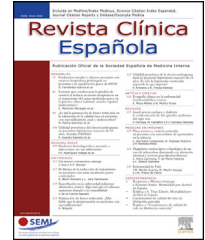




Revista Clínica Española

www.elsevier.es/rce



REVISIÓN

Nueva era de la medicina basada en las células madre mesenquimales: bases, retos y perspectivas



F.J. Vizoso^{a,b,*}, L.A. Costa^a y N. Eiro^{a,*}

^a Unidad de Investigación, Fundación Hospital de Jove, Gijón, España

^b Servicio de Cirugía, Fundación Hospital de Jove, Gijón, España

Recibido el 21 de septiembre de 2023; aceptado el 25 de octubre de 2023

Disponible en Internet el 28 de noviembre de 2023

PALABRAS CLAVE

Medicina regenerativa;
Células madre mesenquimales;
Secretoma;
Medio condicionado;
Exosomas

Resumen Las células madre de origen mesenquimal (CMM) suscitan un interés especial debido a sus propiedades regenerativas, antiinflamatorias, antiapoptóticas, contra el estrés oxidativo, antitumorales o antimicrobianas. Sin embargo, su implementación en clínica se topa con inconvenientes de la terapia celular como la incompatibilidad inmunológica, la formación de tumores, la posible transmisión de infecciones, la entrada en senescencia celular y la difícil evaluación de seguridad, dosis y potencia; así como complejas condiciones de almacenamiento, elevado coste económico o uso clínico poco práctico. Considerando que los efectos positivos de las CMM se deben, en gran medida, a los efectos paracrinos mediados por el conjunto de sustancias que segregan (factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas o microvesículas), la obtención *in vitro* de esos productos biológicos posibilita una medicina regenerativa libre de células sin los inconvenientes de la terapia celular. No obstante, esa nueva innovación terapéutica implica retos, como el reconocimiento de la heterogeneidad biológica de las CMM y la optimización y estandarización de su secretoma.

© 2023 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI). Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Regenerative medicine;
Mesenchymal stem cells;
Secretome;
Conditioned medium;
Exosomes

New era of mesenchymal stem cell-based medicine: Basis, challenges and prospects

Abstract Stem cells of mesenchymal origin (MSC) arouse special interest due to their regenerative, anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-oxidative stress, antitumor or antimicrobial properties. However, its implementation in the clinic runs into drawbacks of cell therapy (immunological incompatibility, tumor formation, possible transmission of infections, entry into cellular senescence, difficult evaluation of safety, dose and potency; complex storage conditions, high economic cost or impractical clinical use). Considering that the positive effects of MSC are due, to a large extent, to the paracrine effects mediated by the set of substances

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: investigacion@hospitaldejove.com (F.J. Vizoso), noemi.eiro@hospitaldejove.com (N. Eiro).

<https://doi.org/10.1016/j.rce.2023.10.002>

0014-2565/© 2023 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI). Todos los derechos reservados.

they secrete (growth factors, cytokines, chemokines or microvesicles), the *in vitro* obtaining of these biological products makes possible a medicine cell-free regenerative therapy without the drawbacks of cell therapy. However, this new therapeutic innovation implies challenges, such as the recognition of the biological heterogeneity of MSC and the optimization and standardization of their secretome.

© 2023 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI). All rights reserved.

Introducción

Se considera que en torno a 40% de la población mundial padecerá en algún momento de su vida una enfermedad que implicará un proceso inflamatorio o autoinmune no controlable de forma satisfactoria con las terapias farmacológicas actuales. A ello tenemos que añadir el fenómeno del envejecimiento progresivo de la población que ocurre especialmente en los países más desarrollados¹. De tal forma que esta población envejecida se va a ver ineludiblemente sometida en el futuro a una vulnerabilidad fisiológica, que incluye un incremento exponencial de enfermedades degenerativas crónicas (como Alzheimer y Parkinson, y las cardiovasculares: infarto de miocardio, hipertensión y arterioesclerosis; además de diabetes, cáncer, osteoporosis u osteoartritis), una mayor susceptibilidad a las infecciones graves y los riesgos de la polifarmacia (riesgo de interacciones y efectos adversos) y, en definitiva, a una disminución de la calidad de vida²⁻⁴.

Los más recientes estudios sobre «ómicas» de las enfermedades, como la genómica, transcriptómica, proteómica o la metagenómica, con el apoyo de las herramientas de la inteligencia artificial, parecen dibujar de momento tan solo una silueta de los mecanismos de estos complicados procesos fisiopatológicos. Ante tal complejidad, está claro que no resulta suficiente la consideración de dianas terapéuticas basadas en reducidas secuencias moleculares.

Por todo ello, necesitamos hacer algo distinto, y quizás ha llegado el momento de probar nuevas alternativas terapéuticas a través de los paradigmas emergentes de la ciencia y la medicina. En este contexto, el desarrollo de estudios sobre el arquetipo de las células madre y la medicina regenerativa representa uno de los mayores empeños en la historia de la ciencia médica. Los avances tecnológicos y biológicos nos han permitido levantar grandes expectativas en virtud de los diferentes tipos de células madre: embrionarias, pluripotentes inducidas (iPS) y células madre adultas, incluyendo estas últimas las de origen hematopoyético, neural y mesenquimal. De esta manera, una parte significativa de la comunidad científica ha puesto al respecto su mirada en las células madre mesenquimales (CMM), especialmente por sus propiedades excepcionales (fig. 1).

Definición y concepto de células madre mesenquimales: de su papel en la homeostasis celular a la importancia de su disfunción en las enfermedades sistémicas

En la década de 1950, el hematólogo ruso Alexander Friedenstein describió una rara población de células progenitoras clonogénicas en la médula ósea de ratón y otros órganos hematopoyéticos que, en cambio, no pertenecían al linaje de células hematopoyéticas⁵. Se trataba de poblaciones celulares similares a fibroblastos que también se conocen con otros términos como «células progenitoras mesenquimales», «células madre adultas mesenquimales», «células estromales mesenquimales», «células estromales multipotenciales», «células madre intersticiales», «células estromales de la médula ósea», o «células de señalización medicinal»^{6,7}. El Comité de Células Madre Mesenquimales y Tisulares de la Sociedad Internacional de Terapia Celular estableció en 2006 las características mínimas de identificación de las CMM humanas: (a) son adherentes al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar, (b) tienen expresión de CD105, CD73 y CD90, y falta de expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19, así como moléculas de superficie del antígeno leucocitario humano isotipo DR (HLA-DR); y (c) poseen la capacidad para diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro*⁶. Además, las CMM se consideran inmunoprivilegiadas ya que no expresan ni el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II ni moléculas coestimuladoras, como CD86, CD40 o CD80⁸.

Aunque diseminadas en cantidades ínfimas por el organismo, las CMM ejercen un papel clave en la homeostasis tisular mediante sus efectos regenerativos, antiinflamatorios, antiestrés oxidativo, antimicrobianos, antifibróticos, antiapoptóticos o antitumorales. Esos efectos positivos los consiguen a través de la secreción de citoquinas, factores de crecimiento e, incluso, de vesículas extracelulares (VE)⁹⁻¹² (fig. 1). Esa gran capacidad funcional de las CMM puede deberse a que ellas derivan, como el sistema inmunitario y el circulatorio, de una capa embriológica muy funcional: el mesodermo. La evidencia indica que este evoluciona hacia la constitución de un estroma íntimamente interconectado

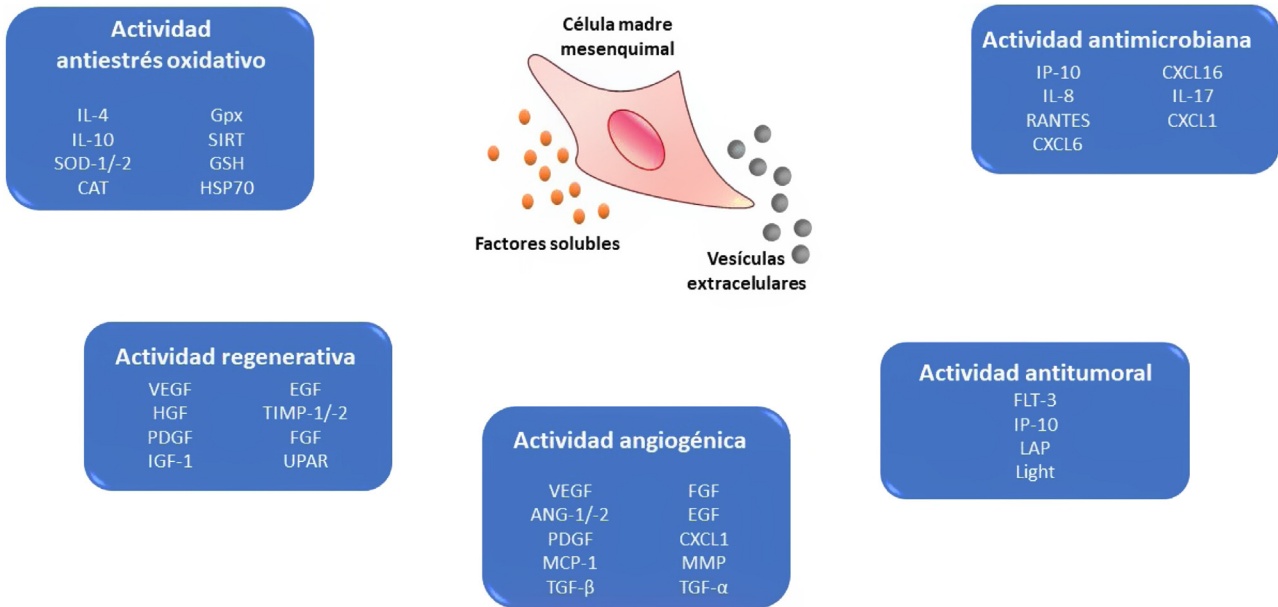


Figura 1 CMM en el contexto de una galaxia de señales intercelulares participando en diversos procesos fisiopatológicos mediante la secreción de factores solubles y VE.
CMM: células madre mesenquimales; VE: vesículas extracelulares.

con los tejidos que derivan del ectodermo o endodermo. Aunque las CMM muestran una localización perivascular en diferentes localizaciones anatómicas, difieren en su capacidad funcional para generar señales paracrinas¹³. Por tanto, la heterogeneidad funcional de las CMM parece reflejar su adaptación para interactuar funcionalmente con el microambiente de los diferentes tejidos y órganos^{11,12,14}.

La idea de la disfunción de las CMM en enfermedades sistémicas surgió de la observación de que los pacientes con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), la diabetes mellitus (DM), la artritis reumatoide (AR) y la esclerosis múltiple o psoriasis, entran en remisión de la enfermedad cuando se trataban con trasplante alógeno de CMM o hematopoyéticas, pero no después de trasplantes autólogos. Con base en estos hallazgos, que ocurrieron en el contexto de tratamiento por leucemia o linfoma¹⁵, se ha planteado la hipótesis de que en esos casos la remisión de la enfermedad sistémica se produjo debido al «reinicio» de la memoria inmunitaria. Pero también podría deberse a la restauración de la homeostasis interna mediante la administración de CMM normalmente funcionales procedentes de donantes sanos. En este sentido, hoy en día se está evidenciando que una depleción o disfunción de este tipo de células parece estar detrás de la fisiopatología de enfermedades como LES, DM, AR, esclerosis múltiple, fibrosis pulmonar idiopática, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, psoriasis y síndromes mielodisplásicos o de envejecimiento precoz¹⁶. Por otra parte, esas enfermedades sistémicas asociadas con una disfunción de las CMM también se caracterizan por la perpetuación de estados inflamatorios, la emisión constante de «señales de alarma», la proliferación, movilización y, finalmente, un secuestro sin fin de CMM en los tejidos dañados, que probablemente conduciría a una depleción de este importante tipo de células homeostáticas y reparadoras especializadas^{16,17}.

Con base en todos estos hallazgos, podemos proponer la hipótesis de que una respuesta inadecuada por parte de las CMM a las señales de alarma provenientes de las células somáticas dañadas, podría contribuir a una pérdida del control de la homeostasis tisular (fig. 2A). Esa situación podría deberse al agotamiento o depleción de unas CMM exhaustas (fig. 2B), o a su disfunción celular primaria o secundaria inducida por alteraciones en el microambiente tisular (fig. 2C). Así pues, la consideración de este nuevo paradigma fisiopatológico puede ser la base para desarrollar nuevas alternativas terapéuticas con la utilización de las CMM o de los productos biológicos derivados de su secretoma¹⁶.

Era de la terapia celular basada en las células madre mesenquimales: expectativas, resultados y limitaciones

La médula ósea, la grasa subcutánea, la gelatina de Wharton y los cordones umbilicales son las fuentes más utilizadas de CMM. Sin embargo, otros de sus orígenes, como los tejidos fetales/neonatales, la pulpa dental o los de origen uterino y reproductivo^{15,18}, están adquiriendo un gran interés creciente¹⁹.

Además de las aplicaciones de investigación y clínicas clásicas de las CMM, como la osteogénesis imperfecta²⁰, la enfermedad de injerto contra huésped (EICH)²¹, la esclerosis múltiple²², los accidentes cerebrovasculares²³, la osteoartritis²⁴, cirrosis hepática²⁵, enfermedad cardiovascular²⁶ o la enfermedad de Crohn^{27,28}, la amplia gama de posibles aplicaciones de las CMM y/o su secretoma está en constante expansión. A fecha del 21 de julio de 2023, se han registrado 1.315 ensayos clínicos de intervención (ClinicalTrials.gov) en muy diversas indicaciones. Sin embargo, a pesar de todas esas evidencias positivas,

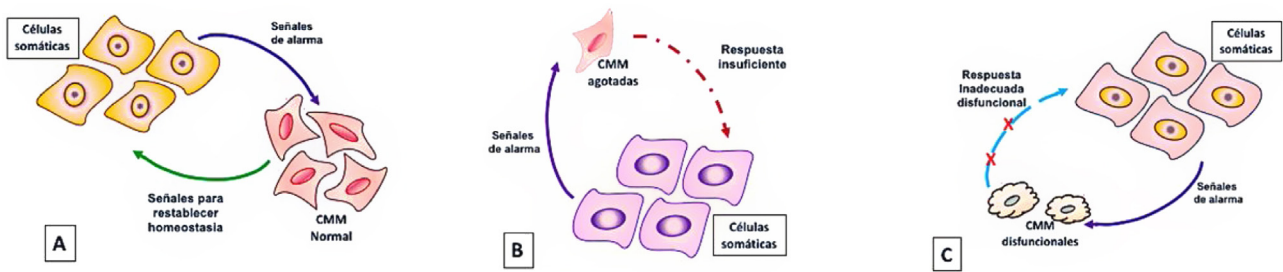


Figura 2 Posibles escenarios de comunicación intercelular entre las células somáticas y las CMM en el contexto de la homeostasis tisular:

(A) las células somáticas dañadas podrían enviar «señales de alarma» indicativas de disfunción a las CMM «centinelas residentes» que desencadenarían su proliferación y activación en respuesta al daño en la célula somática, lo que en última instancia conduciría a la producción de un secretoma especializado; (B) respuesta inadecuada a esas señales de alarma por parte de los CMM debido a su agotamiento o depleción; y

(C) respuesta inadecuada a las señales de alarma por parte de las CMM debido a una disfunción celular primaria o secundaria.

CMM: células madre mesenquimales.

existen limitaciones importantes que incluyen la utilización de un método de aislamiento invasivo; dificultad de cultivar las células en cantidades suficientes; incompatibilidad inmunológica; formación de tumores o émbolos, posible transmisión de infecciones, entrada de las en células senescencia, difícil evaluación de seguridad, dosis y potencia, complejas condiciones de almacenamiento, elevado coste económico, uso clínico poco práctico, difícil disponibilidad de grandes cantidades para uso inmediato, o heterogeneidad biológica de las células en relación con el donante y origen tisular^{19,29–31}. Todo ello condiciona que este nuevo tipo de medicina tenga grandes dificultades para poder generalizarse. Por tanto, resulta necesario encontrar nuevas alternativas estratégicas en el contexto de la medicina basada en las CMM.

Posibilidad de una terapia libre de células basada en el secretoma de las células madre mesenquimales

Inicialmente, los efectos terapéuticos de las CMM fueron atribuidos a su capacidad de injerto y diferenciación. Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que el periodo de implantación de las CMM suele ser demasiado corto para tener un impacto efectivo^{32,33}. De hecho, se ha informado que menos de 1% de las CMM sobreviven más de una semana después de la administración sistémica³⁴, lo que sugiere que los efectos principales de las CMM estén mediados por mecanismos paracrinos a través de los componentes presentes en su secretoma^{35,36}. El secretoma de las CMM se puede obtener *in vitro* en condiciones de cultivo celular (denominado medio condicionado), que contiene la amplia gama de factores bioactivos solubles (factores de crecimiento, citoquinas o quimiocinas) y VE. Ello, además de evitar los inconvenientes de la terapia celular, ofrece nuevas ventajas importantes, tales como una mejor evaluación del producto en cuanto a seguridad, dosis y potencia, de forma análoga a los agentes terapéuticos convencionales; un almacenamiento más sencillo, sin necesidad de la aplicación de agentes crioprotectores; y un abordaje más económico y práctico para el uso clínico²⁹. Además, cabe destacar la

importancia de un componente especialmente relevante del secretoma de las CMM como son las VE³⁷. Esas microvesículas están rodeadas de membrana y contienen una amplia gama de componentes diferentes, como ARN, lípidos y proteínas, incluidas citosinas, quimiocinas, interleucinas, integrinas, tetraspaninas (CD81, CD63 y CD9), proteínas de transporte, factores de transducción de señales (quinasas), proteínas del citoesqueleto y enzimas metabólicas. Las VE se clasifican según su origen en 1) los exosomas (70–150 nm), derivados del compartimento endosómico que corresponden a las vesículas intraluminales de los endosomas multivesiculares; 2) las microvesículas (100–1.000 nm), que son brotes de la membrana plasmática; y 3) los cuerpos apoptóticos, fragmentos más grandes de células apoptóticas (500–2000 nm). Los exosomas son menos complejos e inmunogénicos que sus células progenitoras, ya que tienen un menor contenido de proteínas unidas a la membrana³⁸. Además, la producción y el almacenamiento de exosomas son más fáciles que para las CMM³⁹. Otras ventajas de estos es que incluyen una vida media más larga en el torrente sanguíneo, la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica y el tropismo hacia los tejidos inflamados y tumores^{40,41}.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* sobre los secretomas de las CMM se están incrementando de manera vertiginosa en los últimos años, y demuestran que estos productos biológicos reproducen los efectos de sus células parentales^{9,29} (fig. 3), lo cual nos hace concebir una nueva estrategia terapéutica.

Nuevos conceptos y retos de una estrategia terapéutica de células madre mesenquimales 2.0 basada en los productos su secretoma

De la revisión de la literatura especializada, se puede advertir una visión en perspectiva sobre la evolución de las investigaciones y las posibles aplicaciones de las CMM en las últimas dos décadas: de su interés meramente regenerativo a su potencial antiinflamatorio y otras acciones como proangiogénicas, antiestrés oxidativo, antimicrobiano o antitumoral; de su modo de trasplante inicialmente autólogo al alogénico; y de la terapia celular a la posibilidad de una libre de células basada en los productos derivados

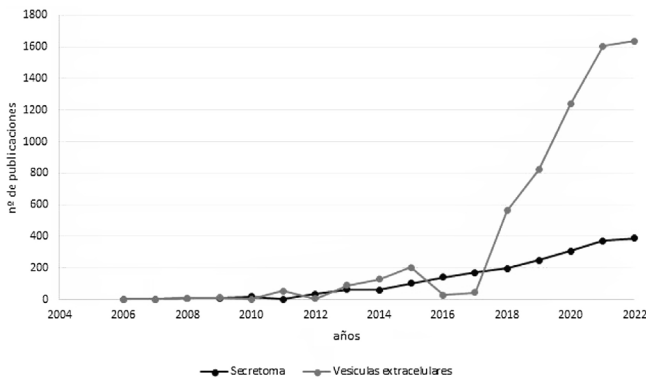


Figura 3 Evolución del número de publicaciones basados en el secretoma y las VE de las células madre mesenquimales. Fuente: PubMed. VE: vesículas extracelulares.

de su secretoma^{9,19}. Asimismo, podemos intuir una serie de retos que serán necesarios solventar para llevar así esta última propuesta a la cabecera del paciente: la consideración de la importancia de la heterogeneidad funcional de las CMM, la producción industrial y estandarización de su secretoma, y la posibilidad de inducir modificaciones en su composición de cara a conseguir aplicaciones terapéuticas más específicas en una nueva medicina basada en las CMM que podemos considerar como 2.0.

Heterogeneidad de las células madre mesenquimales

La no consideración de la heterogeneidad funcional de las CMM ha sido uno de los motivos de disparidad de resultados en la traslación del interés terapéutico de las CMM a la clínica. Sin embargo, esa realidad biológica debiera de representar más bien una oportunidad estratégica clave a elegir la CMM más apropiada para cada indicación terapéutica. La capacidad funcional de las CMM varía en función de su origen tisular u orgánico, de las características del donante y de las condiciones del nicho artificial en condiciones de cultivo y expansión.

Heterogeneidad dependiente del origen

La heterogeneidad funcional de las CMM refleja la diversidad de los entornos presentes en sus nichos naturales, que difieren ampliamente en la dinámica de la comunicación entre las diversas comunidades celulares, condiciones químicas y mecánicas de su microambiente tisular³⁴. En consecuencia, se han reportado diferencias entre las CMM de diferentes orígenes en relación con su capacidad de proliferación, transdiferenciación o inmunofenotipo. Esa heterogeneidad funcional de las CMM también se refleja en variaciones en la producción de su secretoma, incluidas las microvesículas, y, por tanto, es algo a tener en cuenta de cara a las distintas aplicaciones terapéuticas potenciales de este tipo de productos biológicos. Todo ello nos hace concebir la importancia de nuevas fuentes de CMM que, aparte de las clásicamente consideradas, pueden abrir el abanico de posibilidades terapéuticas más específicas. Un ejemplo de ello lo representa

la identificación por parte de nuestro Grupo de una nueva fuente de CMM en el cérvix uterino humano *human Uterine Cervical Stem Cell* (hUCESC)⁴². Esas células pueden ser fácilmente obtenidas por citología o de piezas de histerectomías. Una vez extraídas, muestran una elevada tasa proliferativa en cultivo, lo que permite obtenerlas en grandes cantidades comparativamente con otros tipos de CMM. Además, su secretoma, o medio condicionado obtenido en condiciones de cultivo, contiene sustancias con propiedades regenerativas, antiinflamatorias, inmunorreguladoras, antimicrobianas, antiestrés oxidativo y anticancerosas, más potentes que las obtenidas por CMM de otro origen como las ampliamente utilizadas derivadas del tejido adiposo^{43–47}.

El potencial que presentan las hUCESC y su secretoma podría estar relacionado⁴⁷ con su lugar de origen en el organismo humano. Son obtenidas del cérvix uterino, una zona que es antesala de la cavidad uterina («el cofre de la vida»), y que está constantemente expuesta a elementos dañinos presentes en la vagina, tales como un medio ácido proinflamatorio, bacterias y hongos que la colonizan, o virus como el del papiloma humano, que tiene un papel prominente en el desarrollo de cáncer. Así pues, parece razonable la existencia en esa zona de unas células que atesoren la capacidad de producir un cóctel de sustancias que la protejan⁴⁸.

Heterogeneidad dependiente del donante

Además de la disfunción de las CMM en relación con la existencia de enfermedades sistémicas, existen otras causas de heterogeneidad dependientes del donante. Se sabe que cuando se comparan poblaciones de CMM teóricamente idénticas de diferentes individuos sanos, pueden mostrar diferentes propiedades del secretoma⁴⁹. La edad y la obesidad del donante son factores condicionantes en este sentido, especialmente para las CMM procedentes del tejido adiposo. Aunque este se considera un importante reservorio de células madre, hay evidencias indicando que las CMM de ese origen en pacientes obesos muestran un menor potencial de diferenciación y menos capacidades proangiogénicas que las de los de individuos no obesos^{41,50}.

Las CMM recolectadas de donantes de edad más avanzada se caracterizan por un mayor porcentaje de células apoptóticas y una tasa de proliferación más lenta. Además, las CMM derivadas de la médula ósea o del tejido adiposo obtenidas de individuos de mayor edad poseen propiedades inmunomoduladoras reducidas^{51,52} y una capacidad también reducida de respuesta al estrés oxidativo, en comparación con las CMM de individuos jóvenes⁵³. Pero, incluso, las CMM aisladas de donantes jóvenes y sanos muestran marcadas diferencias en su tasa de proliferación, capacidad de diferenciación y utilidad clínica. Así, por ejemplo, se han descrito diferencias significativas en capacidades proliferativas y de transdiferenciación entre las CMM de donantes sanos, y entre muestras obtenidas del mismo donante, pero de diferentes localizaciones fuentes⁵⁴.

Producción, estandarización y modificación del secretoma de las células madre mesenquimales

Ante el indudable valor científico y tecnológico del secretoma derivado de las CMM y probablemente su gran demanda

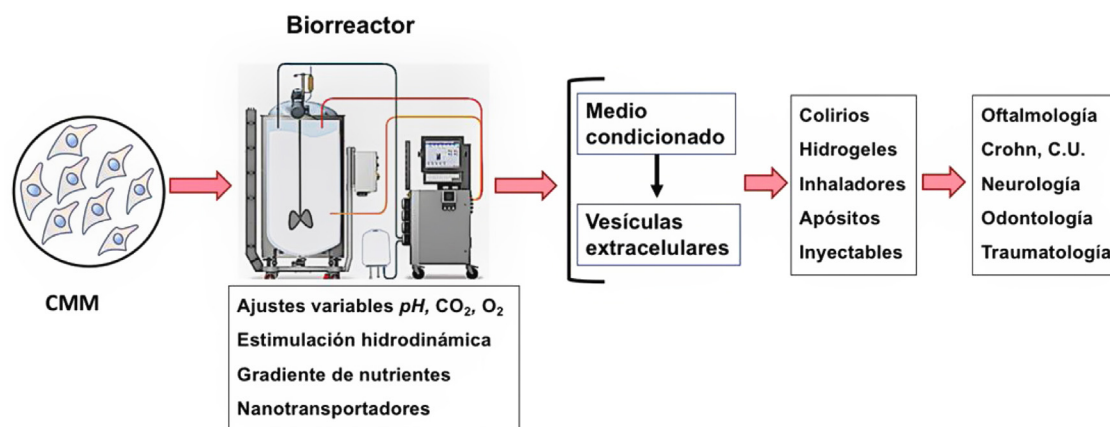


Figura 4 Representación gráfica de la obtención de medio condicionado y microvesículas de las CMM y expansión industrial mediante biorreactores.

CMM: células madre mesenquimales.

future, se impone la necesidad de instaurar su producción *in vitro* a escala industrial. Afortunadamente, hoy disponemos de la tecnología necesaria como los biorreactores, que nos permite un control más exacto y optimizado de las condiciones físico-químicas de los cultivos celulares y de una producción a gran escala de los productos derivados de su secretoma. Esos sistemas de bioingeniería combinan materiales que posibilitan una elevada densidad de cultivo celular, el control de los parámetros hidrodinámicos y de agitación del medio de cultivo, así como control preciso de parámetros químicos o gradiente de nutrientes^{29,55,56} (fig. 4). Además, existe la posibilidad de establecer condiciones *ex vivo* que pueden provocar modificaciones del secretoma de las CMM orientadas hacia aplicaciones terapéuticas más específicas, tales como la concentración de O₂, sistemas de cultivo 3D, métodos de preconditionamiento o manipulación genética.

Las células generalmente se cultivan *in vitro* bajo una tensión de O₂ como la presente en nuestra atmósfera (~21%). Sin embargo, varios estudios han demostrado que las CMM cultivadas en bajas concentraciones de O₂, que es el más propio de los tejidos, retienen mejor su capacidad proliferativa, expresión de antígenos de superficie y potencial de diferenciación, en comparación con las cultivadas con tensión de O₂ atmosférico^{9,19,57-60}. El cultivo celular convencional generalmente se lleva a cabo en un sistema bidimensional (2D) en el que las células crecen como monocapas. Sin embargo, se ha informado que las CMM cultivadas como esferoides 3D tienen propiedades muy superiores en su secretoma al obtenido en los cultivos de CMM 2D, como una mayor producción de factores angiogénicos o proteínas anticancerígenas^{9,61-63}. Por otra parte, las CMM transfectadas con genes antiinflamatorios como la interleucina 10 (IL-10), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) o Foxp3, mejoran la potencia antiinflamatoria de su secretoma⁶⁴⁻⁶⁶. La sobreexpresión del factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF) o de interferón beta induce un efecto neuroprotector significativamente mayor que las CMM nativas, y potencia el efecto antitumoral sobre las células de glioma, respectivamente^{9,67}. No obstante, a pesar de los datos

positivos sobre la manipulación genética de las CMM, existen aspectos que limitan su aplicación clínica por los problemas de seguridad, incluida la posible tumorigenicidad, toxicidad e inmunogenicidad, derivados del uso de agentes virales⁶⁸. Así pues, la tecnología de edición del genoma *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)-Cas9 puede mejorar el potencial terapéutico del secretoma con una mayor seguridad para el paciente⁶⁹. Asimismo, pruebas funcionales específicas, *in vitro* y/o *in vivo*, pueden resultar de interés para garantizar la homogeneidad de la acción de esos productos derivados del secretoma de las CMM antes de las aplicaciones clínicas.

Nuevos retos de aplicaciones terapéuticas de la tecnología células madre mesenquimales 2.0

La disposición de un producto biológico tan versátil abre la posibilidad de un amplio abanico de potencialidades terapéuticas. Existe la oportunidad de desarrollar formulaciones adaptadas para el tratamiento tópico de enfermedades multifactoriales de compleja fisiopatología como, por ejemplo, el síndrome del ojo seco⁷⁰ o la enfermedad inflamatoria intestinal⁷¹. En relación con el primero de esos procesos, nuestros resultados preclínicos demostraron que la instalación tópica de un colirio basado en el medio condicionado de hUCESC (MC-hUCESC), indujo potentes efectos regenerativos, antiinflamatorios en la córnea dañada de los animales^{43,45,72}, así como en un modelo experimental de uveítis. Las enfermedades inflamatorias intestinales, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, de carácter crónico y etiología desconocida, han aumentado su incidencia en la población hasta 30 veces en las últimas décadas. Las CMM son una alternativa terapéutica para estos procesos⁷³. Como demuestran nuestros datos *in vivo* en un modelo experimental murino de colitis, la aplicación tópica mediante enemas de una combinación de MC-hUCESC con un hidrogel mucoadhesivo demostró potentes efectos antiinflamatorios y regenerativos. En los ratones tratados con ese producto innovador, nuestros resultados no solamente evidenciaron una mejora radical de todos los parámetros histológicos

de colitis (inflamación, ulceración, atrofia y displasia), sino también una disminución de la expresión génica de citocinas inflamatorias que, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-6 o interferón γ y que se ha demostrado que tienen un protagonismo muy especial en la compleja fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal⁴⁶.

El cáncer sigue experimentando un incremento imparable de su incidencia, estimándose que pasará de 14 millones de nuevos casos en 2012 a 19 en 2025, y generando 50% de mortalidad en su conjunto. Las CMM derivadas de los tejidos reproductivos, como el útero, la placenta o cordón umbilical o fluido amniótico, han demostrado poder antitumoral contra una amplia variedad de tumores malignos. Esos efectos pueden deberse a elementos solubles altamente presentes en sus secretomas que inducen la inhibición del crecimiento tumoral⁶³, pero también, en parte, a los exosomas de reconocido efecto antitumoral. Esto último resulta especialmente relevante si tenemos en cuenta tres aspectos trascendentales: 1) las células cancerosas internalizan un gran porcentaje de exosomas en comparación con las células normales^{9,63}; 2) existe un tropismo demostrado de estas microvesículas hacia los tumores; y, 3) la posibilidad de carga de esas partículas con agentes antitumorales, tales como citoquinas anticancerosas, virus oncolíticos o quimioterápicos⁶³. En ese contexto nanotecnológico, los exosomas pueden representar innovadores «caballos de Troya» en la concepción de una nueva, sofisticada y selectiva estrategia antitumoral.

La lucha contra las infecciones se está convirtiendo en un auténtico reto para la medicina. Según estimaciones de los epidemiólogos, en el año 2030 se producirán 13 millones de muertes en el mundo a causa de la resistencia a los antibióticos. Existen resultados preliminares que demuestran la actividad bactericida⁴³ o antifúngica⁷⁴ del secretoma de las CMM. Ello puede deberse a que el secretoma de las CMM contiene elevadas concentraciones de citoquinas de reconocido efecto antibacteriano¹⁵ y antifúngico⁷⁴. Además, el secretoma de las CMM puede resultar muy útil para intentar frenar los efectos de la tormenta inflamatoria que provoca la infección viral⁷⁵. En la actualidad se están recogiendo los resultados a largo plazo del efecto terapéutico positivo de la trasplante de CMM o de productos derivados de su secretoma a pacientes críticos afectados de esta enfermedad que, al menos de momento, evidencian datos positivos de seguridad⁷⁶. Ello justifica el interés extraordinario del desarrollo de esta nueva biotecnología de cara a futuras pandemias virales.

La iniciativa de una medicina regenerativa libre de células puede permitirnos también afrontar el reto de un envejecimiento más saludable mediante el alivio de las enfermedades asociadas a este proceso biológico, como las cardiovasculares, neurodegenerativas u osteoarticulares⁷⁷. En este contexto consideramos que tiene cabida una estrategia de restitución del equilibrio homeostático truncado a través de la administración de los productos secretados por las CMM⁷⁸.

Conclusiones

La posibilidad de poder utilizar los productos derivados del secretoma de las CMM se sitúa en el contexto de las nece-

sidades actuales de medicina, donde la compleja realidad fisiopatológica de las enfermedades torna insuficiente el concepto terapéutico clásico de la industria farmacéutica de «una enfermedad, una diana terapéutica». La auténtica respuesta a ese reto se intuye que la tenemos en la naturaleza; puesto que, como sentenció Albert Einstein: «Mira profundamente en la naturaleza y entonces comprenderás todo mejor».

Las CMM son cada vez más reconocidas como elementos clave en la homeostasis interna a través de su efecto paracrino por la producción de un cóctel de factores con efectos regenerativos, antiinflamatorios, antiestrés oxidativo, antimicrobianos o antitumorales. Sin embargo, la terapia basada en la trasplante de esas células se topa con los inconvenientes generales de la terapia celular, que incluye todos los inconvenientes de trasplantar células vivas proliferantes. No obstante, está surgiendo una tecnología CMM 2.0 que supone crear una innovación disruptiva que permite la implementación de una medicina regenerativa libre de células. Esta se basa en la disponibilidad de un derivado biológico como el secretoma de CMM. Ese producto puede ser producido en grandes cantidades, formulado de forma específica para muchos tipos de aplicaciones terapéuticas posibles, y ser la base para futuras investigaciones y desarrollos tecnológicos que representen una fuente de innovación en medicina. Son conocidos los exigentes requerimientos de las agencias reguladoras, pero existen protocolos y procedimientos que representan razonables «hojas de ruta» para poder acercar progresivamente esta tecnología al interés de la terapéutica en medicina. ¡El único fracaso, es no intentarlo!

Financiación

Esta investigación fue apoyada por subvenciones a N.E. y F.J.V. del Instituto de salud Carlos III (PI20/01122) y cofinanciado por la Unión Europea (Next Generation EU).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Population Ageing 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/430); 2019.
2. Gautam N, Das S, Mahapatra SK, Chakraborty SP, Kundu PK, Roy S. Age associated oxidative damage in lymphocytes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010;3:275–82, <http://dx.doi.org/10.4161/oxim.3.4.12860>.
3. Suzman R, Beard JR, Boerma T, Chatterji S. Health in an ageing world-what do we know? *Lancet*. 2015;385:484–6, [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)61597-X](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(14)61597-X).
4. Wimmer BC, Cross AJ, Jakanovic N, Wiese MD, George J, Johnell K, et al. Clinical Outcomes Associated with Medication Regimen Complexity in Older People: A Systematic Review. *J Am Geriatr Soc*. 2017;65:747–53, <http://dx.doi.org/10.1111/jgs.14682>.
5. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;16:381–90.
6. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent

- mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–7, <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>.
7. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9:641–50, <http://dx.doi.org/10.1002/jor.1100090504>.
 8. Oh W, Kim DS, Yang YS, Lee JK. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cell Immunol*. 2008;251:116–23, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.04.003>.
 9. Fernández-Francos S, Eiro N, Costa LA, Escudero-Cernuda S, Fernández-Sánchez ML, Vizoso FJ. Mesenchymal Stem Cells as a Cornerstone in a Galaxy of Intercellular Signals: Basis for a New Era of Medicine. *Int J Mol Sci*. 2021;22:3576, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22073576>.
 10. Wang Y, Fang J, Liu B, Shao C, Shi Y. Reciprocal regulation of mesenchymal stem cells and immune responses. *Cell Stem Cell*. 2022;29:1515–30, <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2022.10.001>.
 11. Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. Atomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet*. 2006;2:e119, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0020119>.
 12. Driscoll J, Patel T. The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease. *J Gastroenterol*. 2019;54:763–73, <http://dx.doi.org/10.1007/s00535-019-01599-1>.
 13. Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, Butenko I, Pobeguts O, Efimenko A, et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:221, <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-015-0209-8>.
 14. de Matos BM, Robert AW, Stimamiglio MA, Correa A. Pluripotent-derived Mesenchymal Stem/stromal Cells: an Overview of the Derivation Protocol Efficacies and the Differences Among the Derived Cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2022;18:94–125, <http://dx.doi.org/10.1007/s12015-021-10258-z>.
 15. Adkins DR, Abidi MH, Brown RA, Khoury H, Goodnough LT, Vij R, et al. Resolution of psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: late complications of therapy. *Bone Marrow Transplant*. 2000;26:1239–41, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1702703>.
 16. Vizoso FJ, Eiro N, Costa L, Esparza P, Landin M, Diaz-Rodriguez P, et al. Mesenchymal Stem Cells in Homeostasis and Systemic Diseases: Hypothesis, Evidences, and Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci*. 2019;20:3738, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20153738>.
 17. Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*. 2010;20:510–8, <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2010.44>.
 18. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med*. 2007;5:57, <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-5-57>.
 19. Costa LA, Eiro N, Fraile M, Gonzalez LO, Saá J, Garcia-Portabella P, et al. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78:447–67, <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-020-03600-0>.
 20. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 1999;5:309–13, <http://dx.doi.org/10.1038/6529>.
 21. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371:1579–86, [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(08\)60690-X](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(08)60690-X).
 22. Uccelli A, Laroni A, Brundin L, Clanet M, Fernandez O, Nabavi SM, et al. MEsenchymal StEm cells for Multiple Sclerosis (MESEMS): a randomized, double blind, cross-over phase I/II clinical trial with autologous mesenchymal stem cells for the therapy of multiple sclerosis. *Trials*. 2019;20:263, <http://dx.doi.org/10.1186/s13063-019-3346-z>.
 23. Lalu MM, Montroy J, Dowlatshahi D, Hutton B, Juneau P, Wesch N, et al. From the Lab to Patients: a Systematic Review and Meta-Analysis of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Stroke. *Transl Stroke Res*. 2020;11:345–64, <http://dx.doi.org/10.1007/s12975-019-00736-5>.
 24. Migliorini F, Rath B, Colarossi G, Driessen A, Tingart M, Niewiera M, et al. Improved outcomes after mesenchymal stem cells injections for knee osteoarthritis: results at 12-months follow-up: a systematic review of the literature. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2020;140:853–68, <http://dx.doi.org/10.1007/s00402-019-03267-8>.
 25. Han HS, Lee H, You D, Nguyen VQ, Song DG, Oh BH, et al. Human adipose stem cell-derived extracellular nanovesicles for treatment of chronic liver fibrosis. *J Control Release*. 2020;320:328–36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.042>.
 26. Yun CW, Lee SH. Enhancement of Functionality and Therapeutic Efficacy of Cell-Based Therapy Using Mesenchymal Stem Cells for Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20:982, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20040982>.
 27. García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum*. 2005;48:1416–23, <http://dx.doi.org/10.1007/s10350-005-0052-6>.
 28. Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, Colombel JF, Reinisch W, Baumgart DC, et al. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet*. 2016;388:1281–90, [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)31203-X](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(16)31203-X).
 29. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernández R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2017;18:1852, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18091852>.
 30. Kim HJ, Park JS. Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages. *Dev Reprod*. 2017;21:1–10, <http://dx.doi.org/10.12717/dr.2017.21.1.001>.
 31. Zhou T, Yuan Z, Weng J, Pei D, Du X, He C, et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *J Hematol Oncol*. 2021;14:24, <http://dx.doi.org/10.1186/s13045-021-01037-x>.
 32. Chimenti I, Smith RR, Li TS, Gerstenblith G, Messina E, Giacomello A, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res*. 2010;106:971–80, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.210682>.
 33. Timmers L, Lim SK, Hofer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AAM, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res*. 2011;6:206–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2011.01.001>.
 34. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. 2007;9:204, <http://dx.doi.org/10.1186/ar2116>.
 35. Heo JS, Choi Y, Kim HS, Kim HO. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived

- from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med.* 2016;37:115–25, <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2015.2413>.
36. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol.* 2012;3:297, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00297>.
 37. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7:1535750, <http://dx.doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
 38. Lou G, Chen Z, Zheng M, Liu Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Exp Mol Med.* 2017;49:e346, <http://dx.doi.org/10.1038/emmm.2017.63>.
 39. Kooijmans SAA, Vader P, van Dommelen SM, van Solinge WW, Schiffelers RM. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:1525–41, <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.S29661>.
 40. Harrell CR, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Other Extracellular Vesicles as New Remedies in the Therapy of Inflammatory Diseases. *Cells.* 2019;8:1605, <http://dx.doi.org/10.3390/cells8121605>.
 41. Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther.* 2011;19:1769–79, <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2011.164>.
 42. Eiró N, Sendon-Lago J, Seoane S, Bermúdez MA, Lameelas ML, Garcia-Caballero T, et al. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. *Oncotarget.* 2014;5:10692–708, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.2530>.
 43. Bermudez MA, Sendon-Lago J, Eiro N, Treviño M, Gonzalez F, Yebra-Pimentel E, et al. Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:983–92, <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.14-15859>.
 44. Janssen EM, Dy SM, Meara AS, Kneuert PJ, Presley CJ, Bridges JFP. Analysis of Patient Preferences in Lung Cancer - Estimating Acceptable Tradeoffs Between Treatment Benefit and Side Effects. *Patient Prefer Adherence.* 2020;14:927–37, <http://dx.doi.org/10.2147/ppa.S235430>.
 45. Bermudez MA, Sendon-Lago J, Seoane S, Eiro N, Gonzalez F, Saa J, et al. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. *Exp Eye Res.* 2016;149:84–92, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2016.06.022>.
 46. Sendon-Lago J, Garcia-Del Rio L, Eiro N, Diaz-Rodriguez P, Avila A, Gonzalez LO, et al. Tailored Hydrogels as Delivery Platforms for Conditioned Medium from Mesenchymal Stem Cells in a Model of Acute Colitis in Mice. *Pharmaceutics.* 2021;13:1127, <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13081127>.
 47. Eiro N, Sendon-Lago J, Cid S, Saa J, de Pablo N, Vega B, et al. Conditioned Medium from Human Uterine Cervical Stem Cells Regulates Oxidative Stress and Angiogenesis of Retinal Pigment Epithelial Cells. *Ophthalmic Res.* 2022;65:556–65, <http://dx.doi.org/10.1159/000524484>.
 48. Schneider J, Eiró N, Pérez-Fernández R, Martínez-Ordóñez A, Vizoso F. Human Uterine Cervical Stromal Stem Cells (hUCESCs): Why and How they Exert their Antitumor Activity. *Cancer Genomics Proteomics.* 2016;13:331–7.
 49. Mendicino M, Bailey AM, Wonnacott K, Puri RK, Bauer SR. MSC-based product characterization for clinical trials: an FDA perspective. *Cell Stem Cell.* 2014;14:141–5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.013>.
 50. Oñate B, Vilahur G, Ferrer-Lorente R, Ybarra J, Díez-Caballero A, Ballesta-López C, et al. The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients. *FASEB J.* 2012;26:4327–36, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.12-207217>.
 51. Wu LW, Wang YL, Christensen JM, Khalifian S, Schneeberger S, Raimondi G, et al. Donor age negatively affects the immunoregulatory properties of both adipose and bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Transpl Immunol.* 2014;30:122–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2014.03.001>.
 52. Kizilay Mancini O, Shum-Tim D, Stochaj U, Correa JA, Colmegna I. Age, atherosclerosis and type 2 diabetes reduce human mesenchymal stromal cell-mediated T-cell suppression. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:140, <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-015-0127-9>.
 53. De Barros S, Dehez S, Arnaud E, Barreau C, Cazavet A, Perez G, et al. Aging-related decrease of human ASC angiogenic potential is reversed by hypoxia preconditioning through ROS production. *Mol Ther.* 2013;21:399–408, <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2012.213>.
 54. Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem.* 1999;75:424–36.
 55. Behnke J, Kremer S, Shahzad T, Chao CM, Böttcher-Friebertshäuser E, Morty RE, et al. MSC Based Therapies-New Perspectives for the Injured Lung. *J Clin Med.* 2020;9:682, <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9030682>.
 56. Mohammadipoor A, Antebi B, Batchinsky AI, Cancio LC. Therapeutic potential of products derived from mesenchymal stem/stromal cells in pulmonary disease. *Respir Res.* 2018;19:218, <http://dx.doi.org/10.1186/s12931-018-0921-x>.
 57. Hung SP, Ho JH, Shih YRV, Lo T, Lee OK. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2012;30:260–6, <http://dx.doi.org/10.1002/jor.21517>.
 58. Choi JR, Pingguan-Murphy B, Wan Abas WAB, Noor Azmi MA, Omar SZ, Chua KH, et al. Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;448:218–24, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.096>.
 59. Yamamoto Y, Fujita M, Tanaka Y, Kojima I, Kanatani Y, Ishihara M, et al. Low Oxygen Tension Enhances Proliferation and Maintains Stemness of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. *Biores Open Access.* 2013;2:199–205, <http://dx.doi.org/10.1089/biores.2013.0004>.
 60. Werle SB, Chagastelles P, Pranke P, Casagrande L. The effects of hypoxia on in vitro culture of dental-derived stem cells. *Arch Oral Biol.* 2016;68:13–20, <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.03.011>.
 61. Cesarz Z, Tamama K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9176357, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9176357>.
 62. Li L, Jin S, Zhang Y. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of mesenchymal stem cells on endotoxin-induced acute lung injury in mice through secretion of exosome. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:3825–32.
 63. Eiro N, Fraile M, Fernández-Francos S, Sánchez R, Costa LA, Vizoso FJ. Importance of the origin of mesenchymal (stem)

- stromal cells in cancer biology: «alliance» or «war» in intercellular signals. *Cell Biosci.* 2021;11:109, <http://dx.doi.org/10.1186/s13578-021-00620-6>.
64. Min CK, Kim BG, Park G, Cho B, Oh IH. IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39:637–45, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1705644>.
 65. Bian L, Guo ZK, Wang HX, Wang JS, Wang H, Li QF, et al. In vitro and in vivo immunosuppressive characteristics of hepatocyte growth factor-modified murine mesenchymal stem cells. *In Vivo.* 2009;23:21–7.
 66. Kim DS, Jang IK, Lee MW, Ko YJ, Lee DH, Lee JW, et al. Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ . *EBioMedicine.* 2018;28:261–73, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.002>.
 67. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 2005;65:3307–18, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1874>.
 68. Boulaiz H, Marchal JA, Prados J, Melguizo C, Aránega A. Non-viral and viral vectors for gene therapy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2005;51:3–22.
 69. Meng X, Zheng M, Yu M, Bai W, Zuo L, Bu X, et al. Transplantation of CRISPRa system engineered IL10-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of myocardial infarction in diabetic mice. *J Biol Eng.* 2019;13:49, <http://dx.doi.org/10.1186/s13036-019-0163-6>.
 70. Imaizumi T, Hayashi R, Kudo Y, Li X, Yamaguchi K, Shibata S, et al. Ocular instillation of conditioned medium from mesenchymal stem cells is effective for dry eye syndrome by improving corneal barrier function. *Sci Rep.* 2023;13:13100, <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-40136-2>.
 71. Liu P, Xie XR, Wu H, Li H, Chi JS, Liu XM, et al. Conditioned medium of mesenchymal stem cells pretreated with H(2)O(2) promotes intestinal mucosal repair in acute experimental colitis. *Sci Rep.* 2022;12:20772, <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-24493-y>.
 72. Sendon-Lago J, Seoane S, Martínez-Ordoñez A, Eiro N, Saa J, Vizoso FJ, et al. Corneal regeneration by conditioned medium of human uterine cervical stem cells is mediated by TIMP-1 and TIMP-2. *Exp Eye Res.* 2019;180:110–21, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2018.12.004>.
 73. Eiro N, Fraile M, González-Jubete A, González LO, Vizoso FJ. Mesenchymal (Stem) Stromal Cells Based as New Therapeutic Alternative in Inflammatory Bowel Disease: Basic Mechanisms, Experimental and Clinical Evidence, and Challenges. *Int J Mol Sci.* 2022;23:8905, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23168905>.
 74. Schneider J, Mateo E, Marcos-Arias C, Eiró N, Vizoso F, Pérez-Fernández R, et al. Antifungal Activity of the Human Uterine Cervical Stem Cells Conditioned Medium (hUCESC-CM) Against *Candida albicans* and Other Medically Relevant Species of *Candida*. *Front Microbiol.* 2018;9:2818, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.02818>.
 75. Chaudhary JK, Saini D, Chaudhary PK, Maurya A, Verma GK, Gupta AK, et al. Exploring the Immunomodulatory Aspect of Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Severe Coronavirus Disease 19. *Cells.* 2022;11:2175, <http://dx.doi.org/10.3390/cells11142175>.
 76. Eiro N, Cabrera JR, Fraile M, Costa L, Vizoso FJ. The Coronavirus Pandemic (SARS-CoV-2): New Problems Demand New Solutions, the Alternative of Mesenchymal (Stem) Stromal Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:645, <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2020.00645>.
 77. Sun Z, Hou X, Zhang J, Li J, Wu P, Yan L, et al. Diagnostic and Therapeutic Roles of Extracellular Vesicles in Aging-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:6742792, <http://dx.doi.org/10.1155/2022/6742792>.
 78. Fraile M, Eiro N, Costa LA, Martín A, Vizoso FJ. Aging and Mesenchymal Stem Cells: Basic Concepts, Challenges and Strategies. *Biology (Basel).* 2022;11:1678, <http://dx.doi.org/10.3390/biology11111678>.