 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, (5) realizar dos lavados con PBS, de acuerdo al procedimiento del paso 2, (6) resuspender y fijar con formaldehído, (7) evaluar presencia de marcadores de superficie por citometría de flujo, (8) analizar el fenotipo de las WJ-MSC con el *software* FlowJo.

6.3 Modulación *in vitro*: preconditionamiento con factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)

A partir del pase 3 y en 80% de confluencia, las células WJ-MSC son estimuladas con un medio de preconditionamiento con dos factores de crecimiento, para el preconditionamiento *in vitro* del cultivo. Se preparan tres medios de cultivo: **a) medio de crecimiento** (DMEM-F12 sin rojo fenol suplementado con SFB al 10% y antibiótico penicilina y estreptomycinina al 1%); **b) medio de preconditionamiento** (DMEM-F12 sin rojo fenol suplementado con EGF y bFGF (medio proporcionado por Novograft Laboratories) y antibiótico penicilina y estreptomycinina al 1%) y suplementado con 2% de SFB; **c) medio plano** (DMEM-F12 sin rojo fenol, sin SFB y sin factores de crecimiento antibiótico penicilina y estreptomycinina al 1%).

Procedimiento: (1) Tras 25 días de cultivo a las WJ-MSC y confluencia del 80%, se retira el medio (DMEM-F12 de crecimiento); (2) se realizan dos lavados con 6ml de PBS con duración de 30 seg hasta retirar el remanente del medio DMEM-F12; (3) se añade 10ml el medio de preconditionamiento y se mantiene por 48h en incubación, (4) pasadas las 48h, se retira el medio de preconditionamiento y se realizan tres lavados con 6ml de PBS, (5) se colocan 10ml de medio DMEM F12 sin rojo fenol plano, (6) el medio plano se deja por 48h, (7) después de 48h el secretoma producido por las WJ-MSC se colecta en tubos Falcon de 50 ml y se almacena a -70°C , (8) una vez realizada la colecta, las células permanecen con 10ml de DMEM-F12 de preconditionamiento por 48h, (9) pasadas las 48h, se retira el medio de preconditionamiento y se realizan tres lavados con 6ml de PBS, (10) se colocan 10ml de medio DMEM F12 sin rojo fenol plano, (11) después de 48h el secretoma producido por las WJ-MSC se colecta en tubos Falcon de 50ml y se almacena a -70°C . El ciclo de preconditionamiento y colecta del secretoma se mantiene hasta el pase 4 y se almacena en tubos Falcon de 50ml a -70°C , para su posterior análisis. Para el grupo control sin preconditionamiento, se aplicó un ciclo de cambio de medios entre el **a) medio de crecimiento** (DMEM-F12 sin rojo fenol suplementado con SFB al 10% y antibiótico penicilina y estreptomycinina al 1%) y **c) medio plano** (DMEM-F12 sin rojo fenol, sin SFB y sin factores de crecimiento; antibiótico penicilina y estreptomycinina al 1%); con el mismo protocolo que el grupo preconditionado. Se realizaron un total de 6 ciclos para cada grupo experimental.

6.4 Procesamiento y caracterización del secretoma de WJ-MSC: ensayo múltiple de factores de crecimiento humano, LEGENDplex de Biolegend y citometría de flujo

El secretoma total del cultivo de células troncales mesenquimales derivadas de la Gelatina de Wharton se almacena por pases, en tubos Falcon de 50 ml a -70°C . Todos los secretomas son

liofilizados a $-109^{\circ}\text{C}/0.075\text{Pa}$ durante 30-32h en una liofilizadora Coolsafe Basic cilíndrica, hasta obtener una liofilización completa. El secretoma liofilizado de cada tubo fue etiquetado, pulverizado y almacenado a -70°C en un refrigerador REVCO. Para la caracterización del secretoma se requiere del ensayo múltiple de factores de crecimiento humano LEGENDplex, es un *kit* usado para la cuantificación precisa de múltiples factores de crecimiento en el secretoma de cultivo celular y otras muestras biológicas en suspensión. Este *kit* permite evaluar 13 factores de crecimiento diferentes y sus concentraciones, simultáneamente en cada muestra de secretoma liofilizado humano. Los factores analizados fueron: Ang-2, EGF, EPO, bFGF, G-CSF, GM-CSF, HGF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, SCF, TGF- α y VEGF.

Procedimiento: (1) se crea una curva de concentración conocida (C0-C7), colocando 25 μL de *Wash Buffer (WB)* a C0 para el control, y a C1-C7 se les añadió 25 μL de los reactivos de la curva C1-C7 en tubos de microcentrífuga, (2) para los liofilizados (grupos experimentales), se pesan 0.025g de cada liofilizado en 250 μL de *WB* y se homogeneiza la solución en tubos de microcentrífuga con ayuda de un vórtex, (3) a todos los tubos se les añade 25 μL de *Assay Buffer*, (4) a todos los tubos se les añade 25 μL de perlas provenientes del *kit* listas para su uso y se homogeneizan con ayuda de vórtex durante 10 segundos, (5) se incuban en oscuridad y con agitación constante a temperatura ambiente durante 2h, (6) luego de la incubación, se centrifugan todos los tubos a 10,000 rpm/ 5min en microcentrífuga, (7) se retira el remanente de la tinción y se verifica la presencia de botón con perlas en color azul, (8) se realiza un lavado con 200 μL de *WB*, se mezcla en vórtex durante 5 segundos y se centrifuga a 10,000 rpm/ 5min, (9) se repite un segundo lavado como en (7) y (8), (10) A todos los tubos se les coloca 13 μL de anticuerpo de detección y se incuban en oscuridad y agitación constante a temperatura ambiente durante 1h, importante: no se realizan lavados al concluir (10), (11) inmediatamente se añaden 13 μL de SA-PE y se incuban en oscuridad y agitación a temperatura ambiente durante 30 min, (12) se realizan dos lavados como en (7) y (8) y se retira el exceso de *WB* con ayuda de micropipeta conservando el botón celular, (13) el botón que contenía las perlas se resuspende en 150 μL de *WB* y se transfirieren a tubos de citometría para su análisis por citometría de flujo. Los datos obtenidos son analizados en el *software* que ofrece LEGENDplex de Biologend, los cuáles nos dan valores de concentración en pg/ml de cada uno de los 13 factores analizados y la curva de (C0-C7).

Análisis estadístico

Para la caracterización del secretoma producido por las WJ-MSC en cultivo con y sin el preacondicionamiento con EGF y FGF se realizó un análisis general y descriptivo con ayuda del *software* LEGENDplex de Biologend que ofrece valores en pg/ml de la concentración precisa de los 13 factores de crecimiento de la siguiente manera: se realizó un análisis general sin importar el factor de crecimiento para identificar en cuál condición había una mayor producción de factores de crecimiento. Los datos fueron separados en grupos bajo diferentes condiciones de cultivo:

Grupo A: formado por los datos obtenidos bajo cultivo con DMEM-F12 con rojo fenol y en medio de crecimiento (sin factores de crecimiento), una mezcla de **Pase 1 a Pase 2**.

Grupo B: formado por los datos obtenidos bajo cultivo con DMEM-F12 con rojo fenol y en medio de crecimiento (sin factores de crecimiento), una mezcla de **Pase 3 a Pase 4**.

Grupo C: formado por los datos obtenidos bajo cultivo con DMEM-F12 sin rojo fenol y en medio de crecimiento (sin factores de crecimiento), **solo Pase 3**.

Grupo D: formado por los datos obtenidos bajo cultivo con DMEM-F12 sin rojo fenol y en medio de preacondicionamiento (con factores de crecimiento **EGF y FGF**) de pase 3, comparando el secretoma obtenido en 2019 (**almacenado**).

Grupo E: formado por los datos obtenidos bajo cultivo con DMEM-F12 sin rojo fenol y en medio de preacondicionamiento (con factores de crecimiento **EGF y FGF**) de pase 3, secretoma obtenido en 2021 (**fresco**).

Los datos fueron comparados estadísticamente por un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba Sidak usando el *software* estadístico GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) considerado $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Se usó una $N=4$ en cada grupo y se consideró como variable dependiente a la concentración en pg/ml y a la variable independiente a cada uno de los 13 factores de crecimiento, para cada condición de cultivo. Para el análisis por cada factor de crecimiento comparado en cada condición de cultivo se realizó una prueba ANOVA de una vía y una prueba t de student usando el *software* estadístico GraphPad Prism 8.

7. RESULTADOS

7.1 Fenotipo de las células troncales mesenquimales (WJ-MSC)

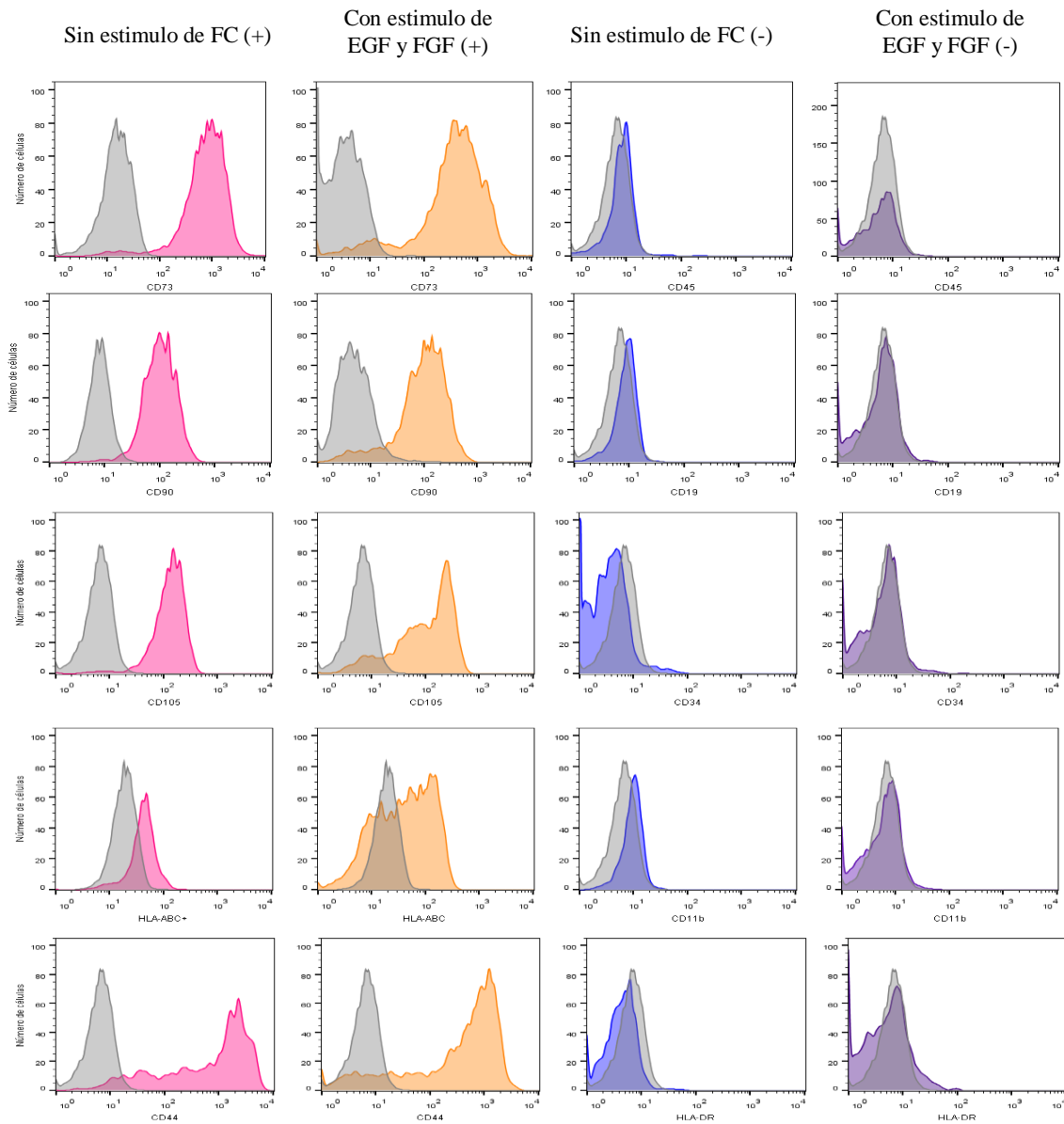


Figura 6. Inmunofenotipo de las WJ-MSC. Marcadores representativos del fenotipo mesenquimal, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC y CD44; positivos y CD45, CD19, CD34, CD11b y HLA-DR; negativos. Se observaron a las poblaciones control, histogramas en color gris. Las poblaciones positivas (histogramas en color **rosa**) y la población negativa (histogramas en color **azul**) por lo tanto, se obtuvo una población aislada de células troncales mesenquimales de cordón umbilical. Para el fenotipo mesenquimal post-preacondicionamiento con EGF y FGF se observaron a la población positiva en color **naranja** y a la población negativa en color **morado**.

El análisis del fenotipo celular por citometría de flujo de las WJ-MSC, mostrado en la Figura 6, se observó que las células presentaron una alta expresión de CD73+, CD90+, CD105+ y CD44+ y HLA-ABC+; una expresión negativa de CD45-, CD19-, CD34-, CD11b- y HLA-DR-; en todos los casos mayor al 89%, con lo que se comprobó su fenotipo mesenquimal para el grupo que no recibió estimulación con EGF y FGF. En el caso de las poblaciones precondicionadas con EGF y FGF, existió una pequeña población negativa para: CD105+ y HLA-ABC+. En los marcadores negativos no hubo modificaciones con o sin precondicionamiento de EGF y FGF.

7.2 Caracterización del secretoma de WJ-MSC

7.2.1 Análisis de la producción total de factores de crecimiento encontrados en el secretoma bajo distintas condiciones de cultivo

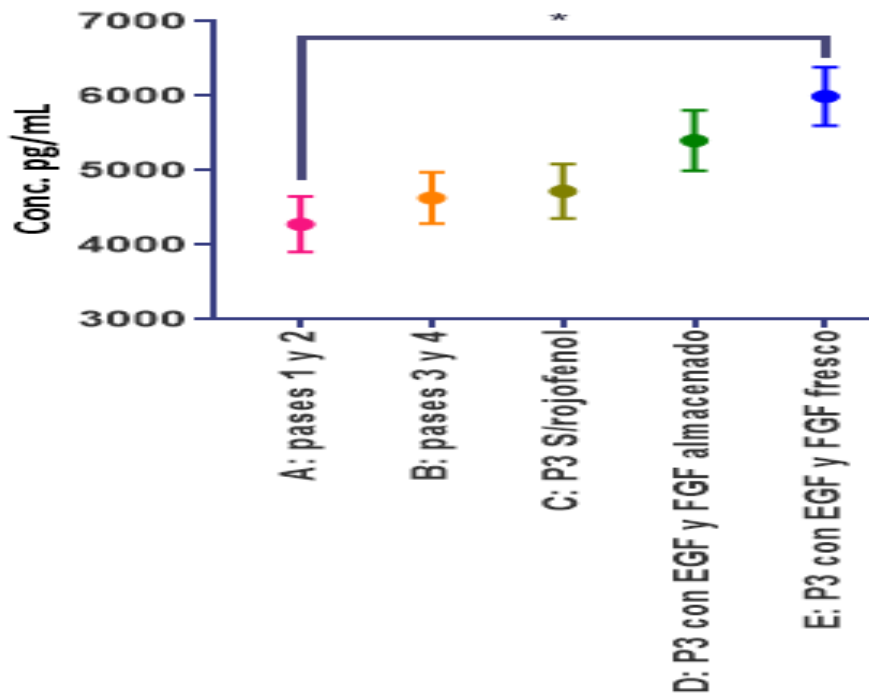


Figura 7. Cuantificación precisa de los factores de crecimiento producidos por las WJ-MSC en diferentes condiciones de cultivo y almacenamiento. Se obtuvieron seis grupos; **A:** pases tempranos (1 y 2) con rojo fenol, **B:** pases tardíos (3 y 4) con rojo fenol, **C:** pase 3 sin rojo fenol, **D:** pase 3 sin rojo fenol y con estímulo de (EGF y FGF) y “almacenado” del año 2019, **E:** pase 3 sin rojo fenol y con estímulo de (EGF y FGF) “fresco” del año 2021. Se encontró diferencia significativa en A vs. E, (n=4) * p= 0.0197. Los datos se compararon estadísticamente mediante un análisis de varianza de

una vía (ANOVA) y prueba Sidak usando el Software estadístico GraphPad Prism 7 considerando $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

El análisis estadístico de los cambios en las concentraciones (pg/ml) entre los grupos experimentales cultivados con/sin rojo de fenol, no mostró diferencia significativa. Con esto, comprobamos que el rojo de fenol podría no alterar la actividad productora y secretora de las WJ-MSC, por lo que incluso, el cultivo primario de WJ-MSC se podría realizar desde un inicio, en un medio libre del rojo de fenol y las células contarían con la misma actividad secretora. Del mismo modo, estadísticamente, no hubo diferencia en cuanto a las concentraciones (pg/ml) entre los grupos experimentales dependientes del pase celular. La producción y secreción de factores de crecimiento fue similar entre los pases 1 a 4, por lo que las células son igualmente secretoras en etapas tempranas como tardías. Con respecto al preacondicionamiento con (EGF y FGF); se observaron de manera cualitativa dos comportamientos, los primeros tres grupos (A, B y C) que no recibieron preacondicionamiento, tuvieron una concentración similar entre sí. Por otro lado, en los grupos: D y E, el preacondicionamiento con EGF y FGF provocó un cambio en la producción y secreción de factores de crecimiento, evidenciado por el aumento en la concentración. La diferencia significativa fue notoria entre el grupo A (WJ.MSC pase temprano) vs el grupo E (WJ-MSC de pase 3 estimuladas con EGF y FGF, fresco), ver figura 7. Con respecto al almacenamiento del secretoma y el mantenimiento de las características biológicas, comparamos un secretoma resultado del preacondicionamiento con EGF y FGF; previamente liofilizado y almacenado en el año 2019 (grupo D), observamos que no existió diferencia significativa con respecto al contenido proteico, cuando este es comparado con un secretoma “fresco” (grupo E) con las mismas características de preacondicionamiento. El análisis de ambos liofilizados (almacenado y fresco) mostró, un rango de concentraciones similares, independiente de los factores de crecimiento analizados, por lo que el almacenamiento del secretoma liofilizado es posible, ver figura 7.

7.2.2 Análisis comparativo múltiple LEGENDplex: producción y secreción de factores de crecimiento.

Una vez analizado en qué condiciones de cultivo, se obtuvo una mayor producción y secreción de factores de crecimiento, fue necesario realizar un estudio más detallado por cada uno de los factores. Los resultados del análisis LEGENDplex del secretoma de WJ-MSC, respaldaron la presencia de varios factores de crecimiento, así como su composición relativa que ayudan a incrementar el conocimiento del perfil del metabolismo de las MSC durante su cultivo *in vitro*.

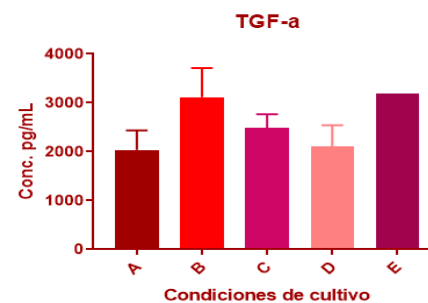
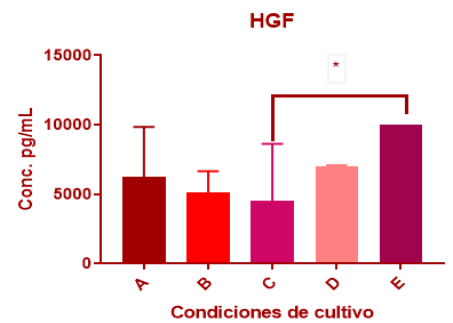
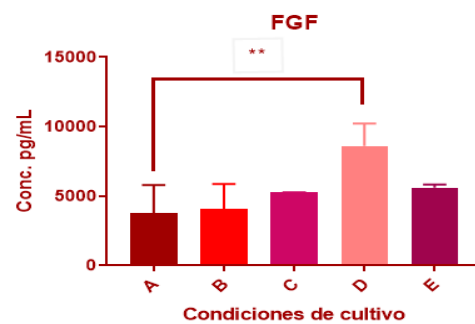
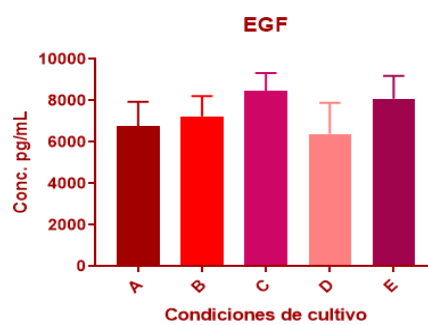
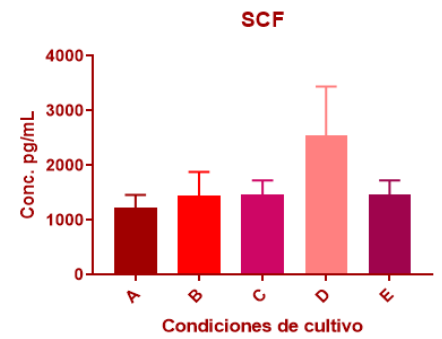
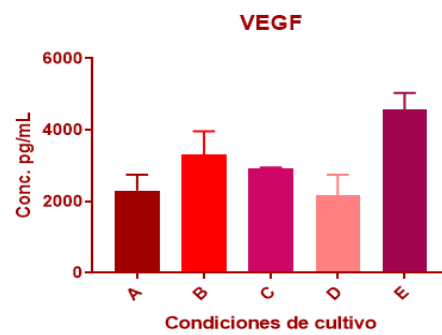
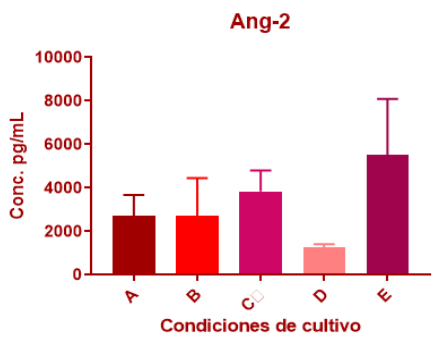
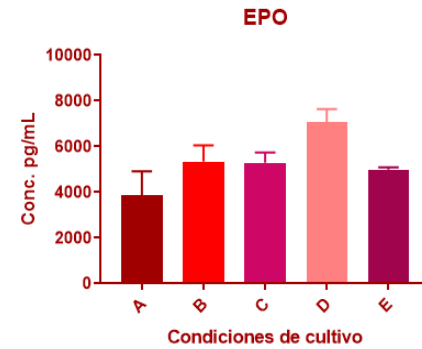
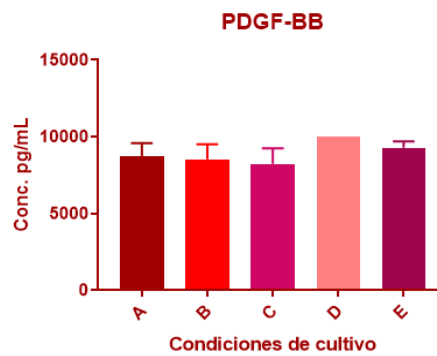
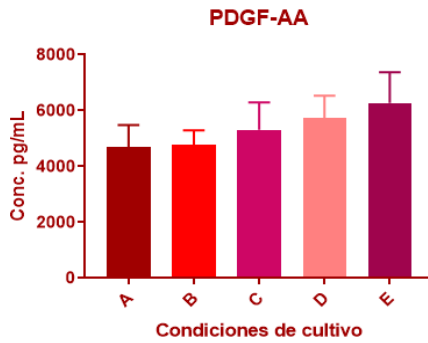
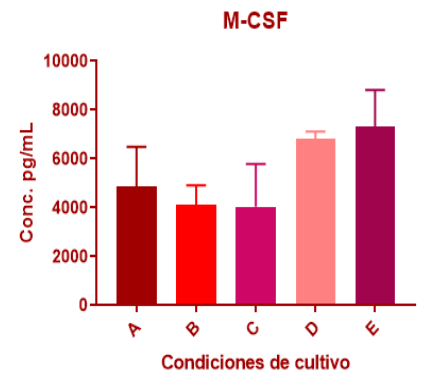
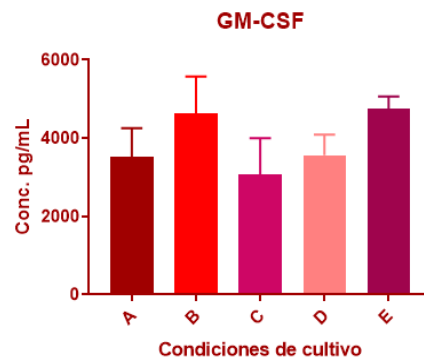
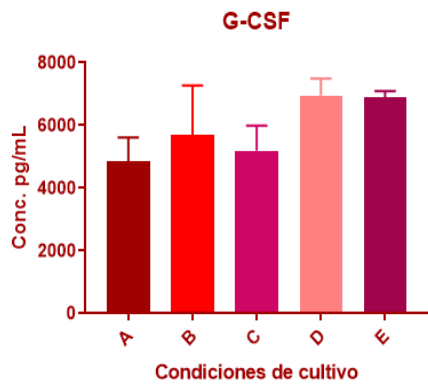


Figura 8. Factores de crecimiento asociados con la proliferación, angiogénesis, troncalidad, regeneración y cicatrización de heridas.

En todos los casos: **A** (pases tempranos 1 y 2), **B** (pases tardíos 3 y 4), **C** (pase 3 cultivadas en medio DMEM-F12 sin rojo fenol), **D** (pase 3 estimuladas con EGF y FGF “almacenado” del año 2019), **E** (pase 3 estimuladas con EGF y “fresco” del año 2021). En todos los grupos se observan concentraciones mayores a los 2000 pg/ml.

Los resultados recopilados confirman que las WJ-MSC producen y secretan factores de crecimiento con actividades angiogénicas, proliferativas, migratorias, quimioatrativas con relevancia en la medicina regenerativa. La tecnología del kit análisis múltiple de Biolegend LEGENDplex, utiliza perlas con alta sensibilidad para la cuantificación de varios analitos presentes en una suspensión como lo es, el secretoma de MSC. Estos analitos pueden ser citocinas o factores de crecimiento (FC), que se categorizan por concentración de manera simultánea en un mismo ensayo. Se evaluaron un total de 13 FC incluidos: Ang-2, EPO, VEGF, SCF, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, EGF, FGF, HGF, TGF- α ; para cada una de las condiciones de cultivo y se subdividieron de acuerdo con su función, pese a que varios de los FC descritos a continuación tienen más de una función o comparten actividad al combinarse con otras citocinas [237-238]. En cuanto a los factores de crecimiento, en el presente estudio, se encontraron niveles por encima de los 2500 pg/ml de: EGF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, PDGF-AA y VEGF, ver figura 8. Por lo que, las WJ-MSC producen de manera constitutiva, FC, asociados con la proliferación celular, incluso sin el precondicionamiento con EGF y FGF. También, particularmente en HGF y bFGF en este estudio se observó una diferencia significativa en cuanto a la secreción de factores de crecimiento dependiente de la condición de cultivo. Para HGF esta diferencia fue notoria en el grupo C vs grupo E, ambas muestras pertenecientes al pase 3, el grupo C (sin precondicionamiento), grupo E (con precondicionamiento). En el caso de bFGF, observamos también un caso significativo entre los datos del grupo A vs el grupo D, grupo A (sin precondicionamiento pases tempranos), comparado con el grupo D (precondicionamiento y almacenado), ver figura 8.

8. DISCUSIÓN

El análisis del fenotipo celular por citometría de flujo de las WJ-MSC evidenció un fenotipo mesenquimal, la expresión positiva de CD73+, CD90+, CD105+, CD44+ y HLA-ABC+; y la expresión negativa de CD45-, CD19-, CD34-, CD11b- y HLA-DR- en este estudio, concuerda con lo observado por Liao y colaboradores en 2020 donde, se señaló una morfología fibroblastoide y la

adherencia a superficies plásticas característica [106 y 222]. El precondicionamiento de las WJ-MSC con los factores EGF y FGF, mantuvo el fenotipo mesenquimal en gran parte de la población celular. Sin embargo, el marcador CD105+ y HLA-ABC+ presentaron una disminución del porcentaje de expresión, con respecto a las WJ-MSC no estimuladas, ver figura 6. Estos cambios en el perfil de expresión también fueron reportados por Riekstina y colaboradores en 2008. Riekstina y su equipo, precondicionaron MSC derivadas de piel con EGF y FGF-2 a 20ng/ml y 40ng/ml respectivamente; y al analizar el fenotipo, observaron a CD90+, CD105+, CD73+, CD45-, CD14-, HLA-DR-, fenotipo que se conservaba en el 95% de la población de los pases 1 a 3. No obstante, con el precondicionamiento a partir del pase 3, observaron una pequeña población positiva para CD34, estos cambios en el perfil post-preacondicionamiento concuerdan con nuestro estudio, ya que CD105+ y HLA-ABC+ también presentaron alteraciones en el pase 3, por lo que planteamos la posibilidad de que el precondicionamiento con EGF y FGF después del pase 3 podría modificar el perfil de las WJ-MSC en cultivo [223].

Yang y su equipo observaron que las WJ-MSC presentaban una proliferación significativamente mayor en los primeros pases (pase 2-3), destacando el pase 3 como la etapa con la máxima proliferación celular. Sin embargo, notaron que esta capacidad de proliferación disminuía a medida que avanzaban los pases celulares. Si bien, en el presente estudio, no se realizaron pruebas de proliferación, de manera descriptiva, también se observó este comportamiento. Yang, también mencionó, que a partir del pase 5, las WJ-MSC presentan cambios morfológicos, como una geometría aplanada e irregular y un cambio en la capacidad de proliferación y secreción, explicado por el envejecimiento de las MSC *in vitro* [224-225].

Riekstina, también describió cambios en la morfología de las MSC al precondicionarlas con diferentes concentraciones de EGF y bFGF (5, 10, 20, 40 ng/ml), observaron cuerpos celulares dendríticos y esferas flotantes en el citoplasma. También, al analizar la capacidad proliferativa, observaron que el uso de ambos factores no tiene efecto en la proliferación celular, pero sí, en la actividad biológica. Al cuantificar la secreción de bFGF en el grupo control (medio de cultivo enriquecido solo con 10% de SFB), encontraron 317-410 pg/ml por 5×10^4 células, [223]. En el presente estudio la producción de bFGF en el grupo control fue de 4000-5000 pg/ml por 1.45×10^5 células tras seis ciclos de colecta, por tanto, con el protocolo de este estudio, se obtuvieron mayores concentraciones de FC. FGF-2/bFGF, es un estimulante de varios tipos celulares incluyendo fibroblastos, mioblastos, células endoteliales y muchos más tipos de origen mesodérmico. bFGF es un factor comúnmente usado en el cultivo de MSC, en varios trabajos se ha evidenciado su efecto en la proliferación celular dependiente de la dosis [105-107 y 223].

De acuerdo con nuestros hallazgos, el uso de EGF y FGF ha demostrado tener un efecto en las WJ-MSC, en el pase 3. El precondicionamiento con EGF y FGF ocasionó que las WJ-MSC aumentaran su actividad biológica, al producir y secretar una mayor concentración de factores de crecimiento. Se comprobó que las WJ-MSC, segregan una variedad de factores de crecimiento que incluyen Ang-2, EPO, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, SCF, TGF- α , VEGF, HGF, EGF y bFGF. Todos estos factores son esenciales en el proceso de autorrenovación mesenquimal por medio de mecanismos autocrinos y por contribuir a la formación de un secretoma rico en factores que desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis y la regeneración tisular por medio de mecanismos paracrinos [226]. EGF, también es un factor de crecimiento con efecto en la proliferación en células de origen mesodérmico y ectodérmico como fibroblastos y queratinocitos [86 y 227]. No obstante, las concentraciones reportadas para una combinación óptima, con efectos en la proliferación celular son (20ng/ml) de EGF y (40ng/ml) de FGF suplementados con SFB a bajas concentraciones (5-10 %). Aunque, es necesario estandarizar la dosis ideal de EGF y FGF en el precondicionamiento de MSC, es un hecho que estos dos factores tienen efecto en la actividad biológica, en el cultivo *in vitro* de WJ-MSC [226-229]. Si bien, la mayoría de los estudios publicados enfatizan el uso de ambos factores de crecimiento con efecto en la proliferación y el mantenimiento del fenotipo mesenquimal, el presente trabajo contribuye de manera novedosa a la investigación, pues EGF y FGF reflejaron un efecto en la actividad biológica de las WJ-MSC, no solo en la proliferación celular.

En un estudio realizado por Pereira y colaboradores, reportaron en el secretoma de MSC tras el precondicionamiento de 48h; elevadas concentraciones de G-CSF y TGF- β 1; y ausencia de EGF, incluso en los grupos sin precondicionamiento (células cultivadas en DMEM con SFB al 10%). Tanto G-CSF como TGF- β , juegan un papel importante en la movilización de células progenitoras y protección de células madre, respectivamente. Sin embargo, las concentraciones de G-CSF presentes en el secretoma, no superaron los 1500pg/ml en los grupos precondicionados [238]. Por otra parte, en el presente estudio, se encontraron concentraciones por encima de los 2500 pg/ml en: GM-CSF, M-CSF y G-CSF, en todas las muestras independientemente del precondicionamiento. Sugerimos que esta diferencia pueda deberse a que Pereira, realizó un ciclo de acondicionamiento de sólo 48 h, y en el presente estudio, fue de 6 ciclos. El periodo de modulación o precondicionamiento es un tema de discusión. Ya que se ha observado que tanto la confluencia como el periodo de precondicionamiento tienen efectos en la concentración de FC en el secretoma. En la revisión realizada por Chouaib, enfatiza una mayor concentración de proteínas conforme mayor sea la confluencia, y el tiempo de cultivo [239], mientras que Sagaradze y colaboradores demostraron, que el pico más alto de secreción se alcanza entre los días 7-10 de cultivo, por lo que

sugiere periodos cortos de precondicionamiento [240]. El protocolo sobre el tiempo de precondicionamiento, es aún controversial y hoy en día, no existe una estandarización con respecto al cultivo de las MSC para la obtención del secretoma.

Dentro de los factores más importantes, podemos encontrar a los factores angiogénicos y vasculogénicos como: Ang-2, EPO y VEGF. Después de una lesión, VEGF tiene un papel relevante en la hematopoyesis necesaria para la neovascularización. Se ha descrito que muchas de las células endoteliales y hematopoyéticas tienen una alta expresión de receptores de membrana como Tie2, Flt-1 y Flk-1 que pueden interactuar con VEGF y otras citocinas angiogénicas como Ang1 y Ang2 [241]. Hildbran y colaboradores mencionaron que, las angiopoyetinas: Ang1 y Ang2 se encuentran mayormente expresados en células progenitoras CD34+, de linaje hematopoyético [242]. En el presente estudio, el análisis comparativo para factores angiogénicos se encontró, que Ang2 es secretada en un rango de 1000-6200 pg/ml, siendo nuestra población CD34 negativa, ver figura 8. Por lo que se comprobó, que las WJ-MSC, producen un secretoma rico en factores angiogénicos, incluida Ang2. El efecto de estos factores en muchas ocasiones es dependiente de la dosis, por ejemplo; Kim y su equipo encontraron, que un efecto angiogénico notorio o incluso la activación de la vía PI3K/Akt, requiere concentraciones mayores a los 800 ng/ml de Ang2, y que en concentraciones bajas en un rango de (50-400 ng/ml), es apenas detectable y carece de efecto en la angiogénesis [243]. Otro factor detectado en el presente estudio fue EPO, que se ha descrito como una glucoproteína que puede actuar como hormona y como un factor de crecimiento, que se activa en casos de hipoxia. Su activación ocasiona la movilización de millones de glóbulos rojos maduros y la sobreexpresión de genes que codifican para la biosíntesis de hemoglobina. En tejidos como cerebro, corazón y músculo esquelético, EPO puede tener una acción protectora de células MSC y células del sistema inmune [124]. EPO, no solo estimula la eritropoyesis, también puede inducir la remodelación ósea, la angiogénesis y ocasionar que las MSC aumenten la secreción de factores de crecimiento [257]. En un estudio con MSC derivadas de médula ósea (BM-MSC) precondicionadas con EPO, las células mostraron una mayor supervivencia, así como la expresión de factores como: HIG1 α , VEGF, Ang, Bcl-2 y Bcl-xL [124, 245]. Villalobos y equipo reportaron que, en humanos sanos, EPO se encuentra en sangre en una concentración de 1-7 pmol/L [246]. En el presente estudio, las WJ-MSC precondicionadas con EGF y FGF, secretaron EPO en un rango de 3800-7500 pg/ml, y encontramos una mayor concentración de EPO en el grupo D (secretoma “almacenado”), aunque sin diferencia significativa con respecto a las otras condiciones de cultivo, ver figura 8. Las WJ-MSC segregan en su secretoma EPO de manera constitutiva y, que el

preacondicionamiento con EGF y FGF favoreció a una mayor secreción de este factor, sin la presencia de un ambiente hipóxico.

SCF, es una citocina importante en la reparación de heridas, su presencia y secreción tiene efecto en la velocidad de reepitelización mediante la activación del receptor *c-kit* en los queratinocitos. Incluso, la activación de *c-kit* conduce a la expresión de otros FC que incluyen a KGF, EGF, PDGF-BB y TGF- α ; que, a su vez, aumentan la migración y proliferación de fibroblastos y neutrófilos [247]. Por lo que la presencia de un factor puede tener efecto en cascada, en la secreción de otros factores que trabajan sinérgicamente en importantes procesos celulares. SCF es esencial en el cierre de heridas en etapas tempranas por su alto reclutamiento de células de la piel e inmunes. Para demostrar el papel de este factor en el cierre de heridas, Miyamoto y equipo demostraron que, en lesiones corneales en ratones mutantes con deficiencia en *SCF/c-kit*, el tiempo de recuperación es más lenta y que después del uso tópico de 8000 pg/ml de SCF, se restaura la velocidad de curación de la herida, ya que tiene efecto en la proliferación celular y en la síntesis de otros factores regenerativos. Por lo que se confirmó el efecto de SCF en la cicatrización de heridas corneales. Los mecanismos moleculares y celulares de SCF en el cierre de heridas siguen en investigación [248].

Como se ha mencionado previamente, es crucial determinar la dosis óptima para el tratamiento de lesiones. En el caso de lesiones extensas o tratamientos repetidos, podría ser necesario administrar concentraciones elevadas de factores específicos. En el presente estudio, SCF se identificó en un rango de 1200 a 4600 pg/ml en el secretoma de WJ-MC. Esta concentración es considerablemente mayor en comparación con los niveles de SCF detectados en sangre (3300 pg/ml) y los informados en otras investigaciones, lo cual sugiere un incremento notable con un potencial terapéutico significativo [177]. En un estudio realizado por Bozkaya y equipo encontraron que, en el secretoma de BM-MS, por cada 10×10^4 células se secretan 125.91 pg/ml de HGF; en plasma sanguíneo la concentración reportada es de 2340.56 pg/ml [139]. En este estudio, observamos que HGF es secretado en concentraciones mayores a los 4000 pg/ml en los grupos que no recibieron preacondicionamiento con EGF y FGF (grupos A-C), y mayores a los 6000 pg/ml en los grupos modulados con dichos factores (grupos D-E), ver figura 8. FGF-2/bFGF es un factor de crecimiento antiapoptótico y antifibrótico al que se ha señalado su rol en la proliferación celular y en la cicatrización de heridas [236, 249]. Pereira y su equipo reportaron que las MSC cultivadas con preacondicionamiento, secretaron altas concentraciones (3111 pg/ml) de FGF-2 [238]; que, comparado con el presente estudio, el rango de concentraciones fue de 3000-4000 pg/ml solo en los grupos sin preacondicionamiento, y de 6000-8500 pg/ml en los grupos con preacondicionamiento, ver figura 8; lo que es un aumento evidente. Con este protocolo, el preacondicionamiento con EGF y FGF, favoreció en una mayor secreción de factores de crecimiento necesarios en la cicatrización

de heridas. Además, FGF-2 puede trabajar sinérgicamente con VEGF, acelerando la regeneración tisular; ambos factores no solo están presentes, lo están en grandes cantidades y juntos tienen un efecto protector de tejidos [250].

Es sabido, que varios de los FC conocidos hasta el momento, tienen la capacidad de provocar la secreción de otros FC específicos y que en conjunto apoyen la reparación tisular. Por ejemplo, se ha demostrado que, tras una lesión en bronquiolos en ratones, durante los primeros días, aumentan los niveles de EGF, TGF- α y HGF, y esta señalización disminuye hasta los 7 días posteriores a la lesión [251]. Las posibles combinaciones entre FC con efectos en la reparación tras heridas son infinitas, la combinación óptima dependerá del contexto del tejido y del tipo de lesión. Ryan y equipo, encontraron que, para inducir la proliferación de células alveolares tras lesión, es necesaria la presencia y combinación de EGF y TGF- α , ya que TGF- α es de los factores que sí o sí debe estar presente si de cicatrización de heridas se habla, principalmente, se requieren niveles elevados de esta citocina en lesiones por rasguños o cortes en tejidos epiteliales [252-253]. Otra combinación con posibles efectos beneficiosos implica el uso de, EGF, FGF y HGF. Estos tres factores han demostrado ser los primeros en ser secretados durante el proceso de reparación tisular. Esta tríada se destaca actuando como un “cóctel” que podría ser aplicada en un tejido dañado para estimular la proliferación, migración y diferenciación celular requerida de manera sostenida que reemplazaría la necesidad de utilizar múltiples factores. En situaciones donde la reepitelización requiera un proceso de angiogénesis, esta combinación puede complementarse con VEGF y PDGF para acelerar el proceso de cicatrización y reparación de heridas. En última instancia, la utilización del secretoma de WJ-MSC dependerá del objetivo específico, ya que es un medio rico en proteínas con funciones dedicadas a la remodelación tisular con propiedades antiapoptóticas [113, 254-255].

Dentro de la terapia libre de células, se han obtenido mejores resultados mediante la administración simultánea de múltiples factores de crecimiento, permitiendo su acción sinérgica para alcanzar un efecto terapéutico óptimo. Sin embargo, surge una interrogante crucial: ¿Qué tanto es tantito?, esta interrogante se enfoca en las implicaciones de utilizar un secretoma con dosis elevadas de ciertas citocinas o FC. Por ejemplo, citocinas proinflamatorias o angiogénicas que podrían inducir la formación de vasos sanguíneos aberrantes [256]. Es vital conocer y controlar los niveles de citocinas administradas localmente, debido a la estabilidad de estos, una vez colocados *in vivo*. Por otro lado, las vías moleculares que median la secreción del secretoma nos ayudarían a comprender mejor el perfil de comunicación involucrados en la reparación de tejidos y su aplicación clínica. Se han involucrado una amplia gama de vías de señalización del secretoma de

células mesenquimales, como la vía PI3K/Akt, que se cree está involucrada en la producción y secreción de FC [61, 257-258].

Las MSC son reconocidas como células altamente secretoras de factores inmunomoduladores, protectores y tróficos. Sin embargo, existen evidencias de que el perfil secretor, así como la potencialidad, varía con respecto a la fuente de obtención de MSC. En un estudio realizado por Sung Ho Shin y colaboradores encontraron que, al comparar el secretoma de mesenquimales de tejido adiposo, médula ósea, placenta y gelatina de Wharton, existían diferencias en la composición. Por ejemplo, los secretomas derivados de origen fetal como lo son placenta y gelatina de Wharton son más diversos en términos de la composición; que los derivados de médula ósea y tejido adiposo. Su estudio identificó un total de 265 proteínas en el secretoma de tejido adiposo, 253 proteínas en secretoma de médula ósea, 511 proteínas en secretoma de placenta y 440 proteínas en secretoma de gelatina de Wharton. Siendo el secretoma de WJ-MS, el que contenía más proteínas relacionadas con el desarrollo tisular y la diferenciación hematopoyética [113]. También es una ventaja que el secretoma de las MSC, al estar libre de células y mostrar concentraciones de FC relativamente bajas de forma basal, reduzca el riesgo de inducir una respuesta inflamatoria grave o provocar rechazo inmunológico y así proporcionarle una mayor seguridad al paciente [243].

Por lo anterior, es importante mencionar que sigue siendo un reto, controlar los cambios en los perfiles de secreción de las MSC, ya que existen variables como la fuente de obtención, la edad del donante y las condiciones de cultivo, que pueden influir en el precondicionamiento *in vitro* y, por ende, en la calidad del secretoma. La mayoría de las técnicas actuales para el análisis del secretoma se basan en la identificación de proteínas por ensayos inmunológicos y espectrometría de masas [240,259-260], el control total de todas las variables mencionadas sigue en investigación, así como de técnicas nuevas, que permitan una lectura sensible y simultánea del contenido proteico total del secretoma. La elección del pase celular también es motivo de estudio y discusión. Se ha informado que las MSC pueden cambiar su fenotipo y multipotencia cuando estas son sometidas al cultivo *in vitro* durante varios pases celulares; por este motivo se ha sugerido usar pases tempranos anteriores al 4, donde las células son altamente secretoras, proliferativas y el fenotipo es mesenquimal en un alto porcentaje [261].

El medio de cultivo y su suplementación con suero fetal bovino (SFB), que comúnmente se usa en el cultivo celular de otros tipos celulares incluidas las MSC, son todo un tema en el aprovechamiento del secretoma como herramienta terapéutica. Dentro de los componentes del SFB pueden encontrarse virus, proteínas priónicas, endotoxinas y otros contaminantes que podrían afectar la viabilidad del cultivo de MSC, además de que existen cambios en la composición del SFB de un lote a otro por cambios del tipo geográficos y estacionales [262-263]. Dicho esto, una de las

sugerencias en la obtención del secretoma y su modulación, es realizar cambios de medios de cultivo al momento del precondicionamiento del secretoma, colocar a las células en un medio libre de SFB o con bajas concentraciones y posteriormente colectar el secretoma liberado en un medio plano (sin/bajas concentraciones de SFB), como se realizó en el presente estudio, para limitar los posibles sesgos debidos al uso del SFB [21 y 227].

Al igual que el precondicionamiento de MSC, las estrategias de lioconservación del secretoma, también se encuentra en desarrollo de un protocolo que permita extender la vida útil de este, sin comprometer las características estructurales y funcionales de los componentes bioactivos liberados por las MSC. Driscoll y colaboradores, reportaron a la liofilización, como una estrategia eficiente para preservar la integridad del secretoma derivado de MSC, al igual que en el presente estudio, se confirmó que la liofilización mantuvo las características del secretoma y que esta técnica podría seguir aprovechándose para extender la vida media biológica del secretoma de MSC [230-231].

Varias técnicas de criopreservación que incluyen el tratamiento con trehalosa y temperaturas menores a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ han tenido resultados positivos en el almacenamiento y conservación del secretoma [232-233]. Sin embargo, la liofilización ha demostrado tener los mejores resultados, permitiendo el almacenamiento por largos periodos de tiempo sin modificar la integridad del secretoma, que *in vitro*, conserve su bioactividad y que se encuentre listo para ser usado [230].

Si bien EGF y FGF han sido identificados como factores comúnmente empleados en el cultivo de MSC para fomentar la proliferación y preservar del fenotipo mesenquimal, en el presente estudio se ha confirmado su dependencia de la dosis. Se evidenció que un incremento en las concentraciones de ambos factores podría dirigir a las MSC hacia una modificación o aumento de factores y citocinas de interés. Por consiguiente, se aspira a controlar el perfil secretor de las MSC para canalizarlo hacia factores clave con miras al tratamiento y uso clínico de diversas enfermedades degenerativas. Los valores de todos los factores de crecimiento obtenidos apoyan el uso terapéutico o en la cicatrización de heridas. Dentro del proceso de cicatrización existe una comunicación celular que implica el intercambio de información entre diferentes tipos de células, en esta comunicación se centra el inicio de muchas de las actividades celulares. La proliferación, diferenciación, migración y apoptosis requieren de una instrucción clara y eficiente [234-237]. Actualmente en la base de datos PubMed del NCBI al teclear en el buscador “Stem cells” aparecen 230,979 resultados, al especificar la fuente de origen “Wharton’s jelly derived stem cells” encontramos 555 estudios, de los cuales, solo 27 corresponden al estudio del secretoma. Con respecto al precondicionamiento o “Modulación” en células mesenquimales, encontramos 68 trabajos publicados, con diferentes estrategias; consultado en enero del 2024. Un ensayo completo del secretoma de las MSC es

necesario para el entendimiento del perfil constitutivo en el cultivo de células troncales, así como técnicas y estrategias en la modulación de la producción de factores de crecimiento que es esencial para el desarrollo y diseño de terapias acelulares. Si bien, se conocen algunos de los factores de crecimiento que se regulan al alza mediante el precondicionamiento celular, queda pendiente una lista completa de los factores del secretoma expresados constitutivamente independientes de la fuente de MSC para que puedan ser comparadas con el perfil del secretoma bajo modulación.

El uso de los agentes bioactivos producidos y secretados en cultivo, son un tratamiento menos invasivo que la inyección local de las citocinas individuales que no ofrecen un potencial terapéutico sostenido o incluso que un trasplante de MSC que comúnmente requiere de un injerto superior a los 2×10^6 células por cada Kg del peso del paciente [238, 264]. Dentro de las complicaciones encontradas en el trasplante de MSC, es que una vez que son inyectadas *in vivo*, las MSC son enfrentadas a un entorno hostil con presencia de señales de muerte que a menudo disminuye la supervivencia celular e incrementa la tasa de apoptosis. [58].

Así mismo, nuestro estudio evidencia que el secretoma final, puede ser congelado, liofilizado y almacenado sin que pierda integridad estructural y funcional hasta por dos años. Este descubrimiento podría ser una opción rentable y con mucho potencial en el mercado. También, es importante considerar que nuestro estudio se centró en el perfil secretor de las WJ-MSc evaluado sólo *in vitro*, y podríamos esperar que al compararlo con el trasplante de MSC en el sitio de lesión existieran diferencias dependientes del entorno modulador. Podríamos observar la presencia o ausencia de algunas citocinas o factores de crecimiento, o ligeros cambios en la concentración. Incluso el microambiente en el contexto de una enfermedad puede determinar señales que modifiquen los patrones de secreción [237-238].

Todavía existen muchos obstáculos en el precondicionamiento celular de las MSC. Por ejemplo, aún se desconocen las dosis aplicables de los FC en el precondicionamiento y las inyectables en el tratamiento específico de alguna patología. Tampoco se ha definido la combinación óptima de FC en el precondicionamiento de MSC. Si bien, la composición del secretoma puede tener diferencias dependientes de la fuente de obtención, existen similitudes. Podemos decir, que en todos se encuentran proteínas relacionadas con la remodelación de la MEC, la homeostasis y que existen vías de señalización que se activarán según la fuente y el contexto tisular. Cualquier secretoma de MSC, contendrá en su “cóctel”, proteínas que regularan migración, proliferación y otros procesos protectores de tejidos [113]. Dentro de las perspectivas a futuro es importante considerar que antes de la aplicación clínica de este secretoma se deben regular los protocolos de fabricación y la calidad de producción. Así como, delimitar la mejor fuente de obtención de poblaciones de MSC y los factores que forman la combinación más potente para cada caso clínico [239].

9. CONCLUSIONES

Se ha logrado exitosamente la obtención, aislamiento y proliferación de células mesenquimales derivadas de la gelatina de Wharton (WJ-MSC), evidenciándose marcadores representativos tanto positivos como negativo en todos los grupos experimentales. Se observó que estas células exhiben una mayor actividad biológica en lo que se definió como pases tardíos (3-4), por la evidencia en el ligero aumento de su actividad secretora en esta condición de cultivo. Por consiguiente, se sugiere realizar el preacondicionamiento cuando las células alcancen una confluencia del 80% en el pase 3. Además, se ha llegado a la conclusión de que es posible cultivar y expandir células mesenquimales en un medio libre de rojo fenol sin que esto altere su actividad secretora. La modulación del perfil bioactivo secretado por las WJ-MSC es posible y existen diversas estrategias. En este estudio se confirmó que el preacondicionamiento con EGF y FGF actuaron como potentes estímulos que inducen cambios en la actividad biológica de estas células, que se reflejó por el incremento de la concentración de factores de crecimiento clave en el mantenimiento de la homeostasis tisular. Asimismo, se ha evidenciado la viabilidad de almacenar el secretoma liofilizado hasta por dos años sin la pérdida de características estructurales y funcionales. En efecto, la obtención y preservación del secretoma permite su aprovechamiento como un dispositivo terapéutico en el campo de la medicina regenerativa.

REFERENCIAS

1. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
2. Watt, F. M., & Hogan, B. L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, *287*, 1427–1430.
3. Sukoyan, M. A., Vatolin, S. Y., Golubitsa, A. N., Zhelezova, A. I., Semenova, L. A., & Serov, O. L. (1993). Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts
4. Rosowski, K. A., Mertz, A. F., Norcross, S., Dufresne, E. R., & Horsley, V. (2015). Edges of human embryonic stem cell colonies display distinct mechanical properties and differentiation potential. *Scientific Reports*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/srep14218>
5. Sobhani, A., Khanlarkhani, N., Baazm, M., Mohammadzadeh, F., Najafi, A., Mehdinejadi, S., & Aval, F. S. (2017). “Multipotent Stem Cell and Current Application”. *Acta Medica Iranica*, *55*(1), 6–23.
6. Oreffo, R. O. C., Cooper, C., Mason, C., & Clements, M. (2005). Mesenchymal stem cells: Lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Reviews*, *1*(2), 169–178. <https://doi.org/10.1385/scr:1:2:169>
7. Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., & Józkwicz, A. (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochimica Polonica*, *62*(3), 329–337. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1023
8. Bacakova, L., Zarubova, J., Travnickova, M., Musilkova, J., Pajorova, J., Slepicka, P., Kasalkova, N. S., Svorcik, V., Kolska, Z., Motarjemi, H., & Molitor, M. (2018). Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnology Advances*, *36*(4), 1111–1126. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.011>
9. Saleh, M., Fotook Kiaei, S. Z., & Kavianpour, M. (2022). Application of Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells in patients with pulmonary fibrosis. *Stem Cell Research & Therapy*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02746-x>
10. Hsieh, J. Y., Fu, Y. S., Chang, S. J., Tsuang, Y. H., & Wang, H. W. (2010). “Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton’s jelly from umbilical cord.” *Stem Cell Development*, *19*(12), 1895–1910.
11. Ilancheran, S., Moodley, Y., & Manuelpillai, U. (2009). Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta*, *30*(1), 2–10.
12. Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., & Józkwicz, A. (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochimica Polonica*, *62*(3), 329–337. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1023
13. Anzalone, R., Iacono, M. L., Corrao, S., Magno, F., Loria, T., Cappello, F., Zummo, G., Farina, F., & La Rocca, G. (2010). New emerging potentials for human Wharton’s jelly mesenchymal stem cells: Immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. *Stem Cells and Development*, *19*(4), 423–438. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0299>
14. Liao, L. L., Ruszymah, B. H. I., Ng, M. H., & Law, J. X. (2020). Characteristics and clinical applications of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stromal cells. *Current Research in Translational Medicine*, *68*(1), 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2019.09.001>
15. Jiang, W., & Xu, J. (2020). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, *53*(1). <https://doi.org/10.1111/cpr.12712>
16. Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, *105*(4), 1815–1822. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>
17. Fu, X., Liu, G., Halim, A., Ju, Y., Luo, Q., & Song, A. G. (2019). Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells (Basel, Switzerland)*, *8*(8), 784. <https://doi.org/10.3390/cells8080784>

17. Ding, D.-C., Shyu, W.-C., & Lin, S.-Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 20(1), 5–14. <https://doi.org/10.3727/096368910x>
18. Ferreira, J. R., Teixeira, G. Q., Santos, S. G., Barbosa, M. A., Almeida-Porada, G., & Gonçalves, R. M. (2018). Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Frontiers in Immunology*, 9, 2837. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02837>
19. Vizoso, F., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1852. <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>
20. Bogatcheva, N. V., & Coleman, M. E. (2019). Conditioned medium of mesenchymal stromal cells: A new class of therapeutics. *Biochemistry. Biokhimiia*, 84(11), 1375–1389. <https://doi.org/10.1134/S0006297919110129>
21. Pawitan, J. A. (2014). Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *BioMed Research International*, 2014, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/965849>
22. Nie, W.-B., Zhang, D., & Wang, L.-S. (2020). Growth factor gene-modified mesenchymal stem cells in tissue regeneration. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 1241–1256. <https://doi.org/10.2147/dddt.s243944>
23. Wang, X., Zhen, L., Miao, H., Sun, Q., Yang, Y., Que, B., Lopes Lao, E. P., Wu, X., Ren, H., Shi, S., Lau, W. B., Ma, X., Ma, C., & Nie, S. (2015). Concomitant retrograde coronary venous infusion of basic fibroblast growth factor enhances engraftment and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells for cardiac repair after myocardial infarction. *Theranostics*, 5(9), 995–1006. <https://doi.org/10.7150/thno.11607>
24. Ball, S. G., Shuttleworth, C. A., & Kielty, C. M. (2007). Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *The Journal of Cell Biology*, 177(3), 489–500. <https://doi.org/10.1083/jcb.200608093>
25. Forte, G., Minieri, M., Cossa, P., Antenucci, D., Sala, M., Gnocchi, V., Fiaccavento, R., Carotenuto, F., De Vito, P., & Baldini, P. M. (2006). Effects of hepatocyte growth factor on mesenchymal stem cells: proliferation, migration and differentiation. *Stem Cells*, 24, 23–33. <https://doi.org/10.1634/célulasmadre.2004-0176>
26. Ghosh, D., & McGrail, D. J. (2017a). Dawson MR Pretreatment with TGF- β 1 improves mesenchymal stem cell function in the wound bed. *Front of. Biol cell development*.
27. Mishima, Y., & Lotz, M. (2008). A14 chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16, S19. [https://doi.org/10.1016/s1063-4584\(08\)60060-6](https://doi.org/10.1016/s1063-4584(08)60060-6)
28. Teixeira, Fábio G., Panchalingam, K. M., Assunção-Silva, R., Serra, S. C., Mendes-Pinheiro, B., Patrício, P., Jung, S., Anjo, S. I., Manadas, B., Pinto, L., Sousa, N., Behie, L. A., & Salgado, A. J. (2016). Modulation of the mesenchymal stem cell secretome using computer-controlled bioreactors: Impact on neuronal cell proliferation, survival and differentiation. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep27791>
29. Teng, X., Chen, L., Chen, W., Yang, J., Yang, Z., & Shen, Z. (s/f-b). “Exosomes derived from mesenchymal stem cells improve the microenvironment of the infarcted myocardium by contributing to angiogenesis and anti-inflammation.” *Cell Physiol Biochem*.
30. Chen, L., Xu, Y., Zhao, J., Zhang, Z., Yang, R., Xie, J., Liu, X., & Qi, S. (2014). Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One*, 9(4), e96161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096161>
31. Li, Xiuying, Bai, J., Ji, X., Li, R., Xuan, Y., & Wang, Y. (2014). Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *International Journal of Molecular Medicine*, 34(3), 695–704. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1821>
32. Miceli, V., Bulati, M., Iannolo, G., Zito, G., Gallo, A., & Conaldi, P. G. (2021). Therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells: The need of cell priming for cell-free therapies

- in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 763. <https://doi.org/10.3390/ijms22020763>
33. Bulati, M., Miceli, V., Gallo, A., Amico, G., Carcione, C., Pampalone, M., & Conaldi, P. G. (2020). The immunomodulatory properties of the human amnion-derived mesenchymal stromal/stem cells are induced by INF- γ produced by activated lymphomonocytes and are mediated by cell-to-cell contact and soluble factors. *Frontiers in immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00054>
 34. Lan, Y. W., Choo, K. B., Chen, C. M., Hung, T. H., Chen, Y. B., & Hsieh, C. H. (s/f-b). “Mesenchymal stem cells preconditioned with hypoxia attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis.” *Stem Cell Res Ther*.
 35. Cui, X., Wang, H., Guo, H., Wang, C., Ao, H., Liu, X., & Tan, Y.-Z. (2010). Transplantation of mesenchymal stem cells preconditioned with diazoxide, a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener, promotes repair of myocardial infarction in rats. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 220(2), 139–147. <https://doi.org/10.1620/tjem.220.139>
 36. Mias, C., Trouche, E., Seguelas, M.-H., Calcagno, F., Dignat-George, F., Sabatier, F., Piercecchi-Marti, M.-D., Daniel, L., Bianchi, P., Calise, D., Bourin, P., Parini, A., & Cussac, D. (2008). Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(7), 1749–1757.
 37. Liu, C., Fan, Y., Zhou, L., Zhu, H.-Y., Song, Y.-C., Hu, L., Wang, Y., & Li, Q.-P. (2015). Pretreatment of mesenchymal stem cells with angiotensin II enhances paracrine effects, angiogenesis, gap junction formation and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 188, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.03.425>
 38. Herrmann, J. L., Wang, Y., Abarbanell, A. M., Weil, B. R., Tan, J., & Meldrum, D. R. (2010). Preconditioning mesenchymal stem cells with transforming growth factor- α improves mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection. *Shock (Augusta, Ga.)*, 33(1), 24–30. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181b7d137>
 39. Ejtehadifar, M., Shamsasenjan, K., Movassaghpour, A., Akbarzadehlaleh, P., Dehdilani, N., Abbasi, P., Molaeipour, Z., & Saleh, M. (2015). The effect of hypoxia on mesenchymal stem cell biology. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(2), 141–149. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.021>
 40. Leroux, L., Descamps, B., Tojais, N. F., Séguy, B., Oses, P., Moreau, C., Daret, D., Ivanovic, Z., Boiron, J.-M., Lamazière, J.-M. D., Dufourcq, P., Couffinhal, T., & Duplâa, C. (2010). Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(8), 1545–1552. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.108>
 41. Chow, D. C., Wenning, L. A., Miller, W. M., & Papoutsakis, E. T. (2001a). Modeling pO(2) distributions in the hematopoietic compartment of the bone marrow. II. Modified Kroghian models. *Biophys J*, 81, 685–696.
 42. Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., & Macke, J. P. (1996). A new member of the Drosophila frizzled family functions as a Wingless receptor. *Nature*, 382, 225–230.
 43. Escobar-Gómez, F., Jódar, E., & Hawkins, F. (2009). Wnt receptor: physiology, pathophysiology and potential new therapeutic targets. *Spanish Journal of Metabolic Bone Diseases*, 18(2), 39–44. [https://doi.org/10.1016/s1132-8460\(09\)72053-7](https://doi.org/10.1016/s1132-8460(09)72053-7)
 44. Madrigal, Marialaura, Rao, K. S., & Riordan, N. H. (2014). A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 260. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0260-8>

45. Youn, S. W., Lee, S. W., Lee, J., Jeong, H. K., Suh, J. W., Yoon, C. H., & Kim, H. S. (2011). COMP-Ang1 stimulates HIF-1 α -mediated SDF-1 overexpression and rescues ischemic injury through recruitment of BM-derived progenitor cells. *Blood*, 117, 4376–4386. <https://doi.org/10.1182/sangre-2010-07-295964>
46. Crisostomo, P. R., Wang, Y., Markel, T. A., Wang, M., Lahm, T., & Meldrum, D. R. (2008). Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 294(3), C675-82. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00437.2007>
47. Rasmussen, J. G., Frøbert, O., Pilgaard, L., Kastrup, J., Simonsen, U., Zachar, V., & Fink, T. (2011). Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*, 13(3), 318–328. <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.506505>
48. Kang, H., Kim, K.-H., Lim, J., Kim, Y.-S., Heo, J., Choi, J., Jeong, J., Kim, Y., Kim, S. W., Oh, Y.-M., Choo, M.-S., Son, J., Kim, S. J., Yoo, H. J., Oh, W., Choi, S. J., Lee, S. W., & Shin, D.-M. (2015). The therapeutic effects of human mesenchymal stem cells primed with sphingosine-1 phosphate on pulmonary artery hypertension. *Stem Cells and Development*, 24(14), 1658–1671. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0496>
49. Li, N., Yang, Y.-J., Qian, H.-Y., Li, Q., Zhang, Q., Li, X.-D., Dong, Q.-T., Xu, H., Song, L., & Zhang, H. (2015). Intravenous administration of atorvastatin-pretreated mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial infarction: role of CXCR4. *American Journal of Translational Research*, 7(6), 1058–1070.
50. Tsai, L.-K., Wang, Z., Munasinghe, J., Leng, Y., Leeds, P., & Chuang, D.-M. (2011). Mesenchymal stem cells primed with valproate and lithium robustly migrate to infarcted regions and facilitate recovery in a stroke model. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 42(10), 2932–2939. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.612788>
51. Oses, C., Olivares, B., Ezquer, M., Acosta, C., Bosch, P., Donoso, M., Léniz, P., & Ezquer, F. (2017). Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferoxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. *PloS One*, 12(5), e0178011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178011>
52. Saparov, A., Ogay, V., Nurgozhin, T., Jumabay, M., & Chen, W. C. W. (2016). Preconditioning of human mesenchymal stem cells to enhance their regulation of the immune response. *Stem Cells International*, 2016, 3924858. <https://doi.org/10.1155/2016/3924858>
53. Pasha, Z., Wang, Y., Sheikh, R., Zhang, D., Zhao, T., & Ashraf, M. (2008). Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium. *Cardiovascular Research*, 77(1), 134–142. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm025>
54. He, A., Jiang, Y., Sun, G. C., Li, Y., & Wang, J. (s/f). The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning.
55. Abdi, R., Fiorina, P., Adra, C. N., Atkinson, M., & Sayegh, M. H. (2008). Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a possible therapeutic strategy for type 1 diabetes. *diabetes*, 57(7), 1759–1767.
56. Hoogduijn, M. J., Popp, F., & Verbeek, R. (2010). The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol*, 10(12), 1496–1500.
57. Tsubokawa, T., Yagi, K., & Nakanishi, C. (2010). Impact of antiapoptotic and antioxidant effects of bone marrow mesenchymal stem cells with transient overexpression of heme oxygenase-1 on myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298(5), H1320–H1329.
58. Hu, C., & Li, L. (2018). Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(3), 1428–1442. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13492>

59. Wang, Y., Chen, X., Cao, W., & Shi, Y. (2014). Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology*, *15*(11), 1009–1016. <https://doi.org/10.1038/ni.3002>
60. Carrero, R., Cerrada, I., Lledó, E., Dopazo, J., García-García, F., Rubio, M.-P., Trigueros, C., Dorronsoró, A., Ruiz-Sauri, A., Montero, J. A., & Sepúlveda, P. (2012). IL1 β induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF- κ B. *Stem Cell Reviews*, *8*(3), 905–916. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9364-9>
61. Ranganath, S. H., Levy, O., Inamdar, M. S., & Karp, J. M. (2012). Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell*, *10*(3), 244–258. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.005>
62. Van Zoelen, E. J., Duarte, I., & Hendriks, J. M. et al TGFbeta-induced switch from adipogenic to osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: identification of drug targets for prevention of fat cell differentiation.
63. Lu, Z., Wang, G., & Dunstan, C. R. (2013). Activation and promotion of adipose stem cells by preconditioning tumor necrosis factor alpha for bone regeneration. *J Cell Physiol*, *228*, 1737–1744.
64. Zhao, L., Hu, C., Zhang, P., Jiang, H., & Chen, J. (2019). Preconditioning strategies for improving the survival rate and paracrine ability of mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *23*(2), 720–730. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14035>
65. Xinaris, C., Morigi, M., & Benedetti, V. (s/f). A novel strategy to improve the migration capacity of mesenchymal stem cells and promote tissue repair in a specific form of injury.
66. Toma, C., Wagner, W. R., Bowry, S., Schwartz, A., & Villanueva, F. (2009). Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics: In vivo observations of cell kinetics. *Circulation Research*, *104*(3), 398–402. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.187724>
67. Shi, M., Liu, Z.-W., & Wang, F.-S. (2011). Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells: Immunomodulator of mesenchymal stem cell. *Clinical and Experimental Immunology*, *164*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04327.x>
68. Lillian B. Nanney yloyd e king jr. (s/f). Epidermal growth factor and transforming growth factor- α
69. Cohen, S. (1962). Isolation of a mouse submandibular gland protein that accelerates the eruption of the incisors and the opening of the eyelids in the newborn animal. *J Biol Chem*, *237*, 1555–1562.
70. Wu M., Ruan J., & Zhong B. (2020). Progress in human epidermal growth factor research. *Sheng wu gong cheng xue bao [Chinese journal of biotechnology]*, *36*(12), 2813–2823. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.200209>
71. Schneider, M. R., & Wolf, E. (2009). Epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol*, *218*, 460–466.
72. Bell, G. I., Fong, N. M., Stempien, M. M., Wormsted, M. A., Caput, D., & Ku, L. L. (1986). Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, in vitro expression, and gene organization. *Nucleic Acids Res*, *14*, 8427–8446.
73. Carpenter, G., & Cohen, S. (1979). Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem*, *48*, 193–216.
74. Byyny, R. L., Orth, D. N., Cohen, S., & Doyne, E. S. (1974). Epidermal growth factor: effects of androgens and adrenergic agents. *Endocrinology*, *95*, 776–782.
75. Fisher, D. A., Salido, E. C., & Barajas, L. (1989). Epidermal growth factor and the kidney. *Anu Rev Physiol*, *51*, 67–80.
76. Harris, R. C. (1991). Possible physiological functions of epidermal growth factor in the kidney. *Am J Kidney Disease*, *17*, 627–630.

77. Wei, Z., Park, K. W., Day, B. N., & Prather, R. S. (2001). Effect of epidermal growth factor on preimplantation development and the expression of its receptor in porcine embryos. *Mol Reprod Development*, 60, 457–462.
78. Zeng, F., & Harris, R. C. (2014). Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 28, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.011>
79. Andrae, J., Gallini, R., & Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, 22, 1276–1312.
80. Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M. S., & Ehrlich, H. P. (2009). The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*, 153, 347–358.
81. Bielefeld, L. A., Mini-Nik, S., & Altman, B. A. (2013). Healing of skin wounds: recruitment of developmental pathways for regeneration. *Cell.Mol. Life Sciences*, 70, 2059–2081.
82. Fiddes, J. C., Hebda, P. A., Hayward, P., Robson, M. C., Abraham, J. A., & Klingbeil, C. K. (1991). Preclinical wound healing studies with recombinant human basic fibroblast growth factor. *Ana. New York Academy. Sci*, 638, 316–328.
83. Michał Pikula 1 , Paulina Langa 1 , Paulina Kosikowska 2. (s/f). Piotr Trzonkowski. Stem cells and growth factors in wound healing
84. Medema, J. P., & Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 474, 318–326.
85. Rani, A., & Kartha, K. G. (n.d.). Effects of epidermal growth factor on the proliferation and migration of expanded cardiosphere-derived cells of the adult human heart.
86. Tamama, K., Kawasaki, H., & Wells, A. (2010). Epidermal growth factor (EGF) treatment in multipotent stromal cells (MSCs). Possible improvement of the therapeutic potential of MSC. *J Biomed Biotechnol*.
87. Hilo, M., & Micchelli, C. A. (2013). Regional control of *Drosophila* intestinal stem cell proliferation: EGF establishes the proliferative set point of GSSC and controls exit from quiescence. *Plus one*, 8.
88. Nanba, D., Toki, F., Barrandon, Y., & Higashiyama, S. (2013). Recent advances in the biology of the epidermal growth factor receptor/ligand system on skin homeostasis and keratinocyte stem cell regulation. *J Dermatol Sci*, 72, 81–86.
89. Garcez, R. C., Teixeira, B. L., Schmitt Sdos, S., Alvarez-Silva, M., & Trentin, A. G. (2009). Epidermal growth factor (EGF) promotes the in vitro differentiation of neural crest cells into neurons and melanocytes. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29, 1087–1091.
90. Nelson, A. D., Suzuki, M., & Svendsen, C. N. (2008). A high concentration of epidermal growth factor increases the growth and survival of neurogenic radial glial cells in human neurosphere cultures. *Stem Cells*, 26, 348–355.
91. Ramasamy, R., Tong, C. K., Yip, W. K., Vellasamy, S., Tan, B. C., & Seow, H. F. (2012). Basic fibroblast growth factor modulates cell cycle of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, 45(2), 132–139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00808.x>
92. Sotiropoulou, Panagiota A., Perez, S. A., Salagianni, M., Baxevanis, C. N., & Papamichail, M. (2006). Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(2), 462–471.
93. Tsutsumi, S., Shimazu, A., Miyazaki, K., Pan, H., Koike, C., & Yoshida, E. (2001). Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochemistry Biography. Common Res.*, 288, 413–419.
94. Kurose, H., Bito, T., Adachi, T., Shimizu, M., Noji, S., & Ohuchi, H. (2004). Expression of fibroblast growth factor 19 (Fgf19) during chick embryogenesis and eye development, compared with Fgf15 expression in the mouse. *Gene Expr Patterns*, 4, 687–693.
95. Gong, S.G. (2014). Fibroblast growth factor receptor isoforms. *J Cell Physiol*, 229, 1887–1895.

96. Templeton, T. J., & Hauschka, S. D. (1992). FGF-mediated aspects of skeletal muscle growth and differentiation are controlled by a high-affinity receptor, FGFR1. *Dev Biol*, 1, 169–181.
97. Lin, B. C., Wang, M., Blackmore, C., & Desnoyers, L. R. (2007). The liver-specific activities of FGF19 require Klotho beta. *J Biol Chem*, 282, 27277–27284.
98. Guthrie, G., Vonderohe, C., & Burrin, D. (2022). Fibroblast growth factor 15/19 expression, regulation, and function: An overview. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 548(111617), 111617. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111617>
99. Mohammadi, M., Olsen, S. K., & Ibrahimi, O. A. (2005). Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16, 107–137.
100. Li, Xiaokun. (2018). Protein Structure and Modification of FGFs. En *Fibroblast Growth Factors* (pp. 385–476). Elsevier.
101. Beenken, A., & Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(3), 235–253. <https://doi.org/10.1038/nrd2792>
102. Ware, J. A., & Simons, M. (1997). Angiogenesis in ischemic heart disease. *Nature Med*, 3, 158–164.
103. Yanagisawa-Miwa, A. (1992). Rescue of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science*, 257, 1401–1403.
104. Fulgham, D. L., Widhalm, S. R., Martin, S., & Coffin, J. D. (n.d.). FGF-2-dependent angiogenesis is a latent phenotype in basic fibroblast growth factor transgenic mice. *Endothelium*.
105. Solchaga, L. A., & Portero, J. D. (2005). FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*, 203, 398–409.
106. Tesarova, L., Jaresova, K., Simara, P., & Koutna, I. (2020). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are able to use bFGF treatment and represent a superb tool for immunosuppressive clinical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5366. <https://doi.org/10.3390/ijms21155366>
107. Parivar, K., Baharara, J., & Sheikholeslami, A. (2015). Neural differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells treated with sex steroid hormones and basic fibroblast growth factor. *Cell Journal*, 17(1), 27–36. <https://doi.org/10.22074/cellj.2015.509>
108. Fu, X. B., Sun, T. Z., & Wang, Y. P. (1999). Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi Zhongguo xiufu chongjian waikexue zazhi. *Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*, 13, 278–282.
109. Reyes, M., Lund, T., & Aguiar, D. (2001). Purification and ex vivo expansion of mesodermal progenitor cells from postnatal human marrow. *Blood*, 98, 2615–2625.
110. Pochampán, R., & Sidra De Pera, A. (2004). Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells*, 22, 823–831.
111. Van Den Bos, C., & Mosca, J. D. (1997). Human mesenchymal stem cells respond to fibroblast growth factors. *Buzz Cell*, 10, 45–50.
112. Hori, Y., & Inoue, S. (2004). Effect of culture substrates and the addition of fibroblast growth factor on the proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Knitting Eng*, 10, 995–1005.
113. Shin, S., Lee, J., Kwon, Y., Park, K.-S., Jeong, J.-H., Choi, S.-J., Bang, S. I., Chang, J. W., & Lee, C. (2021). Comparative proteomic analysis of the mesenchymal stem cells secretome from adipose, bone marrow, placenta and Wharton's jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 845. <https://doi.org/10.3390/ijms22020845>
114. Huang, Y. Q., Li, J. J., Hu, L., Lee, M., & Karparkin, S. (2002). Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood*, 99, 1646–1650. <https://doi.org/10.1182/sangre.V99.5.1646>

115. Akwii, R. G., Sajib, M. S., Zahra, F. T., & Mikelis, C. M. (2019). Role of angiopoietin-2 in vascular physiology and pathophysiology. *Cells (Basel, Switzerland)*, 8(5), 471. <https://doi.org/10.3390/cells8050471>
116. Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., & Papadopoulos, N. (1997). Angiopoietin-2, a natural Tie2 antagonist that disrupts angiogenesis in vivo. *Science*, 277, 55–60. <https://doi.org/10.1126/ciencia.277.5322.55>
117. Yu, X., Sha, J., Xiang, S., Qin, S., Conrad, P., Ghosh, S. K., Weinberg, A., & Ye, F. (2016). Suppression of KSHV-induced angiopoietin-2 inhibits angiogenesis, infiltration of inflammatory cells, and tumor growth. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 15(15), 2053–2065. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1196303>
118. Teichert-Kuliszewska, K. (2001). Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovascular research*, 49(3), 659–670. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(00\)00231-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00231-5)
119. McKinney, M. C., McLennan, R., & Kulesa, P. M. (2016). Angiopoietin 2 signaling plays a critical role in neural crest cell migration. *BMC Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0323-9>
120. Kietzmann, T. (2020). Hypoxia-inducible erythropoietin expression: details matter. *Haematologica*, 105(12), 2704–2706. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.261966>
121. Suresh, S., de Castro, L. F., Dey, S., Robey, P. G., & Noguchi, C. T. (2019). Erythropoietin modulates bone marrow stromal cell differentiation. *Bone Research*, 7(1), 21. <https://doi.org/10.1038/s41413-019-0060-0>
122. Bunn, H. F. (2013). Erythropoietin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(3), a011619. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011619>
123. Broxmeyer, H. E. (2013). Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(2), 205–208. <https://doi.org/10.1084/jem.20122760>
124. Tsiftoglou, A. S. (2021). Erythropoietin (EPO) as a key regulator of erythropoiesis, bone remodeling and endothelial transdifferentiation of multipotent mesenchymal stem cells (MSCs): Implications in regenerative medicine. *Cells (Basel, Switzerland)*, 10(8), 2140. <https://doi.org/10.3390/cells10082140>
125. Ushach, I., & Zlotnik, A. (2016). Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(3), 481–489. <https://doi.org/10.1189/jlb.3ru0316-144r>
126. Stanley, E. R., Berg, K. L., Einstein, D. B., Lee, P. S., & Yeung, Y. G. (1994). The biology and action of colony stimulating factor-1. *Stem cells*, 12(1), 15–25.
127. Fixe, P., & Praloran, V. (1997). Macrophage colony-stimulating-factor (M-CSF or CSF-1) and its receptor: structure-function relationships. *European Cytokine Network*, 8(2), 125–136.
128. Ross, F. P. (2006). M-CSF, c-Fms, and Signaling in Osteoclasts and their Precursors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068(1), 110–116. <https://doi.org/10.1196/annals.1346.014>
129. Zolti, M., Ben-Rafael, Z., Meirom, R., Shemesh, M., Bider, D., Mashiach, S., & Apte, R. N. (1991). Cytokine involvement in oocytes and early embryos. *Fertility and Sterility*, 56(2), 265–272. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)54483-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)54483-5)
130. Rodriguez-Perdigon, M., Jimaja, S., Haeni, L., Bruns, N., Rothen-Rutishauser, B., & Rüegg, C. (2022). Polymersomes-mediated delivery of CSF1R inhibitor to tumor associated macrophages promotes M2 to M1-like macrophage repolarization. *Macromolecular Bioscience*, 22(8). <https://doi.org/10.1002/mabi.202200168>

131. Bourette, R. P., & Rohrschneider, L. R. (2000). Early events in M-CSF receptor signaling. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 17(3), 155–166. <https://doi.org/10.3109/08977190009001065>
132. Inoue, K., Qin, Y., Xia, Y., Han, J., Yuan, R., Sun, J., Xu, R., Jiang, J. X., Greenblatt, M. B., & Zhao, B. (2023). Bone marrow Adipoq-lineage progenitors are a major cellular source of M-CSF that dominates bone marrow macrophage development, osteoclastogenesis, and bone mass. *ELife*, 12. <https://doi.org/10.7554/elife.82118>
133. Sehgal, A., Irvine, K. M., & Hume, D. A. (2021). Functions of macrophage colony-stimulating factor (CSF1) in development, homeostasis, and tissue repair. *Seminars in Immunology*, 54(101509), 101509. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101509>
134. Zhong, L., Lu, J., Fang, J., Yao, L., Yu, W., Gui, T., Duffy, M., Holdreith, N., Bautista, C. A., Huang, X., Bandyopadhyay, S., Tan, K., Chen, C., Choi, Y., Jiang, J. X., Yang, S., Tong, W., Dymont, N., & Qin, L. (2023a). Csf1 from marrow adipogenic precursors is required for osteoclast formation and hematopoiesis in bone. *ELife*, 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.82112>
135. Douglass, T. G., Driggers, L., Zhang, J. G., Hoa, N., Delgado, C., Williams, C. C., Dan, Q., Sanchez, R., Jeffes, E. W. B., Wepsic, H. T., Myers, M. P., Koths, K., & Jadus, M. R. (2008). Macrophage colony stimulating factor: Not just for macrophages anymore! A gateway into complex biologies. *International Immunopharmacology*, 8(10), 1354–1376. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.04.016>
136. Ding, J., Wang, J., Cai, X., Yin, T., Zhang, Y., Yang, C., & Yang, J. (2022). Granulocyte colony-stimulating factor in reproductive-related disease: Function, regulation and therapeutic effect. *Biomedecine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, 150(112903), 112903. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112903>
137. Thomas, J., & Liu, F. DC Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor.
138. Rahmati, M., Petitbarat, M., Dubanchet, S., Bensussan, A., & Chaouat, G. Ledee Granulocyte colony-stimulating factor-related pathways tested in an ex-vivo endometrial model.
139. Ok Bozkaya, I., Azik, F., Tavil, B., Koksall, Y., Ozguner, M., Tunc, B., & Uckan Cetinkaya, D. (2015). The effect of granulocyte colony-stimulating factor on immune-modulatory cytokines in the bone marrow microenvironment and mesenchymal stem cells of healthy donors. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 21(11), 1888–1894.
140. Rutella, S. (2007). Granulocyte colony-stimulating factor for the induction of T cell tolerance. *Transplantation*, 84, S26-30.
141. Panopoulos, A. D., & Watowich, S. S. (2008). Granulocyte colony-stimulating factor: Molecular mechanisms of action during steady state and ‘emergency’ hematopoiesis. *Cytokine*, 42(3), 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.03.002>
142. Watari, K., Asano, S., Shirafuji, N., Kodo, H., Ozawa, K., Takaku, F., & Kamachi, S. (n.d.). Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders estimated by enzyme immunoassay.
143. Regards, C., Haigh, A. M., Kelso, A., Metcalf, D., Stanley, E. R., & Young, A. M. (s/f). Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophages, granulocytes, granulocyte-macrophages and multi-CSF.
144. Nicola, N. A., & Metcalf, D. (s/f). Binding of 125I-labeled granulocyte colony-stimulating factor to normal murine hematopoietic cells.
145. Gough, A., Clapperton, M., Foster, R. N., Philpott-Howard, A. V., & Edmonds, J. (n.d.). Randomized placebo-controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor in diabetic foot infection.
146. Morstyn, G., Campbell, L., Souza, L. M., Alton, N. K., Keech, J., Green, M., Sheridan, W., Metcalf, D., & Fox, R. (s/f). Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy.

147. Demetri, G. D., & Griffin, J. D. (n.d.). Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*.
148. Shannon, M. F., Coles, L. S., Fielke, R. K., Goodall, G. J., Lagnado, C. A., & Vadas, M. A. (s/f). Three essential promoter elements mediate tumor necrosis factor and interleukin-1 activation of the granulocyte colony-stimulating factor gene.
149. Shiomu, A., & Usui, T. (2015). Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2015, 568543. <https://doi.org/10.1155/2015/568543>
150. Hamilton, J. A. (2002). GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends in Immunology*, 23(8), 403–408. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)02260-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02260-3)
151. Hamilton, J. A., & Achuthan, A. (2013). Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends in Immunology*, 34(2), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.08.006>
152. Shearer, W. (2003). Biology of common β receptor–signaling cytokines IL-3, IL-5, and GM-CSF. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(4), 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.08.015>
153. Guthridge, M. A., Barry, E. F., & Felquer, F. A. (2004). La vía dependiente de fosfoerina-585 de los receptores GM-CSF/IL-3/IL-5 media la supervivencia de las células hematopoyéticas a través de la activación de NF- κ B y la inducción de bcl-2. *sangre*, 103(3), 820–827.
154. Guthridge, Mark A., Powell, J. A., Barry, E. F., Stomski, F. C., McClure, B. J., Ramshaw, H., Felquer, F. A., Dottore, M., Thomas, D. T., To, B., Begley, C. G., & Lopez, A. F. (2006). Growth factor pleiotropy is controlled by a receptor Tyr/Ser motif that acts as a binary switch. *The EMBO Journal*, 25(3), 479–489. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600948>
155. Cook, A. D., Braine, E. L., & Hamilton, J. A. (2004). Stimulus-dependent requirement for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in inflammation. *The Journal of Immunology*, 173(7), 4643–4651. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4643>
156. Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *blood*, 111(2), 485–491. <https://doi.org/10.1182/sangre-2007-03-079681>
157. Forte, G., Minieri, M., Cossa, P., Antenucci, D., Sala, M., Gnocchi, V., Fiaccavento, R., Carotenuto, F., De Vito, P., & Baldini, P. M. (2006). Effects of hepatocyte growth factor on mesenchymal stem cells: proliferation, migration and differentiation. *Stem Cells*, 24, 23–33. <https://doi.org/10.1634/célulasmadre.2004-0176>
158. Nakamura, T., Sakai, K., Nakamura, T., & Matsumoto, K. (2011). Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor: Hepatocyte growth factor. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26 Suppl 1, 188–202. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06549.x>
159. Fukuta, K., Matsumoto, K., & Nakamura, T. (2005). Multiple biological responses are induced by glycosylation-deficient hepatocyte growth factor. *The Biochemical Journal*, 388(Pt 2), 555–562. <https://doi.org/10.1042/BJ20041698>
160. Chun, S. Y., Lim, J. O., Lee, E. H., Han, M.-H., Ha, Y.-S., Lee, J. N., Kim, B. S., Park, M. J., Yeo, M., Jung, B., & Kwon, T. G. (2019). Preparation and characterization of human adipose tissue-derived extracellular matrix, growth factors, and stem cells: A concise review. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 16(4), 385–393. <https://doi.org/10.1007/s13770-019-00199-7>
161. Gharbia, S., Nazarie, S.-R., Dinescu, S., Balta, C., Herman, H., Peteu, V. E., Gherghiceanu, M., Hermenean, A., & Costache, M. (2022). Adipose-derived stem cells (ADSCs) supplemented with hepatocyte growth factor (HGF) attenuate hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by inhibiting the TGF- β /Smad signaling pathway in chemical-induced liver fibrosis associated with diabetes. *Cells (Basel, Switzerland)*, 11(21), 3338. <https://doi.org/10.3390/cells11213338>

162. Heldin, C.-H., & Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews*, 79(4), 1283–1316. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1283>
163. Westermark B, H.C.-H. Role of platelet-derived growth factor in vivo. At Clark RAF.
164. Betsholtz, C. (s/f). *The PDGF Genes and Their Regulation*.
165. Morita, T., & Liu, Y. (s/f). Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney Int*.
166. Clark, R. A., Folkvord, J. M., Hart, C. E., Murray, M. J., & McPherson, J. M. (1989b). Platelet isoforms of platelet-derived growth factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. *The Journal of Clinical Investigation*, 84(3), 1036–1040. <https://doi.org/10.1172/jci114227>
167. Heldin, P., Laurent, T. C., & Heldin, C. H. (1989). Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *The Biochemical Journal*, 258(3), 919–922. <https://doi.org/10.1042/bj2580919>
168. Blatti, S. P., Foster, D. N., Ranganathan, G., Moses, H. L., & Getz, M. J. (1988). Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(4), 1119–1123. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.4.1119>
169. Canalis, E. (1981). Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 30(10), 970–975. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(81\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0026-0495(81)90094-9)
170. Pierce, G. F., Tarpley, J. E., Tseng, J., Bready, J., Chang, D., Kenney, W. C., Rudolph, R., Robson, M. C., Vande Berg, J., & Reid, P. (1995). Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(3), 1336–1350. <https://doi.org/10.1172/JCI118169>
171. Rubin, K. (1988). Induction of b-type receptors for platelet-derived growth factor in vascular inflammation: Possible implications for development of vascular proliferative lesions. *Lancet*, 331(8599), 1353–1356. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(88\)92177-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(88)92177-0)
172. PDGF α - and β -receptors activate unique and common signal transduction pathways. (1992). *Trends in Cell Biology*, 2(5), 130. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(92\)90088-5](https://doi.org/10.1016/0962-8924(92)90088-5)
173. Sprugel, K. H., McPherson, J. M., Clowes, A. W., & Ross, R. (1987). Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers. *The American Journal of Pathology*, 129(3), 601–613.
174. Steed, D. L. (1995). Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. Diabetic Ulcer Study Group. *Journal of Vascular Surgery*, 21(1), 71–78; discussion 79–81.
175. Cao, Z., Xie, Y., Yu, L., Li, Y., & Wang, Y. (2020). Hepatocyte growth factor (HGF) and stem cell factor (SCF) maintained the stemness of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) during long-term expansion by preserving mitochondrial function via the PI3K/AKT, ERK1/2, and STAT3 signaling pathways. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 329. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01830-4>
176. Ullrich, A., & Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61, 203–205.
177. Kurzrock, R. (2003). *Stem cell factor*. B.C. Decker.
178. Broudy, V. C. (1997). Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*, 90(4), 1345–1364. <https://doi.org/10.1182/blood.v90.4.1345>
179. Matsui, Y., Zsebo, K. M., & Hogan, B. L. (1990). Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature*, 347(6294), 667–669. <https://doi.org/10.1038/347667a0>

180. Tong, J., Gordon, M. S., Srour, E. F., Cooper, R. J., Orazi, A., McNiece, I., & Hoffman, R. (1993). In vivo administration of recombinant methionyl human stem cell factor expands the number of human marrow hematopoietic stem cells. *Blood*, 82(3), 784–791. <https://doi.org/10.1182/blood.v82.3.784.bloodjournal823784>
181. Coffey, R. J., Romano, M., Polk, W. H., & Dempsey, P. J. (1992). Roles for transforming growth factor- α in gastric physiology and pathophysiology. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 65(6), 693–704; discussion 621-3.
182. Andresen, J. L., & Ehlers, N. (1998). Human keratocyte chemotaxis is increased by platelet-derived growth factor BB, epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, acidic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor I. transforming growth -beta. *Curr Eye Res*, 17(1), 79–87.
183. McClintock, J. L., & Ceresa, B. P. (2010). Transforming growth factor- α enhances corneal epithelial cell migration by promoting EGFR recycling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(7), 3455. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4386>
184. Qin, P., & Kurpakus, M. A. (1998). The role of laminin-5 in TGF α /EGF-mediated corneal epithelial cell motility. *Experimental Eye Research*, 66(5), 569–579. <https://doi.org/10.1006/exer.1997.0455>
185. Lundgaard Andresen, J., & Ehlers, N. (1998). Chemotaxis of human keratocytes is increased by platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, transforming growth factor- α , acidic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta. *Current Eye Research*, 17(1), 79–87. <https://doi.org/10.1076/ceyr.17.1.79.5261>
186. McInnes, C., Wang, J., Moustafa, A.-E. A., Yansouni, C., O'Connor-McCourt, M., & Sykes, B. D. (1998). Structure-based minimization of transforming growth factor- α (TGF- α) through NMR analysis of the receptor-bound ligand. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(42), 27357–27363. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27357>
187. Wong, D. T., Donoff, R. B., Yang, J., Song, B. Z., Matossian, K., Nagura, N., Elovic, A., McBride, J., Gallagher, G., & Todd, R. (1993). Sequential expression of transforming growth factors alpha and beta 1 by eosinophils during cutaneous wound healing in the hamster. *The American Journal of Pathology*, 143(1), 130–142.
188. Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N. C., Ramirez, H., Nusbaum, A. G., Sawaya, A., Patel, S. B., Khalid, L., Isseroff, R. R., & Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in wound healing: a comprehensive review.
189. Harris, R. C., Chung, E., & Coffey, R. J. (2003). EGF receptor ligands. En *The EGF Receptor Family* (pp. 3–14). Elsevier.
190. Repertinger, S. K., Campagnaro, E., Fuhrman, J., El-Abaseri, T., Yuspa, S. H., & Hansen, L. A. (2004). EGFR enhances early healing after cutaneous incisional wounding. *The Journal of Investigative Dermatology*, 123(5), 982–989. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202x.2004.23478.x>
191. Bunker, E. N., Wheeler, G. E., Chapnick, D. A., & Liu, X. (2021). Suppression of α -catenin and adherens junctions enhances epithelial cell proliferation and motility via TACE-mediated TGF- α autocrine/paracrine signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 32(4), 348–361. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-08-0474>
192. Melincovici, C. S., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I. M., Roman, A. L., & Mişu, C. M. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Revue Roumaine de Morphologie et Embryologie [Romanian Journal of Morphology and Embryology]*, 59(2), 455–467.
193. Shibuya, M. (2013). Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *The Journal of Biochemistry*, 153(1), 13–19. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs136>

194. Ferrara, N., & Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438, 967–974.
195. Yaniv, K., Isogai, S., Castranova, D., Dye, L., Hitomi, J., & Weinstein, B. M. (2006). Live imaging of lymphatic development in zebrafish. *Nat. Medicine*, 12, 711–716.
196. Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., Shea, O., Powell-Braxton, K. S., Hillan, L., & Moore, K. J. (nineteen ninety six). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380, 439–442.
197. Shibuya, M., & Claesson-Welsh, L. (2006). Signal transduction by VEGF receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cellular Resolution*, 312, 549–560.
- Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M. S., Ehrlich, H. P., & Brem, H. (2009). The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *The Journal of Surgical Research*, 153(2), 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.04.023>
198. Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M. S., Ehrlich, H. P., & Brem, H. (2009). The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *The Journal of Surgical Research*, 153(2), 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.04.023>
199. Diomede, F., Marconi, G. D., Fonticoli, L., Pizzicanella, J., Merciaro, I., Bramanti, P., Mazzon, E., & Trubiani, O. (2020). Functional relationship between osteogenesis and angiogenesis in tissue regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3242. <https://doi.org/10.3390/ijms21093242>
200. Tonnesen, M. G., Feng, X., & Clark, R. A. F. (2000). Angiogenesis in wound healing. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings*, 5(1), 40–46. <https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x>
201. Hu, K., & Olsen, B. R. (2016). The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*, 91, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.06.013>
202. Squillaro, T., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update. *Cell Transplantation*, 25(5), 829–848. <https://doi.org/10.3727/096368915x689622>
203. Sun, L., Akiyama, K., Zhang, H., Yamaza, T., Hou, Y., Zhao, S., Xu, T., Le, A., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in Systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27(6), 1421–1432. <https://doi.org/10.1002/stem.68>
204. Cai, M., Shen, R., Song, L., Lu, M., Wang, J., Zhao, S., Tang, Y., Meng, X., Li, Z., & He, Z.-X. (2016). Bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) improve heart function in swine myocardial infarction model through paracrine effects. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep28250>
205. Amado, L. C., Saliaris, A. P., Schuleri, K. H., St John, M., Xie, J. S., & Cattaneo, S. (2005). Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction *Proc Natl Acad Sci USA*. *Proc Natl Acad Sci*, 102, 11474–11479.
206. Karussis, D., Karageorgiou, C., Vaknin-Dembinsky, A., Gowda-Kurkalli, B., Gomori, J., & Kassis, I. M. (2010). Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arco Neurol*, 67, 1187–1194.
207. Shi, M., Zhang, Z., Xu, R., Lin, H., Fu, J., Zou, Z., Zhang, A., Shi, J., Chen, L., Lv, S. ., He, W., Geng, H., Jin, L., Liu, Z., & Wang, F.-S. (2012). Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves liver function in Acute-on-chronic liver failure patients. *Stem Cells Translational Medicine*, 1(10), 725–731. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0034>
208. Chang, C., Wang, X., Niu, D., Zhang, Z., Zhao, H., & Gong, F. (2009). Mesenchymal stem cells adopt beta cell fate in the diabetic pancreatic microenvironment. *Pancreas*, 38, 275–281.
209. Kursova, L. V., Konoplyannikov, A. G., Pasov, V. V., Ivanova, I. N., Poluektova, M. V., & Konoplyannikova, O. A. (2009). Possibilities for the use of autologous mesenchymal stem cells

- in the therapy of radiation-induced lung injuries. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 147(4), 542–546. <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0538-7>
210. Li, Y., Ricardo, S. D., & Samuel, C. S. (2022). Enhancing the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-based therapies with an anti-fibrotic agent for the treatment of chronic kidney disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6035. <https://doi.org/10.3390/ijms23116035>
 211. Costela-Ruiz, V. J., Melguizo-Rodríguez, L., Bellotti, C., Illescas-Montes, R., Stanco, D., Arciola, C. R., & Lucarelli, E. (2022). Different sources of mesenchymal stem cells for tissue regeneration: A guide to identifying the most favorable one in orthopedics and dentistry applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6356. <https://doi.org/10.3390/ijms23116356>
 212. Wiśniewska, J., Słyszewska, M., Stałanowska, K., Walendzik, K., Kopcewicz, M., Machcińska, S., & Gawrońska-Kozak, B. (2021). Effect of pig-adipose-derived stem cells' conditioned media on skin wound-healing characteristics in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5469. <https://doi.org/10.3390/ijms22115469>
 213. Katagiri, W., Osugi, M., Kawai, T., & Hibi, H. (2016). First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. *Head & Face Medicine*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13005-016-0101-5>
 214. Zhou, B.-R., Xu, Y., Guo, S.-L., Xu, Y., Wang, Y., Zhu, F., Permatasari, F., Wu, D., Yin, Z.-Q., & Luo, D. (2013). The effect of conditioned media of Adipose-derived stem cells on wound healing after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing. *BioMed Research International*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/519126>
 215. Kordelas, L., Rebmann, V., Ludwig, A.-K., Radtke, S., Ruesing, J., Doeppner, T. R., Epple, M., Horn, P. A., Beelen, D. W., & Giebel, B. (2014). MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*, 28(4), 970–973. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.41>
 216. Liu, A., Zhang, X., He, H., Zhou, L., Naito, Y., Sugita, S., & Lee, J.-W. (2020). Therapeutic potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived secretome and vesicles for lung injury and disease. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20(2), 125–140. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1689954>
 217. Waterman, R. S., & Henkle, S. L. (s/f). AM A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or immunosuppressive MSC2 phenotype.
 218. Lee, J. W., Fang, X., & Krasnodembskaya, A. (s/f). Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of soluble paracrine factors.
 219. Nemeth, K., Leelahavanichkul, A., & Yuen, P. S. (s/f). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis through prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their production.
 220. Togel, F., Hu, Z., & Weiss, K. (s/f). Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms.
 221. Fung, M. E., & Thebaud, B. (2014). Stem cell-based therapy for neonatal lung disease: it's in the juice. *Pediatrics Res*, 75(1–1), 2–7.
 222. Liao, L. L., Ruszymah, B. H. I., Ng, M. H., & Law, J. X. (2020). Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells. *Current Research in Translational Medicine*, 68(1), 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2019.09.001>
 223. Riekstina, U., Muceniece, R., Cakstina, I., Muiznieks, I., & Ancans, J. (2008). Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology*, 58(3), 153–162. <https://doi.org/10.1007/s10616-009-9183-2>

224. Yang, Y.-H. K., Ogando, C. R., Wang See, C., Chang, T.-Y., & Barabino, G. A. (2018). Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0876-3>
225. Morgan, A., Babu, D., Reiz, B., Whittal, R., Suh, L. Y. K., & Siraki, A. G. (2019). Caution for the routine use of phenol red - It is more than just a pH indicator. *Chemico-Biological Interactions*, 310(108739), 108739. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108739>
226. Zaragosi, L. E., Ailhaud, G., & Dani, C. (2006). Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells*, 24, 2412–2419. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0006>
227. Toma, J. G., Mckenzie, I. A., & Bagli, S. D. (2005). Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*, 23, 727–737. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0134>
228. Shih, D. T., Lee, D. C., & Chen, S. C. (2005). Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells*, 23(7), 1012–1020.
229. Wong, C. E., Paratore, C., & Dours-Zimmermann, M. T. (2006). Neural crest-derived cells with stem cell characteristics trace back multiple lineages in adult skin. *J Cell Biol*, 175(6), 1005–1015.
230. Driscoll, J., Yan, IK and Patel, T. (2022). Development of an acellular treatment derived from lyophilized mesenchymal stem cells and available on the market. *Pharmaceutics*, 14 (4), 849. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040849>
231. Amable, P. R., Teixeira, M. V. T., Carias, R. B. V., Granjeiro, J. M., & Borojevic, R. (2014). Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(2). <https://doi.org/10.1186/scrt442>
232. Bosch, S., de Beaufort, L., Allard, M., Mosser, M., Heichette, C., Chrétien, D., Jegou, D., & Bach, J.-M. (2016). Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep36162>
233. Maroto, R., Zhao, Y., Jamaluddin, M., Popov, V. L., Wang, H., Kalubowilage, M., Zhang, Y., Luisi, J., Sun, H., Culbertson, C. T., Bossmann, S. H., Motamedi, M., & Brasier, A. R. (2017). Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1), 1359478. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1359478>
234. Pereira, T., Silva, A.-D., Amorim, P., Rêma, I., & Caseiro, A. (2014). Effects of human mesenchymal stem cells isolated from umbilical cord Wharton's jelly and conditioned media on skeletal muscle regeneration using a myectomy model. *Stem Cells International*.
235. Baraniak, P. R., & Mcdevitt, T. C. (2010). Paracrine actions of stem cells and tissue regeneration. *Regeneration Med*, 5, 121–143.
236. Doorn, J., Moll, G., Blanc, L., Van Blitterswijk, K., & De Boer, C. (2012). Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 18, 101–115.
237. Carvalho, M. M., Teixeira, F. G., Reis, R. L., Sousa, N., & Salgado, A. J. (2011). Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in regenerative medicine of the central nervous system. *Curr Stem Cell Res Ther*, 6, 221–228.
238. Pereira, Tiago, Ivanova, G., Caseiro, A. R., Barbosa, P., Bártolo, P. J., Santos, J. D., Luís, A. L., & Maurício, A. C. (2014). MSCs conditioned media and umbilical cord blood plasma metabolomics and composition. *PloS One*, 9(11), e113769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113769>
239. Chouaib, B., Haack-Sørensen, M., Chaubron, F., Cuisinier, F., & Collart-Dutilleul, P.-Y. (2023). Towards the standardization of mesenchymal stem cell secretome-derived product

- manufacturing for tissue regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16). <https://doi.org/10.3390/ijms241612594>
240. Sagaradze, G., Grigorieva, O., Nimiritsky, P., Basalova, N., Kalinina, N., Akopyan, Z., & Efimenko, A. (2019). Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: Towards the clinical translation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1656. <https://doi.org/10.3390/ijms20071656>
241. Politikos, I., T Kim, H., Karantanos, T., Brown, J., McDonough, S., Li, L., Cutler, C., Antin, J. H., Ballen, K. K., Ritz, J., & Boussiotis, V. A. (2017). Angiogenic factors correlate with T cell immune reconstitution and clinical outcomes after double-unit umbilical cord blood transplantation in adults. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 23(1), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.10.013>
242. Hildbrand, P., Cirulli, V., & Prinsen, R. C. (2004). The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from CD34+ progenitors of umbilical cord blood. *Blood*, 104, 2010–2019.
243. Kim, I., Kim, J.-H., Moon, S.-O., Kwak, H. J., Kim, N.-G., & Koh, G. Y. (2000). Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene*, 19(39), 4549–4552. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203800>
244. Kimakova P., Solar P., Solarova Z., Komel R., Debeljak N. (2017) Erythropoietin y su actividad angiogénica. *En t. J. Mol. Ciencia*. 18 :1519. doi: 10.3390/ijms18071519.
245. Suresh, S., Rajvanshi, P. K., & Noguchi, C. T. (2020). The many facets of erythropoietin physiological and metabolic response. *Frontiers in physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01534>
246. Villalobos, JJ, Carrasquel, E., Pérez-González, M., & Capriles, F. (2001). Quantification of Endogenous Erythropoietin (Epo) Levels and Their Relationship with Epidemiological Variables in a Group of Hemodialysis Patients. *Journal of the Faculty of Medicine*, 24 (2), 128–134. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04692001000200006&lng=es&tlng=es.
247. Wang, Z., Wang, Y., Bradbury, N., Gonzales Bravo, C., Schnabl, B., & Di Nardo, A. (2020). Skin wound closure delay in metabolic syndrome correlates with SCF deficiency in keratinocytes. *Scientific Reports*, 10(1), 21732. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78244-y>
248. Miyamoto, K., Kobayashi, T., Hayashi, Y., Zhang, Y., Hara, Y., Higashine, M., Shiraiishi, A., & Ohashi, Y. (2012). Involvement of stem cell factor and c-kit in corneal wound healing in mice. *Molecular Vision*, 18, 1505–1515.
249. 235. Rodrigues, M., Griffith, L., & Wells, A. (2010). Growth factor regulation of multipotent stromal cell proliferation and survival. *Ther Stem Cell Res*, 1.
250. Zisa, D., Shabbir, A., Suzuki, G., & Lee, T. (2009). Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in cardiac repair mediated by bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390, 834–838.
251. Van Zoelen, E. J., Duarte, I., & Hendriks, J. M. (s/f). et al TGFbeta-induced switch from adipogenic to osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: identification of drug targets for prevention of fat cell differentiation.
252. Ryan, R. M., Mineo-Kuhn, M. M., Kramer, C. M., & Finkelstein, J. N. (1994). Growth factors alter the proliferation of neonatal type II alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 266, L17–L22.
253. Kheradmand, F., Folkesson, H. G., Shum, L., Derynk, R., Pytela, R., & Matthay, M. A. (1994). Transforming growth factor α enhances alveolar epithelial cell repair in a new in vitro model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 267, L728–L738.

254. Zahm, J. M., Debordeaux, C., Raby, B., Klossek, J. M., Bonnet, N., & Puchelle, E. (2000). Motogenic effect of recombinant HGF on airway epithelial cells during in vitro wound repair of respiratory epithelium. *J Cell Physiol*, 185, 447–453.
255. Takami, K., Takuwa, N., Okazaki, H., Kobayashi, M., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Dohi, M., Yamamoto, K., Nakamura, T., Tanaka, M., Nakahara, K., Takuwa, Y., & Takizawa, H. (2002). Cellular proliferation of human bronchial epithelial cells: upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (kip1). *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26, 231–238.
256. Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3(Suppl. 3), 4–10. <https://doi.org/10.1159/000088478>
257. Hermann, J. L., Weil Br Abarbanellam Wang, Y., Poynter, J. A., & Manukyan, M. C. (2011). DR IL-6 and TGF- α costimulate vascular endothelial growth factor production from mesenchymal stem cells through mechanisms mediated by ERK, JNK, and PI3K. *Shock*, 35, 512–516.
258. Wang, M.J. (2006). DR Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF through a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Reg. Comprehensive comp. Fisiol*, 291, R880–R884.
259. Sagaradze, G. D., Nimiritsky, P. P., Akopyan, Z. A., & Makarevich, P. I. (2018). Efimenko AY Cell-Free Therapeutics of components secreted by mesenchymal stromal cells as a new class of biopharmaceuticals. *Biopharmaceuticals*, 47, 47–61.
260. Bari, E., Ferrarotti, I., Torre, M. L., Corsico, A. G., & Perteghella, S. (2019). Mesenchymal stem/stromal cell secretome for lung regeneration: The long way through “pharmaceuticalization” for the best formulation. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 309, 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.022>
261. Serra, S. C., Costa, J. C., Assunção-Silva, R. C., Teixeira, F. G., Silva, N. A., Anjo, S. I., Manadas, B., Gimble, J. M., Behie, L. A., & Salgado, A. J. (2018). Influence of passage number on the impact of the secretome of adipose tissue stem cells on neural survival, neurodifferentiation and axonal growth. *Biochimie*, 155, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.09.012>
262. Fang, C.-Y., Wu, C.-C., Fang, C.-L., Chen, W.-Y., & Chen, C.-L. (2017). Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. *PLoS One*, 12(6), e0178960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178960>
263. Panchalingam, K. M., Jung, S., Rosenberg, L., & Behie, L. A. (2015). Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells: a review. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0228-5>
264. Ringdén, O., Uzunel, M., Rasmusson, I., Remberger, M., & Sundberg, B. (2006). Mesenchymal stem cells for the treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplant*, 81, 1390–1397.
265. Park, S. R., Kim, J. W., Jun, H. S., Roh, J. Y., Lee, H. Y., & Hong, I. S. (2018). Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(2), 606–617. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.09.023>