Reseñas de Investigación.

Secretoma de las células madre mesenquimales del cérvix uterino: propiedades antitumorales, antiinflamatorias y regenerativas

15/10/2018

Noemí Eiró1, Jorge Saa1, Juan Sendón-Lago2, María A. Bermúdez2, Sandra Cid1, María Fraile1, Román Pérez-Fernández2, Francisco J. Vizoso1.

1 Unidad de Investigación. Fundación Hospital de Jove, Avda. Eduardo Castro, 161, 33290 Gijón, España.
2 Departamento de Fisiología, Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS). Universidad de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, España.
Proyectos: Instituto de Salud Carlos III PI13/02745 y PI17/02236; FICYT GRUPIN14-116.

En este trabajo describimos el aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de adulto procedentes de una nueva fuente, el cérvix uterino, denominadas hUCESCs (del término en inglés "human Uterine Cervical Stem Cells"). Además, mostramos datos in vitro e in vivo que demuestran que su secretoma, o medio condicionado, tiene efecto antitumoral en el cáncer de mama, así como efecto antiinflamatorio y regenerativo en modelos de experimentación animal de uveítis y de ojo seco, respectivamente. La estrategia de administrar el secretoma de las células madre, en lugar de ellas mismas, podría resolver los múltiples problemas derivados del uso de células vivas proliferantes en el contexto de la medicina regenerativa.

Introducción

Las células madre mesenquimales (CMMs) de adulto se pueden aislar y expandir a partir del estroma de muchos tejidos, siendo la médula ósea y la grasa subcutánea las fuentes más comunes. El comité de CMMs de la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT)) estableció en 2006 las características mínimas para la identificación de las CMMs humanas: i) células adherentes al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar; ii) células que expresan CD105, CD73 y CD90, y no expresan CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 ni moléculas de superficie HLA-DR y iii) células con capacidad para diferenciarse en adipocitos, osteoblastos y condroblastos *in vitro*1.

Inicialmente, se atribuyeron los efectos terapéuticos de las CMMs a su capacidad de injertarse y diferenciarse en los tejidos diana. Sin embargo, varios estudios han revelado que el tiempo de implantación de las CMMs suele ser demasiado corto para tener efecto. En ese sentido, se ha demostrado que menos del 1% de las CMMs sobreviven más de una semana después de su administración sistémica, lo que sugiere que los principales efectos de las CMMs son, probablemente, mediados por mecanismos paracrinos. Estudios

recientes destacan que la amplia gama de factores bioactivos producidos por las CMMs, pueden jugar un papel importante en la regulación de numerosos procesos fisiológicos. Por lo tanto, el secretoma de las CMMs destaca por su posible uso en la regeneración tisular2.

Objetivos

Los objetivos del estudio han sido:

1. Aislamiento y caracterización de las células madre de adulto del cérvix uterino humano, hUCESCs (del término en inglés "human Uterine Cervical Stem Cells").

2. Análisis del potencial antitumoral de las hUCESCs.

3. Evaluación de la capacidad antiinflamatoria de las hUCESCs.

4. Estudio del potencial regenerativo de las hUCESCs.

Metodología

Aislamiento, caracterización y cultivo de hUCESCs

Las hUCESCs se obtuvieron a partir de frotis cervicales de rutina de Papanicolaou realizados a mujeres no menstruantes en edad fértil. La muestra citológica fue disgregada enzimáticamente, luego se centrifugó durante 5 minutos a 400 g y el precipitado celular se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en una placa de cultivo.

La caracterización de las hUCESCs se realizó mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo. Para inmunocitoquímica se utilizaron anticuerpos específicos para vimentina, #-catenina, citoqueratina (clon AE1AE3), actina HHF35, actina de músculo liso, desmina, E-cadherina, KLF4, OCT4 y Sox2. Para citometría de flujo se utilizaron anticuerpos específicos para CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD31, CD34, CD45, CD117, CD133, HLA-DR y TRA1-81. Además, se indujo la diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica de las hUCESCs3.

Las hUCESCs se cultivaron durante 24 ó 48 horas en medio de cultivo DMEM-F12 sin suplementación para la obtención de medio condicionado (MC) o secretoma siguiendo el proceso descrito previamente3. El medio condicionado de las hUCESCs (MC-hUCESCs) se liofilizó y almacenó a -80 ºC hasta su uso. El producto liofilizado se resuspendió en agua estéril justo antes de usarse.

Ensayos de proliferación celular

La tasa de proliferación de las hUCESCs se determinó contando el número total de células, por triplicado, todos los días durante 12 días. Inicialmente, las células se sembraron a una densidad de 2x103 células por pocillo en placa de cultivo de 6 pocillos. El tiempo de duplicación se determinó usando la fórmula: Dt = (t - t0) log2 / (logN - logN0), donde t y t0 son los tiempos en los que se contaron las células, y N y N0 son los números de células en los momentos t y t0, respectivamente. Los experimentos de viabilidad y proliferación celular se llevaron a cabo utilizando ensayos MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) tal y como se describió previamente3. Las células MDA-MB-231, línea celular de cáncer de mama triple negativo altamente agresiva, se sembraron a una densidad de 3x104 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Tras veinticuatro horas, las células se trataron durante 48 horas con medio de cultivo DMEM-F12 con 10% de FBS (+ FBS), con DMEM-F12 sin FBS (-FBS) y con medio condicionado (MC) de MDA-MB-231 o de hUCESCs producido durante 24 o 48 horas. La absorbancia de las muestras se midió a una longitud de onda de 570 nm utilizando un lector de placas de múltiples pocillos. Los resultados se representaron como los valores medios ± la desviación estándar de cuadruplicados de, al menos, tres experimentos independientes.

Estudios sobre un modelo *in vivo* de cáncer de mama

Todos los estudios realizados en animales de experimentación fueron aprobados por el Comité de referencia para la Experimentación Animal. Se realizaron estudios de cáncer de mama mediante xenoinjerto utilizando trece ratones hembra con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) de entre 6 y 8 semanas de edad (6 controles y 7 tratados). Para la generación y seguimiento del crecimiento tumoral, se inyectaron por vía subcutánea 3x106 células MDA-MB-231 transfectadas de manera estable con el vector pcDNA3-luciferasa (células MDA-MB-231-luc) en la almohadilla de grasa mamaria de ambos costados. Quince días después de la inyección de las células, los ratones fueron tratados intratumoralmente con 150 µl de medio de cultivo DMEM-F12 (controles) o con MC-hUCESCs producido durante 48 horas, cada cinco días hasta el día cuarenta y siete. Después de la inyección de luciferina (150 mg/kg), el volumen del tumor se controló externamente mediante luminiscencia usando el sistema IVIS (In Vivo Imaging System, Caliper Life Sciences, Alameda, CA, EE. UU.). Se obtuvo un mapa de intensidad utilizando el software Living Image (Caliper Life Sciences), que utiliza una escala basada en el color para representar la intensidad de cada píxel (azul: baja intensidad, rojo: alta intensidad). Los ratones fueron monitorizados para estudios de supervivencia.

Estudios sobre un modelo *in vivo* de uveítis

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley con un peso de 250 a 300 g. Para inducir uveítis, se inoculó en la pata derecha de las ratas 1 mg/kg de peso de LPS de *Escherichia coli* diluido en 0,1 ml de PBS4.

Se realizaron 5 grupos de 10 ratas cada uno: i) ratas sanas (sin inyección de LPS) no tratadas ii) ratas con uveítis inducida por endotoxina (EIU, del término en inglés "endotoxin-induced uveitis") no tratadas; iii) ratas EIU tratadas con medio de cultivo DMEM-F12; iv) ratas EIU tratadas con dexametasona (DXM) y v) ratas EIU tratadas con MC-hUCESCs producido durante 48 horas. Los tratamientos se aplicaron en cada ojo por vía tópica (1 gota) cada 3 horas durante las primeras 12 horas después de la inyección de LPS. Veinticuatro horas después de la inyección de LPS se realizó la evaluación histológica. Para ello, se extirparon los globos oculares y se fijaron por inmersión en formalina tamponada neutra al 10%; para el análisis de la infiltración de leucocitos de los mismos se siguió el procedimiento descrito previamente4. Además, se analizaron los niveles de ARNm de las citoquinas inflamatorias IL-6, TNF-a, IL-8 y MIP-1a, mediante PCR en tiempo real4.

Estudios sobre un modelo *in vivo* de ojo seco

El síndrome del ojo seco fue inducido en ratas extirpando las glándulas lacrimales extra-oculares bilateralmente. A continuación, se produjo una úlcera alcalina corneal en la zona central de ambos ojos aplicando el procedimiento descrito previamente5. Inmediatamente después, y con el fin de llevar un seguimiento de la evolución de las úlceras, las córneas se lavaron con solución salina durante 30 segundos, se tiñeron con fluoresceína y se fotografiaron bajo luz azul con una cámara digital adjunta a un microscopio quirúrgico. El experimento se llevó a cabo con un total de 12 ratas, distribuidas en 4 grupos de 3 ratas cada uno: i) ratas con ojo seco y úlceras alcalinas corneales sin tratamiento; ii) ratas con ojo seco y úlceras alcalinas corneales tratadas con medio de cultivo DMEM-F12; iii) ratas con ojo seco y úlceras alcalinas corneales tratadas con gotas oftálmicas con hialuronato de sodio (0,015 g / 10 ml); iv) ratas con ojo seco y úlceras alcalinas corneales tratadas con MC-hUCESCs producido durante 48 horas. Los tratamientos se aplicaron en cada ojo por vía tópica (1 gota) cuatro veces al día durante 5 días. Tras los tratamientos, la lesión corneal se midió cuantitativamente utilizando el software ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij/). Además, se seleccionó aleatoriamente una rata de cada grupo y se sacrificaron para la evaluación histológica, según el procedimiento previamente descrito4.

Análisis Estadístico

Cada experimento se realizó al menos 3 veces. Los valores se expresan como la media ± la desviación o el error estándar. Los promedios se compararon mediante la prueba t de Student de 2 colas o el ANOVA de 1 vía, con la prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer para las comparaciones posteriores. Para el análisis de la supervivencia global, se utilizó el método univariante de Cox y las curvas Kaplan-Meier. Los

valores de *p* menores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Se usó el programa SPSS 17.0 (SPSS Inc.) para todos los cálculos.

Resultados

Aislamiento y caracterización de las hUCESCs

Las hUCESCs se obtuvieron por exfoliación del cérvix uterino mediante frotis de Papanicolaou y se caracterizaron mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo. Las hUCESCs expresan vimentina y #-catenina y, en menor medida, citoqueratina (clon AE1AE3), mientras que no expresan actina HHF35, actina de músculo liso, desmina ni E-cadherina. Además, las hUCESCs muestran una intensa expresión de tres factores de transcripción característicos de las células madre embrionarias: KLF4, OCT4 y Sox2 (Figura 1A). Mediante citometría de flujo, se determinó que las hUCESCs expresan CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105, mientras que no expresan CD31 (marcador endotelial), CD34, CD45, CD133 (marcadores hematopoyéticos), CD117, HLA-DR ni TRA-1-81 (marcador de superficie de células madre embrionarias) (Figura 1B). Este fenotipo se observó en diferentes pases. El índice de duplicación de las hUCESCs es de 1,76 cada 24 horas (Figura 1C). Por otra parte, las hUCESCs muestran la capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica (Figuras 1D-F).

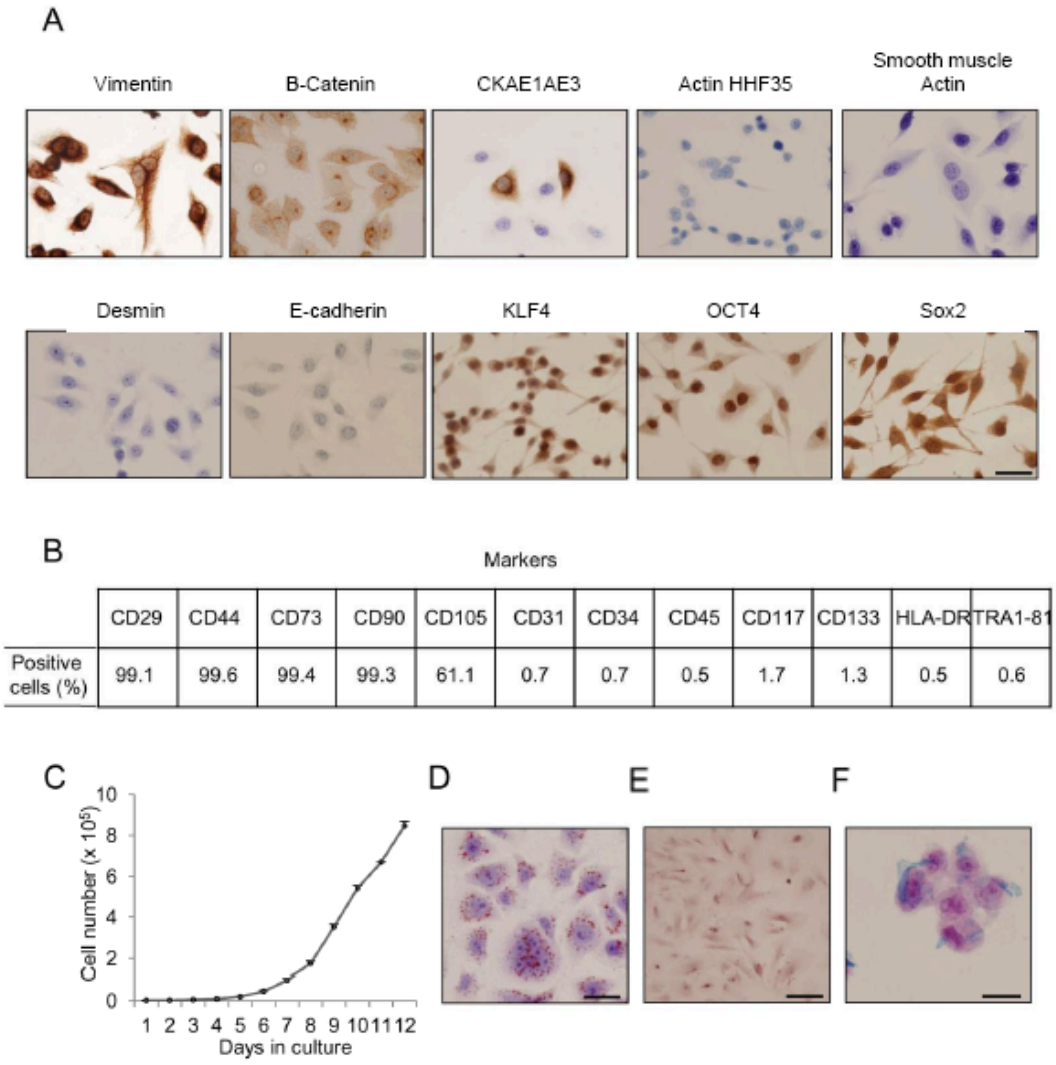


Figura 1. Caracterización de las células madre de cérvix uterino como CMMs.
(A): Imágenes representativas de la expresión, mediante inmunocitoquímica, de las proteínas vimentina (vimentin), β-Catenina (β-Catenin), citoqueratina (CKAE1AE3), actina HHF35 (actin HHF35), actina de músculo liso (smooth muscle actin), desmina (desmin), E-cadherina (E-cadherin); y los factores de transcripción KLF4, OCT4 y Sox2. Barra de escala: 25 µm. (B): Análisis por citometría de flujo de las hUCESCs de los marcadores CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD31, CD34, CD45, CD117, CD133, HLA-DR y Tra1-81. (C): Crecimiento de hUCESCs expresado como número de células después de sembrar $2x10^3$ células/pocillo. (D): Tinción con Oil Red como marcador de células adiposas en hUCESCs después de 12 días de cultivo con medio específico de diferenciación adipogénica. Barra de escala: 25 µm. (E): Tinción con rojo Alizarin S como marcador de diferenciación osteogénica después de 15 días de cultivo. Barra de escala: 25 µm (F): Tinción con Alcian Blue como marcador de diferenciación condrogénica después de 21 días de cultivo. Barra de escala: 25 µm.

Efecto del MC-hUCESCs en la proliferación de células de cáncer de mama en un modelo *in vitro* e *in vivo*

Como se muestra en la Figura 2A, la administración de MC-hUCESCs (producido durante 24 o 48 horas) induce una disminución significativa de la proliferación celular de las MDA-MB-231 a las 48 horas.

A continuación, evaluamos el efecto de la administración intratumoral de MC-hUCESCs *in vivo* utilizando el modelo de xenoinjerto de tumor en ratón inmunodeficiente (SCID). Quince días tras la inyección de las células MDA-MB-231-luc, el tumor se hizo visible y los ratones fueron tratados intratumoralmente cada 5 días con 150 µl de medio DMEM-F12 sin FBS (controles) o de MC-hUCESCs, y se monitorizaron externamente midiendo la luminiscencia (Figura 2B). Se observó una disminución significativa (p = 0,011) en el volumen del tumor después de 15 días de tratamiento con MC-hUCESCs (Figura 2C). Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Figura 2D) indican que los ratones tratados con MC-hUCESCs tuvieron una supervivencia global más larga que los ratones control (p = 0,019).

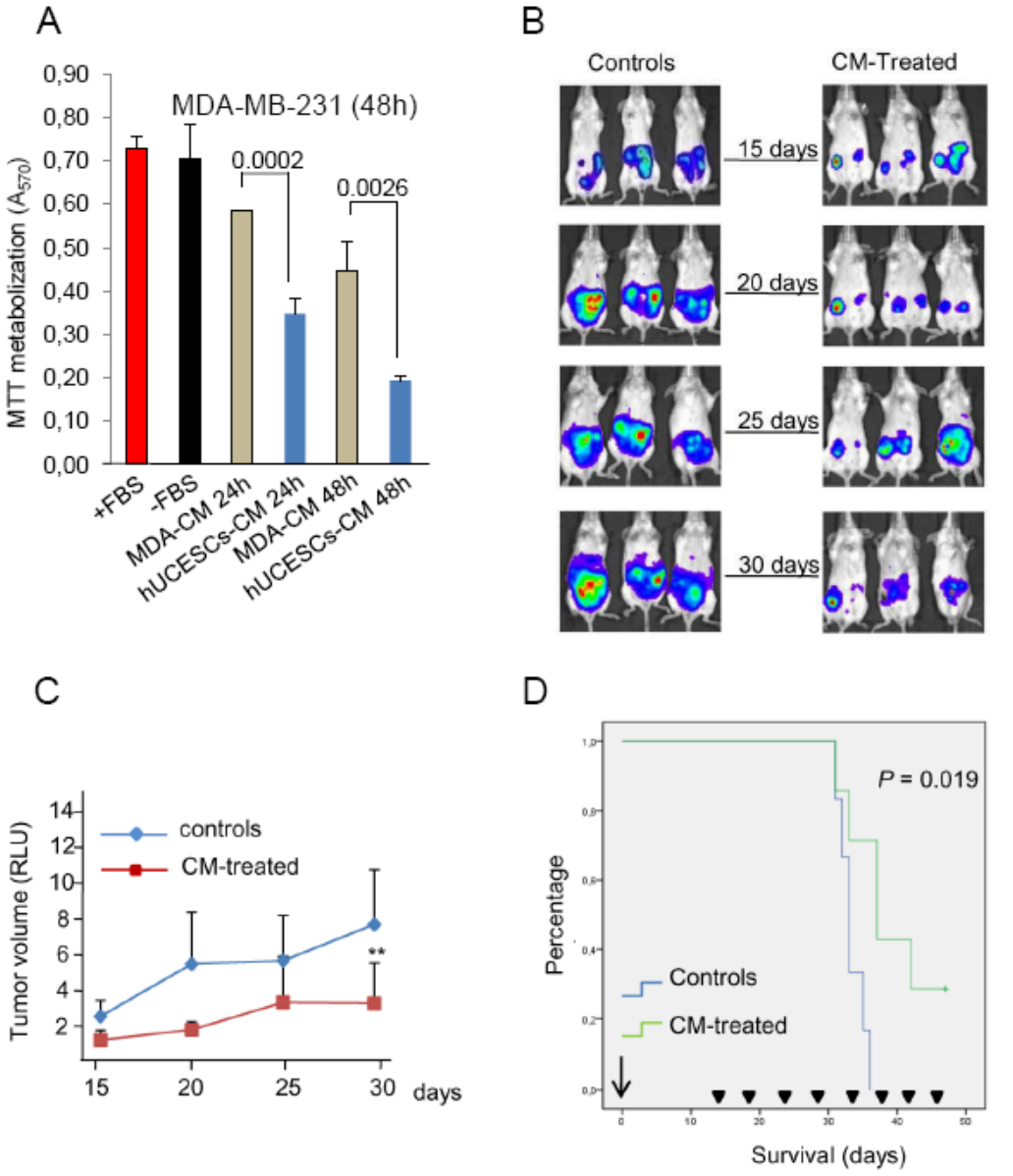
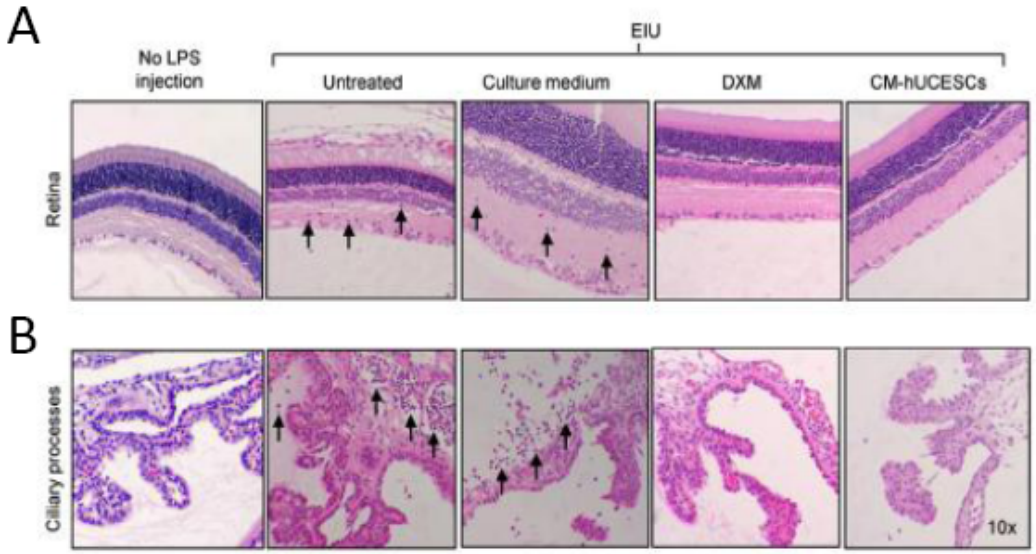


Figura 2. Efecto antitumoral del MC-hUCESCs *in vitro* e *in vivo*.
(A): Ensayo MTT sobre células MDA-MB-231 tratadas durante 48 horas con medio completo (+FBS), medio sin FBS (-FBS), MC-MDA (MDA-CM) y MC-hUCESCs (hUCESCs-CM) de 24 y 48 horas (B): Imágenes representativas del mapa de intensidad de luminiscencia de los ratones tratados intratumoralmente con medio de cultivo (Controls) y con MC-hUCESCs (CM-treated) a los 15, 20, 25 y 30 días después de la inyección de células MDA-MB-231-luc. (C): Determinación del volumen tumoral (tumor volume) midiendo la luminiscencia. Los valores se expresan como la media ± la desviación estándar de los niveles de luminiscencia relativa. (**: $p = 0{,}011$). (D): Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global en ratones tratados con MC (CM-Treated) frente a ratones control (Controls).

El MC-hUCESCs reduce la infiltración de leucocitos y la producción de citoquinas proinflamatorias en un modelo *in vivo* de uveítis

Veinticuatro horas después de la inyección de LPS se realizó la evaluación histológica de las retinas y de los procesos ciliares (Figura 3A-B). Las ratas sanas, a las cuales no se inyectó LPS, no presentaron infiltración de leucocitos. Sin embargo, las ratas con uveítis, tanto no tratadas como tratadas con medio de cultivo, mostraron una infiltración significativa de leucocitos tanto en la retina como en los procesos ciliares. Por el contrario, en las ratas con uveítis tratadas con Dexametasona (DXM) o MC-hUCESCs, se observó una baja infiltración, similar a la observada en ratas sanas (Figura 3C, p<0,001). Para evaluar el efecto del MC-hUCESCs sobre los factores implicados en la inflamación, se analizó la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-6, TNF-α, IL-8 y MIP-1# en el tejido ocular. Los niveles de estos factores fueron significativamente más altos en el tejido ocular de ratas con uveítis no tratadas o tratadas con medio de cultivo que en ratas con uveítis tratadas con DXM o MC-hUCESCs (Figura 3D-G, p <0,01).



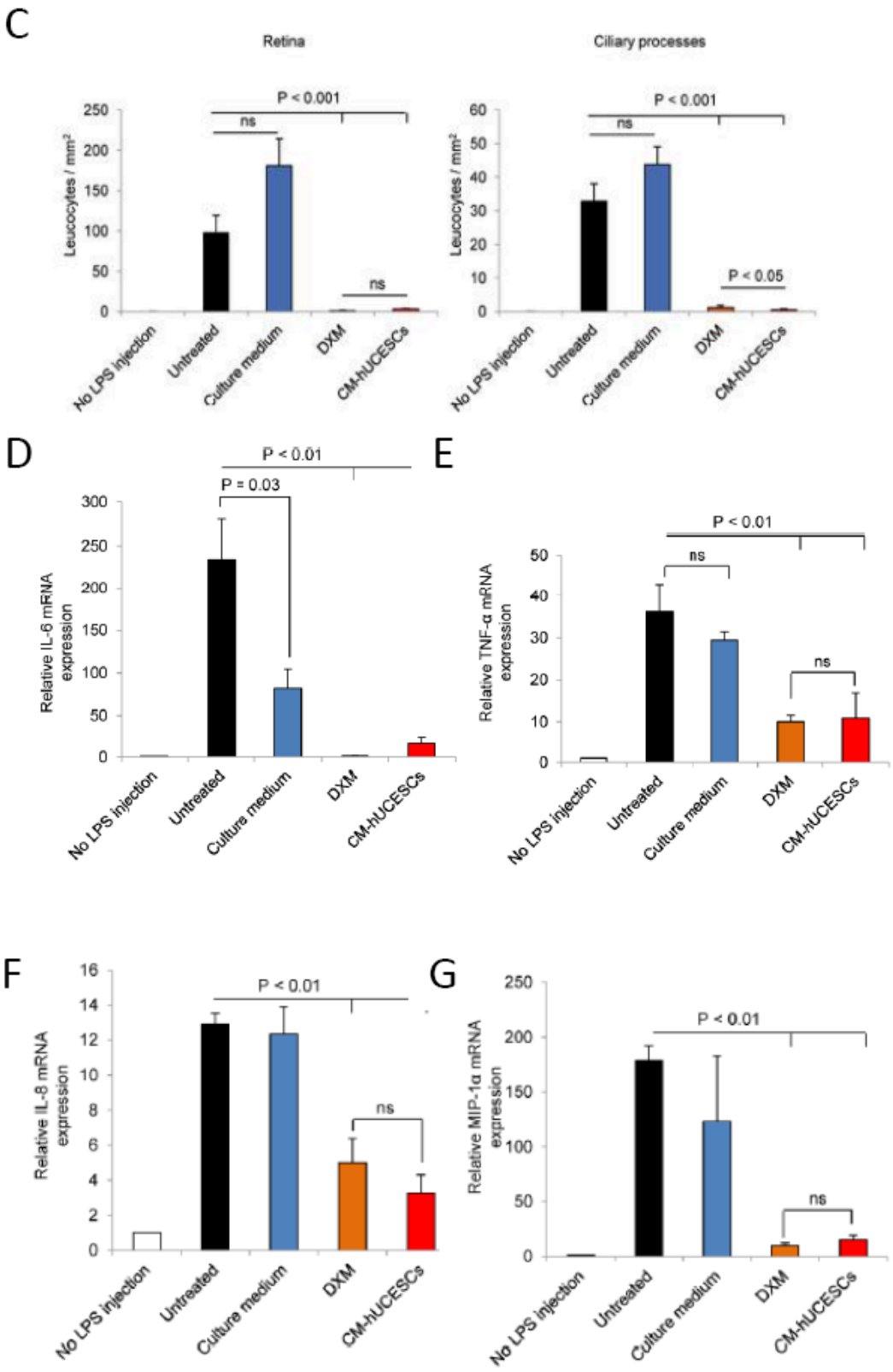
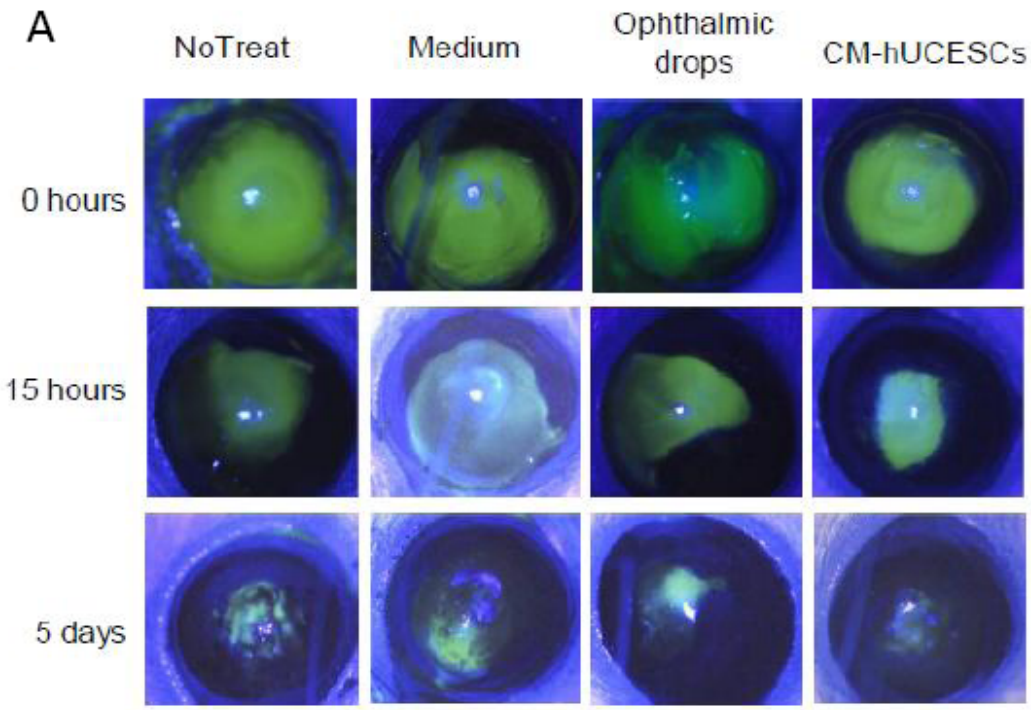

C
Retina
Ciliary processes
Leucocytes / mm²
P < 0.001
ns
P < 0.05
No LPS injection
Untreated
Culture medium
DXM
CM-hUCESCs
D
Relative IL-6 mRNA expression
P < 0.01
P = 0.03
E
Relative TNF-α mRNA expression
F
Relative IL-8 mRNA expression
G
Relative MIP-1α mRNA expression

Figura 3. El MC-hUCESCs reduce la infiltración de leucocitos y la expresión de citoquinas inflamatorias en los tejidos oculares de rata después la inducción de la uveítis por endotoxina.
(A): Tinción representativa de hematoxilina-eosina que muestra leucocitos infiltrados (flechas) en la retina y (B): en los procesos ciliares de: ojos sanos sin inyección de LPS (No LPS injection), con uveítis no tratados (Untreated), con uveítis tratados con medio de cultivo (Culture medium), con uveítis tratados con dexametasona (DXM) y con uveítis tratados con MC-hUCESCs (CM-hUCESCs). El estudio histológico se realizó 24 horas después de la inyección de LPS. (C): Análisis cuantitativo de leucocitos en retina y procesos ciliares. Las barras representan la media ± el error estándar del número de leucocitos/mm^2 de tejido. (n = 5 ratas, p <0,001, ns: no significativo). (D): Expresión de IL-6, (E) TNF-α, (F) IL-8 y (G) MIP-1α en el tejido ocular (n = 5 ratas, p <0,01). Las barras representan la media ± la desviación estándar.

El MC-hUCESCs mejora el cierre de heridas y regenera el epitelio corneal en un modelo *in vivo* de ojo seco

Siete días después de la cirugía de extirpación de las glándulas lacrimales todas las ratas mostraron ojo seco. Las úlceras alcalinas cubrieron entre el 85% y el 95% de la superficie corneal (Figura 4A). Quince horas después de la lesión, la regeneración epitelial fue mayor en los ojos tratados con MC-hUCESCs (62 ± 5% de la lesión total) en comparación con los otros tratamientos (grupo tratado con medio de cultivo: 34 ± 15%; grupo tratado con gotas oftálmicas comerciales: 32 ± 15%) y sin tratamiento (36 ± 13%) (Figura 4A-B, p <0,008). El día 5 después de la realización de la úlcera alcalina, la superficie corneal estaba prácticamente regenerada en todos los grupos tratados (> 74%). No se encontraron diferencias significativas entre las ratas no tratadas (62±16%), tratadas con el medio de cultivo (77±15%) y tratadas con gotas oftálmicas comerciales (74± 15%). Sin embargo, el tratamiento con MC-hUCESCs (92 ± 4%) mejoró significativamente el cierre de la herida en comparación con los otros tratamientos (Figura 4A y 4C, p = 0,005). La evaluación histológica de las córneas mostró que en el grupo tratado con MC-hUCESCs el epitelio se había regenerado completamente. Sin embargo, en los grupos restantes (ratas no tratadas, tratadas con medio de cultivo y con gotas oftálmicas) la regeneración del epitelio no fue completa, mostrando una alteración en la capa epitelial en algún punto de la superficie (Figura 4D).


A
NoTreat
Medium
Ophthalmic drops
CM-hUCESCs
0 hours
15 hours
5 days

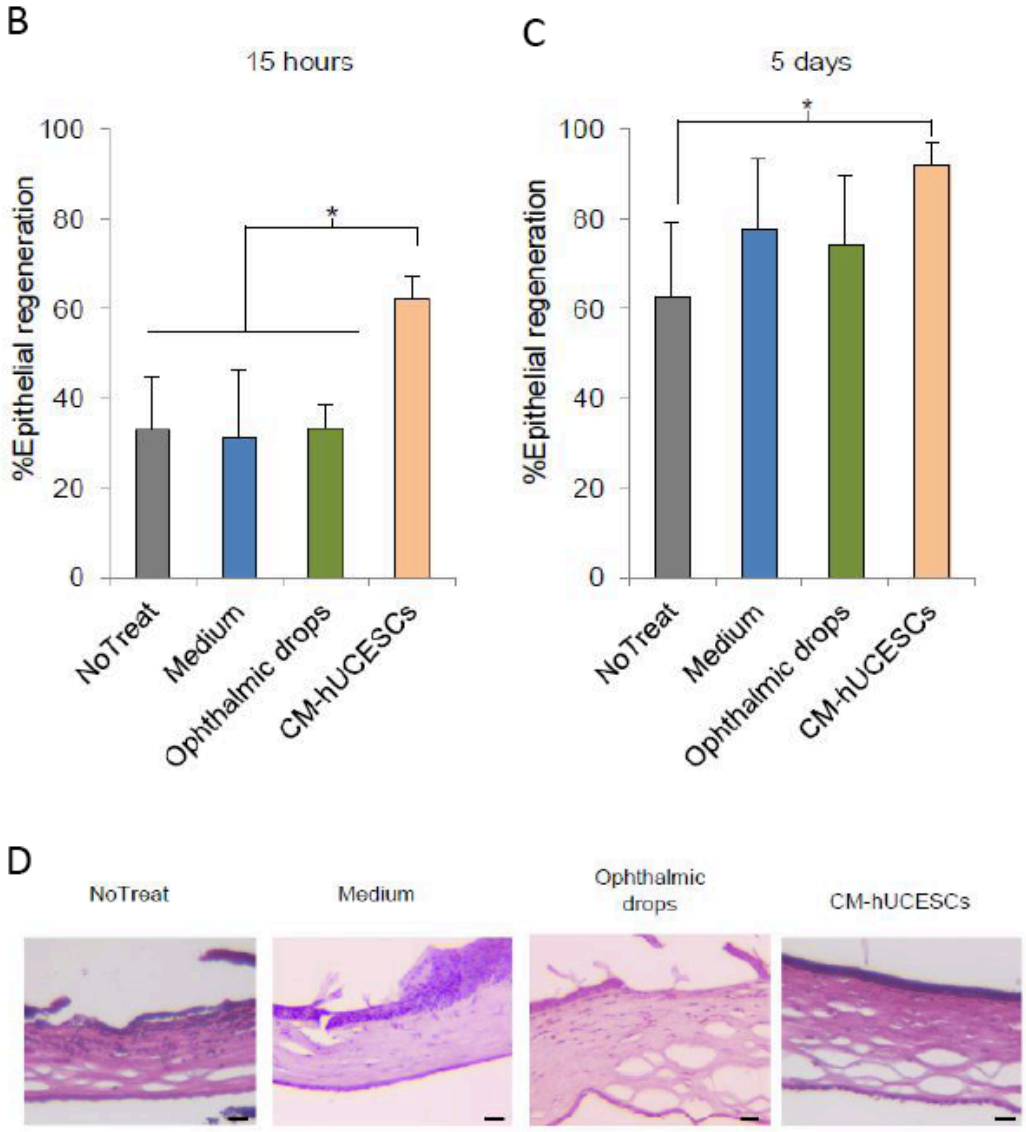


Figura 4. El MC-hUCESCs regenera el epitelio corneal en un modelo *in vivo* de ojo seco.
(A): Imágenes representativas de la tinción de fluoresceína en la córnea después de la realización de la úlcera alcalina (0 horas, 15 horas y 5 días). Cada columna representa el mismo ojo con el mismo tratamiento: sin tratamiento (NoTreat), tratamiento con medio de cultivo (Medium), tratamiento con gotas oftalmológicas (Ophthalmic drops) y tratamiento con MC-hUCESCs (CM-hUCESCs). (B): Porcentaje de regeneración del epitelio corneal 15 horas después de la úlcera alcalina (*: p <0,01; n = 6 córneas en cada grupo). (C): Porcentaje de regeneración del epitelio corneal 5 días después de la úlcera alcalina (*: p = 0,005; n = 6 córneas en cada grupo). (D): Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de las córneas 5 días después de la úlcera alcalina y la aplicación de los tratamientos (barra de escala: 20 µm). Todas las fotografías fueron tomadas de zonas centrales equivalentes de las córneas.

Figura 1. Caracterización de las células madre de cérvix uterino como CMMs.

(A): Imágenes representativas de la expresión, mediante inmunocitoquímica, de las proteínas vimentina (vimentin), #-Catenina (#-Catenin), citoqueratina (CKAE1AE3), actina HHF35 (actin HHF35), actina de músculo liso (smooth muscle actin), desmina (desmin), E-cadherina (E-cadherin); y los factores de transcripción KLF4, OCT4 y Sox2. Barra de escala: 25 µm. (B): Análisis por citometría de flujo de las hUCESCs de los marcadores CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD31, CD34, CD45, CD117, CD133, HLA-DR y Tra1-81. (C): Crecimiento de hUCESCs expresado como número de células después de sembrar 2x103 células/pocillo. (D): Tinción con Oil Red como marcador de células adiposas en hUCESCs después de 12 días de cultivo con medio específico de diferenciación adipogénica. Barra de escala: 25 µm. (E): Tinción con rojo Alizarin S como marcador de diferenciación osteogénica después de 15 días de cultivo. Barra de escala: 25 µm (F): Tinción con Alcian Blue como marcador de diferenciación condrogénica después de 21 días de cultivo. Barra de escala: 25 µm.

Discusión

Nuestros datos demuestran que el secretoma de las hUCESCs tiene un potente efecto antitumoral, antiinflamatorio y regenerativo, lo que las hace buenas candidatas para futuros tratamientos en el contexto de la medicina regenerativa.

No resulta sorprendente que el cuello uterino humano pudiera ser un reservorio de CMMs con funciones antitumorales específicas relacionadas con su nicho anatómico6. De acuerdo con esta hipótesis, hemos observado con anterioridad que el MC-hUCESCs contiene altos niveles de factores implicados en la inhibición de la progresión tumoral, como por ejemplo, el miembro 14 de la superfamilia de ligandos de factores de necrosis tumoral (LIGHT), el ligando de la tirosina quinasa 3 relacionado con Fms (ligando FLT-3), CXCL10 y la proteína asociada a la latencia (LAP)3. Además, los resultados *in vivo* aquí expuestos demuestran que el tratamiento tópico con MC-hUCESCs induce una potente actividad antiinflamatoria. Este efecto podría estar mediado por la reducción de los niveles endógenos de factores proinflamatorios IL-6, IL-8, TNF-a y MIP-1a, y / o por la liberación de sustancias antiinflamatorias como CNTF, IL-13, IL-18BP o IL-10, cuyas concentraciones se encuentran muy elevadas en el MC-hUCESCs4. Esto resulta relevante al considerar los graves efectos secundarios de los actuales tratamientos para la uveítis (corticosteroides y agentes quimioterapéuticos), que resaltan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Nuestros resultados también demuestran un potente efecto regenerativo del MC-hUCESCs sobre las córneas dañadas. Cabe señalar que, como hemos descrito previamente, el MC-hUCESCs contiene concentraciones elevadas de citoquinas con efecto regenerativo, tales como los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP) -1 y -2, los factores de crecimiento

de fibroblastos (FGF) -6 y -7, el receptor de uroquinasa (uPAR) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)5.

Nuestros datos están acorde con las nuevas tendencias en medicina regenerativa de aplicar una terapia sin células madre, utilizando su secretoma2. Esa estrategia, para la cual las hUCESCs parecen idóneas, ofrece diversas ventajas, como por ejemplo: i) la resolución de los problemas de seguridad derivados de la administración de células vivas proliferantes, como la incompatibilidad inmunológica, la tumorigenicidad, la transmisión de infecciones y la entrada de las células madre en senescencia; ii) la mejor evaluación de los secretomas en cuanto a su seguridad, dosis y potencia, de forma análoga a los agentes terapéuticos convencionales; iii) el fácil almacenamiento de los secretomas sin necesidad de la aplicación de agentes crio-preservativos potencialmente tóxicos; y iv) la reducción de costes de producción del secretoma frente a la expansión y mantenimiento de las células.

Bibliografia:

1. Dominici M.; Le Blanc K.; Mueller I.; Slaper-Cortenbach I.; Marini F.; Krause D.; Deans R.; Keating A.; Prockop D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy 2006, 8, 315-317.
2. Vizoso F.J.; Eiro N.; Cid S.; Schneider J.; Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. Int J Mol Sci 2017, 18, E1852.
3. Eiró N.; Sendon-Lago J.; Seoane S.; Bermudez M.A.; Lamelas M.L.; Garcia-Caballero T.; Schneider J.; Perez-Fernandez R.; Vizoso F.J. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. Oncotarget 2014, 5, 10692-10708.
4. Bermúdez M.A.; Sendon-Lago J.; Seoane S.; Eiro N.; Gonzalez F.; Saa J.; Vizoso F.; Perez-Fernandez R. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. Exp Eye Res 2016, 149, 84-92.
5. Bermúdez M.A.; Sendon-Lago J.; Eiro N.; Trevino M.; Gonzalez F.; Yebra-Pimentel E.; Giraldez M.J.; Macia M.; Lamelas M.L.; Saa J.; Vizoso F.; Perez-Fernandez R. Corneal epithelial wound healing and

bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2015, 56, 983-992.

6. Schneider J.; Eiro N.; Perez-Fernandez R.; Martinez-Ordonez A.; Vizoso F. Human uterine cervical stromal stem cells (hUCESCs): Why and how they exert their antitumor activity. Cancer Genom Proteom 2016, 13, 331-337.

Palabras clave:

Autores: Noemí Eiró, Jorge Saa, Juan Sendón-Lago, María A. Bermúdez, Sandra Cid, María Fraile, Román Pérez-Fernández, Francisco J. Vizoso.rnrnAutor de correspondencia: rnFrancisco J. VizosornUnidad de Investigación. rnFundación Hospital de JovernAvda. Eduardo Castro, 161, rn33290 Gijón, Españarninvestigacion@hospitaldejove.comrnTel.: +34 985320050; Fax: +34 985315710. rn

Nº:11 de 2018