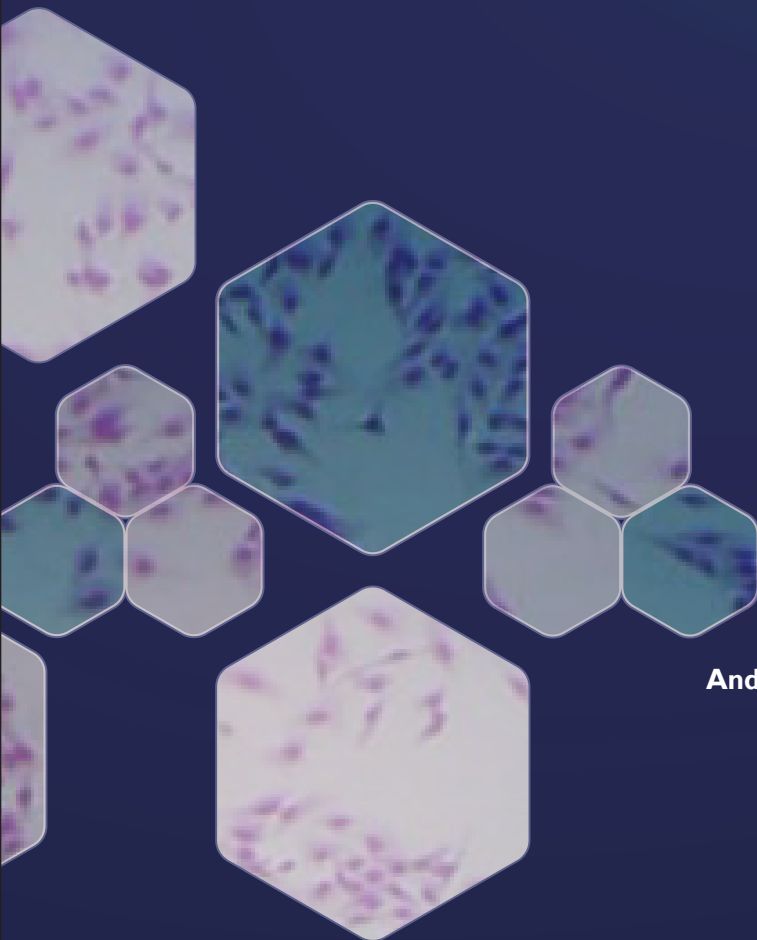


IMPACTO

DEL CULTIVO DE CÉLULAS MADRE
Y SUS APLICACIONES



Ruth Mélida Sánchez Mora

Martha Gómez Jiménez

Andrea Viviana Gualteros Bustos



UNIVERSIDAD COLEGIO
MAYOR DE CUNDINAMARCA

SELLO EDITORIAL

Impacto del cultivo de células madre y sus aplicaciones

Ruth Mélida Sánchez Mora

Martha Gómez Jiménez

Andrea Viviana Gualteros Bustos



**UNIVERSIDAD COLEGIO
MAYOR DE CUNDINAMARCA**

SELLO EDITORIAL

Catalogación en la publicación – Biblioteca Nacional de Colombia

Sánchez Mora, Ruth Mélica

Impacto del cultivo de células madre y sus aplicaciones / Ruth Mélica Sánchez Mora, Martha Gómez Jiménez, Andrea Viviana Gualteros Bustos. – 1a ed. – Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, 2021.

p. 96

Incluye índice de abreviaturas. -- Incluye referencias bibliográficas.

ISBN 978-958-5198-02-9

1. Células madre 2. Cultivo de células I. Gómez Jiménez, Martha II. Gualteros Bustos, Andrea Viviana III. Título

CDD: 616.02774 ed. 23

CO-BoBN– a1076320

Primera edición, 2021

© Ruth Mélica Sánchez Mora, Martha Gómez Jiménez,
Andrea Viviana Gualteros Bustos

© UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

Sello Editorial Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Carrera 13 No. 38-29, Edificio San Juan, noveno piso
selloeditorial@unicolmayor.edu.co
www.unicolmayor.edu.co

Diseño de portada y diagramación: Editorial Scripto SAS
Corrección de Estilo: Xpress Estudio Gráfico y Digital

Bogotá, Colombia, 2021

ISBN: 978-958-5198-02-9

El contenido de esta obra está protegido por las leyes y tratados internacionales en materias del Derecho de autor. Queda prohibida su reproducción total o parcial por cualquier medio impreso o digital conocido o por conocer sin contar con la previa autorización de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

*A Dios, a la virgen y a nuestras familias
por ser nuestros principales inspiradores y motores.*

Tabla de contenido

Lista de figuras	7
Lista de tablas	8
Glosario	9
Índice de abreviaturas	14
Prólogo	19
1. Cultivo de células madre: aislamiento e identificación	21
1.1 Clasificación de las células madre	21
1.2. Aspectos preliminares del cultivo de células madre	23
1.2.1 Microambiente, microentorno o nicho	23
1.2.2 Matriz extracelular	24
1.3 Aislamiento de células madre para cultivo	26
1.3.1 Método de gradiente de densidad de Ficoll	27
1.3.2 Método de dispositivo de filtro de médula ósea	28
1.3.3 Método de digestión (colagenasa)	30
1.3.4 Método de filtración por membrana	31
1.4 Identificación de células madre	34
1.4.1 CD90 (cluster of differentiation 90)	36
1.4.2 CD73 o 5'-nucleotidasa	38
1.4.3 CD105 o endoglina	38
1.4.4 STRO-1	40
1.4.5 CD106 (cluster of differentiation 106)	41
2. Autorrenovación y mantenimiento de células madre	45
2.1 Autorrenovación de las células madre	45
2.2 Mantenimiento de cultivos de células madre	47
2.2.1 Cultivo de mantenimiento de células madre mesenquimales provenientes de tejido adiposo	50

2.2.2	Cultivo de mantenimiento de células madre mesenquimales provenientes de explantes dentales	51
2.2.3	Cultivo de mantenimiento de células madre mesenquimales provenientes de cordón umbilical	51
2.3	Diferenciación dirigida de células madre	53
2.3.1	Condrogénesis	53
2.3.2	Osteogénesis	54
2.3.3	Adipogénesis	56
2.4	Métodos de criopreservación de células madre	57
2.4.1	Procedimiento convencional de congelación lenta	59
2.4.2	Procedimiento de enfriamiento ultrarrápido	59
2.5.	Control de calidad y buenas prácticas de fabricación	60
3.	Sistemas de cultivo de células madre	63
3.1	Cultivos en monocapa	63
3.2	Cultivos 2D	64
3.3	Cultivos 3D	64
3.4	Organoides	67
3.5	Cultivos en biorreactor	68
4.	Aplicaciones de los cultivos de células madre	73
4.1	Las células madre pluripotentes inducidas como modelo para enfermedades	73
4.2	Aplicaciones de los modelos organoides	75
4.3	Las células madre mesenquimales como modelo para enfermedades	78
4.3.1	Las células madre mesenquimales en enfermedades autoinmunes	82
4.3.2	Células madre mesenquimales en tratamiento de cáncer	82
4.3.3	Células madre mesenquimales en enfermedades neurodegenerativas	83
	Conclusión	85
	Referencias	87

Lista de figuras

Figura 1.	Clasificación de células madre	22
Figura 2.	Microambiente de células madre	24
Figura 3.	Ruta de mecanotransducción	26
Figura 4.	Esquema del método de gradiente de densidad de Ficoll-Paque	28
Figura 5.	Dispositivo de filtro para médula ósea	29
Figura 6.	Esquema interno de un prototipo de dispositivo de filtro de médula ósea	30
Figura 7.	Método de digestión con colagenasa	31
Figura 8.	Esquema del sistema de filtración	32
Figura 9.	Esquema de la caja que alberga la membrana del filtro de policarbonato	33
Figura 10.	Molécula Thy-1 y formas solubles propuestas	37
Figura 11.	Representación estructural de CD105 (endoglina)	39
Figura 12.	Expresión inducida de CD106	42
Figura 13.	Autorrenovación de células madre mesenquimales	46
Figura 14.	Rutas de señalización para la diferenciación de células madre mesenquimales	55
Figura 15.	Sistemas de cultivo en monocapa	64
Figura 16.	Método de cultivo en 3D	66
Figura 17.	Representación esquemática del biorreactor de tanque agitado	70
Figura 18.	Representación esquemática del biorreactor oscilante de onda	70
Figura 19.	Representación esquemática del biorreactor de fibra hueca	71
Figura 20.	Representación esquemática del biorreactor de cama fija	71
Figura 21.	Células madre pluripotentes inducidas	74
Figura 22.	Aplicaciones de organoides	76

Lista de tablas

Tabla 1.	Fuentes de obtención de células madre y métodos de aislamiento	27
Tabla 2.	Marcadores de superficie celular de acuerdo con la fuente de extracción	35
Tabla 3.	Descripción general de la expresión de diferentes antígenos de superficie	43
Tabla 4.	Descripción general de la expresión de diferentes antígenos de superficie no expresado por células madre mesenquimales	44
Tabla 5.	Medios de cultivo para células madre mesenquimales respecto a la fuente de obtención	47
Tabla 6.	Suplementos de suero respecto a la fuente de obtención	49
Tabla 7.	Características observadas en el cultivo de células madre mesenquimales obtenidas de diferentes tejidos	52
Tabla 8.	Ensayos clínicos con células madre mesenquimales	80

Glosario

Agrecan: es una proteína central proteoglicana específica de cartílago o proteoglicano de sulfato de condroitina. Son proteoglicanos grandes que contienen hialurón y se encuentran en el cartílago articular.

ACAN: nombre del gen que en los seres humanos codifica agrecan; forma parte de la familia de los genes de lectina.

Angiogénesis: proceso por el cual se da un crecimiento de vasos sanguíneos nuevos.

Autocrino: es un tipo de secreción química que realiza una célula y afecta a la misma célula que secretó la sustancia, como es el caso de las hormonas.

Biglicano: es un proteoglicano pequeño rico en leucina que se encuentra en una variedad de tejidos, incluyendo el endotelio capilar, el músculo esquelético, el cartílago, el hueso y los tendones. La proteína contiene dos cadenas de glicosaminoglicanos y es similar en estructura a la decorina.

Blastómero: cada una de las células que se originan en la primera división del óvulo fecundado. Son células indiferenciadas resultantes de la escisión de un óvulo fertilizado.

CBP: proteína de unión a CREB. Se expresa ubicuamente y participa en la coactivación transcripcional de diversos factores de transcripción.

Células trofoblásticas: el trofoblasto es un grupo de células que forman la capa externa del blastocisto, provee nutrientes al embrión y se desarrolla como parte importante de la placenta, puesto que al tercer mes de la gestación recibirá el nombre de placenta.

Citoquina: proteínas no anticuerpos secretadas por leucocitos inflamatorios y algunas células no leucocíticas que actúan como mediadores intercelulares.

Colagenasa: enzimas que catalizan la degradación del colágeno al actuar sobre los enlaces peptídicos.

CSK: proteínas tirosina quinasas que fosforilan los residuos de tirosina ubicados en las colas C-terminales de la familia kinasa SRC.

Decorina: es un pequeño proteoglicano rico en leucina que interactúa con colágenos fibrilares y modifica la estructura de la matriz extracelular del tejido conectivo; también se ha demostrado que desempeña funciones adicionales en la regulación de las respuestas celulares a los factores de crecimiento.

DMEM: medio de Dulbecco modificado de Eagle por sus siglas en inglés; es una fórmula modificada del medio MEM que permite el crecimiento celular *in vitro* proporcionando los nutrientes esenciales requeridos por la célula.

Dominios SH2 y SH3: los dominios SH2 y SH3 son dominios de interacción de proteínas SH2; por lo general, se une a las proteínas que contienen fosfotirosina y SH3, e interactúa con las proteínas citoesqueléticas.

Endocrinos: sistema de glándulas que liberan sus secreciones (hormonas) directamente en el sistema circulatorio, además de las glándulas endocrinas.

Epigenética: proceso genético por el cual los organismos adultos, a través de diferentes mecanismos, conducen a la restricción en los posibles destinos de las células; eventualmente conducen a su estado diferenciado.

FAS ligando: proteína transmembrana perteneciente a la superfamilia del factor de necrosis tumoral. Se descubrió originalmente en las células del linaje linfocitoide-mieloide, incluidos los linfocitos T activados y las células Natural Killer. Desempeña un papel importante en la homeostasis inmune y la toxicidad mediada por células al unirse al receptor de FAS y desencadenar la apoptosis.

Filopodios: extensión citoplasmática delgada del cono de crecimiento de un axón o una dendrita que explora el entorno celular.

Haploidia: la constitución cromosómica de las células en la que cada tipo de cromosoma se representa una vez; el símbolo es N.

Inmunomodulador: sustancia que actúa regulando el sistema inmune mediante el aumento o la disminución de la capacidad de producir anticuerpos.

Lamelipodios: prolongaciones amplias, laminares y transitorias de la membrana celular son producidas por los microfilamentos de actina del citoesqueleto celular.s

Lumican: pequeño proteoglicano rico en leucina que contiene diez repeticiones de leucina en tándem y cuatro sitios unidos a N dentro de la región de repetición de leucina que pueden sustituirse con keratán sulfato. Media las interacciones entre las moléculas de colágeno dentro de las fibrillas. Se expresa en la mayoría de los tejidos mesenquimales, así como en la córnea.

MEM: medio esencial mínimo; es un medio de cultivo que contiene los nutrientes mínimos indispensables para el crecimiento celular.

MYLK: la quinasa de cadena ligera de miosina es una enzima perteneciente a las serina/treonina proteína quinasas. Está implicada en la contracción del músculo liso vía la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina.

Notch: es una proteína transmembranal que sirve como receptor de señales extracelulares y participa en varias rutas de señalización durante el desarrollo.

Paracrino: señalización celular en la que un factor secretado por una célula afecta a otras células en el entorno local. Este término se usa a menudo para denotar la acción de los péptidos y las proteínas de señalización intercelular en las células circundantes.

Pirosis: dolor subesternal o sensación de ardor, por lo general asociado con regurgitación de jugo gástrico hacia el esófago.

Pleiotrópica: fenómeno por el cual un solo gen es responsable de efectos fenotípicos o caracteres distintos y no relacionados.

PPAR γ : un factor de transcripción nuclear. La heterodimerización con retinoide x receptor alfa es importante en la regulación del metabolismo de glucosa y los procesos de crecimiento celular. Es un objetivo de tiazolidinedionas para el control de la diabetes mellitus.

Proteínas polycomb/trithorax: es un conjunto de proteínas involucrado en la regulación epigenética de las células.

Quimioatrayente: sustancias orgánicas o inorgánicas que poseen efecto inductor de quimiotaxis en células móviles.

Quimiotácticas: movimiento de células u organismos hacia o lejos de una sustancia en respuesta a su gradiente de concentración.

ROCK: la proteína quinasa asociada a Rho. Es una quinasa que pertenece a la familia de serina-treonina quinasas AGC (PKA/PKG/PKC). Participa, principalmente, en la regulación de la forma y el movimiento de las células al actuar sobre el citoesqueleto.

RUNX2: también denominada CBFA1, es un factor de transcripción clave asociado con la diferenciación de los osteoblastos, codificada en humanos por el gen RUNX2 que pertenece a la familia de factores de transcripción RUNX y tiene un dominio Runt de unión a ADN.

Sincitiotrofoblasto: zona periférica del trofoblasto que penetra en los tejidos maternos para unir el blastocito al útero y entrar a formar parte de la placenta. Es la zona que formará las vellosidades coriales.

SRC: proteínas no receptoras con actividad de tirosina cinasa; desempeñan papeles fundamentales en gran variedad de vías de transducción.

Talina: es una proteína de alto peso molecular citoesquelético; tiene una función de adhesión clave que conecta las integrinas al citoesqueleto.

TAZ: es una proteína que actúa como fosfolípido-lisofosfolípido transacilasa (pertenece al fosfolípido: diacilglicerol aciltransferasas). Cataliza la remodelación de cardiolipina inmadura a su composición madura que contiene un predominio de restos tetralinoleoilo.

Tetraspaninas: superfamilia de proteínas de membrana de superficie celular caracterizada por sus cuatro dominios transmembrana; se encuentran en todos los eucariotas multicelulares y actúan como proteínas de andamiaje anclando múltiples proteínas a un área de la membrana celular.

Tiazolidinedionas (TZD): medicamentos introducidos a finales de la década de los noventa del siglo XX como terapia para la diabetes mellitus tipo 2 y otras enfermedades relacionadas.

Vías de señalización WNT: grupo de vías de transducción de señales formadas por proteínas que transfieren las señales del exterior de una célula a través de la superficie receptora de dicha célula hasta su interior.

YAP: es una proteína que actúa como un regulador transcripcional activando la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular y suprimiendo genes apoptóticos.

Yuxtamembrana: porción que ocupa una proteína justo en el interior de la membrana celular.

Índice de abreviaturas

A

A: Adipoblasto

aa: aminoácidos

ADMEM: advanced DMEM

ALCAM: molécula de adhesión celular leucocitaria activada

ALF: antígeno asociado a la función linfocítica

ALGS: síndrome de Alagille

ALS: escala de calificación funcional

α -MEM: medio esencial mínimo de Eagle modificación Alfa

ANPEP: alanilaminopeptidasa

ASB: albúmina de suero bovino

ATP: adenosina trifosfato

B

bHLH: actor de transcripción de la hélice-bucle-hélice

BMP: proteína morfogenética ósea

C

C: condroblasto.

CAR: células alimentadoras aisladas de ratón.

CD: cluster of differentiation.

CFTR: gen regulador de la transmembrana-conductor de la fibrosis quística.

CM: célula madre.

CMAs: células madre adultas.

CMEs: células madre embrionarias

CMHs: células madre hematopoyéticas

CMM: célula madre mesenquimal

CMMs: células madre mesenquimales
CMNs: células madre neurales
CMPihs: células madre pluripotentes humanas inducidas
CMPis: células madre pluripotentes inducidas
CMs: células madre
CS: célula somática
CSs: células somáticas
C-ter: extremo carboxilo
CYT: dominios citoplasmáticos

D

DAF: decaimiento-factor de aceleración
DM: diabetes mellitus
DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMEM-HG: DMEM alto en glucosa
DMEM-LG: DMEM bajo glucosa
DMSO: dimetilsulfóxido

E

EA: enfermedad de Alzheimer
EC: enfermedad de Crohn
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EH: enfermedad de Huntington
EICH: enfermedad de injerto contra huésped
ELA: esclerosis lateral amiotrófica
EM: esclerosis múltiple
EP: enfermedad de Parkinson
ES: esclerosis sistémica

F

FDA: Food and Drug Administration
FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

FISH: hibridación fluorescente *in situ*
FRL: filtros de reducción de leucocitos
FVS: fracción vascular estromal

G

GAGs: glicosaminoglicanos
GDF: factor de crecimiento y diferenciación
GPI: glicofosfatidilinositol

H

HAT: histona acetiltransferasas
HES: hidroxietilalmidón
HGC: hibridación genómica comparativa
HGF: factor de crecimiento de hepatocitos
HSA: antígeno estable al calor

I

ICAM-2: molécula de adhesión intercelular 2
IDCBIS: Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología
e Innovación en Salud
IKK: inhibidores de la I κ B quinasa
IRH: inhibidores de recristalización de hielo de molécula pequeña
ISCT: International Society of Cellular Therapy

L

LEF: factor de unión del potenciador linfoide
LES: lupus eritematoso sistémico
LIF: factor inhibidor de la leucemia

M

MAC-IP: proteína inhibidora de MAC
MAPK : proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCAM: molécula de adhesión celular de melanoma

MCI: masa celular interna
MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos
MEC: matriz extracelular
MELD: modelo para la enfermedad hepática en etapa terminal
MLCK: enzima cinasa de la cadena ligera de miosina
MME: membrana metallo-endopeptidasa
MO: médula ósea

N

NCAM 1: molécula de adhesión celular neural I
NF- κ B: factor nuclear- κ B (NF- κ B)
N-ter: dominio NH 2 huérfano-terminal

O

O: osteoblasto

P

PBS: solución salina tamponada con fosfato
PCC: programa de control de calidad eficiente
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR: receptor PDGF
PDZ: proteína de densidad postsináptica
PPAR γ : proliferador de peroxisoma del receptor de hormonas nucleares γ
PTI: púrpura trombocitopenia inmune

R

ROCK: proteína cinasa asociada a Rho

S

SBRN: suero de becerro recién nacido
SC: stem cell
SCs: stem cells

SDF-1: factor-1 derivado de estroma

SFB: suero fetal bovino

STF: suero de ternera fetal

T

TAP: tecnologías analíticas de proceso

TAZ: coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ

TBX-5: gen osteogénico T-box específico

TCF1: factor de células T1

TEA: trastorno del espectro autista

TFRC: receptor de transferrina

TGF- β : factor transformante de crecimiento beta

Thy1: tu-1 antígeno de superficie celular

TIP: proteínas inducidas por la tensión

TM: transmembrana

TNF: factor de necrosis tumoral

TSPAN-29: tetraspanina 29

U

UA: uniones adherentes

UFC: unidad formadora de colonias

V

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1

Y

YAP: proteína asociada al sí

Z

ZP: zona pelúcida

Prólogo

El impacto de los cultivos de células madres (CMs) se ha reflejado en múltiples aplicaciones a través del tiempo, desde el análisis, la caracterización de vías, moléculas y mecanismos de señalización, implicados en patologías humanas, hasta el descubrimiento de nuevos fármacos y blancos terapéuticos utilizados como solución para estas. Los avances en tecnologías de punta han permitido el desarrollo de nuevos equipos, materias primas y nuevas técnicas moleculares que actualmente facilitan la aplicación de cultivos de CMs en terapias celulares para el tratamiento de enfermedades crónicas y la regeneración de tejidos. En las nuevas técnicas y metodologías de cultivos celulares se busca lograr reproducibilidad, exactitud y precisión, con el fin de diseñar cultivos que imiten las condiciones en que las CMs se encuentran *in vivo*, que permita lograr una mayor certeza e impacto en su aplicabilidad, así como en el diseño de materiales ambientalmente sostenibles y de fácil manipulación.

El avance en los cultivos de CMs se ve reflejado en la creación de bancos públicos de aislamiento, identificación y criopreservación de CMs de sangre de cordón umbilical. Colombia se constituye en el cuarto país después de México, Brasil y Argentina en el que se proyecta actualmente el tratamiento de enfermedades huérfanas, crónicas y metabólicas en poblaciones vulnerables (trasplantes alogénicos) o en los mismos donantes de CMs (trasplantes autólogos). El programa Cordial, desarrollado por el Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS), desde el año 2011 fomenta la donación de sangre de cordón umbilical por parte de maternas en diferentes regiones de Colombia, con el propósito de obtener la mayor diversidad genética y así disminuir los costos de importación de CMs, lo cual mejore la disponibilidad y la oportunidad en los tratamientos, además

de implementar una base de datos que facilita la búsqueda de CMs teniendo como criterio principal la compatibilidad. De esta manera, los cultivos de CMs se convierten en una herramienta útil para el avance en diferentes áreas del conocimiento.

1. Cultivo de células madre: aislamiento e identificación

Ruth Mélida Sánchez Mora

Una célula madre (CM) o célula troncal se caracteriza por ser relativamente indiferenciada, conservando la capacidad de dividirse y proliferar a lo largo de la vida posnatal, con el fin de proporcionar células progenitoras que pueden diferenciarse en células especializadas no solo morfológicamente, sino también funcionalmente.

1.1 Clasificación de las células madre

De acuerdo con el tejido y la etapa en que se aíslan, las CMs se clasifican en células madre embrionarias (CMEs), las cuales se aíslan de un embrión en el estadio de blastocisto, por lo que poseen un alto grado de potencialidad y diferenciación en diversos tipos celulares. Sin embargo, su aislamiento representa una discusión bioética, lo que ha limitado los avances en investigación. Como alternativa se han centrado los estudios en las células madre adultas (CMAs), dentro de las cuales las más relevantes son las células madre mesenquimales (CMMs) que se obtienen a partir de tejidos especializados adultos tales como la médula ósea (MO), el tejido adiposo, epitelial y dental, en los que las CMMs desempeñan funciones de regeneración, recambio celular y mantenimiento de la homeostasis. Las CMMs, a pesar de sus múltiples ventajas, tienen potencial de diferenciación y periodo de vida más limitados en comparación con las CMEs (véase la figura 1).

Como otra opción se han generado las células madre pluripotentes inducidas (CMPis) por medio de la reprogramación genética de CMAs a través de la inser-

ción de genes. Las CMMs se constituyen en las más estudiadas y con una amplia variedad de aplicaciones, debido a su fisiología, potencial de regeneración, diferenciación en múltiples tejidos esqueléticos y capacidad terapéutica; por estas razones las CMMs serán tema central de este libro.

Las CMs también se clasifican de acuerdo con su potencial de diferenciación en:

- *Multipotentes*. Son CMs con un potencial de diferenciación restringido solo a células que conforman la capa germinal de la que son aisladas; por ejemplo, las CMMs que se obtienen del mesodermo y dan origen a huesos, tejido conectivo, tejido muscular y tejido sanguíneo, entre otros.
- *Pluripotentes*. Son CMs capaces de diferenciarse en células que conforman las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), sin embargo, no pueden formar tejidos extraembrionarios, como, por ejemplo, las CMEs y CMPis.
- *Totipotentes*. Son CMs con potencial para diferenciarse en las tres capas germinales y tejidos extraembrionarios, como, por ejemplo, el cigoto (véase la figura 1) (1).

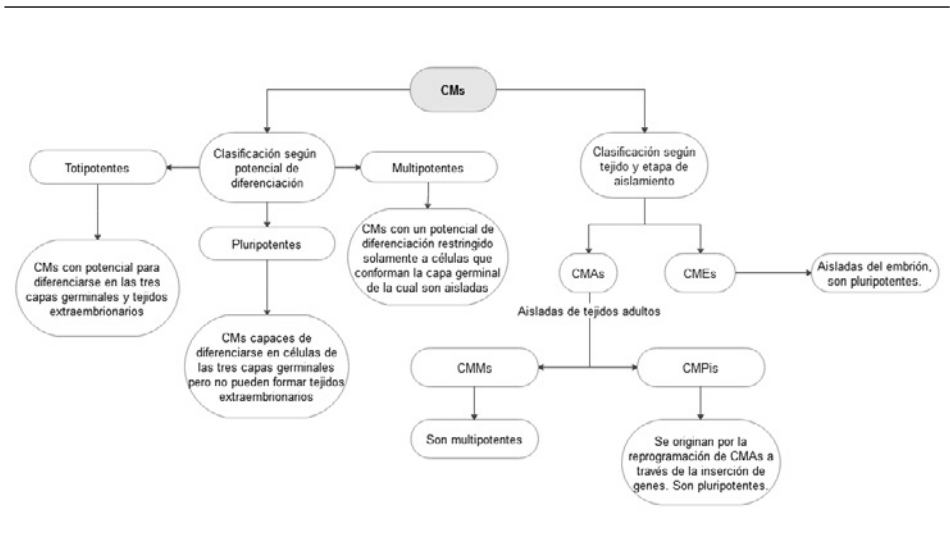


Figura 1. Clasificación de células madre. Las células madre se clasifican por potencial de diferenciación y según tejido y etapa de aislamiento. Como se observa, cada una de ellas presenta diferentes características dependiendo del linaje. **Fuente:** elaboración propia.

I.2. Aspectos preliminares del cultivo de células madre

El cultivo de CMs tiene como objetivos principales mantenerlas y/o autorrenovarlas y diferenciarlas *in vitro*. Esto se logra por medio del control de los factores externos o del microambiente celular, al modificar moléculas, proteínas y la expresión de factores de transcripción. El cultivo se puede diseñar de acuerdo con los requerimientos y las aplicaciones que se le desee dar, ya sean en clínica o en investigación.

Para realizar un cultivo de CMs se debe seguir una serie de etapas. Inicialmente, se debe obtener una muestra adecuada y representativa a fin de aislar las CMs, para lo cual se emplean métodos y tratamientos ya sean físicos, químicos y/o enzimáticos. La muestra obtenida se cultiva con la finalidad de proliferar o expandir las CMs y así facilitar su caracterización por medio del cumplimiento de diferentes criterios de identificación. Finalmente, si es requerido se realiza la inducción celular a través de medios enriquecidos o químicamente modificados. Para comprender los cultivos de CMs es necesario conocer la composición en cuanto a su microambiente y matriz extracelular (MEC), que son aspectos fundamentales para la proliferación y diferenciación de CMs, debido a que estos regulan el comportamiento celular.

I.2.1 Microambiente, microentorno o nicho

El microambiente lo conforman todos los elementos que rodean a las CMs, dentro de los cuales se encuentran diferentes tipos celulares ya diferenciados, la MEC y una gran variedad de biomoléculas (véase la figura 2). El microambiente se considera un factor fundamental en el desarrollo de una CM debido a que su composición modula su destino, la autorrenovación o la diferenciación. En el ser humano las CMs se encuentran confinadas en diferentes microambientes que les permiten su diferenciación a células requeridas; un ejemplo representativo es la médula ósea (MO), la cual se constituye en el microambiente para las células madre hematopoyéticas (CMHs) (2).

Las CMs en un microambiente perivascular (vaso sanguíneo) interactúan con células diferenciadas por medio de moléculas de adhesión como las cadherinas

y las integrinas. La unión a la MEC esta mediada por receptores y moléculas de señalización que pueden incluir factores autocrinos, paracrinos y endocrinos. Otra variable es la tensión de O_2 que puede influir en el desarrollo de las CMs, pues la capacidad de responder a los cambios de la tensión de oxígeno dentro de un rango fisiológico depende de la activación de una familia de factores de transcripción. Los mecanismos de acción no han sido esclarecidos, pero se postula que la tensión de oxígeno interviene en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación durante los estadios tempranos del desarrollo embrionario (véase la figura 2) (2).

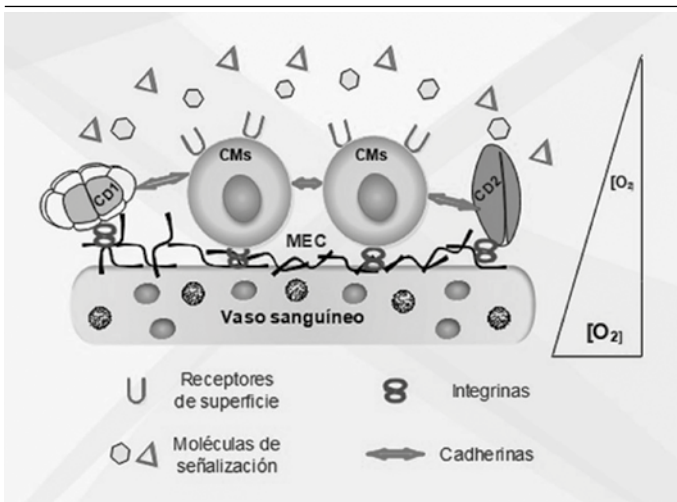


Figura 2. Microambiente de células madre. Las células madre en un vaso sanguíneo interactúan con otras células diferenciadas (CD1, CD2) por medio de las cadherinas. La unión de las células madre a la MEC es mediada por receptores, como, por ejemplo, las integrinas, y moléculas de señalización.

Fuente: elaboración propia.

1.2.2 Matriz extracelular

La MEC se constituye en uno de los componentes más esenciales del microambiente. Es una red de proteínas fibrilares y polisacáridos que anclan las células dentro de su microentorno específico, de modo que regulan el comportamiento celular durante la reparación de tejidos (véase la figura 3). Las principales pro-

propiedades físicas de la MEC son la topografía, la porosidad y la rigidez, las cuales influyen en la propagación, división y migración celular; además, posee señales bioquímicas que tienen un impacto en el fenotipo celular (3).

La capacidad de adherencia celular es una característica importante y dinámica. Abarca desde proyecciones de membrana como los filopodios, activados por actina y encargados de sondear el ambiente externo, hasta proteínas transmembranales como las integrinas, las cuales tienen afinidad por ligandos específicos provenientes de la MEC, de manera que generan una unión entre la MEC y el citoesqueleto de actina de las CMs que forma un espacio intermedio donde se encuentran proteínas absorbidas. En conjunto, estas interacciones activan cascadas de señalización, como, por ejemplo, la vía de señalización que permite la contractilidad actina-miosina, lo cual facilita el agrupamiento de integrinas y la adhesión celular, con lo que se permite la remodelación de la MEC; esta vía es regulada por la fosforilación de la enzima cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) generada por la activación de la proteína G a través de la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK) (3).

Otras vías de señalización bioquímica activadas y que son importantes en la función de la MEC son las vías mediadas por receptores mecanosensibles (como la proteína Talin) y transmitidas, finalmente, por medio de señales mecánicas. Como se ha evidenciado en las interacciones célula-célula y célula-MEC, se transmiten fuerzas mecánicas que alteran la conformación del citoesqueleto celular, de modo que distorsionan la envoltura nuclear al aplanar y extender los poros nucleares y permiten así el acceso de reguladores transcripcionales como la proteína asociada al sí (YAP) y el coactivador transcripcional (TAZ) a distintos sitios de cromatina. Esto genera cambios en el fenotipo celular (véase la figura 3). La fuerza mecánica también proviene de fuentes externas tales como fuerzas de tracción, compresión o esfuerzos cortantes que impactan y regulan el comportamiento celular, tal como se evidencia en la migración celular a regiones de diferente rigidez. Este comportamiento se denomina “durotaxis” y depende del tipo de célula, en el caso de las CMs que migran a regiones rígidas (3).

Otros factores físico-mecánicos que contribuyen a la regulación del destino celular son el confinamiento y las señales geométricas. El confinamiento es un

aspecto relevante, ya que *in vivo* las CMs se encuentran en distintos grados de confinamiento que inducen variaciones conformacionales del citoesqueleto y el núcleo que permiten la formación de fibras, estimulando la propagación y la migración celular. En cuanto a la topografía se debe tener en cuenta la forma, el tamaño y la curvatura del sustrato que influye en la membrana plasmática y en la formación de filamentos de actina, lamelipodios y filopodios de las CMs por medio de diferentes vías de señalización, afectando la migración celular (3).

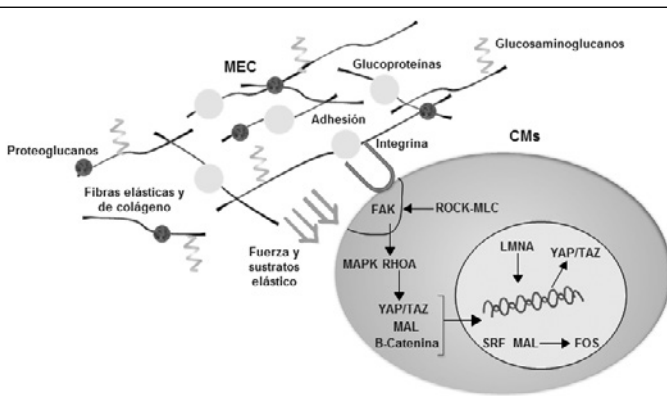


Figura 3. Ruta de mecanotransducción. Las rutas del mecanotransducción dentro de las células madre regulan los fenotipos y destinos celulares. Se muestra la activación de señales bioquímicas por la interacción de fuerzas mecánicas y factores de transcripción. **Fuente:** elaboración propia.

Finalmente, los factores físico-mecánicos son fundamentales en el momento de diseñar sistemas de cultivo celular *in vitro*. Actualmente es posible manipular las propiedades de los materiales e insumos a usar como sustratos (humectabilidad y la elasticidad de la superficie), empleando estrategias químicas que permiten mejorar la adsorción de proteínas y la adhesión celular.

1.3 Aislamiento de células madre para cultivo

El primer paso para el cultivo de CMs es realizar un adecuado aislamiento que permita obtenerlas en óptima cantidad y calidad. Existen diversos tejidos de los que es posible aislar CMs como lo son la médula ósea, el cordón umbilical, el líquido

amniótico, la membrana amniótica, los tejidos dentales, el endometrio, el brote de la extremidad, la sangre menstrual, la sangre periférica, la placenta, la membrana fetal, la glándula salival, la piel y el prepucio, la membrana de revestimiento del cordón umbilical subamniótico, el líquido sinovial, la gelatina de Wharton, los tejidos dentales (encía, pulpa, papila y folículo dental) y el tejido adiposo; por esto existen diferentes métodos de aislamiento de acuerdo con el tejido (véase la tabla 1).

Tabla 1. Fuentes de obtención de células madre y métodos de aislamiento

Fuente	Método de aislamiento
Médula ósea	Método de gradiente de densidad de Ficoll. Nuevo dispositivo de filtro de médula ósea.
Tejido adiposo	Método de digestión. Método de filtración por membrana.
Líquido amniótico y membrana	Método de gradiente de densidad. Método de digestión.
Tejidos dentales	Método de digestión.
Endometrio	Método de digestión.
Brote de la extremidad	Método de digestión.
Sangre periférica	Gradiente de densidad Ficoll.
Placenta y membrana fetal	Método de digestión.
Glándula salival	Método de digestión.
Piel y prepucio	Método de digestión.
Membrana de revestimiento del cordón umbilical subamniótico	Método de digestión.
Líquido sinovial	Método de gradiente de densidad Ficoll.

Fuente: elaboración propia.

1.3.1 Método de gradiente de densidad de Ficoll

El Ficoll-Paque es un medio en gradiente de densidad que permite el preenriquecimiento de células mononucleares y así mejorar el aislamiento de CMMs a partir de sangre periférica y/o MO (véase la figura 4). Inicialmente, la muestra con anticoagulante EDTA o heparina debe ser centrifugada a 3500 rpm durante 20 minutos. La capa de leucocitos obtenida se debe diluir (1: 1) con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) y se coloca en capas sobre la solución de

Ficoll Paque. Se realiza de nuevo un ciclo de centrifugación a 1500 rpm durante 15 minutos. Las células mononucleares aisladas se cultivan en una densidad de 20×10^6 células, en medio (DMEM), suero fetal bovino (SFB) al 15 % y antibióticos (penicilina-estreptomicina) al 1 %. El medio de cultivo se debe cambiar cada dos días descartando las células no adheridas. Luego se desecha el sobrenadante y se centrifugan las células adheridas, las cuales se transfieren a medios nuevos de DMEM, SFB al 15 % y antibiótico al 1 %. Los pases se realizan utilizando tratamiento enzimático con tripsina (véase la figura 4) (4).

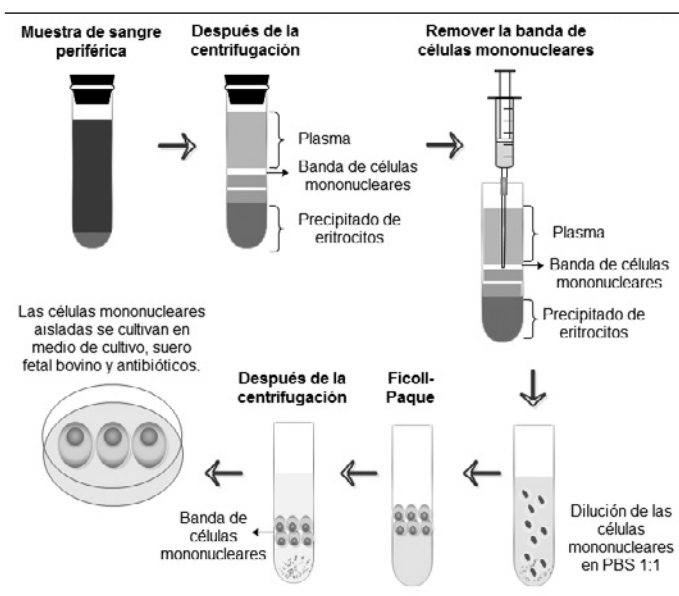


Figura 4. Esquema del método de gradiente de densidad de Ficoll-Paque. Se observa el aislamiento de las células madre a partir de la solución de Ficoll Paque por medio de gradiente de densidad que permite el preenriquecimiento de células mononucleares. **Fuente:** elaboración propia.

1.3.2 Método de dispositivo de filtro de médula ósea

Algunos dispositivos de filtro son utilizados en el aislamiento de CMs provenientes de MO. Estos permiten separar fragmentos de hueso, partículas de grasa y cúmulos grandes de células, caracterizándose por un sistema desechable cerrado, lo cual representa una ventaja sobre el método de gradiente de densidad de Ficoll (5, 6).

Los filtros de reducción de leucocitos (FRL) son los más utilizados debido a su mayor rendimiento respecto al tiempo de obtención de CMs. Inicialmente, la muestra de médula ósea es filtrada con los FRL empleando una jeringa, en condiciones de esterilidad. En seguida se deben realizar dos lavados del filtro con PBS con el fin de reducir la contaminación por los glóbulos rojos. Por último, para recuperar las CMs se realiza un lavado en dirección inversa con una solución de dextrano estéril (véase la figura 5) (6).

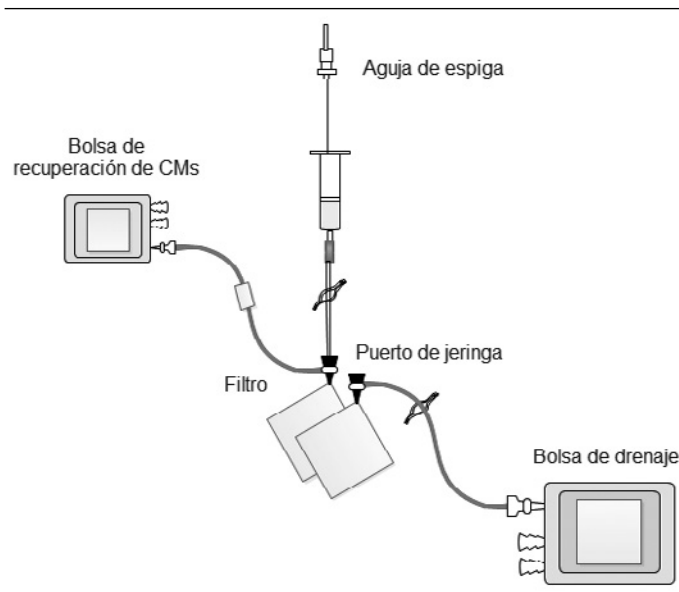


Figura 5. Dispositivo de filtro para médula ósea. Esquema de un prototipo dispositivo de filtro de médula ósea. Sistema de dos bolsas con un filtro de leucocitos integrado. **Fuente:** elaboración propia.

Por otra parte, los dispositivos de microfiltración se encuentran conformados por una matriz uniforme de 160 000 poros de 7 μm en un área de 9 mm de diámetro; demuestran una gran eficiencia de recuperación y enriquecimiento de CMs al separar las células por tamaño de acuerdo con la dimensión de los poros (7 a 8 micras), reteniendo células viables; su proceso es rápido, simple y no requiere instrumentos de alta complejidad (7). Inicialmente, se debe establecer el número de células nucleadas en la muestra de MO, enseguida la muestra debe filtrarse en un filtro de células de 70 μm para eliminar partículas

de mayor tamaño. Posteriormente, se realiza una dilución 1/1 con tampón de prefijación. Esta mezcla se incuba a temperatura ambiente por 15 minutos y luego se filtra en un microfiltro con una frecuencia de 5 mL/l minuto; las CMs deben quedar fijas en el filtro y podrán usarse según los requerimientos (véase la figura 6) (7).

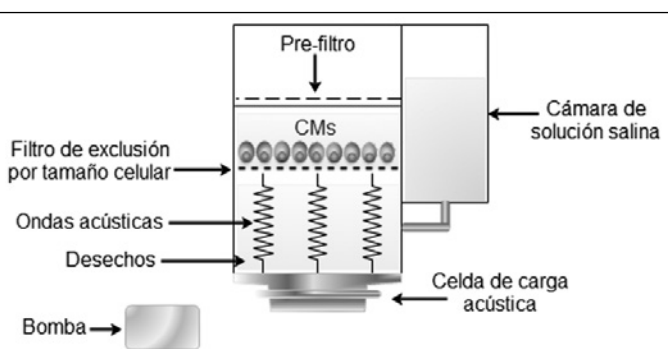


Figura 6. Esquema interno de un prototipo de dispositivo de filtro de médula ósea. Se inyecta la MO aspirada en la unidad de filtro. Inicialmente, se realiza un prefiltrado en el que se eliminan desechos de mayor tamaño. En el filtro de exclusión de células por tamaño es necesario aplicar ondas acústicas con el fin de generar uniformidad en la suspensión celular para que las células de menor tamaño, como, por ejemplo, los eritrocitos y las plaquetas, atraviesen el filtro y queden retenidas las células madre. **Fuente:** elaboración propia.

1.3.3 Método de digestión (colagenasa)

El método de digestión es comúnmente utilizado para aislar CMs de tejido adiposo. El lipoaspirado es la muestra ideal y la enzima comúnmente utilizada es la colagenasa, la cual es ideal usar diluida con PBS: se reconstituye 0,01 g de colagenasa en 10 mL de PBS (véase la figura 7) (8, 9). Inicialmente, el lipoaspirado se debe digerir a 37 °C durante 45 minutos en medio de cultivo con 1mg/mL de colagenasa tipo I y 2 % de albúmina de suero bovino (ASB). A continuación, se detiene la actividad enzimática de la colagenasa adicionando medio completo y centrifugando a 1200 rpm durante 10 minutos, con el fin de obtener en el sedimento la fracción vascular estromal (FVS). En seguida, el sedimento se resuspende en 5 mL de NH_4Cl a 160 mM y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente para lisar los glóbulos rojos contaminantes.

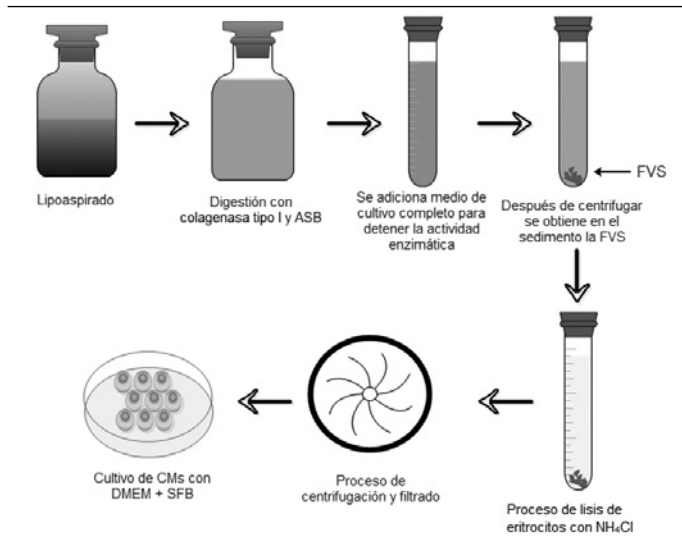


Figura 7. Método de digestión con colagenasa. Se observa el esquema general del método de aislamiento de células madre por medio de la actividad enzimática de la colagenasa. **Fuente:** elaboración propia.

A fin de eliminar los residuos celulares del FVS se centrifuga y se filtra a través de una malla de nailon de 70 μm . Luego debe incubarse en caja con medio completo (6 mL) a 37 °C con 5 % de CO₂, hasta que las células tengan una confluencia del 90 %; para realizar los pases las células deben ser tratadas con tripsina-EDTA al 1 %. Las células se recogen y se centrifugan durante 1 minuto a 1200 rpm, el sobrenadante se descarta y las células se resuspenden en 10 mL de medio completo y son incubadas en cajas a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta una confluencia del 80 %. La viabilidad celular se debe determinar mediante tinción con azul de tripano a las 0 h, 72 h y 10 días (10).

1.3.4 Método de filtración por membrana

El método de filtración por membrana permite el aislamiento de CMs en condiciones específicas, por ejemplo, CMEs. Los filtros poseen diversos tamaños de poro y los más relevantes son de 5 a 8 μm ; se ha descrito que estos filtran en función del tamaño celular, por lo cual permiten enriquecer las CMEs (véase la figura 8) (11).

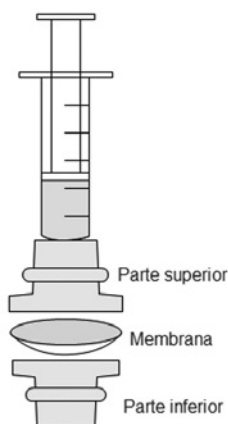


Figura 8. Esquema del sistema de filtración. Se observa la composición interna del filtro. La parte superior y la parte inferior albergan la membrana de filtración. **Fuente:** elaboración propia.

El método de filtración por membrana también ha sido empleado para el aislamiento y la purificación de CMs de tejido adiposo. Después de obtener la FVS (conocida como solución de alimentación - S_a) con un número total de 1×10^6 células en 18 mL, se realiza un proceso de filtración mediante filtros de malla de nylon con tamaño de poro de 11, 20, 41, 60 y 80 μm , a 25 °C, con una frecuencia de 1-1,2 mL/min; la solución que se obtiene se denomina solución de permeado. Se deben evaluar por citometría de flujo el número de células y sus respectivos marcadores en la solución de alimentación y solución de permeado - S_p (12).

Para recuperar las células que se adhirieron al filtro de malla se debe invertir el soporte de membrana y se filtra con DMEM-SFB al 12 % (conocida como la solución de recuperación - S_r) a una frecuencia de 1-1,2 mL/min a 25,0 °C. La solución obtenida debe evaluarse por citometría de flujo teniendo en cuenta los criterios empleados en las soluciones anteriores (cantidad y marcadores celulares) (12):

- la tasa de permeado es descrita como: $(S_p/S_a) \times 100$;
- la tasa de recuperación es descrita como: $(S_r/S_a) \times 100$;
- tasa residual: $100 - [\text{tasa de recuperación} + \text{tasa de permeado}]$.

También existen filtros elaborados en policarbonato con un tamaño de poro estándar de 4-5 μm (véase la figura 9), los cuales se utilizan mediante un dispositivo

de filtración de membrana giratoria controlado por computadora portátil que consiste en tres bombas, cinco pinzas, cuatro balanzas de pesaje y un mecanismo impulsor. Las muestras de las que se aislarán las CMs se transfieren mediante una jeringa equipada con una cánula (13).

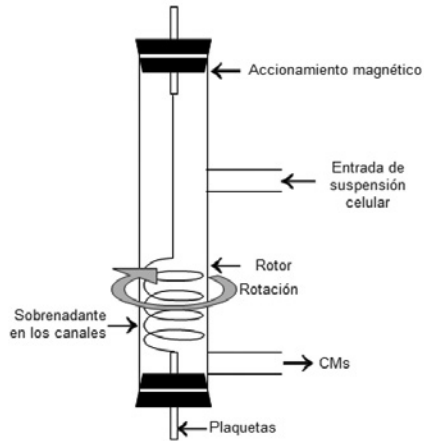


Figura 9. Esquema de la caja que alberga la membrana del filtro de policarbonato. Se muestra el esquema y el funcionamiento general del sistema que contiene la membrana de filtro de policarbonato. **Fuente:** elaboración propia.

Actualmente se describe la ultrafiltración de exosomas. Los exosomas son estructuras vesiculares extracelulares con un diámetro de 40 a 100 nm, formadas en el interior de las CMMs, contienen citoquinas y factores de transcripción con secreciones paracrinas e inmunomoduladoras durante la angiogénesis, la comunicación célula-célula y la regeneración de tejidos (17). Se pueden caracterizar por la expresión de proteínas de superficie de membrana marcadoras específicas de la superfamilia de proteínas tetraspanina, tales como CD9, CD63 y CD81, importantes para la formación y el transporte dentro de la célula, así como para el reconocimiento de las células diana. Los exosomas permiten colocarse en el tejido afectado por lesiones, como, por ejemplo, quemaduras, en las que se han evidenciado mejores efectos que con las CMMs (14).

Cuando se alcance una confluencia celular de 80-90 % de las CMMs, se debe realizar un lavado en agitación con medio DMEM bajo en glucosa y sin SFB, se les agrega medio y las células se incuban a 37 °C y 5 % de CO₂. Después de cultivar

adecuadamente las CMMs se realiza una ultracentrifugación a 100 000 gravedades durante la noche a 4 °C. Se recoge el sobrenadante y se centrifuga a 2700 gravedades por cinco minutos y luego se pasa por un filtro de 0,2 µm para retirar residuos celulares, de modo que queda apto para el proceso de ultrafiltración (14).

La ultrafiltración permite aislar los exosomas de acuerdo con el tamaño, 10-20 mL del sobrenadante se colocan en un filtro ultra y se centrifuga a 2700 gravedades hasta que se obtiene 100-200 µL del producto filtrado, el cual se lava en 4 mL de PBS y se centrifuga de nuevo a 2700 gravedades en centrífuga refrigerada; el lavado junto con el proceso de centrifugado se repite tres veces. El producto filtrado se concentra y se usa según los requerimientos (14).

En los últimos años el aislamiento de CMEs ha representado uno de los mayores desafíos para la ciencia, pues el tejido de obtención es la masa celular interna (MCI) del embrión humano, de modo que se han implementado métodos para aislar un solo blastómero sin destruir el embrión humano (15). Algunas técnicas utilizadas son la disección mecánica, en la que la MCI se aísla por presión mecánica. Representa una forma efectiva de derivar nuevas líneas de CMEs, no requiere componentes xeno (de origen animal) y su ejecución requiere de múltiples y complejas acciones. La disección con láser es bastante prometedora, pero es de costo elevado. Por otra parte, la inmunocirugía permite obtener una cantidad adecuada de la MCI, pero requiere componentes xeno como medios de cultivo con suero de cobaya, lo cual lo excluye de futuras aplicaciones a escala clínica. La microdisección de blastocistos humanos usando agujas finas es de fácil manipulación, pero ofrece baja tasa de rendimiento. Por último, la minimización de la proliferación de células trofoblásticas permite obtener CMEs de embriones normales, anormales, congelados y descongelados. Además, ofrece una tasa de rendimiento de solo el 50 % (15). Después del aislamiento de la MCI, las CMEs se cultivan utilizando capas de alimentación, matrices extracelulares, proteínas, péptidos y polímeros sintéticos (15).

1.4 Identificación de células madre

La caracterización de CMs es fundamental, ya que de esto depende la calidad de las células aisladas para futuras aplicaciones. Según la International Society of Ce-

llular Therapy (ISCT) existen cuatro criterios de identificación y caracterización específicos para CMMs:

- adherencia al plástico en 24 horas bajo condiciones estándar de cultivo;
- morfología fibroblastoide a las 30 horas de incubación bajo condiciones estándar;
- determinar la expresión de más de 95 % de marcadores celulares de CMAs y CMMs, mediante citometría de flujo, inmunofluorescencia indirecta e inmunohistoquímica (véase la tabla 2).
- posible diferenciación hacia tejido adipogénico, condrogénico y osteogénico.

En la tabla 2 se relacionan los principales tejidos empleados como fuentes de obtención de CMMs y los marcadores de superficie que deben ser positivos o negativos.

Tabla 2. Marcadores de superficie celular de acuerdo con la fuente de extracción

Fuente	Marcadores de superficie celular	
	Positivo	Negativo
Médula ósea	CD73, CD90, CD105, STRO-1	CD14, CD34, CD45, HLA-DR
Tejido adiposo	CD73, CD090, CD29, CD44, CD71, CD105, CD13, CD166, STRO-1	CD14, CD31, CD34, CD45
Líquido amniótico y membrana	CD29, CD44, CD90, CD105, CD, SH2, SH3, HLA-DR	CD10, CD14, CD34, HLA-DR
Tejidos dentales	CD29, CD44, CD90, CD105	CD14, CD34, CD45
Endometrio	CD73, CD90, CD105, CD146	CD34, CD45
Brote de la extremidad	CD13, CD29, CD90, CD105, CD106	CD3, CD4, CD14, CD15, CD34, CD45, HLA-DR
Sangre periférica	CD44, CD90, CD105, HLA-ABC	CD45, CD133
Placenta y membrana fetal	CD29, CD73, CD90, CD105	CD34, CD45
Glándula salival	CD13, CD29, CD44, CD90, STRO-1	CD34, CD45
Piel y prepucio	CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, SSEA-4, Vimentina	CD34, CD45, HLA-DR

Continúa en la página 36

Fuente	Marcadores de superficie celular	
	Positivo	Negativo
Membrana de revestimiento del cordón umbilical subamniótico	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105	CD34, CD45
Líquido sinovial	CD44, CD90, CD105, CD147, STRO-1	CD31, CD34, CD45, CD106
Gelatina de Wharton	CD73, CD90, CD105	CD14, CD34, CD45, CD79, HLA-DR

Fuente: elaboración propia.

Para un adecuado aislamiento de CMMs es necesaria la identificación de antígenos de superficie, comúnmente denominados marcadores celulares e inmunofenotipo de CMMs, que son específicos según el tejido del cual fueron aislados, con el fin de asegurar que la población de células obtenidas corresponde realmente a CMMs y así realizar una adecuada purificación. Actualmente existen marcadores generales que son comunes en todas las CMMs, los cuales son CD90, CD73, CD105, STRO 1 y CD106; sin embargo, muestran diversas limitaciones (19).

1.4.1 CD90 (cluster of differentiation 90)

Es una proteína que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas, también conocida como Thy1. Está compuesta por 110 aminoácidos, se encuentra unida a un grupo glicosilfosfatidilinositol por medio de dos ácidos grasos saturados que permite su anclaje a la superficie de la membrana celular. Juega un papel importante en interacciones célula-célula y células-MEC al ligando-receptor (correceptor en adherencias focales: sindecan-4, trombospondina y glicanos sulfatados) para diversas integrinas (integrina α v β 3) y otros receptores. Estas interacciones confieren la posibilidad de modular ciertas vías de señalización, como, por ejemplo, proteínas quinasas de la familia Cbp/Csk/Src, Fas, PPAR γ , y la unión-captación de exosomas derivados de CMMs (16, 17). Actualmente, se ha descrito su función como regulador de la diferenciación a células de tres linajes: ectodermo, mesodermo y endodermo. Sin embargo, se observan dos limitaciones relevantes: 1) inespecificidad, presenta expresión en células de origen vascular, linfático, neuronal, CMHs y fibroblastos; 2) inestabilidad evolutiva, no es una proteína conservada entre especies, por lo cual las técnicas de identificación

en las que se emplean anticuerpos no reaccionan adecuadamente con CMMs de otras especies (16).

Se han descrito otras funciones a este marcador tales como ser un detector mecano sensible, supresor tumoral y regulador del desarrollo del hueso y el hígado. Su desregulación se ha asociado a estados patológicos como cáncer, fibrosis pulmonar, glomerulonefritis, etc. (17), por lo cual se ha sugerido que la funcionalidad de Thy1 depende del contexto, pues puede encontrarse en formas solubles (18). Además, se ha establecido que es diez veces más abundante que proteínas de adhesión y 100 veces más abundante que las proteínas de señalización convencionales.

El Thy1 se encuentra en el cromosoma 11q22.3, e inicialmente se traduce a un polipéptido de 161 aminoácidos, el cual sufre diversas modificaciones postranscripcionales: 1) los primeros 19 aminoácidos representan una señal que guía el péptido a la membrana celular y luego son eliminados; 2) ocurren N-glicosilaciones en 2-3 sitios del polipéptido. Los carbohidratos conforman un 30 % de Thy1 y su composición varía de acuerdo con el tejido (véase la figura 10) (18).

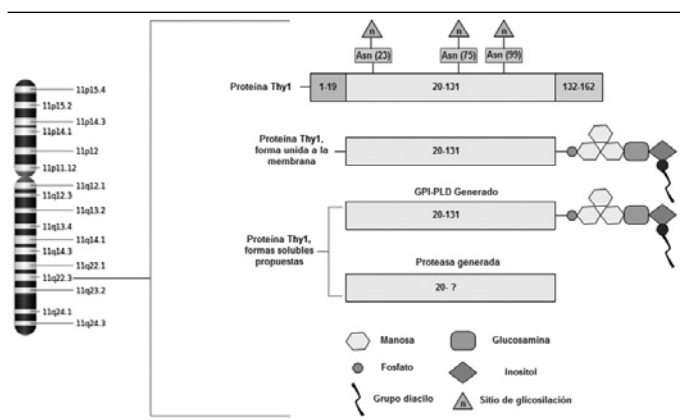


Figura 10. Molécula Thy-1 y formas solubles propuestas. La Thy-1 codificada en el cromosoma 11q22.3 se genera, inicialmente, como una forma proteica de 161 aa. El fragmento inicial de 19 aa se elimina y el terminal de 29 aa se reemplaza con un anclaje GPI que genera la forma madura, la cual se ancla a la superficie externa de la membrana celular mediante el grupo diacilo del anclaje GPI. **Fuente:** elaboración propia.

Thy1 se encuentra inicialmente en la superficie celular y luego se introduce en la membrana, donde es separado el dominio transmembrana C-terminal y se une a glicofosfatidilinositol (GPI) en el residuo I31. Existe Thy1 en forma soluble debido a que hay una forma alternativa de empalme del ARNm que anula el anclaje a GPI, o también puede existir una enzima que separe Thy1 de la superficie celular (18).

1.4.2 CD73 o 5'-nucleotidasa

El CD73 es una ecto-5'-nucleotidasa que convierte el monofosfato de adenosina extracelular en adenosina (16). Se caracteriza por que en CMMs tiene como epítopes específicos los dominios SH3 y SH4. Existen reportes en los que se muestra que el CD73 se expresa en otros tipos celulares como células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, linfocitos, células de músculo liso y fibroblastos; es diferente al expresado en CMMs (19). Otra característica de CD73 es su persistencia durante el desarrollo del cultivo, sin embargo, todavía no existe una evidencia clara de que cualquier tipo de anticuerpo anti-CD73 pueda detectar específicamente CMMs *in vivo* (16).

CD73 se encuentra unida a glicosilfosfatidilinositol (GPI), presente entre los lípidos de la membrana (20). Su expresión ha sido asociada a características celulares específicas como la capacidad de formación de esferoides, potencial de diferenciación bipotente en tipos de células epiteliales y endoteliales, capacidad clonogénica y generación *in vivo* de carcinomas, por lo cual su sobreexpresión ha sido observada en neovascularización tumoral, invasividad y metástasis (20); CD73 actúa durante la agresión tisular aguda o la hipoxia causando la defosforilación de adenosina trifosfato (ATP) en adenosina (21). Además, participa en la supresión de las respuestas mediadas por el sistema inmunitario y promueve la función inmunosupresora de las CMMs.

1.4.3 CD105 o endoglina

La endoglina, también llamada CD105, es una glicoproteína de membrana de tipo I que funciona como receptor tipo III del ligando de la superfamilia de

factor de crecimiento β -transformante (TGF- β); tiene un peso de 180 kDa y se encuentra constantemente fosforilada (16). Se caracteriza por expresarse en diversas células, como, por ejemplo, las endoteliales y los sincitiotrofoblastos (componen la placenta en su fase final), en los cuales se expresa, en gran cantidad, mientras que en condrocitos, fibroblastos, monocitos y CMHs es menos abundante (16). Se caracteriza, principalmente, por participar en el desarrollo de procesos de angiogénesis, desarrollo vascular y el mantenimiento de la integridad de la pared vascular (23). La sobreexpresión de la endogлина está asociada con la proliferación de células endoteliales activas y procesos de neovascularización y angiogénesis activa como en la regeneración e inflamación de tejidos o tumores (23, 24).

CD105 es una proteína con un gran dominio extracelular que contiene una zona pelúcida (ZP) constituida por 260 aminoácidos en la región yuxtamembrana y un dominio NH₂ huérfano β -terminal (N-ter) (25). La unión de puentes disulfuro le permite a la CD105 formar dímeros y monómeros; además, al dominio extracelular se encuentran enlazados glicanos unidos a nitrógeno y oxígeno. El dominio citoplásmico se encuentra fosforilado en los residuos Ser/Thr y contiene una proteína de densidad post-sináptica 95/PDZ presente en el extremo carboxilo (C-terminal) (véase la figura 11) (25).

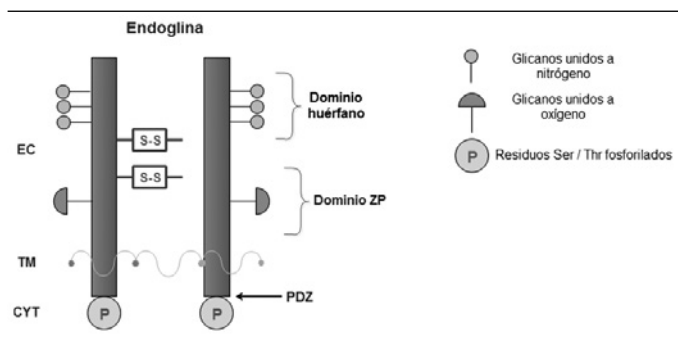


Figura 11. Representación estructural de CD105 (endogлина). Se indican los dominios citoplásmicos (CYT transmembrana y extracelular (EC) de la proteína. **Fuente:** elaboración propia.

El TGF- β es una citoquina pleiotrópica involucrada en la proliferación, diferenciación y migración celular. CD105 participa en la regulación de la señal-

zación de TGF- β 1 en células endoteliales, el cual, a su vez, reduce los niveles de fosforilación de CD105. Se ha observado que la inhibición de la expresión de CD105 mejora la capacidad de TGF- β 1 para suprimir el crecimiento, la migración y la capacidad de formar capilares de células endoteliales (23). Además, los niveles de CD105 regulan la expresión de diferentes componentes de la MEC, incluidos la fibronectina, el colágeno y el lumican; también se ha sugerido un papel crucial del CD105 en la trans migración celular de las CMs (23).

En CMMs recién aisladas de tejido adiposo el CD105 se expresa en un bajo nivel, pero durante los pases celulares se incrementa su expresión, por lo cual se ha sugerido que no es un marcador tan efectivo para la identificación de CMMs *in vivo* y después de su aislamiento (16).

1.4.4 STRO-1

El marcador proteico STRO-1 de las CMMs es una proteína tipo I que se traslada del retículo endoplasmático a la membrana celular en respuesta al agotamiento del calcio intracelular (26). Es el marcador más conocido de CMMs; en la literatura científica se ha reportado que las CMMs que expresan STRO-1 poseen la facilidad para desarrollar procesos de clonogenicidad, angiogénesis y potencial para diferenciarse a adipocitos, osteoblastos, condrocitos, células musculares lisas y fibroblastos, aunque existen excepciones (2, 26). Se cree que STRO-1 no es un marcador general de CMMs, debido a que no se expresa en todos los tipos de CMMs (especialmente en derivadas de sangre periférica), no hay un homólogo en otras especies (por ejemplo el ratón), se expresa en otras células y su expresión se disminuye durante la expansión del cultivo (exceptuando a las derivadas de MO), por lo cual se sugiere que STRO-1 es útil para la identificación de CMMs durante los pases iniciales (2). Se ha descrito que el anticuerpo anti STRO-1 tiene la capacidad de enriquecer la población de CMMs (16), sin embargo, en el caso de CMMs aisladas de MO existe una interferencia entre STRO-1 y glicoforina A, debido a que más del 95 % de las células STRO-1 (+) en la MO son glicoforina A que expresan células eritroides nucleadas (26).

1.4.5 CD106 (cluster of differentiation 106)

También denominado VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular-1) se expresa en el endotelio de los vasos sanguíneos y en las células adyacentes. En CMMs posiblemente VCAM-1 desempeña funciones durante la quimiotaxis, la adhesión celular y la transducción de señales. Se ha descrito que las CMMs que expresan STRO-1 y CD106 muestran características de multipotencialidad, expresión de telomerasa y alta proliferación *in vitro*, por lo cual ambos marcadores permiten una mejor identificación y selección de CMMs humanas (2).

Se ha descrito con mayor énfasis a CD106 como molécula de adhesión, responsable de la adhesión, comunicación célula-célula y orientación celular hacia las heridas y los tejidos dañados, aspectos fundamentales para la regeneración tisular (27). La expresión de CD106 es inversamente proporcional a la densidad celular de las CMMs, debido a que se regula al alza en las CMMs que crecen por debajo de altas densidades celulares; sin embargo, se ha descrito que la expresión de CD106 durante la alta densidad celular inhibe la capacidad migratoria de las CMMs; esta inhibición también ha sido correlacionada con la unión de CD106 a VLA-4 (integrina) (27). La estimulación con citoquinas inflamatorias, como, por ejemplo, el factor de necrosis tumoral (TNF) $-\alpha$ e IL-1 β , también inducen la expresión de CD106 (27).

La expresión de CD106 inducida por la alta densidad celular en CMMs es suprimida por los inhibidores de la I κ B quinasa (IKK), lo cual sugiere que el estímulo inducido por la densidad celular depende de la vía de señalización del factor nuclear- κ B (NF- κ B), el cual es, a su vez, activado por la adhesión célula-célula con N-cadherina (27). La N-cadherina tiene dos presentaciones: la de longitud completa y la truncada, ya que carece de su dominio intracelular (27). El incremento en la expresión de la N-cadherina de longitud completa estimula la expresión de CD106, debido a la alta densidad celular, mientras que la N-cadherina truncada inhibe la expresión de CD106. Por consiguiente, la expresión de CD106 en altas densidades celulares se encuentra mediada por la unión célula-célula a través de las dos formas de N-cadherina (27).

La cadherina es un factor importante en las uniones adherentes (UA) que pertenecen a la familia de proteínas transmembrana dependientes de calcio; N-cad-

herina es la predominante en CMMs y se encuentra asociada a regeneración, migración y formación de tejidos especializados. La sobreexpresión de N-cadherina de longitud completa regula la fosforilación del protooncogén tirosina-proteína quinasa Src, el cual mejora la alta densidad celular de las CMMs, además de regular positivamente a CD106 por la adhesión célula-célula; mientras la N-cadherina truncada no afecta la fosforilación de la quinasa Src (27).

Los tratamientos con inhibidores del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) suprimen la expresión de CD106 en CMMs, PDGF activa al receptor PDGFR, del cual existen dos isoformas: PDGFR α y β , siendo PDGFR β la más relevante. La adhesión célula-célula a través de N-cadherina en altas densidades celulares activa de manera independiente las vías de señalización intracelular Src y PDGFR β en CMMs, lo cual mejora la expresión de CD106 (véase la figura 12) (27).

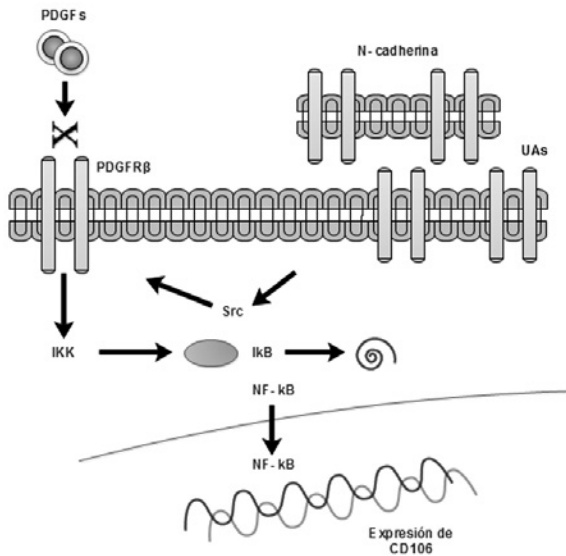


Figura 12. Expresión inducida de CD106. La expresión de CD106 en células madre mesenquimales depende de la densidad celular y aumenta a través de la activación de la vía NF- κ B por la adhesión célula-célula con N-cadherina en cultivos con altas densidades celulares. La fosforilación de la Src quinasa a través del dominio intracelular de la N-cadherina desempeña un papel importante en la regulación positiva de CD106. En la ruta de señalización intracelular de CMMs, la tirosina quinasa Src y el PDGFR β se activan de forma independiente del ligando por la N-cadherina a través de la adhesión célula-célula.

Fuente: elaboración propia.

Los antígenos de superficie son indispensables para la adecuada identificación de CMMs, además de cumplir con funciones biológicas importantes, como es el caso de las integrinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αV y $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$. Estas son moléculas de adhesión celular que permiten el desarrollo de procesos característicos de las CMMs, en este caso la integración tisular, *homing* y migración celular (véase la tabla 3).

La mayoría de marcadores celulares también se expresan en otros tipos celulares. Se ha descrito que los perfiles de expresión de estos marcadores son dependientes de las condiciones de aislamiento, cultivo, expansión y diferenciación, por lo cual la expresión de marcadores no refleja con exactitud la fisiología de las CMMs (28).

Tabla 3. Descripción general de la expresión de diferentes antígenos de superficie

Marcador	Función/localización
CD9	TSPAN-29 (tetraspanina 29)
CD10	MME (membrana metalo-endopeptidasa)
CD13	ANPEP (alanilaminopeptidasa)
CD24	HSA (antígeno estable al calor)
CD29	Integrina $\beta 1$
CD44	Células hematopoyéticas E-/L-ligando selectina
CD46	Proteína del cofactor de membrana
CD49a	Integrina $\alpha 1$
CD49b	Integrina $\alpha 2$
CD49c	Integrina $\alpha 3$
CD49e	Integrina $\alpha 5$
CD49f	Integrina $\alpha 6$
CD51	Integrina alfa-v
CD55	DAF (decaimiento-factor de aceleración)
CD56	NCAM I (molécula de adhesión celular neural I)
CD58	AL-3 (antígeno asociado a la función linfocítica 3)
CD59	Proteína inibidora de MAC (MAC-IP)
CD61	Integrina $\beta 3$
CD71	TFRC (receptor de transferrina)
CD72	LYB-2
CD73	Ecto-5'-nucleotidasa
CD81	Tetraspanina 28

Continúa en la página 44

Marcador	Función/localización
CD90	Thy1 (tu-1 antígeno de superficie celular)
CD90.2	Thy1.2
CD95	Fas
CD102	ICAM-2 (molécula de adhesión intercelular 2)
CD104	Integrina $\beta 4$
CD105	Endoglina = TGF β receptor III
CD106	VCAM 1 (molécula de adhesión celular vascular 1)
CD119	Interferón γ receptor alfa
CD120a	Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral. Miembro IA
CD124	Interleucina 4 receptor
CD146	MCAM (molécula de adhesión celular de melanoma)
CD166	Alcam = SB-10 (molécula de adhesión celular leucocitaria activada)
CD184	CXCR4. Receptor de SDF-1 alfa
HLA-ABC	HLA Clase I/MHC I
Sca-1	Antígeno de células madre-1
SH-2	Anticuerpo contra epítoto de CD105
SH-3	Anticuerpo contra epítoto de CD73
SH-4	Anticuerpo contra otro epítoto de CD73

Fuente: elaboración propia.

Es importante resaltar que también existe una serie de marcadores que no deben ser expresados por CMMs, por lo cual representan un criterio de exclusión (véase la tabla 4).

Tabla 4. Descripción general de la expresión de diferentes antígenos de superficie no expresado por células madre mesenquimales

Marcador	Células en las que se expresa
CD11b	Células inmunitarias
glicoforina-A	Células de linaje eritroide
CD45	Todas las células hematopoyéticas
CD34	CMH, rara vez se expresa en las CMM humanas
CD31	Células endoteliales y hematopoyéticas
CD117	Células progenitoras/hematopoyéticas

Fuente: elaboración propia.

2. Autorrenovación y mantenimiento de células madre

*Ruth Mélida Sánchez Mora
Andrea Viviana Gualteros Bustos*

La autorrenovación y el mantenimiento son aspectos importantes después de haber realizado un correcto aislamiento e identificación de una CM. La autorrenovación permite mantener indiferenciadas las CMMs, por lo cual es importante conocer los diferentes mecanismos que se llevan a cabo en el interior de la CM durante este proceso a fin de realizar un correcto mantenimiento.

2.1 Autorrenovación de las células madre

La autorrenovación es el proceso por el cual una CMM permanece en estado indiferenciado. Para comprender este proceso es necesario conocer la función ejercida por un conjunto de moléculas, bien sea extracelulares o bien intracelulares (véase la figura 13).

Un ejemplo de estas moléculas mediadoras de comunicación celular es el factor inhibidor de la leucemia (LIF), una citoquina pleiotrópica que activa y reprime las actividades de osteoblastos y osteoclastos. Sus funciones se encuentran reguladas por el entorno celular y, aunque sus mecanismos de acción son desconocidos, se ha sugerido que ejerce una interferencia paracrina con células adyacentes (2). Por otra parte, si bien el factor de crecimiento de fibroblastos (FCF) se caracteriza por prolongar la viabilidad de las CMMs en el cultivo, los mecanismos implicados son motivo de estudio en la actualidad

y se sugiere que existe una regulación autocrina que subyace a la función de autorrenovación del FCF (2).

Además, se sugiere que las proteínas de la vía de señalización Wnt también pueden regular la autorrenovación, de manera que permiten la expansión de cultivos de CMMs en un largo periodo de tiempo y ejercer funciones de mantenimiento y reconstitución de linajes hematopoyéticos y de CMs de la piel e intestino. Se ha destacado la proteína Wnt3a que aumenta la proliferación de CMMs y, a su vez, inhibe la diferenciación osteogénica (2).

Finalmente, *oct-4*, *sox-2* y *rex-1* son los marcadores genéticos de CMMs. Las proteínas Polycomb están involucradas a nivel general en la represión de los genes de diferenciación, manteniendo de manera indirecta la activación de *oct-4*, *sox-2* y *rex-1* en CMMs; además, las proteínas Trithorax complementan las proteínas Polycomb mediante el mantenimiento de la activación de genes homeóticos que puede regular directamente la expresión de *oct-4*, *sox-2*, y *Rex-1* (véase la figura 13) (2).

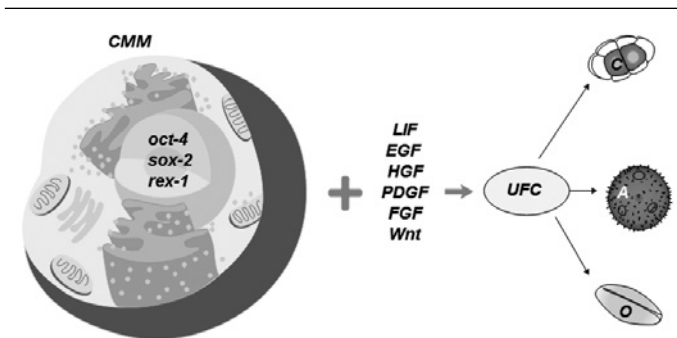


Figura 13. Autorrenovación de células madre mesenquimales. Los factores de señalización extracelular, incluidos los factores de crecimiento y las citoquinas, demuestran promover y/o mantener la autorrenovación de las células madre mesenquimales *in vitro*. Los marcadores genéticos característicos de la autorrenovación del células madre mesenquimales incluyen *oct-4*, *sox-2* y *rex-1*, LIF, factor inhibidor de la leucemia; EGF, factor de crecimiento epidérmico; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; UFC, unidad formadora de colonias; C, condroblasto; O, osteoblasto; y A, adipoblasto.

Fuente: elaboración propia.

2.2 Mantenimiento de cultivos de células madre

El mantenimiento de los cultivos de CMMs requiere de condiciones especiales comparado con el de líneas celulares convencionales. Es necesario evitar la diferenciación con otros linajes no deseados de las células, lo que se logra por medio de un control y monitoreo adecuado del cultivo; por esta razón es importante conocer las condiciones, los suplementos y los aditivos mínimos para un óptimo desarrollo celular. Los medios de cultivo empleados de acuerdo con el tejido de obtención de las CMMs son los medios basales como D-MEM o α -MEM (medio esencial mínimo) (véase la tabla 5), que deben ser suplementados con lípidos, factores de crecimiento y hormonas (15). Existen medios químicamente modificados que tienen incorporadas proteínas de MEC junto con factores de crecimiento; un ejemplo es el Matrigel que contiene fibronectina, laminina y el colágeno tipo IV (15).

En la tabla 5 se relacionan los principales tejidos empleados como fuentes de obtención de CMMs y los medios de cultivo adecuados para la expansión de CMMs.

Tabla 5. Medios de cultivo para células madre mesenquimales respecto a la fuente de obtención

Fuente	Medios de expansión
Médula ósea	DMEM (Dulbecco modified Eagles minimal essential medium, por sus siglas en inglés). DMEM-F 12 de Ham Advanced DMEM (ADMEM)
Tejido adiposo	DMEM DMEM bajo en glucosa (DMEM-LG)
Líquido amniótico y membrana	α -MEM DMEM-F 12 de Ham
Tejidos dentales	α -MEM MEM
Endometrio	DMEM-F12 de Ham
Brote de la extremidad	DMEM-LG
Sangre periférica	α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle-alpha modification) por sus siglas en inglés.

Continúa en la página 48

Fuente	Medios de expansión
Placenta y membrana fetal.	DMEM-LG
Glándula salival	DMEM
Piel y prepucio	°DMEM High Glucose (DMEM-HG) DMEM DMEM-F12 de Ham
Membrana de revestimiento del cordón umbilical subamniótico	DMEM-HG DMEM CMRL1660
Líquido sinovial	α-MEM
Gelatina de Wharton	DMEM

Fuente: elaboración propia.

Para el caso de cultivo de CMEs se requiere una matriz de soporte celular. El más empleado es la capa de fibroblastos mitóticamente inactivos o células alimentadoras aisladas de ratón (CAR), cuya función es mantener la indiferenciación, la pluripotencia, el crecimiento y la expansión celular; debido a la secreción de factores de crecimiento y citoquinas (18). CAR posee una desventaja y es que, dado su origen animal o xeno, tiene la posibilidad de infectar con agentes zoonóticos los cultivos de CMEs y disminuir su aplicabilidad en el ámbito clínico. A manera de alternativa se ha ensayado el uso de células alimentadoras humanas tales como las células estromales umbilicales, presentando características tales como un aislamiento no invasivo y la secreción de factores de crecimiento como el TGF-β y activina A. Estas células presentan variación entre las capas de alimentación, lo cual dificulta su mantenimiento y estandarización (15).

El SFB es un suplemento importante debido a que ofrece factores de crecimiento, proteínas y minerales, portadores de nutrientes insolubles en agua, inhibidores de proteasas y viscosidad. El SFB, al ser de origen xeno puede contaminar los cultivos de CMs con agentes virales, zoonóticos y priones, al igual que con CAR se han buscado otras alternativas de productos derivados de la sangre humana tales como el suero, los derivados de plaquetas y el plasma rico en plaquetas, pero su obtención y estandarización han demostrado ser bastante costosos, además de que se requiere en volúmenes altos, sin tener en cuenta que los derivados de sangre humana también pueden contener agentes infecciosos. Por consiguiente,

la mayoría de medios de cultivo de CMMs contiene entre 10 % y 20 % (vol./vol.) de SFB (véase la tabla 6) (15).

En la tabla 6 se relacionan los principales tejidos empleados como fuentes de obtención de CMM y los suplementos de sueros adecuados para la expansión de CMMs.

Tabla 6. Suplementos de suero respecto a la fuente de obtención

Fuente	Suplemento de suero
Médula ósea	Suero fetal bovino (SFB)
Tejido adiposo	Suero fetal bovino (SFB) Suero de ternera fetal (STF)
Líquido amniótico y membrana	Suero fetal bovino (SFB)
Tejidos dentales	Suero fetal bovino (SFB) Suero de ternera fetal (STF)
Endometrio	Suero de ternera fetal
Brote de la extremidad	Suero fetal bovino (SFB)
Sangre periférica	Suero de becerro recién nacido (SBRN)
Placenta y membrana fetal	Suero fetal bovino (SFB)
Glándula salival	Suero de ternera fetal (STF)
Piel y prepucio	Suero fetal bovino (SFB)
Membrana de revestimiento del cordón umbilical subamniótico	Suero fetal bovino (SFB)
Líquido sinovial	Suero fetal bovino (SFB)
Gelatina de Wharton	Suero fetal bovino (SFB)

Fuente: elaboración propia.

Los aminoácidos no esenciales y los antibióticos también representan otros aditivos importantes. Los antibióticos evitan la contaminación por microorganismos, entre los cuales los más utilizados son la penicilina, la estreptomycinina y la gentamicina. Las condiciones de incubación, así como el porcentaje de CO₂ y la temperatura deben ser similares a las proporcionadas *in vivo* (p. ej., 37 °C con 5 % de CO₂ y 20 % de O₂).

Por último, es importante resaltar el cambio de medio de cultivo en tiempos específicos de acuerdo con el tipo de células, pues es posible la aparición de sustancias extraíbles y lixiviables que migran de la capa de contacto plástica al medio de cultivo con células, alterando el crecimiento celular e incluso provocando la muerte celular (15).

Si se conoce lo que sucede a nivel molecular y los requerimientos físico-químicos durante el estado de autorrenovación de las CMs, es posible establecer las metodologías del mantenimiento del cultivo, ya que los requerimientos son diversos de acuerdo con el tejido de aislamiento.

2.2.1 Cultivo de mantenimiento de células madre mesenquimales provenientes de tejido adiposo

Después de recolectado el lipoaspirado (muestra ideal), se debe realizar un tratamiento físico, en un tubo falcón de 50 mL se adiciona la muestra y SFB en la misma cantidad, se mezclan por agitación y se centrifugan a 3000 rpm durante dos minutos, obteniendo tres capas diferenciadas con diversos contenidos: la capa inferior compuesta por solución salina, anestésico local y células hemáticas que se eliminan mediante drenaje gravitacional. La capa superior contiene adipocitos rotos, ácidos grasos libres y triglicéridos que se desechan mediante capilaridad. Se obtiene la capa intermedia conformada por tejido adiposo purificado, adipocitos, vasos sanguíneos y MEC de tejido fibroso que es en donde se encuentran las CMMs (29).

Posteriormente, se realiza un tratamiento enzimático de la MEC de tejido fibroso y se hace una digestión con colagenasa al 0,075 % durante 30 minutos a 37 °C. Luego se inactiva la enzima adicionando igual volumen de medio de cultivo y se centrifuga a 830 rpm durante diez minutos. Se debe descartar el sobrenadante junto con las grasas indeseables y con el sedimento que contiene un precipitado de alta densidad se le realiza un tratamiento químico. En primer lugar, se resuspende el precipitado con 2 mL de cloruro amónico 160mM (NH_4Cl) durante diez minutos a temperatura ambiente, con el fin de lisar los hematíes restantes y en seguida se centrifuga a 830 rpm durante un minuto.

Para finalizar, se adiciona 1 mL de medio de cultivo al centrifugado, el cual se incuba en medio de cultivo DMEM con un 10 % de SFB y un 1 % de penicilina-estreptomina a 37 °C y un 5 % de CO_2 . A las 24 horas se lava el cultivo con SFB y las células fijas a la superficie se cultivan de nuevo bajo las mismas condiciones iniciales. Cuando las células alcanzan un nivel de confluencia del

70 % (5-7 días de incubación) se realiza el proceso de tripsinización con el fin de producir una disgregación celular, en la cual las células son incubadas a 37 °C con tripsina durante cinco minutos, en seguida se coloca medio con SFB para inactivar la tripsina y, finalmente, se envasan en 1 mL de solución de lactato de Ringer para su posterior caracterización y diferenciación según los requerimientos (29).

2.2.2 Cultivo de mantenimiento de células madre mesenquimales provenientes de explantes dentales

Las CMMs se pueden extraer de explantes dentales. De manera breve, después de extraer los terceros molares se retira la pulpa y el folículo dental que son los tejidos de interés y son denominados explantes. Los explantes son cultivados bajo condiciones estándar en medio α -MEM con 20 % de SFB y 1 % de antibiótico (penicilina-estreptomicina), a los 10 días de incubación se cambia el medio de cultivo y se eliminan los explantes. A las cuatro semanas de cultivo las células empiezan a evidenciar un fenotipo fibroblastoide, además de adherirse al plástico; en seguida, se debe lavar el cultivo con SFB, cambiar el medio de cultivo y se deben incubar de nuevo bajo las mismas condiciones iniciales durante tres semanas hasta alcanzar una confluencia celular del 80 %. Las células son disgregadas con 1 mL de tripsina durante cinco minutos a 37 °C, se realiza la inactivación por medio de un lavado con medio suplementado con SFB, se realiza un lavado con PBS 1X y se centrifuga a 1680 rpm durante cinco minutos a temperatura ambiente. Las células de nuevo son cultivadas bajo condiciones estándar y en el pase n.º 4 es adecuada la realización de la caracterización celular (30).

2.2.3 Cultivo de mantenimiento de células madre mesenquimales provenientes de cordón umbilical

El cordón umbilical durante las últimas décadas ha tomado relevancia como fuente de CMMs, debido a que su obtención no es invasiva y es posible aislar cantidades adecuadas de CMMs. Actualmente, a nivel mundial, existen bancos de cordón umbilical que facilitan terapias celulares por medio de

trasplantes alogénicos y autólogos, optimizando el tiempo y la disponibilidad del material celular.

Después de obtenido el cordón umbilical debe ser procesado de inmediato. Inicialmente, se debe lavar con PBS con el fin de eliminar los restos de sangre y contaminantes, en seguida bajo condiciones de esterilidad el cordón umbilical se debe cortar transversalmente en fragmentos de 0,5-1 cm. Los fragmentos son sometidos a tratamiento enzimático con colagenasa a 0,075 %, hialuronidasa 0,05 % o tripsina 0,125 %, en agitación rotatoria durante tres horas a 37 °C. Posteriormente, el tejido sobrante se descarta por medio de un filtro de 100 µm. Es recomendable realizar un recuento celular con el fin de determinar el número de células viables, las cuales son resuspendidas en medio DMEM con 20 % de SFB, penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y anfotericina B (0,25 mg/mL); se deben incubar a 37 °C, bajo una concentración de CO₂ al 5 %. Se reemplaza el medio a las 48 horas de incubación y es posible observar células adheridas a la superficie del plástico. Cuando se alcanza una confluencia celular igual o mayor al 80 %, se realiza un tratamiento con tripsina con el fin de disgregar las células del plástico. Después de calcular la viabilidad se debe ajustar la concentración dependiendo del tipo celular a aproximadamente 2×10^3 células/cm², y transferir a frascos de cultivo que se incuban bajo las mismas condiciones iniciales con el fin de expandir las CMMs para su posterior caracterización (31).

Si se tienen en cuenta las principales maneras de realizar un cultivo de mantenimiento, es posible determinar sus ventajas y desventajas de acuerdo con el tejido del cual fueron aisladas las CMMs (véase la tabla 7).

Tabla 7. Características observadas en el cultivo de células madre mesenquimales obtenidas de diferentes tejidos

Criterio	Tejido		
	MO	Sangre de cordón umbilical	Tejido adiposo
Éxito de aislamiento	100 %	30-34 %	100 %
Formación de monocapa adherente	4-5 días	2-4 semanas	4-5 días
UFC obtenidas en la monocapa adherente	83+/-61	0,002+/- 0,004	557+/- 673

Fuente: elaboración propia.

2.3 Diferenciación dirigida de células madre

Actualmente, los genes involucrados y las vías de señalización durante la diferenciación de CMMs son ampliamente estudiados, por esta razón es importante modular el microambiente por medio de la adición de sustratos específicos al medio de cultivo transformándolos en medios de inducción, ya que, de esta manera, se mantiene la diferenciación deseada. Las CMMs se caracterizan por la posibilidad de diferenciarse a células del mesodermo (condrocitos, osteocitos y adipocitos), por lo cual este se considera un criterio de identificación de CMMs (35).

2.3.1 Condrogénesis

Después del realizar el cultivo de expansión de CMMs y la identificación se puede inducir la condrogénesis, para lo cual se deben transferir, aproximadamente, 250 000 CMMs a un tubo falcón de 15 mL y se adiciona medio de inducción condrogénico, el cual se caracteriza porque además de los medios estándar debe contener 10 ng/mL de factor de crecimiento transformante $\beta 3$ y 1 $\mu\text{g/mL}$ de proteína 2 morfogenética ósea. Cada tres a cuatro días se debe cambiar el medio y después de 21 días aparecen los gránulos de cartílago (32). Para evidenciar que realmente hay una diferenciación condrogénica se utiliza el colorante Safranina O, que tiene afinidad por los grupos carboxilo y los grupos sulfato de los glicosaminoglicanos (GAGs), los cuales se encuentran en altas concentraciones en la MEC del cartílago.

En el proceso de formación de cartílagos *in vivo* se encuentran marcadores de expresión como los siguientes factores de transcripción SOX-9, escleraxis y los genes de la MEC: colágeno tipos II y IX, agregcan, biglicano y decorina. La condrogénesis se encuentra mediada por diversas vías de señalización moduladas por la acción de moléculas como TGF- β , proteína morfogenética ósea (BMP), factor de crecimiento y diferenciación (GDF) y ligandos WNT. Además se pueden utilizar proteínas recombinantes de CMMs (TGF- $\beta 1$ y TGF- $\beta 3$, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-12, BMP-13) (2). Inicialmente, TGF- β s y BMPs se unen a los receptores específicos de CMMs, desencadenando una señalización intracelular de las proteínas SMAD específicas y, luego, la activación de las principales cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), las cuales actúan sobre su

sustrato (cromatina, las histonas y las acetiltransferasas (HAT)). Se ha descrito que HAT tiene la capacidad de mejorar la transactivación de las proteínas SMAD, permitiendo la activación de los genes de la condrogénesis (2).

También los WNT regulan el proceso de condrogénesis. En específico, WNT3 ayuda a la condrogénesis inducida por BMP-2, regulando su expresión (2). Por otra parte, WNT7 regula la condrogénesis por medio de varias vías de señalización de TGF- β 1 y MAPK, sin embargo, en altas cantidades es inhibitorio. En el caso de WNT1, inhibe la condrogénesis al aumentar la cantidad del factor de transcripción de la hélice-bucle-hélice (bHLH) y Twist 1, además de restringir los factores condroestimuladores y genes diana (véase la figura 14) (2).

2.3.2 Osteogénesis

Para la calcificación, después de la expansión de CMMs se deben transferir mínimo 100 CMMs a una caja de 60 cm² y se cultivan durante 14 días en medio de cultivo bajo condiciones estándar de incubación. Las células que se adhieren a la superficie del plástico se cultivan en medio de inducción de calcificación que, adicional al medio de cultivo estándar, contiene 50 μ g/mL de ácido ascórbico 2-fosfato, dexametasona 10 nM y β -glicerofosfato 10 mM (32). Después de 21 días de incubación se debe evaluar la diferenciación osteogénica mediante la tinción con solución Alizarin Red 40 mM en NaH₂PO₄ 0,1 M pH 4,3 que tiene afinidad por tejidos mineralizados (32).

Existen diversas vías que conducen la osteogénesis en CMMs, principalmente se ha descrito la desacetilación de RUNX2, en la cual intervienen en principio las BMP, en específico BMP-2 y BMP-6; BMP-2 estimula la desacetilación mediada por p300 de RUNX2 mejorando su transactivación (2).

Enseguida, la desacetilación de RUNX2 es mediada por las histonas desacetilasas 4 y 5, para que, posteriormente, las ligasas de ubiquitina (Smurf1, Smurf2 y E3) degraden Runx2. Se ha descrito que en procesos de inflamación asociados a degradación ósea la citoquina TNF- α , por medio de Smurf1 y Smurf2, regula los bajo niveles de la proteína RUNX2 (2).

Por otra parte, los WNT tienen una importante función moduladora en la osteogénesis. Se ha observado que la osteogénesis es dependiente de los niveles de WNT endógenos; a altas concentraciones de WNT la osteogénesis es estimulada mientras que a bajos niveles es inhibida. Además, la señalización de WNT incrementa los niveles de RUNX2. La β -catenina/LEF (factor de unión del potenciador linfoide/TCF1 [factor de células T1]) ocupan un sitio de unión en el promotor de runx2 proximal (gen osteogénico global), por tanto, pueden regular de forma directa la expresión de runx2, lo que ha permitido inferir que BMPs y WNT convergen en RUNX2 (2).

También se ha demostrado que Tbx-5 (gen osteogénico T-box específico) activa el gen diana osteogénico FGF10 por medio de la interacción directa entre Tbx-5 con el corregulador de cromatina TAZ (coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ). Se ha observado que la unión de HAT y TAZ permite la apertura de la cromatina, lo que aumenta la actividad transcripcional de Tbx-5 (véase la figura 14) (2).

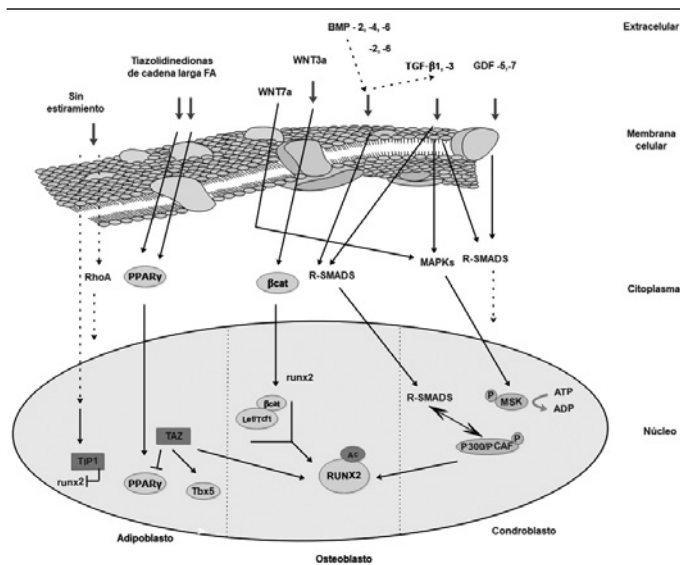


Figura 14. Rutas de señalización para la diferenciación de células madre mesenquimales. La señalización molecular extracelular y los inductores mecánicos de la diferenciación transducen los efectos a través de receptores, canales y otros mecanismos asociados a la superficie celular. **Fuente:** elaboración propia.

2.3.3 Adipogénesis

Para la adipogénesis, después de la expansión de CMMs se deben transferir mínimo 100 CMMs a una caja de 60 cm² y se cultivan durante 14 días en medio de cultivo bajo condiciones estándar de incubación. Las células que se adhieren a la superficie del plástico se cultivan en medio de inducción de adipogénesis que, adicional al medio de cultivo estándar, contiene dexametasona 100 nM, isobutil-metilxantina 0,5 mM e indometacina 50 mM (32). Después de 21 días de incubación se debe evaluar la diferenciación adipogénica mediante la tinción con solución saturada de Oil Red en isopropanol al 60 %, que tiene afinidad por los lípidos (32).

El receptor activado por el proliferador de peroxisoma del receptor de hormonas nucleares γ (PPAR γ) estimula la adipogénesis y, a su vez, reprime la osteogénesis; PPAR γ se transactiva y ocurre una transrepresión a través de su unión a varios ligandos como, por ejemplo, los ácidos grasos de cadena larga y los compuestos de tiazolidinediona. Se ha descrito que TAZ coactiva RUNX2 y reprime PPAR γ , promoviendo la osteogénesis mientras inhibe la adipogénesis; es posible considerar que existan coactivadores de genes adipogénicos y represores de genes osteogénicos, debido a la potencialidad que le confiere a las CMMs diferenciarse en ambos tipos de tejido (2).

Se ha descrito que la mecano-estimulación de estiramiento activa isoformas específicas de proteínas inducidas por la tensión (TIP), mientras que son inhibidas por el no estiramiento (2). Se ha observado que el estiramiento induce la miogénesis mediada por la expresión de TIP3 y al inhibirse el estiramiento mediado por TIP1 se induce la adipogénesis, la cual, además, es aumentada junto con Rho A citoplásmica para inducir señales mecánicas y así contribuir a la forma redonda de las células. Finalmente, es importante en la inducción de la adipogénesis por CMMs el análisis de la inducción mecánica, la morfología celular, la señalización del citoesqueleto y la respuesta transcripcional (véase la figura 14) (2).

2.4 Métodos de criopreservación de células madre

La criopreservación es un paso importante para los bancos de CMs, debido a que permite la conservación de las CMs obtenidas, facilita su transporte al sitio de procesamiento y amplía el tiempo para la realización de las pruebas de control de calidad. Sin embargo, se ha descrito que la criopreservación disminuye la viabilidad celular después del descongelamiento y los crioprotectores evidencian efectos adversos en los pacientes receptores de los trasplantes celulares (33).

Un aspecto importante son los crioprotectores que permiten a las células sobrevivir a los efectos de la congelación y la descongelación al proteger las membranas celulares. Uno de los crioprotectores comúnmente empleados es el dimeilsulfóxido (DMSO), que se caracteriza por interactuar con el agua y disminuir la temperatura de congelación; además, altera la estructura y la función de la membrana celular al interferir en la formación de cristales de hielo y evitar la perforación de la membrana (33).

El DMSO en aplicaciones clínicas ha demostrado diversos eventos adversos, desde los más leves como náuseas y vómitos hasta los que afectan la integridad del paciente como paro cardíaco, respiratorio y convulsiones epilépticas. Se han descrito estudios en los que las concentraciones bajas de DMSO para criopreservar disminuyen reacciones adversas tales como náuseas, fiebre y taquicardia. Por otra parte, ha sido estudiada la posibilidad de disminuir la concentración de DMSO y adicionar otro componente como pentastarch, hidroxietilalmidón (HES), dextrano, etilenglicol y trehalosa, los cuales mantienen el potencial de diferenciación y la viabilidad celular. Además, se ha descrito que los azúcares interactúan con la membrana celular y generan cambios en los patrones de congelación. En estudios en los que se ha evaluado la trehalosa y la sacarosa como criopreservantes individuales, se ha demostrado que mejoran la concentración y la viabilidad celular, además de no presentar efectos adversos en humanos (33).

Otros potenciales crioprotectores son los inhibidores de la recristalización de hielo de molécula pequeña (IRH), los cuales son análogos a la glucoproteína an-

ticongelante unida al carbono y se caracterizan por ser capaces de reducir el tamaño de los cristales de hielo. También se han realizado estudios en el análisis del inhibidor asociado a Rho-quinasa, proteína importante en la fisiología del citoesqueleto. Se ha demostrado que después de la descongelación de las células mejora la supervivencia, pero afecta de forma negativa la expansión (33).

En la actualidad, las nuevas tecnologías buscan la eliminación del DMSO después de la descongelación de las células, por medio de procedimientos de lavado automatizado, pues el método manual tiene desventajas, como, por ejemplo, la necesidad de esterilizar material, el hecho de que se produce una gran pérdida celular, el riesgo de contaminación y que requiere de personal especializado. Asimismo, se desarrollan en la actualidad e implementan otros métodos de eliminación del DMSO tales como la filtración por membrana giratoria, la extracción de DMSO por difusión en canales microfluídicos y la dilución a través de membranas de fibra hueca (33).

Otros factores importantes en la criopreservación son la tasa de congelación, la cual puede ser a velocidad lenta (1 °C/min) o por enfriamiento rápido. Varios estudios han demostrado que el enfriamiento rápido es más efectivo. Respecto al preenfriamiento del DMSO, ha mostrado mejor rendimiento de recuperación celular, pues la no congelación del DMSO provoca reacción exotérmica que podría afectar la criopreservación. Es relevante criopreservar inmediatamente después de la recolección de las células, pues se ha observado que la precrioconservación prolongada afecta la viabilidad y la potencia celular (33).

La concentración celular es un parámetro importante, ya que a concentraciones bajas es necesario aumentar la cantidad de DMSO que puede generar efectos adversos en los pacientes, y a concentraciones celulares muy altas las células tienden a formar aglomerados celulares, lo cual puede generar pérdida celular después del descongelamiento. Estudios han demostrado que la criopreservación de CMs obtenidas de sangre periférica a una concentración de 2×10^8 células/ml producen una alta recuperación de células viables (33).

Las técnicas de criopreservación son la congelación y el almacenamiento a velocidad controlada en nitrógeno de vapor. La temperatura a -80 °C permite la

criopreservación por diez años y mantiene propiedades como, por ejemplo, el potencial de diferenciación, la reconstitución y el potencial de autorrenovación celular. Sin embargo, en diversos estudios ha sido reportado que CMs almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante tres y seis meses pueden perder propiedades tales como la integridad de membrana celular y el potencial clonogénico.

Otros investigadores demostraron que la adición del polisacárido Ficoll a la solución crioprotectora de CMs almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante periodos mayores a un año mejora su estabilidad después de la descongelación. Finalmente, cuando no hay acceso al nitrógeno líquido y a la congelación a velocidad controlada es posible criopreservar las células a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin afectar la supervivencia celular. En general, el almacenamiento de CMs durante menos de diez años no afecta el resultado de la criopreservación (33).

2.4.1 Procedimiento convencional de congelación lenta

Después de la tripsinización, las CMs a una concentración de 1×10^6 células viables/mL se suspenden en una solución de criopreservación, conformada por medio DMEM, 20 % de SFB y 10 % de DMSO. En la congelación lenta se recomienda que el DMSO sea preenfriado y adicionado antes de que las CMs se coloquen a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se sugiere el uso de crioviales de 2 mL, los cuales se deben llenar con 1 mL de CMs en solución de criopreservación y deben llevarse una noche en fase de vapor de nitrógeno a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de criopreservar a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (34).

2.4.2 Procedimiento de enfriamiento ultrarrápido

Después de la tripsinización, las CMs a una concentración de 1×10^6 células viables/mL se suspenden en una solución de criopreservación, de la cual existen diversas alternativas, como, por ejemplo, las siguientes:

- DMEM + 0,5 M de trehalosa;
- DMEM + DMSO 10 %;
- DMEM + etilenglicol 10 %;

- DMEM + trehalosa 0,5 M + DMSO 10 %;
- DMEM + trehalosa 0,5 M + etilenglicol 10 %.

El DMSO debe adicionarse preenfriado a 4 °C durante 1 min. Las células en medio de congelación a temperatura ambiente se depositan en tiras de membrana de nylon de 20 x 20 mm de tamaño, distribuyendo las células en alícuotas mayores a 50 µL. En seguida se debe dejar secar unos minutos bajo condiciones de esterilidad, y luego se enfrían rápidamente en nitrógeno líquido a una velocidad de congelación de 10 °C/min. Es recomendable que las CMs que no contienen crioprotectores adicionales se almacenen en crioviales preenfriados en nitrógeno líquido y luego se congelen en vapor de nitrógeno a una temperatura promedio de -150 °C (34).

2.5. Control de calidad y buenas prácticas de fabricación

El aumento de la aplicación de las CMs en diferentes campos, en especial en el ámbito clínico, lleva a implementar buenos controles de calidad y aplicar buenas prácticas de producción en su cultivo. Actualmente no hay un consenso sobre los estándares de control de calidad entre los países, por lo cual cada centro de investigación debe establecerlos de acuerdo con el uso de las CMs y las exigencias de las entidades reguladoras. Por lo general, la calidad debe evaluarse en el inicio, durante y en el final del proceso de producción, teniendo en cuenta seguridad, eficacia, características de crecimiento, morfología, cariotipo y esterilidad (35).

Es importante que en el caso de CMMs se deban cumplir como mínimo los cuatro criterios de la International Society of Cellular Therapy (ISCT) que garantizan la validez de los procedimientos. Además, la morfología celular debe mantenerse durante todo el proceso de expansión, al igual que se debe garantizar el crecimiento celular manteniendo la duplicación de la población (DP), expresada con la ecuación:

$$DP = \log(FI)/\log(2)$$

Donde FI es el número de células que aumentaron con respecto al número de células inoculadas, esta cifra se multiplica por el número de células finales y el valor resultante se divide en el número de células inoculadas. La duplicación de la población no debe sobrepasar de 20 duplicaciones a fin de evitar el proceso de muerte celular, por lo cual la viabilidad debe ser mayor al 90 % y puede evaluarse mediante el método de exclusión de azul de tripano o utilizando yoduro de propidio (citometría de flujo) (35).

Si la expansión de CMMs se lleva a cabo durante periodos largos de tiempo, es importante asegurar que se conserve la estabilidad genómica con el fin de evitar aberraciones cromosómicas. Esto se puede corroborar mediante el análisis de cariotipo, por hibridación genómica comparativa (HGC) o la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (35).

Por otra parte, el programa de control de calidad eficiente (PCE), según la Farmacopea Europea, permite detectar la contaminación durante el cultivo de CMMs. Se deben realizar pruebas durante todo el proceso de cultivo, incluyendo reactivos y materiales, en busca de descartar la presencia de bacterias, hongos, micoplasmas y endotoxinas bacterianas (35).

Finalmente, la eficacia de las CMMs obtenidas debe evaluarse mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* (animales) durante la fase preclínica. Es posible evaluar la capacidad inmunomoduladora de las CMMs a través de ensayos *in vitro*, como, por ejemplo, la inhibición de la proliferación de linfocitos T y el ensayo de liberación de citoquinas. También se pueden emplear tecnologías analíticas de proceso (TAP) como las desarrolladas por la Food and Drug Administration (FDA), con el fin de disminuir los riesgos de la calidad, bien sea de procesos o bien de productos celulares (35).

3. Sistemas de cultivo de células madre

Andrea Viviana Gualteros Bustos

La conformación de los sistemas de cultivo evidencia el impacto de la tecnología y la búsqueda de ampliar la aplicabilidad de los cultivos de CMs. Actualmente se emplean cultivos desde conformaciones en monocapa, que son las más básicas, hasta los robustos cultivos organoides y el empleo de biorreactores, lo cual permite la recreación de microambientes sofisticados que facilitan una mayor obtención, cantidad y calidad de CMs.

3.1 Cultivos en monocapa

El cultivo en monocapa es el sistema de cultivo más simple, es de bajo costo, de fácil manejo y permite la expansión de CMs en un único compartimento donde se difunden los nutrientes a las células y ocurre el intercambio gaseoso (CO_2 y O_2) (35). Dentro de sus principales limitaciones se encuentra la manipulación externa (por parte de un operador); este procedimiento demanda varios pasos que requieren de lavados y tratamientos enzimáticos (tripsinización), lo que facilita la contaminación, además de que hace difícil establecer parámetros de control respecto a la fisiología celular. Por otra parte, al ser un cultivo estático se producen diversas concentraciones de pH, oxígeno disuelto, nutrientes y metabolitos, de modo que se crea un ambiente heterogéneo que puede alterar la potencialidad de las CMs. Finalmente, el cultivo en monocapa no produce altos volúmenes celulares, por consiguiente no son recomendados para aplicaciones terapéuticas, mas son potencialmente usados en investigación (véase la figura 15) (35).

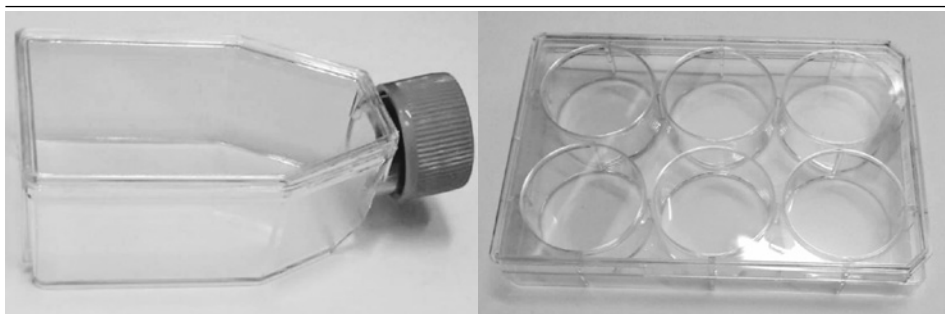


Figura 15. Sistemas de cultivo en monocapa. Se observan los sistemas de cultivo en monocapa utilizados, principalmente, frascos de cultivo y multipozos. En el caso del cultivo de células madre para terapias se suelen emplear *tripleflask cell culture flasks*. **Fuente:** elaboración propia.

3.2 Cultivos 2D

Son cultivos conformados por sustratos rígidos recubiertos por laminina, poliornitina, polilisina y fibronectina que imitan la composición de la MEC, promoviendo la fisiología celular en cuanto a procesos de adhesión (por medio de receptores de integrina), migración celular, expansión y diferenciación. Es un sistema reproducible, de bajo costo, fácil manipulación y comparable con modelos de cultivo de células animales. Sin embargo, no imita la complejidad y la organización del tejido al limitar el contacto celular, la difusión de nutrientes y el intercambio gaseoso, lo que puede alterar el desarrollo de la morfología celular, la supervivencia, la proliferación y la diferenciación, lo que dificulta el estudio de los cultivos de CMs. Con el fin de contrarrestar las desventajas de los cultivos 2D se diseñaron cultivos 3D (36, 37).

3.3 Cultivos 3D

Los cultivos 3D proporcionan una mejor organización celular, facilitando interacciones más complejas entre las células, lo que permite imitar de mejor manera la organización de tejidos *in vivo* en comparación con los cultivos 2D. Las conformaciones de cultivo 3D poseen dos estructuras: sin andamios y con andamios. En las técnicas sin andamios las CMs se cultivan en ausencia de biomateriales y la MEC la proporcionan las mismas células al autoensamblarse formando agregados celulares o esferoides. En las técnicas con andamios las

CMs se cultivan en matrices sólidas o líquidas fabricadas en materiales naturales o sintéticos como, por ejemplo, Matrigel, que facilitan la interacción célula-matriz, la transmisión de señales químicas y físicas específicas y representan una guía para el comportamiento celular. A pesar de las múltiples ventajas de los cultivos en 3D, son más costosos que los cultivos en 2D y las técnicas para el acceso y la visualización de las CMs son más complejas, así como dificultan la distribución homogénea de componentes (O_2 y nutrientes), lo que conduce a áreas necróticas, muerte celular y heterogeneidad en el cultivo que afectan la reproducibilidad entre ensayos, además de requerir equipos y profesionales especializados (36).

Existen diferentes tecnologías para diseñar los andamios de los cultivos 3D. Una de ellas es la basada en hidrogeles (véase la figura 16), que son redes de polímeros entrecruzadas en agua, hechas de diferentes sustratos naturales tales como la agarosa, el colágeno, la seda, el quitosano, la celulosa y el Matrigel; asimismo, sintéticos como poli 2-hidroxietil metacrilato y polietilenglicol, los cuales presentan una amplia gama de características mecánicas y químicas. Los hidrogeles se caracterizan por ser nutritivos, permeables al oxígeno, hidrófilos y con baja citotoxicidad; además, son versátiles y se adaptan a la fisiología celular, mostrando respuesta a señales físicas como la rigidez (36).

Los hidrogeles de sustratos naturales son biocompatibles, bioactivos y poseen sitios de unión para las CMs, lo que favorece la viabilidad, la proliferación, la migración celular, la diferenciación y la remodelación de la matriz de gel (véase la figura 16). Sin embargo, estos biomateriales aíslan de forma selectiva algunas respuestas celulares al contener fracciones variables no caracterizadas de factores de crecimiento. Además, es difícil ajustar las propiedades físicas y químicas del hidrogel. Por último, la forma y el tamaño de las células individuales no se pueden controlar (3).

Los hidrogeles de sustratos sintéticos se caracterizan por ser muy reproducibles. Las propiedades físico-químicas son fáciles de ajustar y sirven para cultivos de largo plazo debido a que no se pierde el contacto entre las células y la MEC a medida que se degrada, lo que permite obtener más CMs destinadas a aplicaciones clínicas y de investigación básica para el estudio de la fisiología celular en

estas células. Como desventaja se encuentra que no posee factores endógenos, lo cual dificulta el comportamiento celular normal (3).

Por otra parte, la tecnología basada en micropocillos se puede producir por medio de grabado en silicio, fotolitografía y moldeo de materiales de hidrogel utilizando litografía suave (véase la figura 16) (3). Los cultivos de CMs en micropocillos facilitan la formación de esferoides que pueden emplearse en ingeniería de tejidos y en la evaluación toxicológica de los fármacos. Los micropocillos son versátiles, ya que se pueden regular las características de la MEC por medio del ajuste de la densidad celular, la porosidad, la mecánica del hidrogel y las dinámicas geométricas, de modo que permiten el estudio de las interacciones célula-célula, del comportamiento celular, de patrones de diferenciación y de cambios en la arquitectura del citoesqueleto celular. Sin embargo, los micropocillos han sido descritos como modelos pseudo-3D que impiden imitar el entorno 3D *in vivo* (3).

Finalmente, la tecnología basada en microgel consiste en la encapsulación de células individuales en 3D (véase la figura 16) que se pueden cultivar por semanas en rangos de rigidez variable, lo que permite recrear tejidos en los que su arquitectura consiste en múltiples bloques repetitivos, como es el caso de los lóbulos hepáticos y las nefronas, mostrando gran utilidad en medicina regenerativa y diseño de tejidos (3).

Dada la versatilidad de las tecnologías de andamios es posible su combinación obteniendo plataformas con vascularización *in vitro* que muestran similitud con la formación de tejidos *in vivo* (36).

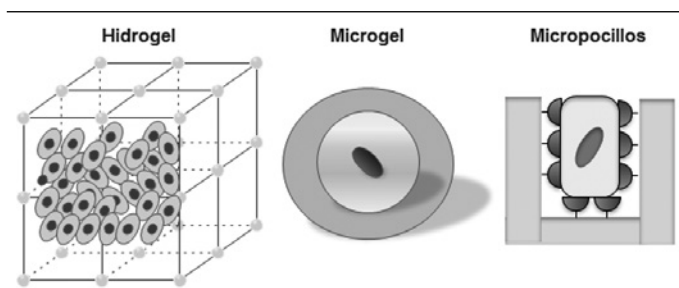


Figura 16. Método de cultivo en 3D. Descripción esquemática de los principales métodos utilizados para lograr el cultivo de células en 3D. **Fuente:** elaboración propia.

3.4 Organoides

Los organoides son una organización de células en una estructura similar a un órgano. Se pueden generar por medio de cultivos en 3D, basados en la combinación de las técnicas con andamios y sin andamios, debido a que las células se autoorganizan para formar tejidos sobre una matriz que proporciona estructura y señales externas que permiten la formación de un órgano. Una de las matrices más empleadas es Matrigel, la cual induce señales fisicoquímicas para la correcta organización del tejido (3). Los organoides presentan diversas limitaciones como, por ejemplo, la ineficiente reproducibilidad, un alto costo y una difícil manipulación y configuración.

Los problemas en la reproducibilidad son generados debido a que no existe un control que regule la autoorganización de las CMs en los organoides, por consiguiente, no es posible realizar réplicas exactas de esferas organoides en cuanto a aspectos tales como el tamaño, la forma, la composición celular, así como las características fenotípicas y moleculares, lo que influye en la calidad de los ensayos y no valida su uso en entornos clínicos y farmacéuticos. Se han logrado avances en la estandarización y el control del microambiente, pero no se han alcanzado las buenas prácticas de fabricación (37).

La vascularización es importante en estos cultivos, pues permite la distribución uniforme del oxígeno y los nutrientes a todas las capas celulares, desde las más internas hasta las de la periferia, lo que fomenta un adecuado desarrollo celular que permitirá a los organoides tener una imitación más real de la fisiología tisular. Esto representa una gran utilidad en estudios de farmacología al permitir el análisis del metabolismo de los fármacos desde la absorción hasta la circulación de los compuestos. La vascularización de organoides abre la puerta a los trasplantes, ya que facilitaría la integración del organoide a la red vascular del paciente. Actualmente se han logrado modelos organoides neovascularizados para diversas patologías, como, por ejemplo, el cáncer, útiles en el estudio de la oncogénesis, la angiogénesis, la administración y el análisis de la toxicidad de fármacos. También se ha diseñado tejido adiposo vascularizado para generar tejidos blandos y así favorecer la medicina regenerativa. Sin embargo, se deben desarrollar técnicas que tengan en cuenta la vascularización desde el diseño y el desarrollo de una

red vascular que comprenda a nivel funcional y fenotípico capas de células musculares lisas endoteliales y vasculares (37).

Los organoides han permitido el modelado de enfermedades recreando interacciones complejas entre células en un microambiente esférico. No obstante, no se ha logrado representar la fisiología de la inflamación *in vivo*, debido a que involucra diversos tipos celulares como las células endoteliales, los monocitos, los macrófagos y los leucocitos, además de procesos celulares tales como adhesión de células endoteliales, la diferenciación de monocitos a macrófagos, la extravasación de leucocitos y su transmigración. El flujo sanguíneo juega un papel fundamental en los procesos de inflamación, pues transporta las células inmunitarias que llegan a los sitios de la lesión a través de la interacción y la quimioatracción con las células endoteliales de las paredes de los vasos sanguíneos. Por esta razón, a fin de simular la inflamación *in vitro* en los modelos organoides es fundamental establecer la vascularización, la perfusión sanguínea y las células inmunitarias, considerando aspectos relevantes en el estudio de enfermedades vasculares y enfermedades inflamatorias de la piel y del intestino (37).

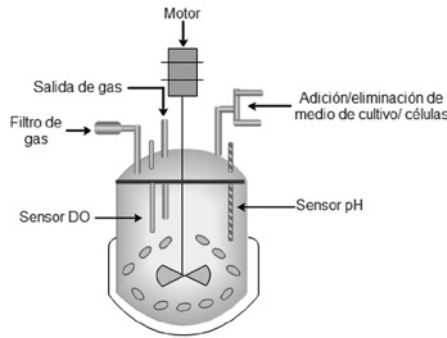
3.5 Cultivos en biorreactor

La producción de una alta cantidad de células con los estándares de calidad para el uso en terapias celulares requiere de sistemas de cultivos escalables y controlables, como es el caso de los cultivos en biorreactores (35). Usar biorreactores permite desarrollar cultivos homogéneos al facilitar el monitoreo y el control de todas variables tales como el pH, la temperatura, el oxígeno y la concentración de dióxido de carbono, además de servir como soporte para la adhesión celular. Un biorreactor presenta características generales como, por ejemplo, una fácil operación y manipulación, el monitoreo durante todas las etapas y el control de los parámetros del cultivo, así como facilita una adecuada recolección de células y alcanza altas cantidades celulares en un óptimo periodo de tiempo a un costo adecuado. Se han usado varios tipos de biorreactores para la expansión de CMs como los son el biorreactor de tanque agitado, el biorreactor oscilante, el biorreactor de fibra hueca y el biorreactor de cama fija (35).

Existen tecnologías de uso único que son configuraciones desechables con alta capacidad de producción (2000 L). Se caracterizan porque no se requieren procesos de limpieza y esterilización y su uso es más común en terapias celulares personalizadas. Un elemento importante para el uso de un biorreactor es el uso de portadores que, de acuerdo con su tamaño, se denominan bien sean microportadores (100-300 μm) o bien macroportadores (0,6-5 mm) (35). Los portadores tienen por objetivo principal servir de soporte para la adhesión y la proliferación celular. Los portadores poseen dos tipos de superficie: porosa y no porosa (la porosa recrea un entorno 3D con mejor exactitud). Entre las limitaciones del uso de portadores se encuentran las alteraciones que pueden generarse en las células durante el proceso de recolección, lo cual afecta el rendimiento celular, por consiguiente, durante el diseño del cultivo en un biorreactor con portadores es relevante encontrar un equilibrio entre la adhesión y el crecimiento eficiente (35).

La selección de los portadores es un aspecto relevante en el momento de usar un biorreactor para cultivo de CMs. La literatura recomienda emplear los de carga neutra, es decir, los que se encuentran cargados positivamente y que atraen las células por fuerzas electrostáticas. Otro criterio de selección es que los portadores sean biodegradables, con el fin de evitar los niveles de aglomeración y facilitar la recolección de las células al degradar al portador por medio de digestión enzimática (tratamiento con enzimas proteolíticas), para que, finalmente, por métodos de filtración las células sean recolectadas (35).

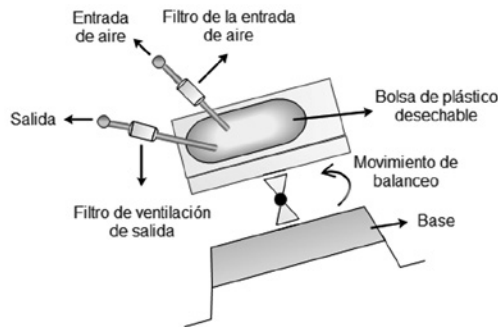
Dentro los tipos de biorreactores se encuentra el de tanque agitado, el cual permite un cultivo homogéneo gracias a impulsores que promueven la mezcla, además de que facilita el monitoreo de parámetros de cultivo, la eliminación de desechos, es de fácil operación y produce una cantidad adecuada de células minimizando costos y mano de obra (véase la figura 17). Para el adecuado funcionamiento de este tipo de biorreactor es necesario el uso de microportadores de un diámetro aproximado de 100-300 μm , con el fin de que se mantengan en suspensión y las células se adhieran y proliferen de mejor manera. Una de las principales desventajas del tanque agitado es la formación de aglomerados en los microportadores, lo cual impide una difusión uniforme de nutrientes y evita una adecuada recolección de células (35).



Biorreactor de tanque agitado

Figura 17. Representación esquemática del biorreactor de tanque agitado. Se especifica la ubicación de cada una de sus partes. **Fuente:** elaboración propia.

Por otra parte, el biorreactor oscilante de onda lo conforma una bolsa de plástico de un solo uso, la cual se coloca sobre una plataforma con movimiento constante y coordinado, generando un intercambio gaseoso y la distribución de nutrientes adecuados; esto permite obtener un óptimo microambiente para el desarrollo de las CMs (véase la figura 18). Además, al ser un sistema cerrado evita la contaminación, permite obtener adecuadas concentraciones de CMs, es de flexible manipulación e indispensable el uso de microportadores (35).



Biorreactor oscilante de onda

Figura 18. Representación esquemática del biorreactor oscilante de onda. Se especifica la ubicación de cada una de sus partes. **Fuente:** elaboración propia.

Otra opción para la expansión de CMs es el biorreactor de fibra hueca, conformado por capilares porosos, también denominados fibras huecas, los cuales se

encuentran en el interior de un cilindro externo organizados en paralelo (véase la figura 19). Las células se inoculan dentro de la fibra denominada espacio intracapilar, y en el espacio extracapilar que comprende la zona entre el cilindro y las fibras es en donde fluye el medio de cultivo y los nutrientes a través de los poros hasta el espacio intracapilar, de manera que permite la nutrición celular. Es importante destacar que los desechos y los residuos se transportan a través de la fibra, lo que facilita su adecuada separación. Este biorreactor permite recrear un microambiente homogéneo de bajo esfuerzo cortante y fibras para la adhesión celular (35).

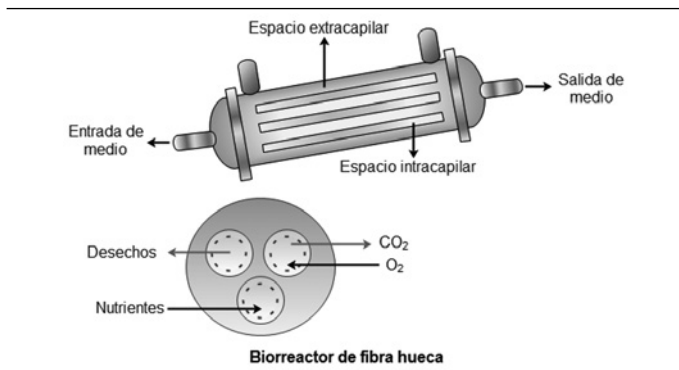


Figura 19. Representación esquemática del biorreactor de fibra hueca. Se especifica la ubicación de cada una de sus partes. **Fuente:** elaboración propia.

Finalmente, el biorreactor de cama fija se caracteriza porque las células se inoculan en un andamio inmovilizado localizado en el interior de una columna (Figura 20).

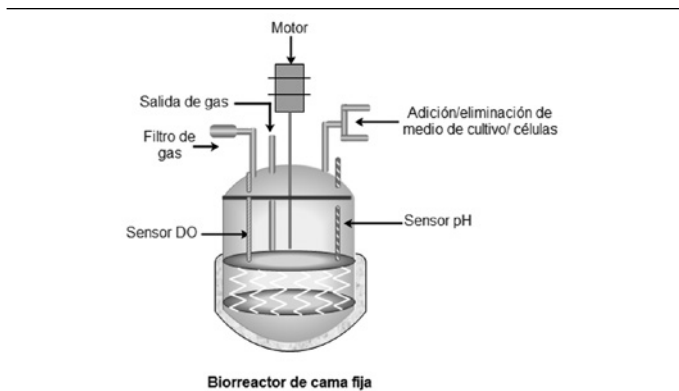


Figura 20. Representación esquemática del biorreactor de cama fija. Se especifica la ubicación de cada una de sus partes. **Fuente:** elaboración propia.

El andamio favorece la estabilidad química, la adhesión y el crecimiento celular al proveer una alta área de superficie. El andamio fijo disminuye el esfuerzo cortante y permite el crecimiento celular en 3D al recrear una mejor imitación de las condiciones *in vivo*. La mayor desventaja de este tipo de biorreactor es el poco control de los gradientes de concentración de los compuestos (35).

4. Aplicaciones de los cultivos de células madre

*Ruth Mélida Sanchez Mora
Martha Gómez Jiménez*

Las aplicaciones que se presentan en este capítulo evidencian el impacto de los cultivos celulares, en los cuales los conocimientos y avances en el aislamiento, la expansión y la diferenciación de CMs son fundamentales. Gracias a los cultivos de CMs es posible disminuir la experimentación en modelos animales y las preocupaciones bioéticas que conlleva su uso en la investigación científica. Además del uso de modelos animales, no permite la transpolación de los resultados a la especie humana. Así, por ejemplo, como los estudios preclínicos para la selección de fármacos, el advenimiento de nuevas tecnologías de cultivo 3D y el uso de robustos equipos como los biorreactores permiten responder a los nuevos desafíos en el campo de la investigación y el modelamiento de patologías en beneficio de la salud humana.

4.1 Las células madre pluripotentes inducidas como modelo para enfermedades

En el 2006, Takahashi y Yamanaka generaron CMPis a partir de células somáticas (CSs) de ratón. Años más tarde, estas fueron obtenidas de células madre potenciales humanas e inducidas a su diferenciación y son conocidas como CMPihs. La llegada de esta tecnología ha abierto nuevas posibilidades para la investigación biomédica. Este avance ha dado acceso a células madre similares a células madres embrionarias de humanos, lo que evita muchas de las limitaciones éticas relacionadas con el uso de embriones humanos en la investigación científica (38).

Las CMPihs se pueden obtener a partir de la reprogramación de células somáticas adultas utilizando factores de transcripción específicos: Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4 (véase la figura 21). Actualmente se han desarrollado protocolos en los que se utilizan virus Sendai, ácidos ribonucleicos (ARN) y episomas para inducir la diferenciación y reprogramación genética en las CMs, los cuales se caracterizan por ser vectores que no integran o dejan secuencias residuales en el genoma de la CM, generando CMPis de mejor calidad al disminuir efectos no deseados o impredecibles en el comportamiento celular. Las CMPis tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos de células pertenecientes a las tres capas germinales y se constituyen en una plataforma poderosa para el modelado de enfermedades y el descubrimiento de fármacos (véase la figura 21) (36).

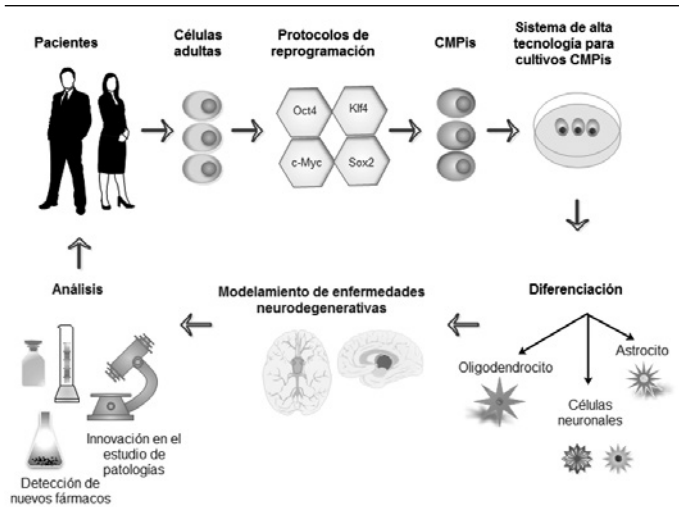


Figura 21. Células madre pluripotentes inducidas. Se relacionan las aplicaciones de las CMPis en el proceso de modelado de enfermedades.

Fuente: elaboración propia.

Las CMs derivadas del paciente pueden reprogramarse genéticamente para generar CMPihs y, gracias a la alta tecnología, se pueden cultivar y diferenciar en células cerebrales como oligodendrocitos, astrocitos y diferentes poblaciones neuronales. Todo esto brinda la posibilidad de estudiar con precisión las enfermedades neurodegenerativas *in vitro* y obtener información esencial sobre el fenotipo de la enfermedad, así como de los conocimientos patológicos. Asimismo, esta estrategia ofrece la posibilidad de probar medicamentos *in vitro* e identificar

nuevas terapias para trastornos incurables como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Las CMPihs poseen diversas limitaciones, debido a que la mayoría de protocolos para su manipulación aún se encuentran en proceso de estandarización. Uno de los grandes desafíos es disminuir el riesgo de variabilidad genética entre clones y linajes por las interferencias en la memoria epigenética. Sin embargo, se han implementado estrategias como la obtención de células de tejidos más jóvenes (tienen menos mutaciones acumuladas), usar protocolos que no integran secuencias transgénicas, así como controlar y monitorear variaciones en linajes celulares (36).

4.2 Aplicaciones de los modelos organoides

Los organoides permiten el desarrollo de diversas aplicaciones biomédicas, pues al ser estructuras tridimensionales (3D) que se componen de múltiples tipos de células autoorganizadas pueden recapitular el desarrollo embrionario y tisular *in vitro*. Las aplicaciones de los organoides 3D se ilustran en la figura 22. Se han diseñado organoides cerebrales que han permitido el modelamiento de diferentes regiones del cerebro, como, por ejemplo, la corteza y el cerebro medio. Estos modelos facilitan el estudio del desarrollo temprano del cerebro y sus trastornos, tales como las enfermedades neurodegenerativas y los trastornos del desarrollo neurológico. La mayoría de células empleadas para desarrollar estos organoides son las CMPis, las cuales han demostrado tener gran eficiencia en el momento de obtener información sobre progresión de patologías, interacciones interregionales en el cerebro y comportamiento de los tipos de células dentro de una región del cerebro, lo que facilita el desarrollo de nuevos tratamientos (36, 37).

También se han implementado modelos organoides para células madre neurales (CMNs). Estos tienen forma de neuroesferas cerebrales, las cuales se han utilizado en el estudio de la infección por el virus Zika durante la neurogénesis y el crecimiento, mostrando que este virus altera la morfología e

impide el crecimiento de las neuroesferas, a través de la pirosis del núcleo, la inflamación y el daño mitocondrial, procesos similares a los efectuados por el virus del dengue. Lo anterior permitió sugerir que el virus Zika produce muerte neuronal durante el desarrollo fetal, lo cual genera un extenso daño tisular. Estos estudios han permitido la identificación de dos posibles compuestos farmacológicos como el hidrobromuro de hippeastrina y el dihidrato de amodiaquina, que pueden inhibir la infección por el virus Zika en células progenitoras neurales corticales (37).

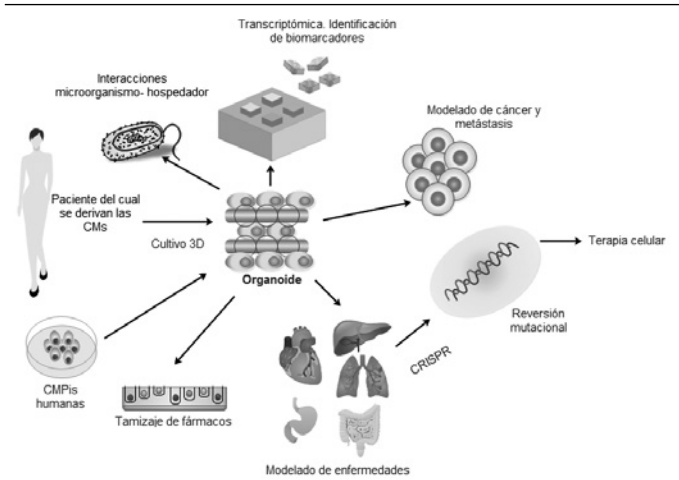


Figura 22. Aplicaciones de organoides. Los organoides son usados como una opción estratégica para investigar mecanismos reguladores y patológicos a nivel molecular. Además, permiten evaluar una amplia gama de productos terapéuticos y farmacéuticos. **Fuente:** elaboración propia.

Los organoides también han permitido modelar el hígado y el páncreas mediante el diseño de cocultivos con CMPis, células endoteliales y CMMs que permiten la autoorganización de los brotes hepáticos vascularizados y funcionales. Los brotes hepáticos pueden proporcionar una fuente ilimitada de hepatocitos para aplicaciones en la selección de fármacos y el diseño de tratamientos (37).

Existe la posibilidad de diseñar organoides de intestino humano por medio de la adición de factores de crecimiento que permitan el desarrollo intestinal embrionario hasta el tejido adulto con morfología similar al epitelio intestinal humano

y características fisiológicas de absorción y secreción, lo que permitiría el estudio de infecciones intestinales producidas por virus como el rotavirus, además de modelar interacciones con bacterias patógenas como *Helicobacter pylori* y *Salmonella enterica*, y así facilitar la realización de pruebas de terapia antiviral/ antibacteriana (37).

En otros estudios se han modelado organoides tumorales derivados de células tumorigénicas circulantes, líneas celulares cancerosas y células extraídas de tumores del paciente que son expandibles y permiten modelar formas específicas de cáncer y tipos raros de cáncer, facilitando la selección y detección de fármacos. Los modelos organoides de cáncer son superiores a las líneas celulares y a los modelos de xenoinjerto debido a su configuración física y su arquitectura, la cual representa características específicas como, por ejemplo, la heterogeneidad de los tumores; esto ha permitido el modelamiento del cáncer de próstata, colorrectal y de ovario (37).

En el caso del cáncer de próstata, los organoides han permitido comprender los mecanismos de metástasis y analizar la respuesta farmacológica, identificando nuevas sensibilidades a los medicamentos. Por otra parte, los organoides de tumores colorrectales han permitido analizar la resistencia a los medicamentos, el potencial metastático de las células y la identificación de biomarcadores relevantes en farmacología, lo que contribuye al desarrollo de la medicina personalizada. Otro aspecto importante es la edición del genoma por medio de CRISPR/Cas9, que ha demostrado ser capaz de generar CMs de cáncer intestinal humano al inducir cuatro genes de cáncer colorrectal mutados: APC, P53, KRAS y SMAD4 (37).

Finalmente, los organoides han permitido el modelado de enfermedades hereditarias como el trastorno del espectro autista (TEA), un trastorno del desarrollo neurológico que se puede modelar utilizando organoides corticales neuronales generados a partir de CMPis obtenidas de individuos que padecen la patología (37). Esto ha permitido evidenciar procesos de patogénesis poco claros en otros modelos de estudio, como, por ejemplo, las alteraciones en la duración del ciclo celular y el incremento en la producción de neuronas inhibitorias GABAérgicas, gracias a la capacidad de representar el desarrollo telecefálico embrionario en

el tercer trimestre del desarrollo humano y la regulación de la producción de neuronas GABAérgicas (37).

Los organoides intestinales también permiten el estudio de la fibrosis quística, una enfermedad autosómica recesiva causada por la mutación del gen regulador de la transmembrana-conductor de la fibrosis quística (CFTR) (37). La edición de la mutación de CFTR a través de CRISPR/Cas9 en CMs primarias intestinales en adultos permitió la restauración completa de la fisiología de organoides intestinales modelados para fibrosis quística (37).

Los organoides hepáticos permiten el modelamiento del síndrome de Alagille (ALGS), el cual consiste en la formación anormal de los conductos biliares que alteran la fisiología del hígado. El síndrome de Alagille es un trastorno genético autosómico dominante causado por mutaciones en el gen JAG1 que codifica el ligando JAG1 de NOTCH (37). Se han logrado realizar organoides hepáticos con CMPis empleando Matrigel y factores de transcripción como FGF10, el cual induce la diferenciación a células hepáticas y de vesícula biliar, lo que permite recrear el síndrome de Alagille con alteraciones en estructuras tubulares aparentes y expresión reducida de ARNm para los marcadores de diferenciación del ARNm de NOTCH 2 y del conducto biliar (CK19, CK7, GGT y CFTR) (37). Por esta razón se sugiere que los organoides hepáticos podrían modelar enfermedades metabólicas del hígado sin aberraciones genéticas (37).

4.3 Las células madre mesenquimales como modelo para enfermedades

Las CMMs se han descrito en la regeneración de tejidos por su capacidad de migrar a los sitios de lesión y se diferencian en los tipos celulares requeridos para reponer la pérdida de tejido o realizar un recambio celular con el fin de mejorar la fisiología. Esta migración es conocida como *homing* y se ha sugerido que es provocada por señales quimiotácticas producidas por el tejido en el sitio de la lesión, como es el caso del factor-1 derivado de estroma (SDF-1/CXCR4/receptor alfa CD184), el cual se ha caracterizado como un quimioa-

trayente para CMMs. También han sido descritas otras proteínas tales como algunos receptores de quimioquinas (CXCR4, CX3CR1, CXCR6, CCRI y CCR7), la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), citoquinas inflamatorias de MMP-2, MTI-MMP y MMP-9, y las citoquinas PDGF-AB, IGF-1 y RANTES (28).

La función de regeneración de tejidos de las CMMs se realiza mediante dos vías principales. En la primera las CMMs se diferencian de los tipos de células del tejido lesionado, adoptando sus propiedades funcionales; en la segunda, las CMMs ejercen un efecto inmunomodulador mediante mecanismos paracrinos (como, por ejemplo, la estimulación del ciclo celular), de modo que impulsan la autorregeneración del tejido lesionado (28).

Se han realizado estudios con CMMs en animales grandes (p. ej., los equinos), en los que se ha usado como una terapia adecuada en enfermedades inflamatorias agudas y crónicas degenerativas de tendones, cartílagos y huesos. Además, el tratamiento con CMMs, ya sea de tipo alogénico o autólogo en varias especies animales, incluyendo caballos, perros y gatos, resulta seguro y sin eventos adversos (28).

Los estudios en fase clínica en humanos se han realizado en diversas patologías (véase la tabla 8) con énfasis en las enfermedades neurodegenerativas (p. ej., la esclerosis lateral amiotrófica [ELA], caracterizada por la muerte de las motoneuronas y la esclerosis múltiple [EM], que es una inflamación crónica del sistema nervioso), en las cuales se ha realizado terapia con CMMs aisladas de medula ósea y de tejido adiposo; los números de células inyectadas varían de 1×10^6 a 1×10^8 células por kg de peso corporal.

Los diferentes estudios muestran resultados en los cuales se describe que la terapia mostró una mejora de agudeza visual, se impulsaron efectos inmunomoduladores, se retrasó la progresión de las patologías y no se observaron eventos adversos. También es importante destacar que en enfermedades agudas como la insuficiencia hepática y el infarto agudo de miocardio la terapia con CMMs ha demostrado efectos antiinflamatorios, seguridad, viabilidad y mejoría en la función hepática (en los casos de cirrosis hepática) (28).

Tabla 8. Ensayos clínicos con células madre mesenquimales

Patología	Origen de CMMs	Ruta de aplicación/ números celulares infundidos	Efectos después del tratamiento
Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	Médula ósea autóloga	Intratecalmente/ 2×10^6 /kg	No se observaron eventos adversos (39).
	Médula ósea autóloga	Intratecalmente/ 2×10^6 /kg	Se evidenciaron niveles de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y TGF- β en CMMs identificados como marcadores biológicos potenciales para predecir la efectividad de la terapia con CMMs autólogas (40).
	Médula ósea autóloga	Intramuscular Intratecalmente/ 1×10^6 /kg	No se observaron eventos adversos. Reducción de la pendiente de la Escala de calificación funcional ALS revisada (41).
	Tejido adiposo autólogo	Intratecalmente/ 10^7 - 10^8 /kg	No se observaron eventos adversos (42).
	Médula ósea autóloga	Intratecalmente/ $15 \pm 4,5 \times 10^6$	No se observaron eventos adversos. Progresión de la enfermedad retardada (43).
Esclerosis múltiple (EM)	Médula ósea autóloga	Vía intravenosa/ $1-2 \times 10^6$ /kg	Seguridad y viabilidad durante el tratamiento (44).
	Médula ósea autóloga	Vía intravenosa/ $1,6 \times 10^6$ /kg	No se observaron eventos adversos. Mejora de la agudeza visual (45).
	Médula ósea autóloga	Vía intravenosa / $1-2 \times 10^6$ /kg	No se observaron eventos adversos. Reducción de la inflamación (46).
Lesión de la médula espinal	Tejido adiposo autólogo	Vía intravenosa/ 4×10^8	No se observaron eventos adversos. Sin desarrollo tumoral (47).
	Médula ósea	Localmente 10^7 / ml	No se observaron eventos adversos. Mejoras variables en la sensibilidad táctil (48).
	Médula ósea autóloga	Intramedular $1,6 \times 10^6$ subduralmente $3,2 \times 10^6$	No se observaron eventos adversos. Efecto terapéutico muy débil en comparación con la inyección múltiple de CMMs (49).

Patología	Origen de CMMs	Ruta de aplicación/ números celulares infundidos	Efectos después del tratamiento
Osteoartritis	Tejido adiposo autólogo	Intra-articularmente/ dosis baja $1,0 \times 10^7$ dosis media $5,0 \times 10^7$ dosis alta $1,0 \times 10^8$	No se observaron eventos adversos. En la dosis alta se observó mejorada la función y el dolor (50).
	Tejido adiposo autólogo	Intra-articularmente/ dosis baja 2×10^6 dosis media 10×10^6 dosis alta 50×10^6	No se observaron eventos adversos. Los pacientes tratados con CMMs en dosis bajas experimentaron mejoras significativas en los niveles de dolor (51).
Enfermedad de injerto contra huésped (EICH)	Médula ósea alogénica	Vía intravenosa/ $1,1 \times 10^6$ / kg	No se observaron eventos adversos. El 70 % de pacientes respondió, mientras el 30% no respondió a la infusión de CMMs (52).
	Médula ósea alogénica	Vía intravenosa/ $0,9-9 \times 10^6$ / kg	Inmunosupresor. Reparación del epitelio intestinal dañado (53).
	Médula ósea alogénica	Vía intravenosa 2×10^6 /kg varias aplicaciones cada cuatro días	Evento adverso de toxicidad aguda identificable. Las infusiones múltiples fueron bien toleradas y seguras en niños. Las respuestas clínicas, particularmente en el sistema gastrointestinal, se observaron en la mayoría de los niños con enfermedad injerto contra huésped refractaria severa (54).
Enfermedad de Crohn (EC)	Médula ósea autóloga	Vía intravenosa hasta 10^6 / kg	No se observaron eventos adversos y factibles (55).
	Médula ósea alogénica	Vía intravenosa 2×10^6 /kg	Índice de actividad de la EC reducido e índice de gravedad endoscópico de EC reducido (56).
Trasplante de hígado Insuficiencia hepática aguda o crónica. Cirrosis hepática	No conocido	Vena porta y vena central $1,5 \times 10^8$	No hay evidencia de administración de toxicidad aguda (57).
	Cordón umbilical alogénico	Vía intravenosa/ $0,5 \times 10^6$	No se observaron eventos adversos. Reducción de la puntuación modelo para la enfermedad hepática en etapa terminal (MELD) (58).
	Médula ósea autóloga	Vena intravenosa o porta $3-5 \times 10^6$ /kg	No se observaron eventos adversos. Mejora de la puntuación MELD (59).

Continúa en la página 82

Patología	Origen de CMMs	Ruta de aplicación/ números celulares infundidos	Efectos después del tratamiento
Enfermedad del riñón	Médula ósea autóloga	Vía intravenosa / $1-2 \times 10^6/\text{kg}$	No se observaron eventos adversos. Inmunosupresión sistémica (60).
Infarto agudo de miocardio	Médula ósea autóloga	10 sitios infartados/	No se observaron eventos adversos con CMMs autólogas y alogénicas. Mejora de la puntuación de la New York Heart Association (61).
	Médula ósea alogénica	$20-200 \times 10^6$	
	Médula ósea autóloga	Arteria relacionada con el infarto/ 1×10^6 células	No se observaron eventos adversos. Mejora moderada en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo a los seis meses de seguimiento (62).

Fuente: elaboración propia.

4.3.1 Las células madre mesenquimales en enfermedades autoinmunes

Las CMMs, por sus propiedades immuno-moduladoras, representan una alternativa para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis sistémica (ES), esclerosis múltiple (EM), púrpura trombocitopenia inmune (PTI), diabetes mellitus (DM) tipo I y la EC. La mayor característica de las CMMs es el control de la expansión de células específicas del antígeno Th1/Th17, la disminución en la secreción de quimioquinas inflamatorias, citoquinas y el número de células CD34+ (63).

4.3.2 Células madre mesenquimales en tratamiento de cáncer

Las CMMs han demostrado acciones antitumorales o antiangiogénicas convirtiéndose en una alternativa de tratamiento para pacientes que experimentan metástasis y falla terapéutica. Sin embargo, es relevante aclarar que debe existir un equilibrio en el número de células a emplear durante la terapia celular, pues es

posible promover el crecimiento tumoral. Actualmente, las terapias con CMMs se han empleado en cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de pulmón, leucemia y linfoma (63). Los mecanismos de acción de las CMMs, a nivel general, en el tratamiento de cáncer son el efecto citorreductor, la generación de linfocitos T antineoplásicos y la supresión de los efectos del injerto contra el tumor (63).

4.3.3 Células madre mesenquimales en enfermedades neurodegenerativas

Las CMMs han sido utilizadas en el tratamiento de trastornos neurológicos como lesiones de la médula espinal, la EA, la EP y la esclerosis lateral amiotrófica. Sin embargo, las enfermedades neurodegenerativas son de alta complejidad y las terapias celulares deben tener en cuenta más de un tipo de célula. En diversos estudios se ha demostrado que las CMMs ejercen efectos neuroprotectores, antiinflamatorios, secreción de factores tróficos VEGF y activación de la microglia, lo que conlleva a una remodelación del tejido y disminuye el tejido cicatricial (64, 65).

Conclusión

Los objetivos a futuro de los cultivos de CMs deben centrarse en generar nuevos campos de acción mediante la implementación de nuevas tecnologías y materiales biomiméticos, lo que permita desarrollar metodologías más específicas con el fin de observar, controlar y monitorear el comportamiento celular a nivel molecular tanto intracelular como del entorno. Sin embargo, es necesario superar varios desafíos respecto a la comprensión de la fisiología de las CMs. Los bancos de CMs actualmente han tomado gran importancia y son una gran herramienta en la investigación en diferentes áreas del conocimiento. Estos bancos facilitan la disponibilidad de CMs para terapias, especialmente en el campo de la medicina regenerativa, por lo cual el uso de tecnologías de punta en los sistemas de cultivo y los adelantos en técnicas como, por ejemplo, la criopreservación, representan un avance en el propósito de superar las dificultades actuales en el cultivo de CMs e implementar nuevas aplicaciones en este campo.

Referencias

1. Saito MT, Silverio KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. *World journal of stem cells*. 2015;7(2):399-407.
2. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis research & therapy*. 2007;9(1):204.
3. Bao M, Xie J, Huck WTS. Recent Advances in Engineering the Stem Cell Micro-niche in 3D. *Advanced science*. 2018;5(8):1800448.
4. Ouryazdanpanah N, Dabiri S, Derakhshani A, Vahidi R, Farsinejad A. Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells: Growth Factor-Free Isolation, Molecular Characterization and Differentiation. *Iranian journal of pathology*. 2018;13(4):461-6.
5. Rye PD, Hoifodt HK, Overli GE, Fodstad O. Immunobead filtration: a novel approach for the isolation and propagation of tumor cells. *The American journal of pathology*. 1997;150(1):99-106.
6. Hibino N, Nalbandian A, Devine L, Martinez RS, McGillicuddy E, Yi T, et al. Comparison of human bone marrow mononuclear cell isolation methods for creating tissue-engineered vascular grafts: novel filter system versus traditional density centrifugation method. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2011;17(10):993-8.
7. Pillai SG, Zhu P, Siddappa CM, Adams DL, Li S, Makarova OV, et al. Enrichment and Molecular Analysis of Breast Cancer Disseminated Tumor Cells from Bone Marrow Using Microfiltration. *PloS one*. 2017;12(1):e0170761.

8. Raposio E, Simonacci F, Perrotta RE. Adipose-derived stem cells: Comparison between two methods of isolation for clinical applications. *Annals of medicine and surgery*. 2017;20:87-91.
9. Ishii K, Suzuki N, Mabuchi Y, Sekiya I, Akazawa C. Technical advantage of recombinant collagenase for isolation of muscle stem cells. *Regenerative therapy*. 2017;7:1-7.
10. De Francesco F, Mannucci S, Conti G, Dai Pre E, Sbarbati A, Riccio M. A Non-Enzymatic Method to Obtain a Fat Tissue Derivative Highly Enriched in Adipose Stem Cells (ASCs) from Human Lipoaspirates: Preliminary Results. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(7).
11. Qu C, Yan M, Yang S, Wang L, Yin Q, Liu Y, et al. Haploid embryonic stem cells can be enriched and maintained by simple filtration. *The Journal of biological chemistry*. 2018;293(14):5230-5.
12. Lin HR, Heish CW, Liu CH, Muduli S, Li HF, Higuchi A, et al. Purification and differentiation of human adipose-derived stem cells by membrane filtration and membrane migration methods. *Scientific reports*. 2017;7:40069.
13. Schlinker AC, Radwanski K, Wegener C, Min K, Miller WM. Separation of in-vitro-derived megakaryocytes and platelets using spinning-membrane filtration. *Biotechnology and bioengineering*. 2015;112(4):788-800.
14. Klymiuk MC, Balz N, Elashry MI, Heimann M, Wenisch S, Arnhold S. Exosomes isolation and identification from equine mesenchymal stem cells. *BMC veterinary research*. 2019;15(1):42.
15. Khan FA, Almohazey D, Alomari M, Almofty SA. Isolation, Culture, and Functional Characterization of Human Embryonic Stem Cells: Current Trends and Challenges. *Stem cells international*. 2018;2018:1429351.
16. Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histology and histopathology*. 2013;28(9):1109-16.

17. Morris RJ. Thy-1, a Pathfinder Protein for the Post-genomic Era. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2018;6:173.
18. Bradley JE, Ramirez G, Hagood JS. Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *BioFactors*. 2009;35(3):258-65.
19. Barry F, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, Zaia J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;289(2):519-24.
20. Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, Shimada S, Akiyama Y, Aihara A, et al. CD73 as a therapeutic target for pancreatic neuroendocrine tumor stem cells. *International journal of oncology*. 2016;48(2):657-69.
21. Kumar V. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic signalling*. 2013;9(2):145-65.
22. de Leve S, Wirsdorfer F, Jendrossek V. Targeting the Immunomodulatory CD73/Adenosine System to Improve the Therapeutic Gain of Radiotherapy. *Frontiers in immunology*. 2019;10:698.
23. Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *Journal of translational medicine*. 2004;2(1):18.
24. Metcalfe E, Arik D, Oge T, Etiz D, Yalcin OT, Kabukcuoglu S, et al. CD105 (endoglin) expression as a prognostic marker of angiogenesis in squamous cell cervical cancer treated with radical radiotherapy. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2018;14(6):1373-8.
25. Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;299(4):H959-74.
26. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 2014;32(6):1408-19.

27. Chosa N, Ishisaki A. Two novel mechanisms for maintenance of stemness in mesenchymal stem cells: SCRGI/BST1 axis and cell-cell adhesion through N-cadherin. *The Japanese dental science review*. 2018;54(1):37-44.
28. Uder C, Bruckner S, Winkler S, Tautenhahn HM, Christ B. Mammalian MSC from selected species: Features and applications. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2018;93(1):32-49.
29. Serna-Cuéllar E, Santamaría-Solís L. Protocolo de extracción y procesamiento de células madre adultas del tejido adiposo abdominal: coordinadas del cirujano plástico en la investigación traslacional. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*. 2013;39:s44-s50.
30. Brizuela C C, Galleguillos G S, Carrión A F, Cabrera P C, Luz C P, Inostroza S C. Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *International Journal of Morphology*. 2013;31:739-46.
31. Arbósa. A, Nicolau. F, Quetglas. M, Ramis. JM, Monjo. M, Muncunill. J, et al. Obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un programa altruista de donación de sangre de cordón. *Inmunología*. 2013;32(1):1-40.
32. Mizuno M, Katano H, Otabe K, Komori K, Kohno Y, Fujii S, et al. Complete human serum maintains viability and chondrogenic potential of human synovial stem cells: suitable conditions for transplantation. *Stem cell research & therapy*. 2017;8(1):144.
33. Hornberger K, Yu G, McKenna D, Hubel A. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells: Emerging Assays, Cryoprotectant Agents, and Technology to Improve Outcomes. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. 2019;46(3):188-96.
34. Irdani T, Mazzanti B, Ballerini L, Saccardi R, Torre R. A non-traditional approach to cryopreservation by ultra-rapid cooling for human mesenchymal stem cells. *PloS one*. 2019;14(7):e0220055.

35. Mizukami A, Swiech K. Mesenchymal Stromal Cells: From Discovery to Manufacturing and Commercialization. *Stem cells international*. 2018;2018:4083921.
36. Centeno EGZ, Cimarosti H, Bithell A. 2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modelling. *Molecular neurodegeneration*. 2018;13(1):27.
37. Ho BX, Pek NMQ, Soh BS. Disease Modeling Using 3D Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(4).
38. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
39. Oh KW, Moon C, Kim HY, Oh SI, Park J, Lee JH, et al. Phase I trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Stem cells translational medicine*. 2015;4(6):590-7.
40. Kim HY, Kim H, Oh KW, Oh SI, Koh SH, Baik W, et al. Biological markers of mesenchymal stromal cells as predictors of response to autologous stem cell transplantation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: an investigator-initiated trial and in vivo study. *Stem cells*. 2014;32(10):2724-31.
41. Petrou P, Gothelf Y, Argov Z, Gotkine M, Levy YS, Kassis I, et al. Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase I/2 and 2a Clinical Trials. *JAMA neurology*. 2016;73(3):337-44.
42. Staff NP, Madigan NN, Morris J, Jentoft M, Sorenson EJ, Butler G, et al. Safety of intrathecal autologous adipose-derived mesenchymal stromal cells in patients with ALS. *Neurology*. 2016;87(21):2230-4.
43. Sykova E, Rychmach P, Drahoradova I, Konradova S, Ruzickova K, Vorisek I, et al. Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase I/IIa Clinical Trial. *Cell transplantation*. 2017;26(4):647-58.

44. Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, et al. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology*. 2010;67(10):1187-94.
45. Connick P, Kolappan M, Patani R, Scott MA, Crawley C, He XL, et al. The mesenchymal stem cells in multiple sclerosis (MSCIMS) trial protocol and baseline cohort characteristics: an open-label pre-test: post-test study with blinded outcome assessments. *Trials*. 2011;12:62.
46. Llifriu S, Sepulveda M, Blanco Y, Marin P, Moreno B, Berenguer J, et al. Randomized placebo-controlled phase II trial of autologous mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *PLoS one*. 2014;9(12):e113936.
47. Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, Lee HY, et al. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem cells and development*. 2011;20(8):1297-308.
48. Mendonca MV, Larocca TF, de Freitas Souza BS, Villarreal CF, Silva LF, Matos AC, et al. Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury. *Stem cell research & therapy*. 2014;5(6):126.
49. Oh SK, Choi KH, Yoo JY, Kim DY, Kim SJ, Jeon SR. A Phase III Clinical Trial Showing Limited Efficacy of Autologous Mesenchymal Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury. *Neurosurgery*. 2016;78(3):436-47; discussion 47.
50. Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem cells*. 2014;32(5):1254-66.
51. Pers YM, Rackwitz L, Ferreira R, Pullig O, Delfour C, Barry F, et al. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(7):847-56.

52. Sanchez-Guijo F, Caballero-Velazquez T, Lopez-Villar O, Redondo A, Parody R, Martinez C, et al. Sequential third-party mesenchymal stromal cell therapy for refractory acute graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2014;20(10):1580-5.
53. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006;81(10):1390-7.
54. Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, Talano JA, Jacobsohn D, Broadwater G, et al. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2011;17(4):534-41.
55. Dhere T, Copland I, Garcia M, Chiang KY, Chinnadurai R, Prasad M, et al. The safety of autologous and metabolically fit bone marrow mesenchymal stromal cells in medically refractory Crohn's disease - a phase I trial with three doses. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2016;44(5):471-81.
56. Forbes GM, Sturm MJ, Leong RW, Sparrow MP, Segarajasingam D, Cummins AG, et al. A phase 2 study of allogeneic mesenchymal stromal cells for luminal Crohn's disease refractory to biologic therapy. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2014;12(1):64-71.
57. Soeder Y, Loss M, Johnson CL, Hutchinson JA, Haarer J, Ahrens N, et al. First-in-Human Case Study: Multipotent Adult Progenitor Cells for Immunomodulation After Liver Transplantation. *Stem cells translational medicine*. 2015;4(8):899-904.
58. Shi M, Zhang Z, Xu R, Lin H, Fu J, Zou Z, et al. Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves liver function in acute-on-chronic liver failure patients. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(10):725-31.

59. Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2009;21(10):1199-205.
60. Reinders ME, de Fijter JW, Roelofs H, Bajema IM, de Vries DK, Schaapherder AF, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. *Stem cells translational medicine*. 2013;2(2):107-11.
61. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *Jama*. 2012;308(22):2369-79.
62. Lee JW, Lee SH, Youn YJ, Ahn MS, Kim JY, Yoo BS, et al. A randomized, open-label, multicenter trial for the safety and efficacy of adult mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction. *Journal of Korean medical science*. 2014;29(1):23-31.
63. Hawsawi YM, Al-Zahrani F, Mavromatis CH, Baghdadi MA, Saggi S, Oyouni AAA. Stem Cell Applications for Treatment of Cancer and Autoimmune Diseases: Its Promises, Obstacles, and Future Perspectives. *Technology in cancer research & treatment*. 2018;17:1533033818806910.
64. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience reports*. 2015;35(2).
65. Zakrzewski W, Dobrzynski M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):68.

IMPACTO

DEL CULTIVO DE CÉLULAS MADRE Y SUS APLICACIONES

El impacto de los cultivos de células madre se ha reflejado en múltiples aplicaciones a través del tiempo, desde el análisis, la caracterización de vías, moléculas y mecanismos de señalización, implicados en patologías humanas, hasta el descubrimiento de nuevos fármacos y blancos terapéuticos utilizados como solución para estas.

Los avances en tecnologías de punta han permitido el desarrollo de nuevos equipos, materias primas y nuevas técnicas moleculares que actualmente facilitan la aplicación de cultivos de células madre en terapias celulares para el tratamiento de enfermedades crónicas y la regeneración de tejidos.

