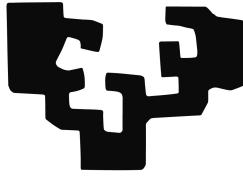


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Modulación de la capacidad de la respuesta reparadora de
las células madre mesenquimales derivadas de
tejido adiposo**

Cristina Isabel García Naveda

Leioa, 2018

Directores:

Prof. Dr. Teodoro Palomares Casado

Prof. Dra. Ana Isabel Alonso Varona

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

En estas primeras líneas me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas y entidades que con su apoyo han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Teodoro Palomares y la Dra. Ana Alonso, su confianza, esfuerzo y paciencia durante todos estos años.

En segundo lugar a María, Fede y Eva, por tantos buenos momentos y por todo lo que aprendimos juntos desde esos primeros días de laboratorio.

Gracias a Verónica, Patricia y María por haberme hecho más fácil la dura recta final. A mis compañeros de departamento, a todos los que habéis contribuido para que esto pudiera llevarse a cabo.

Gracias a los miembros del SGIker por su colaboración para sacar adelante esta investigación.

A la Fundación Jesús de Gangoiti Barrera por su gran aporte a la ciencia, apoyando año tras año a jóvenes investigadores.

Agradecer a la empresa Histocell la oportunidad de haber formado parte de este proyecto. A mis compañeros, por todo lo que me enseñaron.

Gracias a los que os habéis preocupado por mis ausencias y me habéis animado a seguir.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia. Papá, mamá, Ana, Laura y Gabri. Sin vuestro apoyo habría sido mucho más difícil. A Sergio, GRACIAS.

ÍNDICE

ÍNDICE DE MATERIAS

I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	1
II. INTRODUCCIÓN	5
II.1. LESIÓN TISULAR Y RESPUESTA INFLAMATORIA	7
II.2. ESTRÉS OXIDATIVO	10
II.2.1 Radicales libres.....	10
II.2.2 Vías metabólicas de señalización.....	13
II.2.3 Factores de transcripción.....	16
II.2.4 Citocinas.....	20
II.2.5 Agentes antioxidantes celulares	24
II.3. ENFERMEDADES ASOCIADAS AL ESTRÉS OXIDATIVO	27
II.3.1 Enfermedades cardiovasculares	27
II.3.2 Enfermedades neurológicas	27
II.3.3 Enfermedades respiratorias.....	28
II.3.4 Enfermedades reumáticas	29
II.3.5 Enfermedades renales	29
II.3.6 Enfermedades intestinales	30
II.4. TERAPIA ANTIOXIDANTE	31
II.5. TERAPIA CELULAR	40
II.5.1 Tipos de células madre	40

II.5.2 Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AMSCs).....	44
II.5.3 Propiedades de las AMSCs.....	45
II.5.4 Mecanismos de acción de las AMSCs	47
II.5.5 Pre-acondicionamiento de las AMSCs	49
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
IV.1. MATERIAL Y TÉCNICAS	57
IV.1.1 Células.....	57
IV.1.1.1 Fibroblastos.....	57
IV.1.1.2 AMSCs	57
IV.1.2 Cultivos celulares	58
IV.1.2.1 Congelación de las células.....	58
IV.1.2.2 Descongelación y mantenimiento celular.....	59
IV.1.2.3 Siembra de la suspensión celular en placa	60
IV.1.3 Técnicas de experimentación	60
IV.1.3.1 Determinación de la proliferación celular	60
IV.1.3.2 Determinación de los niveles intracelulares de GSH ...	61
IV.1.3.3 Determinación de los niveles intracelulares de ROS ...	62
IV.1.3.4 Determinación de la capacidad antioxidante	62
IV.1.3.5 Determinación de los niveles de apoptosis	64
IV.1.3.6 Determinación de la expresión génica.....	65

IV.2. PROCEDIMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTALES	67
IV.2.1 Inducción de estrés oxidativo en fibroblastos y AMSCs.....	67
IV.2.1.1 Efecto de la oxidación sobre la proliferación celular...67	
IV.2.1.2 Efecto de la oxidación sobre los niveles intracelulares de ROS y GSH.....67	
IV.2.1.3 Efecto de la oxidación sobre la apoptosis y expresión génica68	
IV.2.2 Evaluación de la eficacia de los diferentes tratamientos frente al estrés oxidativo inducido en fibroblastos humanos.....69	
IV.2.2.1 Efecto de la terapia farmacológica antioxidante con NAC.....69	
IV.2.2.2 Efecto de la terapia celular mediante el co-cultivo con AMSCs.....71	
IV.2.2.3 Efecto del medio derivado de las AMSCs privadas de SBF72	
IV.2.2.4 Efecto de la adición de NAC a la terapia celular con AMSCs sobre la proliferación de fibroblastos oxidados.....74	
IV.2.2.5 Efecto del pre-acondicionamiento de las AMSCs con dosis bajas de H ₂ O ₂ sobre fibroblastos oxidados.....75	
IV.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
V. RESULTADOS	81
V.1. EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE FIBROBLASTOS	83
V.1.1 Efecto sobre la morfología celular.....83	
V.1.2 Efecto sobre la viabilidad celular.....85	

V.1.3 Efecto sobre los niveles intracelulares de ROS.....	85
V.1.4 Efecto sobre los niveles intracelulares de GSH	86
V.1.5 Efecto sobre la proliferación celular.....	88
V.1.6 Efecto sobre el porcentaje de apoptosis.....	88
V.1.7 Efecto sobre la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo.....	90
V.2. EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE AMSCs.....	92
V.2.1 Efecto sobre la morfología celular.....	92
V.2.2 Efecto sobre la viabilidad celular.....	94
V.2.3 Efecto sobre los niveles intracelulares de ROS.....	94
V.2.4 Efecto sobre los niveles intracelulares de GSH	95
V.2.5 Efecto sobre la proliferación celular.....	96
V.2.6 Efecto sobre el porcentaje de apoptosis.....	97
V.2.7 Efecto sobre la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo.....	99
V.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA RESPUESTA DE LOS FIBROBLASTOS Y LAS AMSCs FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO	101
V.4. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA TERAPIA FARMACOLÓGICA ANTIOXIDANTE CON NAC SOBRE FIBROBLASTOS OXIDADOS.....	104
V.5. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA TERAPIA CELULAR CON AMSCs SOBRE FIBROBLASTOS OXIDADOS	106
V.5.1 Efecto del co-cultivo con AMSCs sobre la proliferación de fibroblastos oxidados.....	106
V.5.2 Efecto del medio derivado de las AMSCs privadas de SBF.....	107

V.5.3 Capacidad antioxidante y de respuesta al estrés oxidativo de las AMSCs-SD.....	111
V.6. EFECTO DE LA ADICIÓN DE NAC A LA TERAPIA CELULAR SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS OXIDADOS.....	113
V.6.1 Efecto de la adición de NAC a los fibroblastos oxidados cultivados con M _{SD}	114
V.7. EFECTO DEL PREACONDICIONAMIENTO DE LAS AMSCs CON DOSIS BAJAS DE H₂O₂ SOBRE FIBROBLASTOS OXIDADOS.....	115
V.7.1 Capacidad antioxidante y de respuesta al estrés oxidativo de las AMSCs-P	115
V.7.2 Efecto del MP _{SD} sobre los fibroblastos oxidados.....	119
VI. DISCUSIÓN.....	123
VII. CONCLUSIONES	137
VIII. BIBLIOGRAFÍA	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Radicales libres y metabolitos asociados	13
Figura 2. Regulación redox de las rutas metabólicas JNK y p38.....	15
Figura 3. Regulación redox de la ruta metabólica PI3K/Akt.....	16
Figura 4. Mecanismos de acción de las AMSCs.....	48
Figura 5. Cultivo de fibroblastos en frasco de 75 cm ²	57
Figura 6. Cultivo de AMSCs en frasco de 75 cm ²	58
Figura 7. Esquema de las diferentes estrategias terapéuticas llevadas a cabo para hacer frente al estrés oxidativo.	69
Figura 8. Imágenes de microscopía de contraste de fases de fibroblastos control y sometidos a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂ obtenidas a las 24, 48 y 72 h post-oxidación.....	84
Figura 9. Viabilidad celular de los fibroblastos sometidos a concentraciones crecientes de H ₂ O ₂ . (A) Valores de viabilidad celular relativos al control a las 24 h tras la exposición al H ₂ O ₂ . (B) Curva dosis respuesta para el cálculo de IC ₅₀	85
Figura 10. Niveles intracelulares de ROS de fibroblastos sometidos a dosis crecientes de H ₂ O ₂ . (A) Valores de ROS, en UA de fluorescencia, obtenidos cada 10 min durante 1 h. (B) Valores de ROS relativizados al control, a los 30 y 60 min.....	86
Figura 11. Niveles intracelulares de GSH en fibroblastos (expresados en porcentaje con respecto al control), determinados durante las 4 h tras la exposición a concentraciones crecientes de H ₂ O ₂	87
Figura 12. Curva de proliferación de fibroblastos control y oxidados con la dosis moderada (0.25 mM) y la dosis alta (1.0 mM) de H ₂ O ₂	88
Figura 13. Efecto de la oxidación con 0.25 y 1.0 mM de H ₂ O ₂ sobre el porcentaje de apoptosis de los fibroblastos a las 3 y 24 h. (A) Citometría de flujo; histogramas biparamétricos (Alexa-IP) divididos en cuadrantes que incluyen respectivamente: (R4) células vivas; (R5) apoptosis primaria; (R3) apoptosis avanzada y (R2) necrosis. (B) Representación gráfica del porcentaje de apoptosis (primaria y avanzada)..	89
Figura 14. Niveles de expresión relativos al control (Log ₂) de los genes COX-2 y NF-κB tras (A) 1 h y (B) 3 h de la exposición de los fibroblastos a 0.25 mM y 1.0 mM de H ₂ O ₂ ..	90

- Figura 15.** Niveles de expresión relativos al control (Log_2) de los genes IGF-1, IL-1 β , TGF- β 1 y TNF- α tras (A) 1 h y (B) 3 h de la exposición de los fibroblastos a 0.25 mM y 1.0 mM de H_2O_291
- Figura 16.** Imágenes de microscopía de contraste de fases de AMSCs control y sometidas a diferentes concentraciones de H_2O_2 obtenidas a las 24, 48 y 72 h post-oxidación.93
- Figura 17.** Viabilidad celular de las AMSCs sometidas a concentraciones crecientes de H_2O_2 . (A) Valores de viabilidad celular relativos al control a las 24 h tras la exposición al H_2O_2 . (B) Curva dosis respuesta para el cálculo de IC_{50}94
- Figura 18.** Niveles intracelulares de ROS de AMSCs sometidas a dosis crecientes de H_2O_2 . (A) Valores de ROS, en UA de fluorescencia, obtenidos cada 10 min durante 1 h. (B) Valores de ROS relativizados al control, a los 30 y 60 min..95
- Figura 19.** Niveles intracelulares de GSH en AMSCs (expresados en porcentaje con respecto al control), determinados durante las 4 h tras la exposición a concentraciones crecientes de H_2O_296
- Figura 20.** Proliferación de AMSCs oxidadas con la dosis moderada (0.25 mM) y la dosis alta (1.0 mM) de H_2O_2 , a las 24, 48 y 72 h.97
- Figura 21.** Efecto de la oxidación con 0.25 y 1.0 mM de H_2O_2 sobre el porcentaje de apoptosis de las AMSCs a las 3 y 24 h. (A) Citometría de flujo; histogramas biparamétricos (Alexa-IP) divididos en cuadrantes que incluyen respectivamente: (R4) células vivas; (R5) apoptosis primaria; (R3) apoptosis avanzada y (R2) necrosis. (B) Representación gráfica del porcentaje de apoptosis (primaria y avanzada)..98
- Figura 22.** Niveles de expresión relativos al control (Log_2) de los genes COX-2 y NF- κ B tras (A) 1 h y (B) 3 h de la exposición de las AMSCs a 0.25 mM y 1.0 mM de H_2O_299
- Figura 23.** Niveles de expresión relativos al control (Log_2) de los genes IGF-1, IL-1 β , TGF- β 1 y TNF- α tras (A) 1 h y (B) 3 h de la exposición de las AMSCs a 0.25 mM y 1.0 mM de H_2O_2100
- Figura 24.** Comparación de la respuesta al estrés oxidativo (0.25 y 1.0 mM de H_2O_2) entre los fibroblastos y las AMSCs. (A) Niveles intracelulares de ROS; (B) niveles intracelulares de GSH; (C) apoptosis y (D) viabilidad celular.....102
- Figura 25.** Comparación de las modificaciones de los niveles de expresión génica en respuesta al estrés oxidativo entre los fibroblastos y las AMSCs. Niveles de expresión de (A) COX-2; (B) NF- κ B; (C) IGF-1; (D) IL-1 β ;(E) TGF- β 1 y (F) TNF- α 103
- Figura 26.** Efecto del tratamiento con NAC de los fibroblastos oxidados (0.25 mM de H_2O_2) sobre: (A) niveles intracelulares de ROS; (B) niveles intracelulares de GSH y (C) proliferación celular105

Figura 27. Proliferación de fibroblastos control y oxidados (0.25 mM H ₂ O ₂) en co-cultivo con AMSCs a las 24, 48 y 72 h tras la oxidación..	107
Figura 28. Capacidad antioxidante del medio obtenido tras 48 h de cultivo con AMSCs en condiciones de crecimiento con 10% SBF y del M _{SD}	108
Figura 29. Efecto del tratamiento con M _{SD} sobre fibroblastos control: (A) Niveles intracelulares de ROS; (B) Niveles intracelulares de GSH y (C) Proliferación celular..	109
Figura 30. Efecto del M _{SD} sobre fibroblastos sometidos a oxidación (0.25 mM H ₂ O ₂): (A) Niveles intracelulares de ROS; (B) Niveles intracelulares de GSH; (C) Capacidad antioxidante celular total a las 6 h de añadir el oxidante y (D) Proliferación celular..	110
Figura 31. Comparación de la capacidad antioxidante celular total entre las AMSCs y las AMSCs-SD.....	111
Figura 32. Proliferación de las AMSCs y las AMSCs-SD oxidadas (0.25 mM H ₂ O ₂). Los datos están expresados en número de veces respecto al control no oxidado de cada una de las poblaciones.....	112
Figura 33. Proliferación de fibroblastos sometidos a estrés oxidativo y tratados con NAC, AMSCs y la combinación de ambos.	113
Figura 34. Proliferación de fibroblastos sometidos a estrés oxidativo y tratados con NAC, M _{SD} y la combinación de ambos.	114
Figura 35. Comparación de la capacidad antioxidante celular total entre las AMSCs y las AMSCs-P.....	116
Figura 36. Niveles de expresión génica en AMSCs-P respecto a las AMSCs. (A) Niveles de expresión de COX-2 y NF-κB; (B) Niveles de expresión de IGF-1, IL-1β, TGF-β1 y TNF-α	116
Figura 37. Comparación de las modificaciones de los niveles de expresión génica en respuesta al estrés oxidativo entre AMSCs y AMSCs-P. (A) Niveles de expresión génica tras la oxidación de las células con 0.25 mM de H ₂ O ₂ ; (B) Niveles de expresión génica tras la oxidación de las células con 1.0 mM de H ₂ O ₂	118
Figura 38. Proliferación de AMSCs y AMSCs-P oxidadas con 0.25 y 1.0 mM de H ₂ O ₂	119
Figura 39. Capacidad antioxidante del medio obtenido tras 48 h de cultivo con AMSCs en condiciones de crecimiento con 10% SBF, del M _{SD} y del MP _{SD}	120
Figura 40. Comparación del tratamiento con M _{SD} y MP _{SD} sobre fibroblastos control: (A) Niveles intracelulares de ROS; (B) Niveles intracelulares de GSH y (C) Proliferación celular.....	121

Figura 41. Comparación del tratamiento de fibroblastos sometidos a estrés oxidativo con M_{SD} y con MP_{SD} . (A) Niveles intracelulares de ROS; (B) Niveles intracelulares de GSH; (C) Capacidad antioxidante celular total y (D) Proliferación celular	122
--	-----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistemas antioxidantes celulares endógenos, enzimáticos y no enzimáticos.....	25
Tabla 2. Antioxidantes naturales exógenos, incorporados a través de la dieta.....	26
Tabla 3. Antioxidantes sintéticos.....	34
Tabla 4. Estudios clínicos recientes con antioxidantes.	38
Tabla 5. Medicamentos de terapia celular con MSCs autorizados a nivel mundial.....	44
Tabla 6. Métodos de preconditionamiento celular y mecanismos de acción.	49
Tabla 7. Reactivos que componen la solución de retrotranscripción.	66

ABREVIATURAS

AAPH: 2,2'-azobis (2-amidino-propano) diclorhidrato

ABTS: 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulphonate)

AMSC: *Adipose-derived Mesenchymal Stem Cell*, Célula Madre Mesenquimal derivada de tejido Adiposo

AMSC-P: Célula Madre Mesenquimal derivada de tejido Adiposo Pre-Acondicionada

AMSC-SD: *Serum Deprived Adipose-derived Mesenchymal Stem Cell*, Célula Madre Mesenquimal derivada de tejido Adiposo Privada de Suero

AP-1: *Activator Protein 1*, Proteína Activadora 1

ARE: *Antioxidant Response Element*, Elemento de Respuesta Antioxidante

ASC: *Adult Stem Cell*, Célula Madre Adulta

ASK1: *Apoptotic Signal-regulating Kinase 1*, Proteína Quinasa regulada por señales de Apoptosis 1

ATF: *Activating Transcription Factor*, Factor de Transcripción Activador

ATP: Adenosín trifosfato

BMMSC: *Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell*, Célula Madre Mesenquimal de Médula Ósea

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CoQ₁₀: Coenzima Q₁₀

CoQ₁₀-H⁺: Ubisemiquinona

CoQ₁₀-H₂: Ubiquinol

COX: Ciclooxygenasa

DAMP: *Danger Associated Molecular Pattern*, Patrón Molecular Asociado a Daño

DD: *Death Domain*, Dominio de Muerte

DMAE: Degeneración Macular Asociada a la Edad

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*, Ácido Desoxirribonucleico

dNTP: Desoxinucleotido trifosfato

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EGF: *Epidermal Growth Factor*, Factor de Crecimiento Epidérmico

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

eNOS: Óxido Nitrico Sintasa endotelial

EPO: *Eosinophil Peroxidase*, Peroxidasa del Eosinófilo

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ERK: *Extracellular signal-Regulated Kinase*, Quinasa Regulada por Señales Extracelulares

ESC: *Embryonic Stem Cell*, Célula Madre Embrionaria

FDA: *Food and Drug Administration*, Administración de Alimentos y Medicamentos

FGF: *Fibroblast Growth Factor*, Factor de Crecimiento de Fibroblastos

GPX: Glutación Peroxidasa

Grx: Glutarredoxina

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

GST- π : Glutación S-transferasa- π

H₂DCF-DA: 2,7-diclorofluoresceína diacetato

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HDL: *High Density Lipoprotein*, Lipoproteína de Alta Densidad

HGF: *Hepatocyte Growth Factor*, Factor de Crecimiento Hepatocitario

HIF: *Hypoxya Inducible Factor*, Factor Inducible por Hipoxia

HLA: *Human Leucocyte Antigen*, Antígeno Leucocitario Humano

HOBr: Ácido Hipobromoso

HOCl: Ácido Hipocloroso

HSP: *Heat Shock Protein*, Proteína de Choque Térmico

IC₅₀: Concentración Inhibitoria del 50% de la población

IDO: Indoleamina 2,3 dioxigenasa

IFN- γ : Interferón- γ

IGF: *Insulin-like Growth Factor*, Factor de Crecimiento similar a la Insulina

IGFBP: *Insulin-like Growth Factor-Binding Protein*, Proteína Transportadora del Factor de Crecimiento similar a la insulina

IKK: Quinasas I κ B

IL: Interleucina

iNOS: Óxido Nitrico Sintasa inducible

iPS: *Induced Pluripotent Stem Cell*, Célula Madre Pluripotente inducida

ISCT: *International Society for Cell Therapy*, Sociedad Internacional de Terapia Celular

I κ B: Inhibidores de kappa B

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*, Quinasa c-Jun N-terminal

Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*, Proteína 1 asociada a ECH tipo kelch

LDL: *Low Density Lipoprotein*, Lipoproteína de Baja Densidad

LPS: Lipopolisacáridos

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*, Proteína Quinasa Activada por Mitógenos

mBCI: Monoclorobimano

miRNA: *Micro-Ribonucleic Acid*, Micro Ácido Ribonucleico

MPO: Mieloperoxidasa

MP_{SD}: Medio Acondicionado por AMSCs-P

mRNA: *Messenger-Ribonucleic Acid*, Ácido Ribonucleico mensajero

MSC: *Mesenchymal Stem Cell*, Célula Madre Mesenquimal

M_{SD}: Medio Acondicionado por AMSCs-SD

mTOR: *mammalian Target of Rapamycin*, Diana de Rapamicina en células de mamífero

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NAC: N-acetilcisteína

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido

- NADPH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
- NF- κ B:** *Nuclear Factor kappa B*, Factor Nuclear kappa B
- NLR:** *Nucleotide Oligomerization Domain-like Receptor*, Receptor tipo Dominio de Oligomerización de Nucleótidos
- NO:** Óxido Nítrico
- NO₂:** Dióxido de Nitrógeno
- NOD:** *Nucleotide Oligomerization Domain*, Dominio de Oligomerización de Nucleótidos
- NOS:** Óxido Nítrico Sintasa
- NOX:** NADPH oxidasa
- Nrf2:** Factor Nuclear Eritroide 2
-
- O₂⁻:** Anión superóxido
- OH[•]:** Radical hidroxilo
- ONOO⁻:** Peroxinitrito
- ONOOH:** Ácido peroxinitroso
- ORAC:** *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, Capacidad de Absorción de Radicales del Oxígeno
-
- PBS:** *Phosphate Buffered Saline*, Tampón Fosfato Salino
- PGE-2:** Prostaglandina E₂
- PI3K:** Fosfatidilinositol 3-quinasa
- PKB:** *Protein Kinase B*, Proteína Quinasa B
- PP5:** *Serine-Threonine Phosphatase 5*, Serina-treonina fosfatasa 5
- PTEN:** *Phosphatase and Tensin homologue*, homólogo de la Fosfatasa y la Tensina
- PTPase:** *Protein Tyrosine Phosphatase*, Proteína Tirosina Fosfatasa
-
- Redox:** Óxido-Reducción
- RNA:** *Ribonucleic Acid*, Ácido Ribonucleico
- RNS:** *Reactive Nitrogen Species*, Especies Reactivas del Nitrógeno
- ROS:** *Reactive Oxygen Species*, Especies Reactivas del Oxígeno
- RT-qPCR:** *Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa y en Tiempo Real

SBF: Suero Bovino Fetal

sCTMP: *Somatic Cell Therapy Medicinal therapy*, Medicamento de Terapia Celular somática

SDF-1: *Stromal cell-Derived Factor 1*, Factor Derivado de célula Estromal 1

SGIker: Servicios Generales de Investigación, Ikerkuntzarako Zerbitzu Orokorrak (UPV/EHU)

SOD: Superóxido dismutasa

SODD: *Silencer Of Death Domains*, Silenciadora de los Dominios de Muerte

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*, Transductor de Señal y Activador de la Transcripción

TACE: *Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme*, Enzima de Conversión del Factor de Necrosis Tumoral-Alfa

TGF- β : *Transforming Growth Factor-Beta*, Factor de Crecimiento Transformante-Beta

TLR: *Toll-like Receptor*, Receptor Tipo Toll

TNF-R: *Tumor Necrotic Factor Receptor*, Receptor del Factor de Necrosis Tumoral

TNF- α : *Tumor Necrotic Factor-Alpha*, Factor de Necrosis Tumoral-Alfa

TNT: *Tunneling Nanotubes*, Nanotubos de membrana

TRADD: *Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1-associated Death Domain*, Dominio de Muerte Asociado al Receptor tipo 1 del Factor de Necrosis Tumoral

Trx: Tiorredoxina

TSG-6: *Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene 6*, gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral.

UA: Unidades Arbitrarias

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Durante las últimas décadas, el aumento de la esperanza de vida y el consecuente envejecimiento de la población ha dado lugar al incremento de la incidencia de diversas enfermedades —cardiovasculares, respiratorias, renales, autoinmunes o neurológicas— en cuya fisiopatología interviene un estado inflamatorio crónico en el tejido afectado, lo cual dificulta su tratamiento. De hecho, actualmente, muchas de estas enfermedades carecen de tratamiento curativo y se limita a tratamiento sintomático.

La cronificación de la inflamación ocurre como consecuencia de un desequilibrio del estado redox celular, debido a una desregulación de los sistemas antioxidantes celulares que da lugar a una sobreproducción de especies reactivas y a un ambiente prooxidativo. Dichas especies reactivas pueden llegar a dañar componentes celulares como proteínas, lípidos y DNA, y modificar las rutas de señalización, impidiendo así una correcta resolución de la inflamación. Tanto la alta prevalencia de las enfermedades anteriormente mencionadas como su coste socio sanitario asociado, hacen necesario intensificar la investigación en el ámbito del estrés oxidativo y la cronificación de la inflamación con el objetivo de proponer estrategias terapéuticas más efectivas.

Una de las estrategias más estudiadas ha sido la terapia antioxidante con diferentes fármacos. Aunque se han obtenido resultados positivos *in vitro*, su eficacia *in vivo* es limitada, por lo que continúa en estudio. Actualmente, la terapia celular con células madre mesenquimales (MSCs) es uno de los enfoques terapéuticos más prometedores para hacer frente al estrés oxidativo y restaurar las funciones biológicas del tejido dañado. Incluso se han propuesto diferentes mecanismos para incrementar la actividad de las MSCs, utilizando agentes externos, mejorando así su actividad en situaciones de estrés oxidativo. Estos avances abren nuevas vías de investigación encaminadas a abordar el tratamiento de las enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. LESIÓN TISULAR Y RESPUESTA INFLAMATORIA

La inflamación es una reacción tisular, conservada a lo largo de la evolución, que se conoce desde hace casi 2000 años y cuyos síntomas clínicos fueron descritos por el médico romano Cornelius Celsus en el primer siglo A.D. (Védrenes, 1876). Es una respuesta inespecífica a un estímulo nocivo, bien por infección por patógenos o por daño tisular de diversa etiopatogenia (traumatismo, isquemia, estrés y factores ambientales como la radiación ultravioleta) (Rock y *cols.*, 2010), que provoca cambios en la homeostasis de los tejidos y en el flujo sanguíneo, así como la activación y migración de células del sistema inmune y la secreción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. La respuesta inflamatoria ocurre fundamentalmente en tejidos conectivos vascularizados, teniendo como objetivo la eliminación del agente causante, la reparación estructural y funcional de los tejidos afectados, y una transición hacia el estado de homeostasis (Medzhitov, 2010).

La respuesta inflamatoria se produce a nivel del estroma de los órganos. Este estroma está constituido por múltiples tipos celulares (fibroblastos, pericitos, células musculares lisas y endoteliales, pre-adipocitos y células madre mesenquimales) asociados a una matriz extracelular que les proporciona soporte estructural y participa en el control de la señalización celular. Entre las células estromales citadas, los fibroblastos desempeñan una función relevante, ya que ayudan a definir la estructura histológica y, por tanto, la arquitectura de los órganos, y favorecen un microambiente adecuado donde se llevan a cabo funciones especializadas. Así, los fibroblastos controlan la homeostasis tisular, participando en múltiples procesos biológicos como la síntesis y depósito de los componentes de la matriz extracelular, la regulación de la diferenciación epitelial, la cicatrización y la senescencia, entre otros (Sriram y *cols.*, 2015).

El inicio de la respuesta inflamatoria requiere la interacción entre las células residentes del estroma y poblaciones celulares propias del sistema inmunitario que migran al compartimento estromal. Esta comunicación celular se lleva a cabo fundamentalmente mediante la liberación de factores solubles de efecto paracrino. El conjunto de factores liberados como consecuencia del daño tisular (DAMPs, *Danger*

Associated Molecular Patterns) activa a efectores del sistema inmunitario que desencadenan la reacción inflamatoria. Entre estos efectores se encuentran la familia de receptores transmembrana Toll (TLRs, *Toll-like Receptors*) y la familia de receptores citoplasmáticos NOD (NLRs, *NOD-like Receptors*), que juegan un papel fundamental como mediadores de la inflamación (Feldman y cols., 2015). La unión de los DAMPs a los receptores TLRs o NLRs provoca la activación de las vías de señalización asociadas a la inflamación y, por tanto, la producción de citocinas proinflamatorias y prostaglandinas. Dichos mediadores inducen la producción de exudados inflamatorios que contienen proteínas plasmáticas y leucocitos, principalmente neutrófilos y monocitos, extravasados debido a la vasodilatación, y que pueden dar lugar a la relocalización y activación de macrófagos en el lugar donde se ha producido el daño (Lei y cols., 2015).

Las células inflamatorias activan los fibroblastos residentes a través de diferentes mediadores como interleucina 1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o especies reactivas del oxígeno (ROS) o del nitrógeno (RNS). Como respuesta, los fibroblastos activados expresan citocinas, como TNF- α , IL-1 β e interleucina 6 (IL-6), entre otras, que reclutan células del sistema inmune, como neutrófilos y macrófagos, perpetuando el microambiente inflamatorio mediante la activación de genes que controlan la supervivencia celular, la angiogénesis y la migración celular (Bollrath y Greten, 2009; Yu y cols., 2009; Grivennikov y Karin, 2010).

Además, existen otros factores importantes implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria, entre los que se encuentran el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) y la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), cuya función como mediadores en la inflamación se abordará con más detalle en el siguiente apartado de esta introducción.

La respuesta inflamatoria normalmente finaliza tras la eliminación de las células inflamatorias (neutrófilos, linfocitos y macrófagos), así como tras la supresión de la activación de los genes proinflamatorios y el tráfico celular, proceso que se conoce como resolución de la inflamación (Serhan y Savill, 2005).

Por lo general, la reacción inflamatoria, durante la cual los fibroblastos desempeñan un papel activo (Buckley y cols., 2001; Madar y cols., 2013), ocurre durante

un corto período de tiempo y, normalmente, es beneficiosa para el huésped (Nathan y Ding, 2010). Sin embargo, su persistencia en el tiempo y su cronificación están implicados en la fisiopatología de múltiples enfermedades tales como la aterosclerosis, obesidad, cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma bronquial, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, psoriasis y celiaquía) y enfermedades neurodegenerativas (enfermedades de Alzheimer y Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis múltiple) (Nathan y Ding, 2010).

En la perpetuación del estado inflamatorio, desempeña un papel fundamental la pérdida de control del equilibrio redox. Así, durante la respuesta inflamatoria se produce un incremento de los niveles de ROS y RNS, generados principalmente como producto del metabolismo de las células del sistema inmune.

Niveles bajos de ROS/RNS son importantes para la reparación tisular ya que protegen el área dañada contra posibles agentes infecciosos y actúan como segundos mensajeros para la regulación de importantes procesos celulares como la supervivencia celular, la proliferación y la señalización inflamatoria. Por el contrario, un exceso de ROS/RNS, altamente reactivos, puede dañar constituyentes celulares como lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. La actividad antioxidante celular puede contrarrestar dicho incremento de especies reactivas, permitiendo la resolución de la inflamación, indispensable para una correcta reparación del daño tisular.

Por el contrario, una sobreproducción sostenida de ROS/RNS, debida a la desregulación de los sistemas celulares pro y antioxidante, conlleva un estado de estrés oxidativo que ocasiona el daño celular y la cronificación de la inflamación.

II.2. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es el resultado del desequilibrio entre la producción de radicales libres (ROS/RNS) y la capacidad de las células para eliminar el exceso de dichos intermediarios reactivos, lo que imposibilita la reparación del daño causado por su acumulación.

II.2.1 Radicales libres

Los radicales libres se definen como átomos o moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos (Halliwell y Gutteridge, 2007). Esta circunstancia los hace altamente reactivos, ya que tienden a compensar el desequilibrio electrónico cediendo o capturando electrones de otras moléculas del entorno, actuando de agentes reductores en el primer caso y oxidantes en el segundo (más frecuente en el entorno celular) (Valko y cols., 2007). El hecho de que en el material biológico se produzcan radicales libres fue publicado por primera vez en el año 1954 (Commoner y cols., 1954) y hoy en día es ampliamente aceptado (Ahmadinejad y cols., 2017).

Existen numerosos tipos de radicales libres en la naturaleza, entre los que destacan los ROS y los RNS como productos del metabolismo celular.

Por un lado, los **ROS** representan la especie radical más importante generada en los sistemas biológicos. Como ya se ha comentado anteriormente, un exceso de ROS, debido a su elevada reactividad, puede dañar constituyentes celulares como lípidos, proteínas o DNA, lo que se relaciona con numerosas enfermedades y con el proceso de envejecimiento.

Las mayores fuentes de ROS son la cadena transportadora de electrones, los complejos NADPH oxidasa (NOX), el retículo endoplasmático y la xantina oxidasa (Gorrini y cols., 2013). Una de las principales especies radicales es el anión superóxido (O_2^-), formado por la reducción del oxígeno gracias a enzimas como NOX o xantina oxidasa, o de forma no enzimática por la semiubiquinona de la cadena transportadora de

electrones mitocondrial. Comparado con otros radicales libres, el O_2^- es una molécula poco reactiva y muy selectiva, cuya vida media es de unos pocos segundos (Powers y cols., 2011). Las células inflamatorias son capaces de producir gran cantidad de O_2^- con el objetivo de protegerse contra los organismos invasores. La enzima superóxido dismutasa (SOD) convierte el O_2^- en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y éste, a su vez, se puede convertir en radical hidroxilo ($OH\cdot$) en presencia de metales de transición, como el hierro y el cobre, mediante la reacción de Fenton–Haber–Weiss, o bien ser reducido directamente a agua mediante las enzimas catalasa o glutatión peroxidasa (GPX) (Trachootham y cols., 2009). Durante la actividad metabólica de los neutrófilos activados, el H_2O_2 también puede convertirse en ácido hipocloroso (HOCl) o ácido hipobromoso (HOBr) en presencia de las enzimas peroxidasa del eosinófilo (EPO) o mieloperoxidasa (MPO) (Mütze y cols., 2003; Rees y cols., 2007). El HOCl es capaz de dañar biomoléculas mediante la oxidación de tioles, lípidos, ascorbato y NADPH. Además, puede atravesar las membranas celulares y promover la fragmentación y agregación de proteínas. Funciona como una sustancia quimiotáctica que permite un excelente control microbiano y la activación del sistema de defensa que facilita la rápida e inocua reparación de tejidos (Wang y cols., 2007). El HOBr también es capaz de degradar la matriz extracelular y proteínas, contribuyendo al daño tisular asociado a enfermedades inflamatorias, como el asma (Ress y cols., 2007).

El H_2O_2 es relativamente estable cuando está protegido de la luz y de la contaminación con trazas de metales (Kalyanaraman, 2013). La permeabilidad de las membranas celulares permite su entrada al medio intracelular y, aunque es un agente oxidante débil, a altas concentraciones es citotóxico. El H_2O_2 es incapaz de oxidar el DNA o los lípidos de forma directa, pero puede inactivar algunas enzimas. Su citotoxicidad se debe, ante todo, a su capacidad de generar $OH\cdot$ (Halliwell y Gutteridge, 2007; Yu y cols., 2016).

El radical $OH\cdot$ posee un fuerte potencial oxidante y una alta reactividad, con una vida media *in vivo* muy corta, de 10^{-9} segundos (Pastor y cols., 2000), motivo por el cual reacciona cerca de su lugar de formación, afectando a una gran cantidad de moléculas, sin ser muy selectivo. Es el ROS más dañino presente en los sistemas biológicos y, debido a su alta reactividad, no es capaz de difundir a través de las membranas celulares.

El segundo tipo de radicales libres, los **RNS**, se caracteriza por poseer un potente efecto proinflamatorio y causar peroxidación lipídica y modificaciones proteicas, a través de lo cual produce daño tisular (Andreadis y *cols.*, 2003; Sugiura e Ichinose, 2011).

El óxido nítrico (NO) es un RNS generado en muchos tipos celulares a partir del aminoácido L-arginina. Dicha síntesis ocurre mediante la acción de los tres tipos del grupo enzimático de las óxido nítrico sintasas (NOS): NOS neuronal (NOS1), NOS endotelial (eNOS o NOS3) —ambas expresadas de forma constitutiva y cuya actividad es calcio-dependiente— y NOS inducible (iNOS o NOS2), cuya expresión es reducida en tejidos sanos y puede ser inducida por estímulos nocivos como la presencia de lipopolisacáridos (LPS), TNF- α e IL-1 (Pacher y *cols.*, 2007; Sugiura e Ichinose, 2011). El NO derivado de iNOS puede jugar un papel como inductor o inhibidor de la inflamación, dependiendo de su concentración y asociación con otras biomoléculas (Ghosh y Erzurum, 2011).

Durante la inflamación existe un incremento de NO, un agente reductor débil que puede reaccionar con el O₂ para formar dióxido de nitrógeno (NO₂), o con el O₂⁻ para producir peroxinitrito (ONOO⁻) (Fialkow y *cols.*, 2007). Esta última reacción ocurre tres veces más rápido que la dismutación del O₂⁻ para producir H₂O₂. Además, es la reacción primaria cuando ambos, el O₂⁻ y el NO están presentes (Powers y *cols.*, 2011; Figura 1).

El NO puede nitrosilar residuos tiol de proteínas, alterando así su estructura proteica y, por tanto, su función biológica, lo cual puede estar relacionado con la regulación de la inflamación (Schulman y Hare, 2012). Por ejemplo, un exceso de NO puede inducir la S-nitrosilación e inactivación de NF- κ B y conducir a la apoptosis de células inflamatorias e inducir la resolución de la inflamación (Sugiura e Ichinose, 2011). Por el contrario, niveles bajos de NO pueden inhibir la apoptosis mediante la S-nitrosilación de la caspasa-3 (Mitchell y Marletta, 2005; Mitchell y *cols.*, 2007).

El ONOO⁻ (o su forma protonada ONOOH), aunque no es un radical libre en sí mismo, posee un gran poder oxidante y puede dañar una gran cantidad de moléculas, como el DNA y proteínas. Así, es capaz de oxidar proteínas de forma irreversible mediante la nitrosilación de los grupos sulfhidrilo de los aminoácidos cisteína, tirosina, metionina y triptófano, inhibiendo así su función (Radi y *cols.*, 2001).

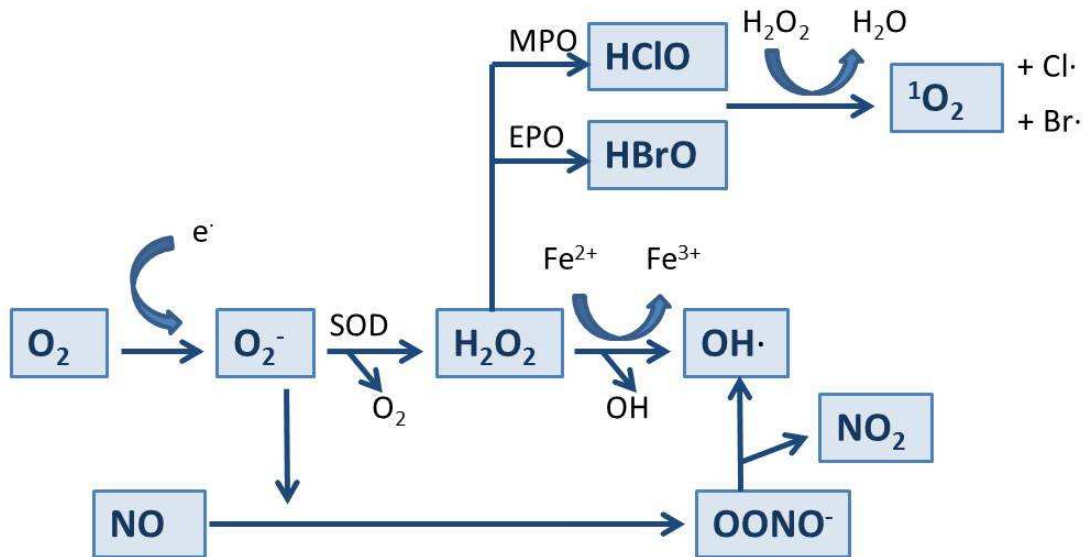


Figura 1. Radicales libres y metabolitos asociados

El aumento de los niveles de oxidantes, teniendo en cuenta cómo y dónde se han generado, tiene dos efectos potencialmente importantes: provocar el daño de diferentes componentes celulares y desencadenar la activación de vías de señalización específicas.

II.2.2 Vías metabólicas de señalización

Existen diferentes vías de señalización del sistema inmune, cuya función es transmitir la información del exterior de la célula al citoplasma y al núcleo. Dicha información se transmite mediante la activación de las vías metabólicas proteína quinasa activadas por mitógenos (**MAPK**) y fosfatidilinositol 3-quinasa/proteína Akt (**PI3K/Akt**), implicadas en la respuesta frente al estrés oxidativo y que dan lugar a la supervivencia celular o a la apoptosis, dependiendo de los niveles de ROS/RNS.

Hay tres familias clásicas que conforman las tres rutas principales de **MAPK**. La ruta de las quinasa reguladas extracelularmente (ERK 1/2, *extracellular signal-regulated kinase*), las c-Jun N-terminal quinasa (JNK) y las quinasa p38. En condiciones de estrés

oxidativo moderado, la vía de señalización ERK 1/2 promueve la supervivencia celular, mientras que las vías JNK y p38 inducen la muerte celular (Matsuzawa e Ichijo, 2005).

Las vías **ERK** regulan principalmente procesos de crecimiento y diferenciación celular, por lo que su activación tiene lugar, sobre todo, en respuesta a estímulos mitogénicos, inducidos principalmente por citocinas y factores de crecimiento. En ocasiones también se activan por estrés oxidativo, lo que provoca la estimulación de los receptores tirosina quinasa, los cuales activan la proteína RAS mediante modificaciones tiol (S-nitrosilación o glutathionilación). RAS, una vez activada, fosforila y activa de forma secuencial las quinasas MEK 1/2 y ERK 1/2, produciéndose la translocación de esta última al núcleo, permitiendo la regulación de diferentes factores de transcripción y estimulando así la supervivencia celular (Lander y cols., 1996; Mallis y cols., 2001).

Las rutas JNK y p38 se activan en situaciones de estrés como la radiación UV, la radiación ionizante, el choque térmico, el estrés osmótico y en respuesta a citocinas proinflamatorias como TNF- α o IL-1. Bajo condiciones sin estrés, la proteína quinasa regulada por señales de apoptosis 1 (ASK1, *apoptotic signal-regulating kinase 1*) se encuentra inhibida por la forma reducida de tiorredoxina (Trx) o glutarredoxina (Grx). Un aumento del estrés oxidativo provoca la oxidación de Trx y Grx y la liberación de la proteína ASK1, que forma un complejo multimérico activado mediante su fosforilación. La activación de ASK1 da lugar a la subsecuente activación de JNK y p38, provocando la muerte celular. JNK también puede estar inhibida mediante la formación de un complejo con glutatión S-transferasa- π (GST- π) bajo condiciones sin estrés y puede ser activada por ROS de forma similar que ASK1. Las moléculas reguladoras negativas, como la Serina-treonina fosfatasa 5 (PP5, *Ser/Thr phosphatase 5*), inhiben la actividad quinasa de ASK1, mediante su desfosforilación, y la proteína de shock térmico 72 (Hsp72, *heatshock protein 72*) inhibe también la actividad JNK (Figura 2; Trachootham y cols., 2008).

Las vías de señalización de JNK y p38 tienen un papel dual dependiendo del tipo celular y del estímulo. Además, la duración de la activación de dichas vías también tiene consecuencias diferentes. Una activación transitoria puede promover la supervivencia celular, mientras que una activación continuada puede dar lugar a apoptosis (Matsuzawa e Ichijo, 2005).

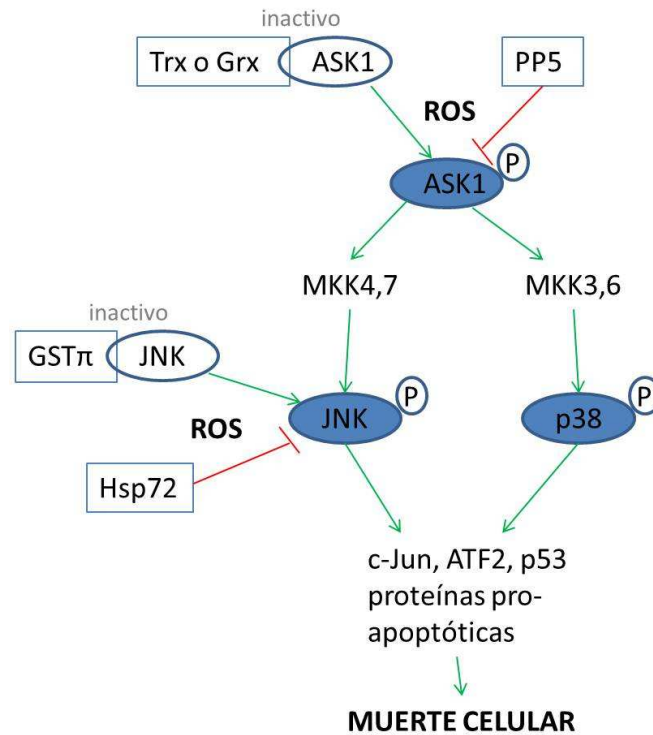


Figura 2. Regulación redox de las rutas metabólicas JNK y p38. Adaptado de Trachootham y cols., 2008.

Otra de las rutas de transducción de la señal celular es **PI3K**, la cual juega un importante papel en la regulación del crecimiento, proliferación, supervivencia y motilidad celular. Niveles moderados de ROS activan dicha ruta promoviendo la supervivencia celular; sin embargo, un estrés oxidativo sostenido en el tiempo puede inhibirla y provocar la muerte celular (Leslie, 2006). La transducción de la señal se produce, principalmente, debido a la fosforilación de moléculas diana como la proteína Akt, también denominada proteína quinasa B (PKB). Esto da lugar a la inactivación de proteínas proapoptóticas y a la activación de factores de transcripción para la síntesis de proteínas antiapoptóticas. En condiciones de estrés oxidativo, tiene lugar la inactivación oxidativa de fosfatasas como la proteína tirosina fosfatasa (PTPase, *protein tyrosine phosphatase*) y el homólogo de la fosfatasa y la tensina (PTEN, *phosphatase and tensin homologue*), permitiendo la activación constitutiva del receptor tirosina quinasa y PI3K. Sin embargo, una modificación oxidativa directa de PI3K y Akt puede dar lugar a la inactivación de dicha vía metabólica, comprometiendo así las señales de supervivencia. Además, la vía PI3K/Akt puede promover la producción de ROS por parte de las células

mediante la activación de las proteínas Rac y NOX. Otros estudios han demostrado que los ROS producidos por NOX pueden contribuir a la supervivencia de las células de la línea monocito/macrófago mediante la activación de Akt y la inhibición de las vías de señalización p38 MAPK (Wang y cols., 2007; Figura 3).

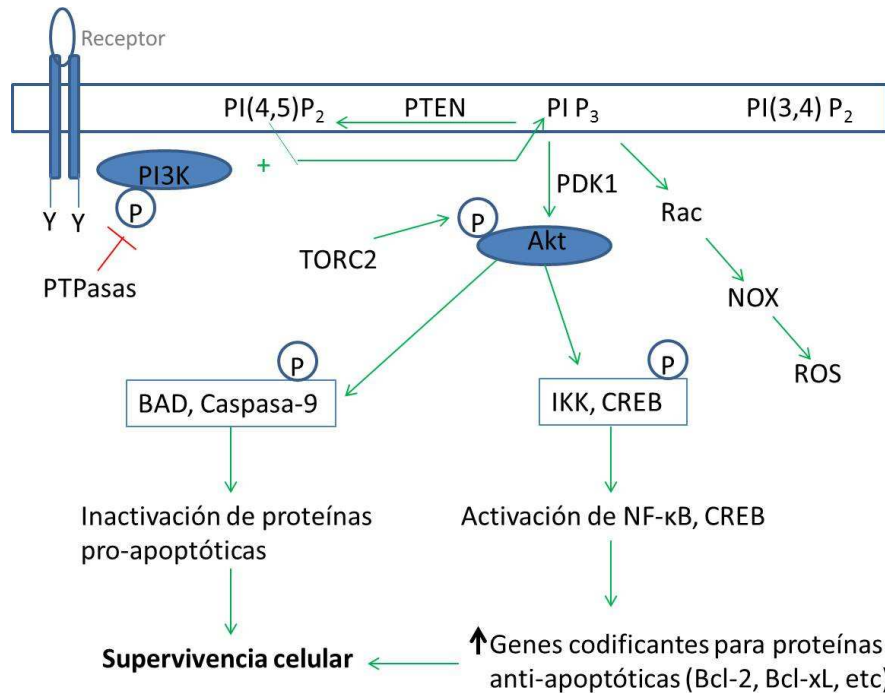


Figura 3. Regulación redox de la ruta metabólica PI3K/Akt. Adaptado de Trachootham y cols., 2008.

II.2.3 Factores de transcripción

Los factores de transcripción NF- κ B, factor inducible por hipoxia (HIF), proteína activadora 1 (AP-1), factor transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) y factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) son claves en la regulación del proceso inflamatorio y el control redox.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el factor **NF- κ B** es uno de los principales coordinadores y reguladores de la inmunidad y de la inflamación. Se encuentra en el citosol, inactivo y bloqueado por los inhibidores de kappa B (I κ B); el estrés oxidativo es capaz de activar las kinasas I κ B (IKK) que fosforilan la proteína I κ B, dando lugar a su poliubiquitinación y subsecuente degradación proteasomal. De este modo, NF- κ B puede translocarse al núcleo y activar la transcripción de diferentes genes,

participando así en la regulación de múltiples procesos biológicos como el desarrollo, proliferación y supervivencia celular (Gilmore, 2006). Entre otros agentes, el H₂O₂ puede activar dicho factor de forma directa, mediante la fosforilación de IKK (Kamata y cols., 2002), o de forma indirecta, vía MEK o AKT (Nemoto y cols., 1998; Madrid y cols., 2001). Una vez en el núcleo, el NF-κB tiene que estar en su forma reducida para poder unirse al DNA, sin embargo la oxidación del residuo Cys-62 de la subunidad p50 inhibe su capacidad de unión (Toledano y Leonard, 1991; Mitomo y cols., 1994). La oxidación de p50 es reversible y, por tanto, se puede reestablecer su unión al DNA mediante la reducción por Trx (Matthews y cols., 1992). Se ha observado que el NF-κB nuclear se puede inhibir mediante diferentes modificaciones redox como la glutationilación o la S-nitrosilación (Marshall y Stamler, 2001; Pineda-Molina y cols., 2001). Por esta razón, este factor de transcripción es sensible a modificaciones de ROS; así, niveles moderados promueven su activación y la supervivencia celular, mientras que niveles altos lo inactivan, dando lugar a la muerte celular (Pantano y cols., 2006; Trachootham y cols., 2008).

En relación a la participación de NF-κB en la regulación redox, se ha observado que dicho factor puede aumentar la expresión de algunas proteínas antioxidantes, como la cadena pesada de ferritina, SOD2 y GST-π. Dichas proteínas evitan una acumulación excesiva de ROS y, por tanto, previenen el daño oxidativo (He y Karin, 2011; Morgan y Liu, 2011). La inactivación de NF-κB favorece la acumulación de ROS y puede inducir la oxidación de otras proteínas como la tirosina fosfatasa, que incluye SHP1 y SHP2. La oxidación de dichas proteínas tiene como consecuencia la pérdida de su actividad fosfatasa, la acumulación de JAK2 fosforilado y la activación de la vía de señalización JAK2-STAT3, lo cual atenúa la activación de macrófagos (de Jonge y cols., 2005; He y Karin, 2011).

La activación de NF-κB puede dar lugar a la síntesis de la enzima COX-2, uno de los principales mediadores proinflamatorios, responsable de la persistencia de la inflamación y de la producción de prostaglandinas, a través de la oxidación del ácido araquidónico. La enzima COX está presente en dos isoformas, COX-1 y COX-2, cuya principal fuente son los macrófagos y células endoteliales y, en menor medida, fibroblastos y mastocitos (Abd-El-Aleem y cols., 2001). La primera se expresa de forma

constitutiva, se encuentra en el citoplasma o cerca del retículo endoplasmático y participa en la producción de prostaglandinas que intervienen en diferentes procesos fisiológicos, como la protección del epitelio gástrico, mantenimiento del flujo renal o la agregación plaquetaria. Sin embargo, la segunda, situada fundamentalmente en la región perinuclear y en la membrana nuclear, se expresa tras la inducción inflamatoria tras la exposición a LPS o citocinas proinflamatorias, como IL-1 α e IL-1 β , y presenta una correlación directa con el estrés oxidativo celular. Además, se ha observado que la oxidación con H₂O₂ da lugar a un aumento de la expresión de COX-2, lo cual está directamente relacionado con la senescencia celular (Zdanov y cols., 2007; Zdanov y cols., 2009). Asimismo, dicha enzima regula la producción de los prostanoideos que participan en la inflamación y en otros procesos no inflamatorios, tanto fisiológicos como patológicos.

Otro de los factores de transcripción es el **HIF**, cuya expresión está aumentada durante el proceso inflamatorio. Así, dicho factor regula el metabolismo y supervivencia celular en condiciones de hipoxia y está ligado a la inmunidad innata, controlando la expresión de genes proinflamatorios, la migración celular e induciendo la plasticidad fenotípica de los macrófagos (Imtiyaz y Simon, 2010; Koeppen y cols., 2011).

Existen diferentes isotipos de HIF, entre los cuales destaca el HIF-1, un factor de transcripción heterodimérico compuesto por las subunidades α y β (Semenza, 2007). La subunidad proteica HIF-1 β se expresa de forma constitutiva, mientras que el nivel de HIF-1 α depende del nivel de oxígeno celular (Bruick, 2003).

En condiciones de normoxia, se produce la hidroxilación de HIF-1 α , dando lugar a su ubiquitinización y subsecuente degradación por el proteasoma (Koeppen y cols., 2011). En cambio, en condiciones de hipoxia, hay una respuesta celular para evitar la apoptosis, por lo que se bloquea dicha degradación, se produce la unión con HIF-1 β para dar lugar a HIF-1, el cual se transloca al núcleo activando genes implicados en la adaptación a la hipoxia, supervivencia celular, angiogénesis y metástasis, en el caso de procesos tumorales (Brahimi-Horn y Pouyssegur, 2007).

La estabilidad de HIF-1 α es sensible a las variaciones de niveles de ROS. En situación de normoxia, la acumulación de ROS/RNS puede estabilizar y activar HIF-1 α

promoviendo la supervivencia celular. Sin embargo, en condiciones de hipoxia, los ROS pueden impedir la unión de HIF-1 al DNA, induciendo la apoptosis celular (Nishi y cols., 2008).

El factor de transcripción **AP-1** es un heterodímero compuesto por dominios proteicos de diferentes subfamilias como Jun, Fos, Maf y ATF (Wang y cols., 2012). Dicho factor de transcripción controla tanto la proliferación como la apoptosis celular, específicamente en la regeneración tisular (Angel y cols., 2001). La activación de AP-1 durante la inflamación inicia la expresión de mediadores inflamatorios, como TNF- α , TGF- β y COX-2, de forma aislada o interactuando con otros factores de transcripción (Wagner, 2010; Schonthaler y cols., 2011). La actividad de AP-1 depende del estado redox celular. El estrés oxidativo puede activar c-jun y ATF-2 mediante la fosforilación por JNK y p38 respectivamente, promoviendo así la actividad de AP-1. Por otro lado, el NO puede inhibir la unión de AP-1 al DNA mediante la S-glutationilación de dicho factor. Además, c-jun puede ver reprimida su expresión o ser degradado por el proteasoma en respuesta al estrés oxidativo, promoviendo así la apoptosis celular (Xia y cols., 2007).

Los factores de transcripción **STATs** (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) son una familia de proteínas entre las que destacan STAT1 y STAT3, que parecen actuar de forma opuesta: STAT1 es el mediador central de los interferones y puede favorecer la inflamación y la apoptosis, mientras que STAT3 antagoniza este proceso, induciendo la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10, limitando la respuesta inmune e inhibiendo la maduración de células dendríticas, todo lo cual promueve la supervivencia celular (Yu y cols., 2009).

Finalmente, el factor **Nrf2** está implicado en la respuesta al estrés oxidativo mediante la activación de la transcripción génica para la síntesis de antioxidantes, enzimas detoxificantes de fase II, enzimas para la síntesis de GSH y otras proteínas citoprotectoras (Kobayashi y cols., 2004). En situación de homeostasis se encuentra en el citoplasma unido a la proteína inhibidora Keap1 (Yamamoto y cols., 2008). Cuando aumenta la concentración de ROS/RNS, el complejo Keap1/Nrf2 se disocia permitiendo la acumulación de Nrf2 y su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, forma un heterodímero con las proteínas Maf, lo que permite su unión a una secuencia específica

del DNA denominada ARE (*Antioxidant Response Element*), desencadenando así la transcripción de múltiples genes para la síntesis de enzimas antioxidantes (Fujii y Akaike, 2013).

II.2.4 Citocinas

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, que regulan diferentes funciones biológicas a través de una acción autocrina o paracrina. Para ello, cada citocina se une a su receptor específico, generando una cascada de señalización y de expresión génica responsable de una respuesta celular específica. De este modo, están implicadas en múltiples actividades biológicas, como la comunicación intercelular, la activación de receptores específicos de membrana, la proliferación y diferenciación celular, y la quimiotaxis (Commins y *cols.*, 2010).

Las citocinas juegan también un papel esencial en la regulación del proceso inflamatorio y en la homeostasis tisular. En dicho proceso, existe un balance entre las citocinas proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α e IFN- γ) y antiinflamatorias (TGF- β 1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-13), cuyo desequilibrio puede dar lugar a diferentes patologías (Akdis, 2012).

Durante los últimos años, se ha estudiado el papel de los factores de crecimiento y citocinas en diferentes órganos y tejidos, con el objetivo de explorar su posible aplicación terapéutica en enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer, y en medicina regenerativa, específicamente en el tratamiento de enfermedades neurológicas, entre otras patologías.

Como se ha señalado anteriormente, al producirse el daño tisular, las células residentes del estroma secretan citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , para reclutar células inflamatorias presentes en el sistema microvascular circundante (Bentzinger y *cols.*, 2013), principalmente neutrófilos, los cuales promueven un ambiente proinflamatorio necesario para eliminar los desechos celulares. A su vez, dichos neutrófilos secretan quimiocinas para inducir la migración de monocitos y

macrófagos a la zona dañada, los cuales secretan IL-1 β y TNF- α , perpetuando el estado inflamatorio.

La familia de citocinas IL-1, compuesta por once miembros (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33, IL-36Ra, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-37 e IL-38), es crítica en la respuesta inflamatoria, ya que interviene tanto en la fase de respuesta aguda como en las alteraciones del metabolismo, en la reacción febril y en la activación linfocitaria. Todas las células del sistema inmune expresan y/o son afectadas por los miembros de la familia IL-1 (Garlanda y cols., 2013). La **IL-1 β** es su miembro más representativo, debido fundamentalmente a su importante papel como mediador en enfermedades autoinflamatorias (fiebre mediterránea familiar y síndrome de Muckle-Wells), enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide), enfermedades neurodegenerativas (esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer) y diabetes. También interviene en diferentes desórdenes pulmonares como el asma, daño pulmonar agudo, EPOC, sarcoidosis, asbestosis y silicosis (Dinarello y cols., 2012). A diferencia de las demás citocinas, la producción de IL-1 β requiere la maduración proteolítica promovida por complejos multiproteicos citoplasmáticos denominados inflamomas, como NLRP3. Dicha citocina se expresa en el citoplasma como un precursor inactivo (pro-IL-1 β) y necesita ser procesada proteolíticamente. La activación de NLRP3 permite la formación de un complejo para la activación de la caspasa-1 y, finalmente, la maduración proteolítica de pro-IL-1 β , que da origen a la forma biológicamente activa de IL-1 β . Actúa como un potente activador de COX-2 y NF- κ B, lo que contribuye al mantenimiento de la respuesta inflamatoria (Hernández y Urcuqui, 2012). **IL-1 α** , por el contrario, está presente en las células de forma constitutiva. Aunque sólo tiene un 25% de homología con IL-1 β en su secuencia aminoacídica, comparte el mismo receptor y ejerce efectos biológicos similares. La citocina **IL-6** posee actividad tanto proinflamatoria (es un potente activador de COX-2) como antiinflamatoria (es capaz de inhibir TNF- α e IL-1 y activar IL-10), cuya liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF- α . Las citocinas **IL-12 e IL-18** (también conocida como factor inductor del IFN- γ) tienen un efecto sinérgico con TNF- α en cuanto a la estimulación de la producción de **IFN- γ** , siendo este último un modulador esencial de la respuesta inmune por su capacidad de activar los macrófagos y las células *natural killer*.

La citocina **TNF- α** es clave en el inicio de la respuesta inflamatoria. Se sintetiza como un precursor de 212 aminoácidos que se hidroliza mediante la enzima TACE (enzima de conversión del TNF- α), dando lugar a una glicoproteína de 185 aminoácidos, la forma soluble y biológicamente activa, capaz de unirse a su receptor. Se conocen dos receptores de dicha citocina, denominados TNF-R1, expresado en la mayoría de tejidos, y TNF-R2, que se encuentra de forma específica en las células del sistema inmune. El receptor TNF-R2, a diferencia de TNF-R1, carece de un dominio de muerte (DD, *Death Domain*), por lo que su activación induce la supervivencia celular. Sin embargo, la unión de TNF- α al TNF-R1 puede activar diferentes vías metabólicas, tanto de supervivencia como de apoptosis celular. Tras su unión al receptor, éste experimenta un cambio conformacional que da lugar a la disociación de la proteína inhibitoria SODD del dominio de muerte intracelular. Esta disociación hace posible la unión de la proteína TRADD al dominio de muerte, lo cual puede desencadenar tres vías metabólicas: la activación de NF- κ B, la activación de la vía MAPK o la activación de caspasas, dando lugar a la muerte celular (Cereda y *cols.*, 2012). La activación de una u otra vía depende de múltiples factores como el tipo celular, la actividad de otras citocinas o los niveles de ROS/RNS, entre otros (Wajant y *cols.*, 2002). Así, una baja concentración de ROS/RNS promueve la reparación tisular, estimulando de forma indirecta la inflamación. De esta forma produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular y ayuda a reclutar células inflamatorias y a la producción de factores de crecimiento por parte de los macrófagos. Sin embargo, una alta concentración mantenida en el tiempo, ejerce un efecto negativo sobre la reparación del tejido dañado, perpetuando el estado inflamatorio (Barrientos y *cols.*, 2008).

Los macrófagos son importantes para fagocitar y eliminar el agente causante de la inflamación y las células apoptóticas, pero dicho mecanismo citotóxico y una producción excesiva de ROS/RNS puede dañar el tejido circundante, por lo que su actividad debe reducirse tras la inflamación y, de este modo, promover la reparación del tejido. Por esta razón, la función dual del **TGF- β 1** es un factor clave en el inicio y en la resolución de la respuesta inflamatoria. En la fase inicial de la inflamación, estimula el reclutamiento de células inflamatorias y el fenotipo proinflamatorio y fagocítico de los macrófagos, los cuales secretan TNF- α , IL-1 β e IL-6. Una vez que se han eliminado los

patógenos y restos celulares, el TGF- β 1 contribuye a la desactivación de los macrófagos, dando lugar a su fenotipo más antiinflamatorio y a la secreción de IL-10 e IGF-1 (Lemos y cols., 2015). Del mismo modo, TGF- β 1 puede inhibir la producción de TNF- α y bloquear la translocación de NF- κ B al núcleo mediante la inhibición de la fosforilación de I κ B, para suprimir así la actividad de las células inmunes (Smythies y cols., 2010). Por otro lado, se ha observado que NF- κ B puede regular de forma negativa la ruta metabólica TGF- β /SMAD, dando lugar a una persistencia de la inflamación (Behm y cols., 2012). La citocina **IL-4** actúa también sobre los macrófagos activados, reduciendo los efectos de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α , e inhibiendo la producción de ROS. La **IL-10** es también una de las principales citocinas antiinflamatorias, debido a su capacidad de inhibir IL-1, IL-6 y TNF- α , estimulando la producción endógena de citocinas antiinflamatorias. La citocina **IL-11** es capaz de regular de forma positiva la vía de señalización MAPK, promoviendo así la supervivencia celular. La **IL-13** posee unas características estructurales y funcionales similares a la IL-4 y puede inhibir la producción de NO y de varias citocinas como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α , entre otras.

Por último, **IGF-1** es un factor de crecimiento, sintetizado principalmente por los hepatocitos, los fibroblastos y los macrófagos, cuya expresión es esencial para una correcta reparación del tejido. Normalmente, se encuentra unido a proteínas (IGF-1 binding proteins, IGFbps), especialmente a IGFBP-3, para prolongar su vida media de minutos a horas y controlar así su actividad. Estas proteínas de unión también ayudan a modular la interacción de IGF-1 con su receptor (IGF-1R) y así controlar de forma indirecta su actividad biológica (Lara-Díaz y cols., 2017). Al unirse a su receptor, se produce la activación de la ruta metabólica PI3K/Akt, induciendo así la división celular (Temraz y cols., 2013). Dependiendo del contexto celular, IGF-1 regula diferentes procesos. Por ejemplo, modula la expresión génica en condrocitos (Yang y cols., 2017), la síntesis proteica en osteoblastos (Guo y cols., 2017), el ciclo celular en enterocitos (Van Landeghem y cols., 2015), el metabolismo en adipocitos (Chang y cols., 2016) y la supervivencia en células ciliadas cocleares (Yamahara y cols., 2017). La deficiencia de IGF-1 da lugar a un aumento de la inflamación y a un fallo en los mecanismos de renovación celulares (Rodríguez-de la Rosa y cols., 2017). Por el contrario, su sobreexpresión acelera la resolución del proceso inflamatorio (Tonkin y cols., 2015).

II.2.5 Agentes antioxidantes celulares

La homeostasis es crucial para mantener una correcta funcionalidad de las células. Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, niveles bajos de ROS/RNS actúan como moléculas señalizadoras, mientras que niveles altos ejercen un efecto perjudicial, llegando a dañar macromoléculas y dando lugar, en última instancia, a diferentes patologías asociadas al desequilibrio redox (Barbieri y Sestili, 2012). Con el fin de mantener un estado de homeostasis, las células han desarrollado un complejo sistema de defensa antioxidante, incluyendo sistemas enzimáticos y no enzimáticos (Tabla 1) que actúan de forma sinérgica, localizados de forma estratégica en los diferentes compartimentos celulares, citoplasma y orgánulos, e incluso en el espacio extracelular.

Los antioxidantes enzimáticos se definen como proteínas de alto peso molecular que eliminan radicales libres catalizando reacciones químicas. Entre dichas enzimas, destaca la SOD, que elimina el O_2^- catalizando su conversión a H_2O_2 , el cual, puede ser convertido en agua y oxígeno mediante la actuación de la catalasa. La enzima GPX elimina el H_2O_2 utilizando el GSH como co-sustrato aunque, en altas concentraciones de H_2O_2 , la enzima GPX tiene una menor afinidad por el sustrato que la catalasa (Powers y cols., 2011). Otro de los sistemas antioxidantes enzimáticos son las peroxirredoxinas, las cuales consumen el H_2O_2 mediante la oxidación de la proteína tiorredoxina (Kozakowska y cols., 2015).

Por otro lado, los antioxidantes no enzimáticos son moléculas de bajo peso molecular que eliminan los radicales libres mediante diferentes estrategias, bien de forma directa, mediante la unión a metales de transición, o bien a través de la regulación de rutas metabólicas que controlan el estado redox. En este sentido, el tripéptido GSH, compuesto por glutamato, cisteína y glicina, es el antioxidante celular endógeno más abundante (0,2 - 10 mM). Además de actuar como co-sustrato para GPX, es capaz de eliminar diferentes especies reactivas (O_2^- , $OH\cdot$ y $ONOO^-$) de forma directa, así como ayudar a otros antioxidantes derivados de la dieta (vitaminas E y C) a mantenerse activos, en un estado reducido (Powers y cols., 2011). El GSH participa también en diferentes reacciones metabólicas y bioquímicas como la síntesis y

reparación del DNA, la síntesis de proteínas, el transporte de aminoácidos y la activación de enzimas. Por todo ello, la actividad de dicho tripéptido influye en todos los sistemas del organismo, particularmente en los sistemas inmune y nervioso (Tibullo y cols., 2017).

Tabla 1. Sistemas antioxidantes celulares endógenos, enzimáticos y no enzimáticos.

Antioxidantes endógenos	Mecanismo de acción
Enzimáticos	
SOD	Cataliza la transformación de O_2^- a H_2O_2 (Abreu y Cabelli, 2010)
Catalasa	Cataliza la eliminación de H_2O_2 (Glorieux y cols., 2015)
GPX	Elimina el H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos (Bhabak y Mugesh, 2010)
Peroxirredoxina	Elimina el H_2O_2 y peróxidos orgánicos (Park y cols., 2016)
No enzimáticos	
GSH	Múltiples funciones en la defensa antioxidante celular (Kozakowska y cols., 2015)
Ácido úrico	Elimina radicales OH (Kushiyama y cols., 2016)
Ácido lipoico	Elimina radicales libres, se une a metales de transición, recicla la vitamina C y aumenta los niveles intracelulares de GSH (Tibullo y cols., 2017)
Coenzima Q	Protege frente al proceso de peroxidación lipídica (Varela-López y cols., 2016)
Albúmina	Se une a metales de transición y limita su disponibilidad (Roche y cols., 2008)
Bilirrubina	Neutraliza radicales libres y evita la peroxidación lipídica (Vítek, 2017)
Melatonina	Neutraliza el HClO y otros radicales (Reiter y cols., 2000)

II. Introducción

Por otro lado, existen también moléculas antioxidantes exógenas que se incorporan al torrente sanguíneo a través de la dieta (Tabla 2).

Tabla 2. Antioxidantes naturales exógenos, incorporados a través de la dieta.

Antioxidantes naturales exógenos	Mecanismo de acción
Vitamina C	Elimina radicales libres y recicla la vitamina E (Kagan y cols., 1992; Padayatty y cols., 2003)
Vitamina E	Inhibe la peroxidación lipídica (Schneider, 2005)
Minerales: Cobre, Zinc, Manganeso, Selenio, etc...	Actúan como co-factores de enzimas antioxidantes como SOD y GPX (Goszcz y cols., 2015)
Carotenoides: β -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, etc...	Eliminan radicales libres (Peto y cols., 1981; Jia y cols., 2017)
Resveratrol	Regula la actividad de SOD, catalasa y GPX (Wang y cols., 2017; Singh y Vinayak, 2017)
Flavonoides: Curcumina, quercetina, kaempferol, etc...	Eliminan radicales libres y/o quelan iones metálicos (Heim y cols., 2002; Marchiani y cols., 2014)

II.3. ENFERMEDADES ASOCIADAS AL ESTRÉS OXIDATIVO

Existen evidencias que relacionan de forma directa el estrés oxidativo con la aparición o el desarrollo de gran número de enfermedades. A continuación se detallan algunas de las más comunes.

II.3.1 Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares poseen una etiología multifactorial, estando asociadas generalmente a hipercolesterolemia, hipertensión, tabaquismo, diabetes, dietas no equilibradas, estrés y vida sedentaria (Opara y cols., 1999). Durante los últimos años, numerosos estudios afirman que el estrés oxidativo debería ser considerado como la primera o segunda causa de las enfermedades cardiovasculares (Pacher y cols., 2007; Ciancarelli y cols., 2012). En particular, tanto estudios *in vitro* como *in vivo* demuestran el papel del estrés oxidativo en la aterosclerosis, isquemia, hipertensión, cardiomiopatía, hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca congestiva (Bahorun y cols., 2006; Dröge, 2002; Chatterjee y cols., 2007; Ceriello, 2008).

El estrés oxidativo actúa principalmente como desencadenante de la aterosclerosis. Es bien conocido que la formación de las placas de ateroma es consecuencia de una inflamación endotelial temprana, lo que da lugar a la generación de ROS y al reclutamiento de macrófagos *in situ*. La lipoproteína de baja densidad (LDL) circulante es oxidada por las especies reactivas, lo que promueve la formación de células espumosas y la acumulación de lípidos. El resultado de dichos eventos es la formación de placas de ateroma.

II.3.2 Enfermedades neurológicas

El estrés oxidativo se ha relacionado con las enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Halliwell, 2001; Christen, 2000; Butterfield,

2002; Schrag y *cols.*, 2013). Así, por ejemplo, en esta última, diversas investigaciones han demostrado que el daño oxidativo juega un papel esencial en la pérdida de neuronas y la progresión de la demencia (Christen, 2000). El péptido tóxico β -amiloide, presente en el cerebro de las personas con enfermedad de Alzheimer, se produce por la acción de los radicales libres y es responsable, al menos en parte, de la neurodegeneración observada durante la aparición y progreso de dicha enfermedad (Butterfield, 2002). Por otro lado, en la enfermedad de Parkinson, el aumento del estrés oxidativo se asocia a la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Las células de la microglía pueden producir grandes cantidades de O_2^- , causando la oxidación de la dopamina a productos de la quinona, dañinos para el funcionamiento mitocondrial en el cerebro, los cuales inducen la apoptosis de dichas neuronas (Halliwell y *cols.*, 2001; Jana y *cols.*, 2007).

II.3.3 Enfermedades respiratorias

Diferentes estudios señalan que desórdenes pulmonares como el asma y la EPOC, determinados por una inflamación crónica sistémica y local, están relacionados con el estrés oxidativo (Caramori y Papi, 2004; Guo y Ward, 2007; Hoshino y Mishima, 2008; MacNee, 2001; Gumral y *cols.*, 2009). Por ejemplo, en pacientes con asma ocurre una producción excesiva de oxidantes de forma espontánea o tras la estimulación de los leucocitos. Los niveles de EPO y MPO se ven incrementados en diferentes fluidos, como la sangre periférica y el esputo inducido, y en el tejido pulmonar. También se ha observado un aumento en la expresión de otros marcadores de estrés oxidativo como la nitrotirosina en las células epiteliales bronquiales, células del músculo liso y parénquima pulmonar, y la 3-bromotirosina en las vías respiratorias y en el esputo de pacientes con asma (Caramori y Papi, 2004). En pacientes con EPOC se ha demostrado que los ROS provocan daño tisular, contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular y broncoconstricción (Gumral y *cols.*, 2009).

II.3.4 Enfermedades reumáticas

La artritis reumatoide es una de las enfermedades reumáticas más comunes. Es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a las articulaciones y a los tejidos circundantes, en cuya fisiopatología influyen la infiltración de macrófagos y células T activadas (Valko y *cols.*, 2007; Walston y *cols.*, 2006). Los radicales libres juegan un papel esencial tanto en el inicio como en el progreso de dicho síndrome, favoreciendo el aumento de los niveles de isoprostano y prostaglandina, presentes en el líquido sinovial de los pacientes afectados (Mahajan y Tandon, 2004).

II.3.5 Enfermedades renales

El estrés oxidativo está relacionado con numerosas patologías que afectan al riñón como la nefritis intersticial o la insuficiencia renal (Dröge, 2002; Galle, 2001). El incremento de ROS producido en diferentes patologías renales da lugar al reclutamiento de células inflamatorias y a la producción de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α y la IL-1 β que, como ya se ha señalado previamente, juegan un papel predominante como mediadores proinflamatorios, así como la activación del factor de transcripción NF- κ B, requerido para mantener el proceso inflamatorio. La última fase de la inflamación se caracteriza por un aumento de la producción de TGF- β que interviene en la síntesis de matriz extracelular. Teniendo esto en cuenta, cuando un estímulo de estrés oxidativo actúa de forma crónica en tejidos renales, el resultado es un estado inicial de inflamación que, cuando se cronifica, da lugar a la formación de abundante tejido fibrótico que deteriora la función del órgano y conduce a la insuficiencia renal. Un ejemplo de ello es la nefrotoxicidad inducida por determinados fármacos, como la ciclosporina o la bleomicina (Galle, 2001; Massicot y *cols.*, 1997).

II.3.6 Enfermedades intestinales

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son las principales enfermedades inflamatorias intestinales. En el tracto gastrointestinal las fuentes de ROS son las enzimas xantina oxidasa, amina oxidasa, aldehído oxidasa así como la NOX, presente esta última en los macrófagos de la lámina propia, donde el principal agente oxidante es el OH·. Se ha observado que en la mucosa intestinal inflamada existen niveles bajos de SOD y gran cantidad de neutrófilos, monocitos y linfocitos. La activación de neutrófilos y monocitos puede inducir una mayor formación de HOCl, el cual resulta más tóxico que el O_2^- o el H_2O_2 y puede reaccionar de forma inespecífica con sulfhidrilos, ácidos grasos poliinsaturados, DNA, piridina, nucleótidos y aminoácidos aromáticos. Además, los macrófagos y neutrófilos de los pacientes con dichas enfermedades generan mayores niveles de O_2^- que los individuos sanos, lo cual se asocia a un aumento de la permeabilidad del endotelio vascular. Todo ello provoca daño en el músculo liso, el sistema nervioso entérico y las células intersticiales de Cajal, manifestándose mediante la sintomatología típica de dichas enfermedades (Patlevič y cols., 2016).

II.4. TERAPIA ANTIOXIDANTE

Como se ha señalado en el apartado anterior, diversas patologías se asocian a un desequilibrio del estado redox. Se ha demostrado que existe una correlación inversa entre la capacidad antioxidante total en suero o plasma y la aparición o progreso de diferentes patologías como las descritas anteriormente. Por esta razón, desde hace décadas, se ha propuesto la utilización de los agentes antioxidantes, naturales y sintéticos, como un abordaje terapéutico prometedor de dichas patologías.

A continuación, se detallan algunos de los antioxidantes estudiados para el tratamiento o prevención de diversas patologías asociadas al estrés oxidativo.

Ácido lipoico

El ácido lipoico es una molécula antioxidante que se sintetiza de forma endógena y también se puede encontrar en algunos alimentos, como vísceras de animales o vegetales como brócoli o espinacas. Gracias a su capacidad antioxidante, elimina radicales libres, quelata metales de transición, aumenta los niveles intracelulares de GSH y recicla las vitaminas C y E (Tibullo y cols., 2017). Además, regula diferentes vías metabólicas asociadas al estrés oxidativo como p38, ERK MAPK, AKT y NF- κ B (Salinthonne y cols., 2008). Por todo ello, el ácido lipoico se ha propuesto para el tratamiento de enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

De hecho, se ha demostrado en diferentes ensayos clínicos, que la administración de ácido lipoico posee efectos beneficiosos, tanto en la prevención como en el tratamiento de enfermedades como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, renales y hepáticas (Rochette y cols., 2015), incluso en enfermedades neurológicas como la esclerosis múltiple y la enfermedad de Alzheimer (Salinthonne y cols., 2008).

Coenzima Q₁₀

La Coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) es un componente liposoluble de las membranas celulares. Todas las células son capaces de sintetizarla en condiciones fisiológicas, pero también se puede ingerir a través de la dieta e incorporarse a las membranas biológicas. Desempeña su función en la mitocondria principalmente, donde interviene en tres procesos bien caracterizados: *i*, la transferencia de electrones de los complejos I y II al complejo III, a través de la cadena transportadora de electrones de la membrana interna mitocondrial y la subsecuente polarización de la membrana y la generación de ATP; *ii*, la producción de O₂⁻ y H₂O₂; y *iii*, la neutralización de radicales libres. La forma totalmente oxidada de la CoQ₁₀, también denominada ubiquinona, es capaz de aceptar electrones, principalmente de la NADH, para pasar a su forma totalmente reducida (ubiquinol-CoQ₁₀-H₂). Dicha forma reducida es capaz de donar electrones, eliminando así los radicales libres. Sin embargo, la forma intermedia entre la ubiquinona y el ubiquinol, es la ubisemiquinona, reducida de forma univalente (CoQ₁₀-H⁺), que actúa como prooxidante formando O₂⁻ y H₂O₂. Este efecto se observa en todas las membranas biológicas incluyendo las del aparato de Golgi, los sistemas endosoma/lisosoma, así como en la mitocondria, lo cual ha dado lugar a la controversia en relación a la administración de CoQ₁₀ como terapia antioxidante (Linnane y cols., 2007).

El principal papel antioxidante de la CoQ₁₀ es la prevención de la peroxidación lipídica, de forma directa o mediante la interacción con el α-tocoferol (vitamina E). El ubiquinol es capaz de neutralizar radicales peroxilo, evitando así la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. La CoQ₁₀ y el α-tocoferol cooperan como antioxidantes mediante la acción del ubiquinol, restableciendo el α-tocoferoxil a α-tocoferol. Sin embargo, la reactividad del α-tocoferol con los radicales peroxilo es mucho mayor que la del ubiquinol, por lo que se cree que, *in vivo*, el ubiquinol, no actúa como antioxidante, pero regenera la capacidad antioxidante del α-tocoferol (Lass y Sohal, 1998).

Diversos estudios *in vitro* demuestran la capacidad antioxidante de la CoQ₁₀ y los beneficios de los complementos con CoQ₁₀ se atribuyen a su capacidad de mantener un metabolismo energético mitocondrial eficiente y, de esta forma prevenir la disfunción mitocondrial, más que a su actividad como antioxidante celular directo. Por esta razón,

la CoQ₁₀ ha sido propuesta como tratamiento para diferentes patologías, como el infarto agudo de miocardio (Singh y *cols.*, 2007), la hipertensión arterial (Rosenfeldt y *cols.*, 2007) o las enfermedades neurodegenerativas (Mancuso y *cols.*, 2010).

Vitamina E

La vitamina E, también denominada α -tocoferol, es un antioxidante liposoluble capaz de incorporarse a las membranas plasmáticas y eliminar los radicales libres presentes en las mismas, principalmente el radical peroxilo; esto le permite detener la peroxidación lipídica, por lo que es considerado el agente más importante en la eliminación de radicales libres en las membranas (Serbinova y *cols.*, 1991). Los radicales oxidados del α -tocoferoxil producidos en este proceso se pueden reciclar de nuevo a la forma reducida activa. Dicho proceso se realiza tanto de forma directa, a través de la vitamina C (Fujisawa y *cols.*, 2006), como de forma indirecta, gracias al GSH intracelular y el ácido lipoico que reciclan dicha vitamina C (Guo y Packer, 2000).

En relación a su utilidad terapéutica, en algunos ensayos clínicos se ha observado una ralentización del progreso de la enfermedad de Alzheimer moderada (Dysken y *cols.*, 2014; Sano y *cols.*, 1997). Sin embargo, en otros estudios no se ha apreciado ningún beneficio respecto a los pacientes tratados con placebo (Petersen y *cols.*, 2005) e incluso hay autores que indican que puede llegar a ser perjudicial dependiendo del tipo de paciente (Lloret y *cols.*, 2009). Por el contrario, estudios más recientes sugieren que el tratamiento con vitamina E puede llegar a reducir hasta un 35% la presencia de enfermedades cardiovasculares en individuos con diabetes y un genotipo determinado (Hp2-2; Hochberg y *cols.*, 2017). También se han obtenido resultados positivos en pacientes con insuficiencia hepática aguda grave (Miguel y *cols.*, 2017).

Tabla 3. Antioxidantes sintéticos.

Antioxidantes sintéticos	Propiedades
NAC	Estimula la síntesis de GSH y elimina radicales libres (Mokhtari y cols., 2017)
Alopurinol	Inhibe la xantina oxidasa y elimina radicales libres (Okafor y cols., 2017)
Bardoxolone metilo	Activa la vía del Nrf2 e inhibe la del NF-κB (Hasegawa y cols., 2017)
Edaravona	Elimina radicales libres e inhibe la peroxidación lipídica (Dennis y Witting, 2017)
Dimetil fumarato	Activa la vía del Nrf2, reduciendo la respuesta inflamatoria (Hoffmann y cols., 2017)
Probucol	Evita la oxidación del colesterol LDL (Yamashita y cols., 2015)
Idebenona	Análogo de la CoQ10 que inhibe la peroxidación lipídica (Jaber y Polster, 2015)

La tabla 3 muestra algunos de los antioxidantes sintéticos más relevantes que han sido desarrollados para el tratamiento de diferentes enfermedades.

N-acetilcisteína

La N-acetilcisteína (NAC) es la forma N-acetilada del aminoácido cisteína, el cual es un factor limitante en la biosíntesis de GSH. Sin embargo, dicho aminoácido no puede ser administrado como terapia de forma directa, debido a que se oxida fácilmente a cistina, una sustancia muy poco soluble que da lugar a la formación de radicales libres e importantes efectos citotóxicos. Por ello, se ha optado por la utilización de la NAC que, además de atenuar el estrés oxidativo mediante un aumento de los niveles intracelulares del GSH, es capaz de eliminar el exceso de ROS mediante una reacción directa con su grupo tiol (Zhang y cols., 2011).

El potencial terapéutico de la NAC se demostró por primera vez en los años 60, como agente mucolítico en pacientes con fibrosis quística (Hurst y cols., 1967). Desde entonces, se ha utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo como enfermedades cardiovasculares, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedades

neurodegenerativas, nefropatía inducida por la utilización de contrastes radiológicos, etc. (Rushworth y Megson, 2014). Además, la NAC se utiliza como tratamiento en la intoxicación con paracetamol, para evitar el daño hepatocelular. El beneficio de la NAC en la sobredosis por paracetamol radica en restablecer los niveles hepáticos de GSH, que han disminuido por el uso de dicho tripéptido para detoxificar el fármaco.

Se ha observado también un efecto antiinflamatorio de la NAC, asociado a su capacidad de inhibir la proteína IKK (Oka y *cols.*, 2000), lo que da lugar a una disminución de la actividad de NF- κ B (Pajonk y *cols.*, 2002). También puede promover la síntesis de ciertas proteínas que inhiben la activación de NF- κ B (Elbini Dhouib y *cols.*, 2016), evitando así la propagación de la cascada inflamatoria. Otros estudios demuestran que puede regular la fase inicial de la respuesta inmune (Omara y *cols.*, 1997), así como disminuir la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL- β) en pacientes sometidos a hemodiálisis o en shock séptico (Emet y *cols.*, 2004; Nascimento y *cols.*, 2010). En estudios experimentales, también se observó dicha disminución en ratones con infarto cerebral (Khan y *cols.*, 2004).

Alopurinol

El alopurinol es un compuesto químico que se emplea como medicamento frente a un exceso de ácido úrico y sus efectos tóxicos asociados. Actúa mediante la inhibición de la xantina oxidasa, responsable de la oxidación consecutiva de hipoxantina y xantina, que da lugar a la producción de ácido úrico. Además del aumento de ácido úrico, un incremento de la actividad xantina oxidasa da lugar a la formación de radicales libres. Aunque de forma tradicional se ha usado para el tratamiento de la gota, existe un interés por dicho compuesto debido a su capacidad para eliminar radicales libres (Moorhouse y *cols.*, 1987; Okafor y *cols.*, 2017). Así, estudios clínicos recientes han demostrado un efecto positivo del alopurinol en enfermedades cardiovasculares (Okafor y *cols.*, 2017) y en la nefropatía diabética (Shepler y *cols.*, 2012).

Bardoxolone metilo

Bardoxolone metilo es un compuesto, que se encuentra en fase experimental, con capacidad para modular las vías implicadas en la regulación redox. Es un potente activador del factor Nrf2 e inhibidor de NF- κ B, por lo que también posee propiedades antiinflamatorias. Se han realizado ensayos clínicos con Bardoxolone metilo en pacientes diabéticos con enfermedad renal crónica, habiéndose obtenido resultados dispares (Chin y *cols.*, 2014; de Zeeuw y *cols.*, 2013; Pergola y *cols.*, 2011).

Edaravona

La edaravona fue el primer fármaco neuroprotector introducido a nivel mundial. Desde el año 2001 se ha utilizado en Japón para tratar a pacientes con infarto cerebral (Kikuchi y *cols.*, 2012). Ejerce su efecto antioxidante mediante la regulación de la producción de OH \cdot y O $_2^{\cdot-}$, lo que da lugar a la inhibición de la peroxidación lipídica. Recientemente (mayo de 2017) la FDA ha aprobado la utilización de edaravona como tratamiento contra la esclerosis lateral amiotrófica (Traynor, 2017). Se ha demostrado que dicho fármaco protege las células de forma directa mediante la inducción de peroxirredoxina-2 y la inhibición de la apoptosis (Ahmadinejad y *cols.*, 2017).

Dimetil fumarato

El dimetil fumarato fue aprobado en el año 2013 por la FDA y desde entonces se utiliza como terapia en la esclerosis múltiple para reducir la actividad y progresión de la enfermedad (Hoffmann y *cols.*, 2017). Se ha observado que activa el factor Nrf2, dando lugar a un aumento de la síntesis de GSH. Además, induce la síntesis de la enzima glutatión reductasa, que cataliza la reducción de GSSG a GSH. En modelos animales, se ha demostrado que reduce la neurotoxicidad dopaminérgica en la enfermedad de Parkinson. Además, en modelos animales de hemorragia intracerebral, el dimetil fumarato reduce el edema cerebral y la inflamación, mejora la resolución del hematoma

y promueve la recuperación neurológica, todo ello mediante la activación de dicha vía de transcripción Nrf2 (Jing y *cols.*, 2015; Zhao y *cols.*, 2015; Iniaghe y *cols.*, 2015).

Probucol

El Probucol es un potente fármaco antioxidante que se ha utilizado durante las últimas tres décadas para la prevención y tratamiento de la enfermedad cardiovascular ateromatosa y los xantomas. El Probucol disminuye los lípidos y posee un importante efecto antiinflamatorio y antioxidante. Asimismo, reduce también la producción de radicales libres eliminando de forma directa el O_2^- e inhibe la oxidación del colesterol en LDLs, lo cual ralentiza la formación de las placas ateroscleróticas. Sin embargo, sus efectos secundarios han limitado su uso, ya que provoca de forma simultánea una reducción del colesterol HDL (Yamashita y *cols.*, 2015).

Idebenona

La Idebenona es un análogo de la CoQ₁₀, también aprobado por la FDA, para tratar la enfermedad de Alzheimer y otras afecciones cognitivas como la ataxia de Friedreich. Sin embargo, los resultados en la mejora de los síntomas neurológicos son inconsistentes, ya que puede actuar también como pro-oxidante, debido a la formación de una semiquinona inestable en el complejo I de la cadena transportadora de electrones (Jaber y Polster, 2015; tabla 4).

Tabla 4. Estudios clínicos recientes con antioxidantes.

Antioxidante	Patología	Referencia
Ácido lipoico	Diabetes	Derosa y cols., 2016
	Artritis reumatoide	Mirtaheri y cols., 2015
	Esclerosis múltiple	Khalili y cols., 2014
	Enfermedad de Alzheimer	Shinto y cols., 2014
	Lesión de médula espinal	Mohammadi y cols., 2015
	Enfermedad renal crónica	Safa y cols., 2014
Coenzima Q ₁₀	Diabetes	Mehrdadi y cols., 2017
	Infarto de miocardio	Aslanabadi y cols., 2016
	Enfermedad renal crónica	Gokbel y cols., 2016
	Artritis reumatoide	Abdollahzad y cols., 2015
	Enfermedad de hígado graso no alcohólico	Farsi y cols., 2016
	Enfermedad de Parkinson	Yoritaka y cols., 2015
	Esclerosis múltiple	Sanoobar y cols., 2016
Vitamina E	Diabetes	Khatami y cols., 2016
	Esclerosis lateral amiotrófica	Michal Freedman y cols., 2013
	Asma	Ghaffari y cols., 2014
	Enfermedad de Alzheimer	Dysken y cols., 2014
	Insuficiencia hepática aguda grave	Miguel y cols., 2017
NAC	Lesión renal aguda	Song y cols., 2015
	Fibrosis pulmonar idiopática	Valenzuela y Ancochea, 2013
	Diabetes	Szkudlinska y cols., 2016
	Enfermedad de Parkinson	Monti y cols., 2016
	Insuficiencia hepática aguda	Squires y cols., 2013
Alopurinol	Infarto de miocardio	Separham y cols., 2016
	Enfermedad renal crónica	Satirapoj y cols., 2015
	Diabetes	Liu y cols., 2015
	Artritis inflamatoria	Kim y cols., 2014; Stamp y cols., 2017
Bardoxolone metilo	Diabetes	Chin y cols., 2014

Edaravona	Esclerosis lateral amiotrófica	Nagase y <i>cols.</i> , 2016
	Accidente cerebrovascular isquémico agudo	Kaste y <i>cols.</i> , 2013
Dimetil fumarato	Esclerosis múltiple	Havrdova y <i>cols.</i> , 2017
	Psoriasis	Lijnen y <i>cols.</i> , 2016
Probucol	Diabetes	Jin y <i>cols.</i> , 2106
	Aterosclerosis	Yamashita y <i>cols.</i> , 2016
Idebenona	Ataxia de Friedreich	Arpa y <i>cols.</i> , 2014
	Enfermedad de Alzheimer	Thal y <i>cols.</i> , 2003
	Distrofia muscular de Duchenne	Buyse y <i>cols.</i> , 2017
	Neuropatía óptica	Klopstock y <i>cols.</i> , 2013

II.5. TERAPIA CELULAR

El fundamento de la terapia celular es restituir los procesos biológicos dañados en el curso de la enfermedad mediante la aportación de precursores celulares sanos o la aplicación de los factores producidos por estas células. Para ello se utilizan diferentes tipos celulares, con prometedores resultados en el caso de las células madre. Estas poblaciones celulares se caracterizan por su capacidad de autorrenovación, proliferación y diferenciación, según lo cual se diferencian los distintos tipos de células que se exponen a continuación.

II.5.1 Tipos de células madre

Células madre embrionarias (ESCs, *Embryonic Stem Cells*)

Las ESCs derivan del blastocisto y poseen dos características principales: *i*, son pluripotentes, es decir son capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares procedentes de cualquiera de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) y *ii*, bajo unas condiciones determinadas son capaces de proliferar indefinidamente (Ying y cols., 2003). Sin embargo, el dilema ético que supone la destrucción de un embrión humano y los problemas asociados a la seguridad de la terapia basada en ESCs son los principales factores que han ralentizado el desarrollo de terapias clínicas con dichas células. La pluripotencia de dichas células es un arma de doble filo; la misma plasticidad que permite a las ESCs generar cientos de tipos celulares diferentes también hace que sea difícil controlar su proliferación, su potencial de diferenciación y de tumorigenicidad en el trasplante *in vivo* (Nussbaum y cols., 2007). Por esta razón, la mayoría de los estudios con este tipo celular se centran en modelos animales, aunque dependiendo de la legislación de cada país, existe una regulación diferente en cuanto a la investigación con ESCs (De Trizio y Brennan, 2004; Volarevic y cols., 2018).

Recientemente se ha conseguido producir ESCs humanas de “grado clínico” que cumplen los más estrictos requisitos de calidad para poder ser utilizadas en pacientes y

han sido aprobadas para su uso en un pequeño número de ensayos clínicos en fase inicial. Ejemplos de ello son los trasplantes de células progenitoras cardiovasculares derivadas de ESCs en pacientes con disfunción ventricular izquierda (Menasché y cols., 2018) y de células epiteliales pigmentarias de la retina derivadas de ESCs en pacientes con dos enfermedades oculares, degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) y distrofia macular de Stargardt (Song y cols., 2015). Aunque se han completado las primeras fases de dichos ensayos, antes de poder ofrecer estas terapias a un gran número de pacientes, deben realizarse estudios de larga duración para poner a prueba su seguridad y su eficacia.

Células madre pluripotentes inducidas (iPS, *Induced Pluripotent Stem Cells*)

Las iPS son un tipo de células madre pluripotentes obtenidas a partir de una célula somática adulta, no pluripotente, mediante la transducción de cuatro factores de transcripción determinados Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4. Se obtuvieron, por primera vez, en el año 2006 en células de ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006) y un año después en células humanas (Takahashi y cols., 2007). Esta hazaña se considera uno de los mayores logros y un gran avance en la investigación con células madre. Dichas células son muy similares a las ESCs en cuanto a su cariotipo, fenotipo, actividad telomerasa y capacidad de diferenciación, con la ventaja de que disminuyen la posibilidad de rechazo en los trasplantes al proceder del propio paciente (Ghaedi y Niklason, 2016) y no generan la controversia ética de las ESCs. Sin embargo, existen una serie de desventajas que dificultan su aplicación en clínica como son la modificación genómica, la teratogenicidad, la transmisión de patógenos no humanos a humanos, y el coste y laboriosidad del proceso de reprogramación celular (Cefalo y cols., 2016).

Recientemente, se ha suspendido un ensayo clínico con iPS autólogas que investigaba su potencial para el tratamiento de DMAE, debido a la aparición de una mutación (Mandai y cols., 2017).

Actualmente, existen varios ensayos clínicos en fase de reclutamiento de pacientes con el objetivo de explorar su potencial clínico en diferentes patologías como leucemia, ataxia telangiectasia, enfermedad granulomatosa crónica y retinoblastoma, entre otras (Volarevic y cols., 2018).

Células madre adultas (ASCs, *Adult Stem Cells*)

Las ASCs están presentes en tejidos y órganos adultos y poseen una plasticidad más limitada que las ESCs. Inicialmente se definieron como células multipotentes, es decir, capaces de diferenciarse únicamente a células de su misma capa germinal embrionaria. Sin embargo, años más tarde se observó que la potencialidad de algunos tipos de ASCs era mayor de lo esperado, con capacidad para diferenciarse en células de distintos linajes (Bajek y cols., 2016). Algunas, como las células madre mesenquimales (MSCs, *Mesenchymal Stem Cells*) y las células madre hematopoyéticas, son capaces de diferenciarse a diversos tipos celulares, mientras que otras son precursoras directas de las células del tejido en el que se encuentran, como las células madre de la piel o las células madre neuronales. La aplicación de dichas células en investigación y como terapia no genera controversia ético-legal como las ESCs, ya que su obtención no requiere la destrucción de un embrión. Además, hay ocasiones en las que las ASCs se pueden obtener del mismo paciente a tratar, eliminando así los problemas derivados de la respuesta inmunitaria del huésped frente al injerto. Actualmente, están registrados más de cinco mil estudios clínicos con ASCs (<https://clinicaltrials.gov>).

Entre los diferentes tipos de células madre señalados, las MSCs resultan de gran interés para su aplicación en terapia celular, ya que poseen una serie de ventajas:

- Se pueden aislar a partir de tejido maduro del propio paciente o de un donante.
- Se caracterizan por su facilidad de cultivo y por su gran potencial de expansión *in vitro*.
- Pueden diferenciarse a múltiples tejidos de las tres capas embrionarias tras ser inducidas *in vitro* (Baer y Geiger, 2012).
- Poseen un riesgo muy bajo de actividad tumorigénica una vez trasplantadas (Segal-Gavish y cols., 2016).
- Poseen una baja inmunogenicidad y tienen propiedades antiinflamatorias (Li y cols., 2017).
- Su obtención y utilización no genera controversia ética.

Inicialmente, las MSCs fueron aisladas a partir de médula ósea, por Alexander Friedenstein durante la década de los 60 (Friedenstein y cols., 1968). Sin embargo, durante los últimos años, se ha descrito su presencia en localizaciones tan diversas como tejido adiposo (Zuk y cols., 2002), pulpa dental (Pierdomenico y cols., 2005), cordón umbilical (Capelli y cols., 2011), líquido amniótico (Schmidt y cols., 2008), membrana sinovial (Murata y cols., 2014), folículo piloso (Wang y cols., 2013), endometrio (Mutlu y cols., 2015), placenta (Hu y cols., 2016), sangre periférica (Koerner y cols., 2006), sangre de cordón umbilical (Liu y cols., 2014), sangre menstrual (Mehrabani y cols., 2016), leche materna (Hassiotou y cols., 2012) y orina (Zhang y cols., 2008).

Dado que las MSCs carecen de un marcador molecular específico y universal, para que una célula pueda ser considerada como tal, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, *International Society for Cell Therapy*) ha definido los siguientes criterios mínimos:

- Adhesión al plástico en condiciones estándar de cultivo.
- Fenotipo positivo ($\geq 95\%$): CD105, CD73 y CD90. Fenotipo negativo ($\leq 2\%$): CD34, CD45, CD11a, CD19 o CD79a, CD14 o CD11b y HLA-DR.
- Diferenciación *in vitro* (bajo estímulo específico) a osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

Se ha sugerido la eficacia de las MSCs como agente terapéutico en múltiples patologías como el daño pulmonar agudo, infarto de miocardio, fallo renal agudo, isquemia cerebral, enfermedad de Alzheimer y daño corneal, entre otras (Gupta y cols., 2007; Ortiz y cols., 2007; Lee y cols., 2009; Tögel y cols., 2005; Sheikh y cols., 2011; Lee y cols., 2010; Yao y cols., 2012). Sin embargo, aún quedan cuestiones por solventar como son la vía de administración más idónea en cada caso, la selección de la dosis, los posibles efectos adversos a largo plazo, etc. Como consecuencia de estos interrogantes existe un número limitado de medicamentos de terapia celular somática (sCTMP, *somatic Cell Therapy Medicinal therapy*) basados en MSCs autorizados actualmente. El primer medicamento autorizado a nivel mundial formulado con MSCs fue HeartiCellgram AMI (Corea del Sur) en el año 2011. Desde entonces han sido también

autorizados otros medicamentos en diferentes países (Tabla 5). Sin embargo, en la Unión Europea todavía no existe ningún sCTMP comercializado.

Tabla 5. Medicamentos de terapia celular con MSCs autorizados a nivel mundial. (Guadix y cols., 2017).

Nombre	País	Origen MSC	Dosis	Enfermedades
HeartiCellgram AMI®	Corea del Sur	MSC autógenas de médula ósea	10 ⁶ MSC/kg de paciente	Infarto agudo de miocardio
Cartistem ®	Corea del Sur	MSC alogénicas de sangre de cordón umbilical	500 µl del hidrogel con ácido hialurónico/cm ² de defecto del cartílago	Defectos del cartílago de la rodilla originados por una artrosis traumática y degenerativa
Cuspitem ®	Corea del Sur	MSC autógenas de tejido adiposo	3x10 ⁷ MSC/cm de diámetro de la fístula	Fístulas de Crohn
Prochymal ®	Canadá y Nueva Zelanda	MSC alogénicas de médula ósea	8 dosis de 2x10 ⁶ MSC/kg de paciente en 4 semanas consecutivas	Enfermedad de injerto contra huésped en pacientes pediátricos
TEMCELL HS ®	Japón	MSC alogénicas de médula ósea	8 dosis de 2x10 ⁶ MSC/kg de paciente en 4 semanas consecutivas	Enfermedad de injerto contra huésped Infarto de miocardio

Además de los medicamentos anteriormente presentados para aplicación en terapia celular somática, en EEUU existen diferentes productos con MSCs de origen alogénico autorizados como productos sanitarios. Tal es el caso de OsteoCel® (NuVasive, Inc.) (Eastlack RK, 2014), Trinity® (Orthofix, Inc.) (Peppers TA, 2017), Allostem® (AlloSource, Inc.) y LiquidGen® (Skye Orthobiologics LLC). En todos ellos conjugan una matriz (aloinjerto) donde incorporan las células, con el objetivo de promover la osteogénesis y reducir la inflamación en lesiones óseas (Guadix y cols., 2017).

II.5.2 Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AMSCs)

Entre los múltiples tipos de MSCs, las obtenidas a partir de médula ósea (BMMSCs, *Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells*) han sido las células más utilizadas y mejor caracterizadas para investigación en terapia celular. Sin embargo,

dichas células poseen una serie de desventajas para su aplicación en clínica, como su método de extracción altamente invasivo para el paciente, existiendo riesgo de infección, su limitada accesibilidad y el bajo número de células obtenidas. Por ello, se han estudiado diferentes nichos de MSCs teniendo en cuenta sus propiedades biológicas, capacidad de diferenciación y expresión de marcadores de superficie. Una de estas alternativas son las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AMSCs, *Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells*) obtenidas a partir de liposucciones, lipoplastias o lipectomías. Estas células comparten muchas características biológicas con las BMMSCs pero poseen una serie de ventajas:

- Alta disponibilidad y fácil extracción mediante procedimientos mínimamente invasivos.
- El tejido adiposo posee una mayor densidad de células madre que la médula ósea (5% frente a 0.01%) (Fraser y cols., 2006).
- Se pueden mantener *in vitro* durante más tiempo que las BMMSCs, poseen una mayor tasa de proliferación y una menor tasa de senescencia (Kern y cols., 2006; Im, 2017).
- Su potencial osteogénico no disminuye con la proliferación celular, al contrario que las BMMSCs (Wu y cols., 2013).

II.5.3 Propiedades de las AMSCs

El potencial terapéutico de las AMSCs está muy relacionado con sus propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antioxidantes.

En primer lugar, la actividad inmunomoduladora de las AMSCs se lleva a cabo mediante diferentes vías. Por un lado, se ha demostrado que las AMSCs son capaces de modular la función de las células T, las mayores ejecutoras de la respuesta inmune adaptativa, a través de diferentes mecanismos: *i*, la falta de expresión en las AMSCs del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH clase II) y de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 o CD40 da lugar a la anergia de las células T; *ii*, pueden inhibir la proliferación de dichas células mediante la producción de factores solubles

como TGF- β , IGF, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento hepatocitario (HGF), NO, IL-10 y prostaglandina E₂ (PGE-2), y *iii*, son capaces de inactivarlas, mediante la producción de la enzima indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO) que cataliza la conversión del triptófano a quinurenina, modulando así la respuesta inmune. Por otro lado, las AMSCs pueden inhibir la proliferación de las células *natural killer*, las mayores ejecutoras de la respuesta inmune innata, mediante la secreción de factores solubles como TGF- β y PGE-2 o bien mediante contacto directo célula-célula (Salem y Thiernemann, 2010). Dicha propiedad inmunomoduladora de las AMSCs las hace especialmente adecuadas para su utilización en transplantes alogénicos.

En segundo lugar, las AMSCs son capaces de regular la respuesta inflamatoria mediante diferentes mecanismos. Se ha observado que expresan niveles elevados del antagonista del receptor IL-1 (IL-1ra), lo cual inhibe la producción de IL-1 α y TNF- α por parte de los macrófagos, modulando así la fase temprana de la inflamación. Otro de los mecanismos descritos es la inducción de un *feedback* negativo desencadenado por el TNF- α y otras citocinas proinflamatorias liberadas por los macrófagos residentes, las cuales activan las AMSCs para secretar la proteína antiinflamatoria gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral (TSG-6, *Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene 6*). Dicha proteína reduce la síntesis de NF- κ B por parte de los macrófagos residentes, modulando así la cascada de señalización de las citocinas proinflamatorias. La inducción de un *feedback* negativo puede ser desencadenado también por otras moléculas liberadas por dichos macrófagos residentes y por las células del tejido dañado, como son LPS, TNF- α o NO, que en este caso, estimulan a las AMSCs para secretar PGE-2, dando lugar a la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 por parte de los macrófagos (Prockop y Oh, 2012).

En tercer lugar, las propiedades antioxidantes de las AMSCs se deben a su capacidad para reducir la peroxidación lipídica, a través del incremento de los niveles de GSH y SOD, y modulando las vías metabólicas que dan lugar a la activación de proteínas antioxidantes. Estudios recientes demuestran que las AMSCs disminuyen la producción de radicales libres, lo que tiene como consecuencia una reducción de la apoptosis en los tejidos dañados (Kim y cols., 2015; Dietrich y cols., 2015).

II.5.4 Mecanismos de acción de las AMSCs

En relación a los mecanismos de acción de las AMSCs, inicialmente se pensó que su efecto terapéutico, observado en modelos animales con diferentes patologías, estaba relacionado con la capacidad de dichas células para migrar a los tejidos dañados, diferenciarse en el tipo celular requerido y reemplazar a las células muertas (Song y Tuan, 2004). Sorprendentemente, a partir de múltiples estudios en animales e incluso de ensayos clínicos llevados a cabo durante las últimas décadas, se ha puesto en entredicho este paradigma. Se ha observado que el número de células trasplantadas que llegan y se integran de forma funcional en los tejidos dañados es demasiado bajo como para poder ejercer un efecto terapéutico (Phinney y Prockop, 2007). Dicha limitación se debe, en parte, a la muerte de las células unas horas después de ser trasplantadas, como consecuencia de una combinación de factores mecánicos, celulares y del huésped. En particular, el estrés mecánico durante la implantación (Amer y cols., 2016), la pérdida de contacto de las células con su matriz extracelular (He y cols., 2015), la privación de nutrientes y oxígeno en el lugar donde se implantan (Deschepper y cols., 2011) y la respuesta inflamatoria del huésped (Haque y cols., 2015), son factores que limitan la supervivencia a largo plazo de las células trasplantadas.

Existen hipótesis que indican que las MSCs son capaces de reparar los tejidos dañados a través de otros mecanismos alternativos a la diferenciación o a la fusión celular, promoviendo la viabilidad y proliferación celular, reduciendo la apoptosis y, en algunos casos, modulando la respuesta inmune. Dichos mecanismos alternativos incluyen las interacciones célula-célula mediadas por nanotubos de membrana (TNT, *Tunneling Nanotubes*) y la actividad paracrina de las células mediante la secreción de factores solubles y la producción de vesículas extracelulares que contienen péptidos o proteínas reparadoras, mRNA y miRNAs (Spees y cols., 2016; Figura 4).

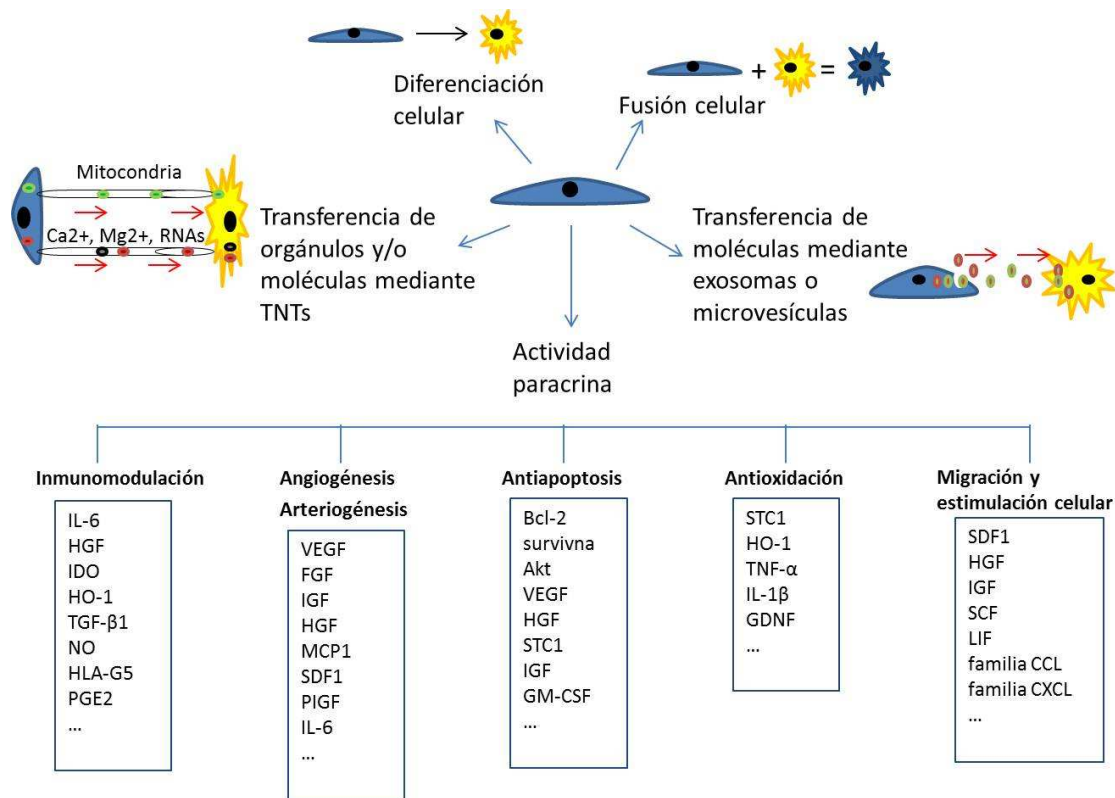


Figura 4. Mecanismos de acción de las AMSCs. Adaptado de Liang y cols., 2014.

Actualmente, el mecanismo terapéutico más aceptado asociado a las AMSCs es la generación de un microambiente pro-regenerativo, mediante la secreción paracrina de factores tróficos. Todo el espectro de moléculas secretadas por las AMSCs se denomina secretoma, el cual consiste en más de cien moléculas biológicamente activas entre las que se incluyen diferentes tipos de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y miRNAs (Salgado y cols., 2010; Oses y cols., 2017). En diferentes patologías como el infarto agudo de miocardio y el daño cerebral o hepático, se ha demostrado que la administración del secretoma de AMSCs es capaz de reproducir, al menos en parte, el efecto terapéutico observado tras la administración de las propias células (Lee y cols., 2015; Wei y cols., 2009), al mismo tiempo que se reduce la complejidad de la terapia y su coste económico. Sin embargo, uno de los mayores problemas asociados al uso del secretoma es que, en la mayoría de los casos, la concentración de citocinas y factores de crecimiento es demasiado baja para su uso terapéutico (Angoulvant y cols., 2011).

II.5.5 Pre-acondicionamiento de las AMSCs

Recientemente, se ha observado que las AMSCs, una vez establecidas en el tejido dañado, son capaces de percibir el microambiente y cambiar el patrón de biomoléculas secretadas de acuerdo a las necesidades especiales de dicho tejido lesionado (Ezquer y cols., 2016). Debido a la elevada plasticidad de las AMSCs, es posible modificar la composición de su secretoma, mediante la exposición de dichas células a un estímulo pre-acondicionador *in vitro*, produciendo así un medio acondicionado con una combinación y ratio de biomoléculas específicas para una determinada patología. En este contexto, se están desarrollando diferentes estrategias para estimular el efecto paracrino de las AMSCs como la ingeniería genética o el pretratamiento con diferentes factores físicos o químicos (Yu y cols., 2013; Tabla 6).

Tabla 6. Métodos de pre-acondicionamiento celular y mecanismos de acción.

Método	Mecanismos
Térmico	Induce la expresión de las proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Proteins). Promueve la supervivencia celular e inhibe vías metabólicas apoptóticas (Qiao y cols., 2015; Feng y cols., 2014).
Hipóxico	Activación de genes antiapoptóticos como Akt, Bcl-2 e HIF-1 α (Das y cols., 2010; Hu y cols., 2008).
Disminución del pH	Aumenta los niveles de expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 y el factor derivado de célula estromal 1 (SDF-1, stromal cell-derived factor 1). Aumenta la migración transendotelial y la diferenciación celular. Aceleran la recuperación del flujo sanguíneo, aumentan el número de capilares y arteriolas y el número de fibras musculares regeneradas (Cencioni y cols., 2013).
Privación de nutrientes	Las células entran en estado quiescente, lo que promueve su supervivencia bajo condiciones de isquemia. Aumenta la viabilidad celular, se estimula la autofagia y aumentan la expresión de enzimas gluconeogénicas como PEPCCK (Moya y cols., 2017)
H₂O₂	Aumentan los niveles de VEGF, HGF e IL-6. Promueve la diferenciación y supervivencia celular (Zhang y cols., 2012).
Citocinas (IGF-1, FGF-2, TGF-α, TNF-α, etc)	Mejora la supervivencia celular, aumenta la producción de factores paracrinos y favorece el efecto antiinflamatorio (Khan y cols., 2011; Herrmann y cols., 2010)
Farmacológico (Trimetazidina, Isoflurano, Eritropoyetina, Deferoxamina, Melatonina, LPS, etc)	Los antioxidantes y estabilizadores de HIF-1 α ayudan a las células a hacer frente al aumento del estrés oxidativo. Los inhibidores del transporte de electrones mitocondrial bloquean la activación de las vías de muerte mitocondrial. Los fármacos antiapoptóticos promueven la supervivencia celular (Carrière y cols., 2009; Mizukami y cols., 2016).

El proceso de pre-acondicionamiento consiste en exponer dichas células a un agente tóxico a concentraciones subletales o bien privarlas de oxígeno o nutrientes con el fin de hacerlas más resistentes a condiciones desfavorables. Este proceso da lugar a la expresión y secreción de diferentes moléculas necesarias para reducir el daño. En este sentido, se ha observado que en el pre-acondicionamiento de AMSCs por hipoxia (1% O₂), se estabiliza la proteína HIF-1 α y da lugar a la secreción de altos niveles de factores proangiogénicos; en pre-acondicionamientos con ROS se estimula la secreción de factores antiapoptóticos (Carrière y cols., 2009; Liu y cols., 2013; Chacko y cols., 2010) y en el pre-acondicionamiento con LPS o IFN- γ se induce la secreción de moléculas con actividad antiinflamatoria (Krampera y cols., 2006; Yao y cols., 2009). Este tipo de estrategia permitiría inducir la producción y secreción de una combinación y ratio apropiados de factores tróficos específicos para una determinada patología, mejorando así la eficacia de la terapia.

La utilización de dicho secretoma o medio acondicionado tiene una serie de ventajas respecto al uso de las células madre como terapia:

- Mayor bioseguridad porque se reduce el riesgo de formación de tumores.
- Disponibilidad inmediata, ya que el secretoma se puede liofilizar, facilitando así su almacenamiento.
- Mayor reproducibilidad del efecto terapéutico, ya que la variabilidad biológica del secretoma se puede minimizar definiendo bien su composición.
- Mayor facilidad y seguridad en cuanto a manipulación y administración.
- Menor coste de producción, ya que el secretoma se puede producir en grandes cantidades, reutilizando las mismas células.

Por todo ello, el uso del medio acondicionado como terapia puede reducir los altos costes asociados a la producción de terapias celulares, en las cuales se tienen que obtener y expandir células para cada paciente (Osés y cols., 2017).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El estrés oxidativo puede provocar una cronificación del estado inflamatorio, dando lugar al desarrollo de diferentes enfermedades.

La terapia celular con AMSCs posee un gran potencial para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la inflamación debido a las propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antioxidantes de dichas células. Sin embargo, existen limitaciones para obtener una respuesta antioxidante óptima con dicha terapia.

Estudios previos indican que el preacondicionamiento de las AMSCs aumenta la capacidad celular para hacer frente al daño oxidativo.

Teniendo en cuenta estos hechos, el **Objetivo General** de este estudio es analizar la capacidad terapéutica de las AMSCs preacondicionadas, y de su medio acondicionado, en un modelo *in vitro* de estrés oxidativo inducido en fibroblastos.

Este objetivo general se fundamenta en la siguiente **Hipótesis**:

El preacondicionamiento de las AMSCs con dosis bajas de H₂O₂ permite incrementar su capacidad antioxidante y mejorar su poder de reparación de fibroblastos sometidos a estrés oxidativo.

Para confirmar esta hipótesis se proponen los siguientes **Objetivos Específicos**:

1. Analizar la respuesta de los fibroblastos frente al estrés oxidativo.
2. Analizar la respuesta de las AMSCs frente al estrés oxidativo.
3. Analizar el efecto de la terapia antioxidante con la NAC sobre fibroblastos oxidados.
4. Analizar el efecto de la terapia celular con AMSCs sobre fibroblastos oxidados.
5. Analizar el efecto de la adición de la NAC al co-cultivo con AMSCs y al medio acondicionado por las AMSCs sobre la proliferación de fibroblastos oxidados.
6. Analizar el efecto de las AMSCs preacondicionadas con dosis bajas de H₂O₂ sobre fibroblastos oxidados.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1. MATERIAL Y TÉCNICAS

IV.1.1 Células

IV.1.1.1 Fibroblastos

Los fibroblastos utilizados para este estudio fueron donados por el banco celular de HistoCell S.L. (Parque Científico-Tecnológico de Zamudio, Bizkaia, España). Dichas células habían sido aisladas a partir de prepucio humano y se expandieron *in vitro* mediante subcultivos. De este modo, se obtuvo una reserva de células que fue almacenada y criopreservada en nitrógeno líquido.

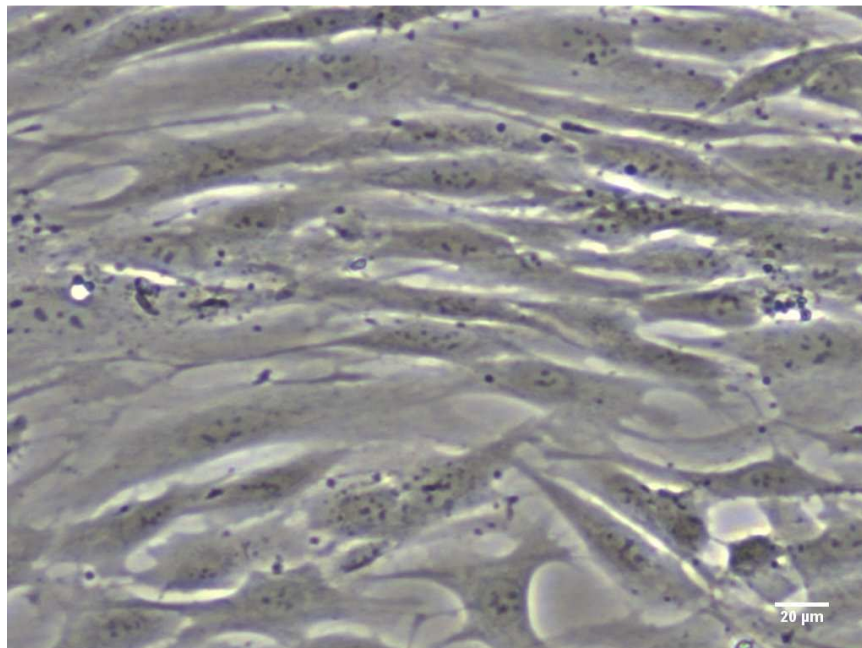


Figura 5. Cultivo de fibroblastos en frasco de 75 cm². Imagen obtenida con el microscopio de contraste de fases (100x).

IV.1.1.2 AMSCs

Las AMSCs fueron donadas por el banco celular de HistoCell S.L. Dichas células fueron aisladas a partir de muestras de tejido adiposo, procedente de lipoaspirados. Tras su expansión *in vitro* para obtener una reserva suficiente, se almacenaron en nitrógeno líquido para su correcta conservación a lo largo de todo el estudio.

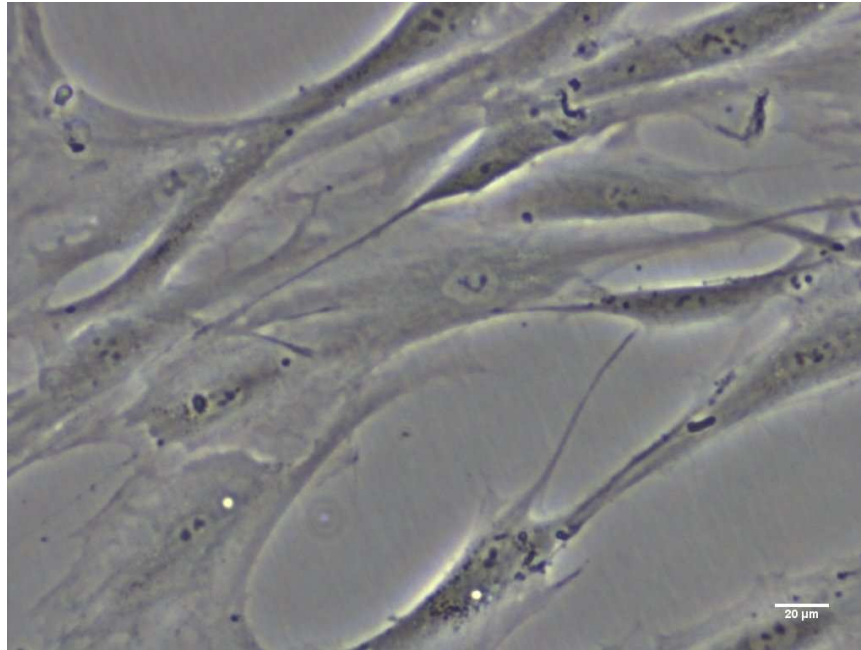


Figura 6. Cultivo de AMSCs en frasco de 75 cm². Imagen obtenida con el microscopio de contraste de fases (100x).

IV.1.2 Cultivos celulares

IV.1.2.1 Congelación de las células

Con el objetivo de crear un *stock* celular suficiente para realizar la experimentación, se procedió a la congelación de las células. Así, una vez alcanzada la semiconfluencia en los cultivos primarios, se despegaron las células con un lavado de tampón fosfato en solución salina (PBS, Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU) y añadiendo 0.1% tripsina y 2 mM ácido etilendiaminotetraacético (tripsina-EDTA) (Gibco, Life Technologies™). La suspensión celular obtenida se centrifugó a 500 g (Heraeus Labofuge 400R, Alemania) durante 5 min. Posteriormente, se realizó el recuento celular en un hemocitómetro Burker (BlauBrand®, Alemania), calculando la viabilidad mediante el método de exclusión de azul tripán (Gibco, Life Technologies™). La densidad celular para la congelación fue de 1×10^6 células/criovial resuspendidas en 1 ml de solución de congelación compuesta por 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich Chemical Co.) en suero bovino fetal (SBF, Biochrom AG, Alemania). Una vez distribuidas las células en los crioviales, se etiquetaron

y se introdujeron en un contenedor para congelación sumergido en propanol (Mr. Frosty Nalgene® Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), el cual se trasladó directamente al ultracongelador a -80°C MDF-U52V (Sanyo Electric Biomedical Co, Japón). Este sistema permite atenuar la velocidad de enfriamiento, produciendo un descenso paulatino de la temperatura de 1°C cada minuto, aproximadamente, hasta alcanzar los -80°C. Tras 24 h, los viales fueron almacenados en el contenedor de N₂ líquido a -180°C.

IV.1.2.2 Descongelación y mantenimiento celular

Los viales de células se descongelaron en el baño termostático a 37°C, manteniendo los cultivos en condiciones de esterilidad, en la cabina de flujo laminar vertical VP-100 (Telstar, España). Tras la descongelación del vial, se centrifugaron las células durante 5 min a 500 g, resuspendiendo el *pellet* celular en el medio de cultivo apropiado para cada uno de los tipos celulares.

La siembra de las células tuvo lugar en frascos de cultivo de 25, 75 y 175 cm² de superficie (Sarstedt AG & Co, Alemania) en similares condiciones tanto para fibroblastos como para AMSCs. La densidad de siembra fue de 2x10³ células/cm² en medio de cultivo compuesto por DMEM-GlutaMAX™-I (Gibco, Life Technologies™, Carlsbad, CA, EEUU), suplementado al 10% con SBF, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Lonza, Bélgica).

El tiempo requerido por las células para su adhesión a la superficie de cultivo fue de 4 h para los fibroblastos y de 2 h para las AMSCs. Los cultivos se mantuvieron en el incubador (CO₂ incubator MCO-18AIC-UV, Sanyo Electric Biomedical Co) en atmósfera de humedad a saturación, a 37°C de temperatura y un 5% de CO₂.

Transcurridos 3 días en el caso de los fibroblastos y 5 días para las AMSCs, se alcanzó el estado de semiconfluencia (80-90% de la superficie de adhesión ocupada), momento en el que se realizó un subcultivo. Para ello, se despegaron las células realizando un lavado con PBS y añadiendo tripsina-EDTA 0,05% durante 5 min. Posteriormente, se añadió un 10% de SBF para neutralizar la tripsina-EDTA, se realizó

otro lavado de la superficie de cultivo con PBS y la suspensión obtenida se centrifugó durante 5 min a 500 g. Las células se subcultivaron a partir de las densidades indicadas anteriormente para continuar con la expansión celular.

Las células utilizadas para la realización de las experiencias tenían un mínimo de tres pases y en ningún caso fueron subcultivadas más de nueve veces.

IV.1.2.3 Siembra de la suspensión celular en placa

Con el cultivo en semiconfluencia y una cantidad de células suficiente para realizar la experimentación, se procedió a despegar las células del frasco. Se retiró el medio de crecimiento, se realizó un lavado con PBS y se incubaron las células con tripsina-EDTA a 37°C durante 5 min. Posteriormente se añadió SBF y se centrifugaron a 500 g durante 5 min. El *pellet* obtenido se resuspendió en medio de crecimiento y se realizó el contaje directo en el hemocitómetro.

Para la experimentación en placa (Sarstedt AG & Co.) se sembraron ambos tipos celulares en medio de crecimiento a una concentración de 2.1×10^4 células/pocillo para las placas de 24 pocillos y de 4×10^3 células/pocillo para las placas de 96 pocillos.

IV.1.3 Técnicas de experimentación

En este trabajo se han utilizado las siguientes técnicas experimentales:

IV.1.3.1 Determinación de la proliferación celular

En las placas de 96 pocillos la proliferación celular se determinó mediante el método de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT, Sigma Aldrich Chemical Co.), un ensayo colorimétrico que permite cuantificar la actividad metabólica celular. Las sales de MTT (de color amarillo) son metabolizadas por las enzimas mitocondriales de las células viables, transformándose en cristales de formazán (de color azul) (Zirafi y cols., 2014).

El MTT se disolvió en PBS a una concentración de 5 mg/ml y se añadieron 10 μ l/pocillo. Tras incubar la placa durante 2 h se retiró el medio, se añadieron 100 μ l/pocillo de DMSO y se determinó la absorbancia a $\lambda=540$ nm en un lector multiparamétrico de placas (Synergy™ HT System; Biotek Instruments Inc, Winooski, VT, EEUU).

En las placas de 24 pocillos se determinó la proliferación mediante recuento directo en cámara Burkner. La obtención de las células se realizó mediante un lavado con PBS y una breve exposición a tripsina-EDTA. A partir de la suspensión celular obtenida, se tomó una alícuota, se mezcló con azul tripán (1:1) y se realizó el recuento de células viables en el microscopio de contraste de fases.

IV.1.3.2 Determinación de los niveles intracelulares de GSH

La determinación de los niveles intracelulares de GSH se realizó con la sonda fluorescente monoclorobimano (mBCL, Molecular Probes®, Eugene, OR, EEUU). La especificidad de este fluorocromo por el GSH es debida a la enzima GST que cataliza la conjugación del GSH con el mBCL, formándose un producto fluorescente (Kamencic y cols., 2000).

A partir de un *stock* de mBCL 1mg/ml en etanol absoluto, el fluorocromo se diluyó en PBS para la obtención de la concentración de trabajo adecuada (100 μ M). Tras lavar las células con PBS, se añadieron a los pocillos 100 μ l de sonda mBCL y se incubaron durante 60 min en oscuridad y a 37°C. La medida de fluorescencia de la placa de 96 pocillos se llevó a cabo en el lector multiparamétrico de placas Synergy™ HT System, con una configuración de filtros de $\lambda_{ex}= 360$ nm y $\lambda_{em}= 460$ nm. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (UA) de fluorescencia, valor que se obtuvo tras la eliminación del valor de autofluorescencia de las células incubadas con PBS.

IV.1.3.3 Determinación de los niveles intracelulares de ROS

La medida de los niveles intracelulares de ROS se llevó a cabo mediante la utilización de la sonda fluorescente 2,7-diclorofluoresceína diacetato (H_2DCF -DA, Molecular Probes®). Dicha sonda difunde a través de la membrana celular de forma pasiva debido a sus propiedades lipofílicas. Una vez en el citosol, las esterasas hidrolizan su enlace éster (H_2DCF) convirtiéndola en hidrófoba y en presencia de ROS se convierte en su forma fluorescente (DCF), permitiendo así su cuantificación (Lee y *cols.*, 2015).

A partir de una solución de 1 mM en etanol absoluto, el fluorocromo se diluyó en PBS a 10 μ M para su uso. En la placa de 96 pocillos se añadieron 100 μ l de sonda por pocillo y se incubaron las células durante 30 min en oscuridad a 37°C. Transcurrido este tiempo, se retiró la sonda y se añadieron 100 μ l de PBS durante 10 min. Tras llevar a cabo los diferentes tratamientos, se realizaron medidas secuenciales con intervalos de 10 min de la fluorescencia emitida, durante 1 h, en el lector multiparamétrico de placas, con una configuración de filtros de λ_{ex} = 492-495 nm y λ_{em} = 517-527 nm. Dicha cinética permite conocer la evolución del contenido intracelular de ROS de forma progresiva. Los resultados se expresaron en UA de fluorescencia, una vez restada la autofluorescencia de las células.

IV.1.3.4 Determinación de la capacidad antioxidante

Determinación de la capacidad antioxidante celular total

La actividad antioxidante celular total se determinó con el *kit* de capacidad antioxidante total (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EEUU), basado en la capacidad de los sistemas antioxidantes de la muestra de inhibir la oxidación, inducida por la metmioglobina, del compuesto ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) a $ABTS^+$. Dicha capacidad de prevenir la oxidación es comparada con una curva patrón de Trolox, un análogo del tocoferol soluble en agua, siendo cuantificada como milimoles equivalentes de Trolox (Miller y *cols.*, 1993).

Tras someter a las células a las diferentes condiciones experimentales, se midió la capacidad antioxidante total de las mismas a partir de la obtención de extractos del contenido intracelular. Para ello, las células se despegaron mecánicamente utilizando un *scraper* (Costar®, Corning Incorporated, New York, NY, EEUU) con PBS a 4°C y manteniendo los frascos sobre hielo durante el proceso. Tras 5 min de centrifugado a 500 g a 4°C, se resuspendió el *pellet* en 150 µl de PBS y se procedió al sonicado de la muestra (Sonopulus Mini 20. Bandelin Electronic, Alemania). Para ello, utilizando una sonda de 1.5 mm de diámetro, se aplicaron 6 pulsos de 5 segundos con pausas de 20 segundos, manteniendo las muestras en hielo en todo momento. Posteriormente, la muestra se centrifugó (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Alemania) a 10.000 g durante 15 min a 4°C, tomando el sobrenadante para proceder a su análisis inmediato con el *kit* de capacidad antioxidante total o bien para su conservación a -80°C durante un período máximo de un mes.

Con el objetivo de determinar la capacidad antioxidante en relación a la cantidad de proteína de la muestra, se utilizó el *kit* colorimétrico DC-Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU). La cantidad de proteína de las muestras se comparó con una curva patrón de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich Chemical Co.) de concentración conocida.

La cuantificación de la capacidad antioxidante se realizó en el lector multiparamétrico de placas, $\lambda_{Abs}=750$ nm y los resultados de la capacidad antioxidante se expresaron en milimoles equivalentes de Trolox, relativizando dichos valores a la cantidad de proteína de la muestra.

Determinación de la capacidad antioxidante de los medios de cultivo

La determinación de la capacidad antioxidante de los diferentes medios de cultivo se realizó mediante un ensayo de capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (ORAC, *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) (Cao y cols., 1993; Ou y cols., 2001).

Con el fin de determinar la actividad antioxidante de dichos medios, se añadió a éstos el agente oxidante 2,2'-azobis (2-amidino-propano) diclorhidrato (AAPH) y se midió la fluorescencia emitida por la fluoresceína sódica.

Como referencia se utilizó la capacidad antioxidante del ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Chemical Co) obtenida a partir de una curva patrón de concentración conocida (0 – 50 mM).

La medida se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos opaca en la que se añadieron 25 µl de muestra (1:1000), 150 µl de fluoresceína sódica y 25 µl de oxidante AAPH. La lectura se efectuó en el medidor multiparamétrico de placas, con una configuración de filtros de $\lambda_{ex}=485$ nm y $\lambda_{em}=520$ nm; las medidas se realizaron cada 5 min durante un tiempo de 2 h. Con los datos obtenidos, el área bajo la curva que se forma en la degradación cinética permite establecer la relación con la capacidad antioxidante de la muestra, expresada en milimoles equivalentes de ácido ascórbico.

IV.1.3.5 Determinación de los niveles de apoptosis

La determinación del porcentaje de apoptosis en la población celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo, con la colaboración de los Servicios Generales de Investigación de la UPV/EHU (SGIker). En los tiempos indicados, se despegaron las células de la superficie de cultivo con tripsina-EDTA y se lavaron con PBS a 4°C. Tras su centrifugación a 500 g durante 5 min a 4°C, se ajustó la cantidad de células de cada muestra a 8×10^5 y se utilizó el método de doble marcaje IP/Anexina V para determinar las células muertas (IP) y las apoptóticas (Anexina V) con el *kit* Alexa Fluor® 488 con yoduro de propidio (Molecular Probes®).

Los resultados indican la relación de células vivas, en fase de apoptosis y necróticas, expresado en forma de porcentajes de la población total y en histogramas biparamétricos.

IV.1.3.6 Determinación de la expresión génica

La determinación de la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo (COX-2 y NF- κ B) e inflamación (IL-1 β , TGF- β 1, IGF-1 y TNF- α) se realizó mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR, *Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction*) a partir del mRNA obtenido de cada tipo celular en las diferentes condiciones de cultivo. Para ello se utilizó un *kit* de extracción de RNA (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU), se cuantificó diluyendo 1:70 la muestra con H₂O (Sigma-Aldrich Chemical Co.) y midiendo la absorbancia a 260 nm. La cantidad de RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de la muestra se calculó según la relación:

$$\frac{\text{Abs } 260 \text{ nm} \times 40 \times 70}{1000}$$

Donde 40 es el coeficiente de extinción de los nucleótidos a $\lambda = 260 \text{ nm}$ y 70 es el factor de dilución utilizado.

Para descartar que el RNA estuviera degradado, se procedió a hacer migrar una cantidad de 100-500 μg de RNA en un gel de agarosa al 2%, en una electroforesis de 30 min a 100 W.

De forma adicional, se midió la absorbancia de la muestra a $\lambda = 280 \text{ nm}$ con el fin de determinar la cantidad de proteína. Así, la relación Abs 260 nm/Abs 280 nm indica el grado de pureza de la muestra, considerada óptima con valores entre 1.8 y 2.

El cDNA se obtiene a partir de la retrotranscripción del RNA. Para ello, se utilizó el *kit* de retrotranscripción SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System (Invitrogen[™], Life Technologies[™]) en condiciones de esterilidad y manteniendo los reactivos en hielo. En primer lugar, se mezclaron 1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNA con 1 μl de *random hexamers* (50 ng/ml) y 1 μl de *dNTP mix* 10 mM, completando con H₂O DEPC hasta 10 μl de volumen. Esta mezcla se incubó 5 min a 65°C y, posteriormente, se enfrió durante 1 minuto en hielo. En segundo lugar, se añadió la solución de retrotranscripción formada por los reactivos mostrados en la tabla 7.

Tabla 7. Reactivos que componen la solución de retrotranscripción.

Reactivos	Vol./reacción
Tampón RT 10%	2 μ l
25 mM MgCl ₂	4 μ l
0,1 M DTT	2 μ l
RNaseOUT TM (40U/ μ l)	1 μ l
SuperScript III RT (200U/ μ l)	1 μ l
TOTAL	10 μl

Finalmente, se combinaron la solución de retrotranscripción y el cDNA y se procedió a su incubación en el termociclador (C1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories), programando un único ciclo consistente en 10 min a 25°C, 50 min a 50°C y 5 min a 85°C. El cDNA excedente fue clasificado y conservado a -80°C.

La RT-qPCR se realizó empleando los recursos técnicos de los SGIker de la UPV/EHU, donde se utilizaron las sondas PTGS-2 COX-2: 102471; NF- κ B1:100646; IL-1 β : 100950; TGF- β 1: 101210; IGF-1: 103127 (Roche Applied Science, Alemania) y TNF- α : Hs99999043.m1 (Taqman Applied Biosystems, EEUU). Para finalizar, los resultados obtenidos fueron procesados en el software de análisis Gen Ex data (Multi D, Suecia).

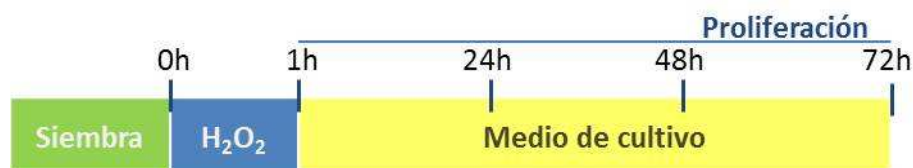
IV.2. PROCEDIMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTALES

IV.2.1 Inducción de estrés oxidativo en fibroblastos y AMSCs

Para la inducción del estrés oxidativo se utilizó H_2O_2 (33% p/v, Panreac Química SLU, España), diluido a diferentes concentraciones en medio DMEM-GlutaMAX™-I.

IV.2.1.1 Efecto de la oxidación sobre la proliferación celular

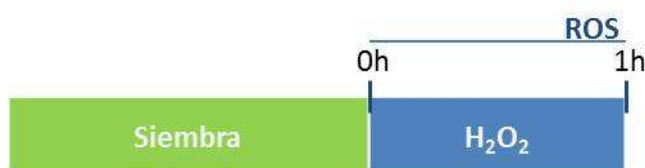
Para determinar el efecto de la oxidación sobre la proliferación de fibroblastos y AMSCs se sembraron 4×10^3 cel/pocillo en placa de 96 pocillos. Con el objetivo de obtener una curva dosis/respuesta, se administraron dosis crecientes de H_2O_2 (0.1, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM) manteniendo la incubación durante 60 min. La cuantificación de la proliferación se realizó a las 24, 48 y 72 h. A partir de los resultados de viabilidad obtenidos a las 24 h, se calculó el valor IC_{50} , el cual refleja la concentración que provoca un efecto letal sobre el 50% de la población celular.



IV.2.1.2 Efecto de la oxidación sobre los niveles intracelulares de ROS y GSH

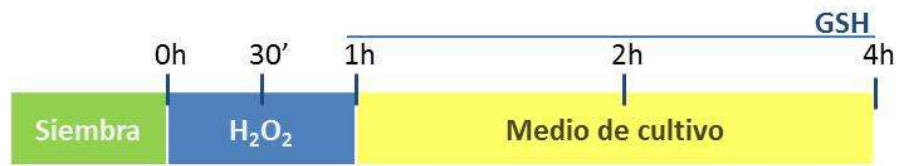
Se sembraron 4×10^3 cel/pocillo en placa de 96 pocillos y se administró H_2O_2 a concentraciones crecientes (0.1, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM) durante 1 h. Durante la oxidación se llevaron a cabo las siguientes medidas:

- Niveles intracelulares de ROS: registros puntuales cada 10 min durante 1 h desde el inicio de la oxidación.



IV. Material y métodos

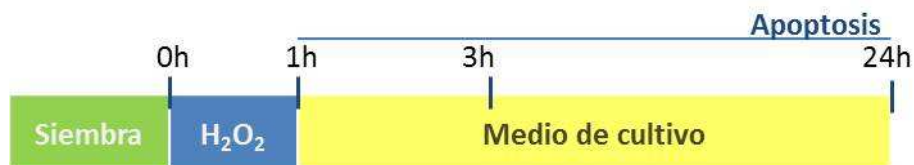
- Niveles intracelulares de GSH: registros a los 30, 60, 120 y 240 min a partir del inicio de la oxidación.



IV.2.1.3 Efecto de la oxidación sobre la apoptosis y expresión génica

Se sembraron 1.6×10^4 células/cm² en tres frascos de 75 cm² para cada uno de los casos, se añadió la oxidación a una concentración moderada y alta de H₂O₂ (0.25 y 1mM) durante 1 h y se realizó la determinación de los siguientes parámetros:

- Apoptosis celular, a las 3 y 24 h desde el inicio de la oxidación.



- Expresión de genes relacionados con estrés oxidativo e inflamación, en células obtenidas 1 y 3 h tras el inicio de la oxidación: COX-2, NF- κ B, IGF-1, IL-1 β , TGF- β 1 y TNF- α .



IV.2.2 Evaluación de la eficacia de los diferentes tratamientos frente al estrés oxidativo inducido en fibroblastos humanos

Para hacer frente a los efectos adversos del estrés oxidativo, se llevaron a cabo tres estrategias terapéuticas: terapia farmacológica antioxidante; terapia celular y terapia combinada (Fig. 7).

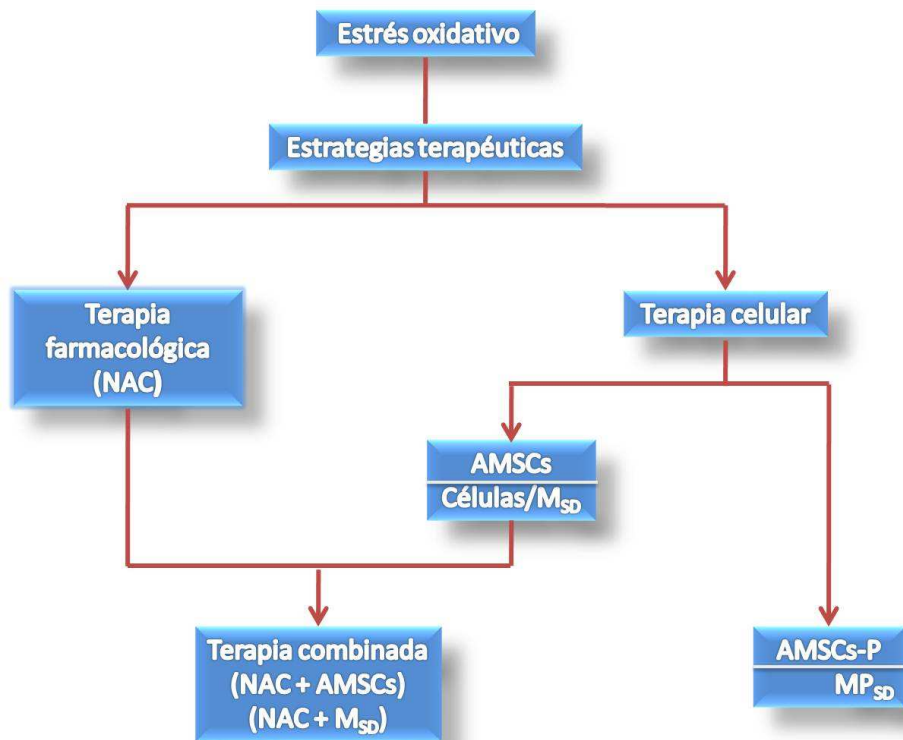


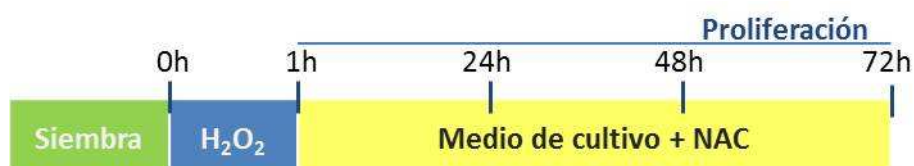
Figura 7. Esquema de las diferentes estrategias terapéuticas llevadas a cabo para hacer frente al estrés oxidativo.

IV.2.2.1 Efecto de la terapia farmacológica antioxidante con NAC

La NAC (Sigma-Aldrich Chemical Co.) es una forma estable del aminoácido no esencial L-Cisteína, que actúa aumentando los niveles intracelulares de GSH mediante el aporte de cisteína (Morini y cols., 1999).

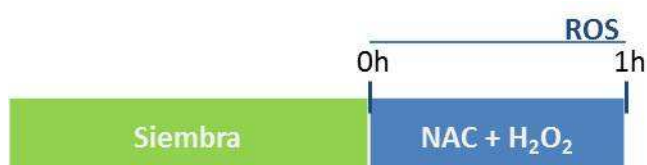
Efecto de la NAC sobre la proliferación de fibroblastos

En placas de 24 pocillos se sembraron 2.1×10^4 fibroblastos por pocillo. Tras administrar una dosis de 0.25 mM de H_2O_2 durante 60 min, se renovó el medio con 1 ml de medio de crecimiento suplementado con 5 mM de NAC y se determinó el efecto de este tratamiento sobre la proliferación celular mediante el recuento directo del número de células, transcurridas 24, 48 y 72 h tras la oxidación.



Efecto de la NAC sobre los niveles intracelulares de ROS en fibroblastos

Tras la siembra de 4×10^3 células/pocillo en placa de 96 pocillos, se añadió medio de cultivo combinado con 5 mM de NAC sobre los fibroblastos. Posteriormente, se administró la oxidación de 0.25 mM de H_2O_2 y se midió la evolución de los niveles de ROS (método referido en el apartado IV.1.3.3.) en una cinética con medidas puntuales cada 10 min.



Efecto de la NAC sobre los niveles intracelulares de GSH en fibroblastos

Se sembraron 4×10^3 células/pocillo en placa de 96 pocillos y se añadió la oxidación de 0.25 mM de H_2O_2 durante una hora. Posteriormente se realizó el tratamiento de los fibroblastos con medio de cultivo suplementado con NAC. Se realizaron medidas puntuales de GSH intracelular (método referido en el apartado IV.1.3.2.) a los 60, 180 y 240 min a partir del inicio de la oxidación.



IV.2.2.2 Efecto de la terapia celular mediante el co-cultivo con AMSCs

Para la realización del co-cultivo de AMSCs con fibroblastos, se utilizaron los insertos Transwell® (Corning Incorporated, New York, NY, EEUU), un soporte que posee una membrana de poliestireno de 0.4 μm de diámetro de poro, que posibilita el co-cultivo de células en diferentes superficies, permitiendo la difusión del medio de cultivo. En primer lugar, se sembraron 2.1×10^4 fibroblastos en 500 μl de medio de cultivo suplementado con 10% SBF por pocillo en placa de 24 pocillos. Transcurridas 24 h, se sembraron 7×10^3 AMSCs en los insertos Transwell®, los cuales fueron colocados en otra placa de 24 pocillos. A continuación, se añadieron 800 μl de medio de cultivo en los pocillos, 200 μl en los insertos y se permitió la aclimatación del cultivo de AMSCs en los insertos durante 2 h.

El tiempo 0 h determina el momento en el que comenzó la oxidación de los fibroblastos con una dosis de 0.25 mM de H_2O_2 , durante 60 min. Posteriormente, se renovó el medio con DMEM-GlutaMAX™-I libre de suero, compartido por ambos tipos celulares en co-cultivo durante la experimentación. Seguidamente, se procedió al emplazamiento de los insertos de AMSCs en la placa que contenía los fibroblastos y se realizó la evaluación del efecto modulador que éstas ejercen sobre los fibroblastos mediante la determinación de su proliferación, para lo cual se contabilizaron las células a las 24, 48 y 72 h tras la oxidación.



IV.2.2.3 Efecto del medio derivado de las AMSCs privadas de SBF

Para la obtención de AMSCs privadas de suero (AMSCs-SD) se sembraron 1.2×10^6 células/frasco de 75 cm^2 en 10 ml de medio de cultivo estándar, suplementado con 10% de SBF. Tras la adhesión celular, el cultivo fue sometido a privación de suero mediante la renovación del medio de cultivo, en ausencia de SBF. El cultivo se recogió 48 h después, despegando las células de la superficie del frasco con tripsina-EDTA y centrifugándolas a 500 g. Finalmente se procedió a la utilización de las células para el análisis correspondiente o bien se almacenaron a -80°C para su posterior utilización. El medio obtenido tras el cultivo de AMSCs-SD, es el denominado M_{SD} . El método de obtención del M_{SD} corresponde a unas proporciones de volumen de medio y superficie de cultivo de 8×10^4 AMSCs/ml y 1.6×10^4 AMSCs/cm² respectivamente.

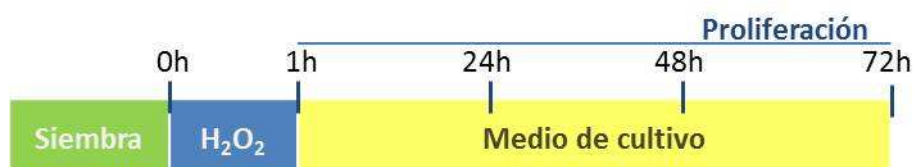
El M_{SD} se centrifugó a 500 g durante 5 min, y se esterilizó con un filtro de $0.22 \mu\text{m}$ (Sarstedt AG & Co.) para su utilización; el excedente se almacenó a -20°C .

Capacidad antioxidante total de las AMSCs-SD

Se sembraron 1.6×10^4 células/cm² en un frasco de 75 cm^2 y se realizó la determinación de la capacidad antioxidante celular total, según el método referido en el apartado IV.1.3.4.

Efecto de la oxidación sobre la proliferación de las AMSCs-SD

En una placa de 96 pocillos se sembraron 4×10^3 AMSCs-SD/pocillo y, una vez adheridas a la placa, se añadió la oxidación de 0.25 mM de H_2O_2 , durante 1 h. Se determinó la proliferación celular a las 24, 48 y 72 h, según el método descrito en el apartado IV.1.3.1.

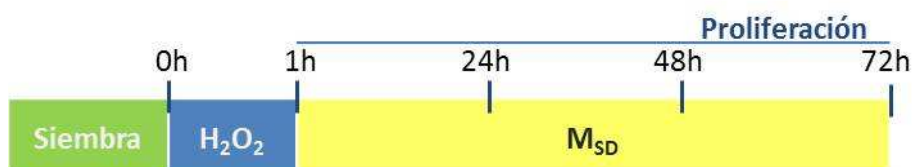


Capacidad antioxidante del M_{SD}

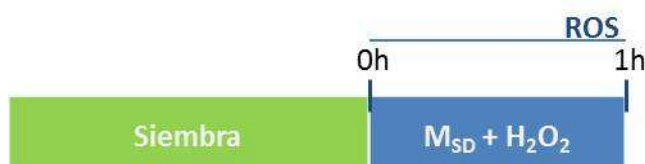
Una vez obtenido el medio tras 48 h de cultivo con AMSCs-SD, se midió su capacidad antioxidante (mmoles Eq. de Ácido Ascórbico), según el método referido en el apartado IV.1.3.4.

Efecto del M_{SD} sobre la proliferación de fibroblastos

En una placa de 96 pocillos se sembraron 4×10^3 fibroblastos/pocillo y, 16 h después, se añadió la oxidación de 0.25 mM de H_2O_2 , durante 60 min. Posteriormente, se renovó el medio con 100 μ l de M_{SD} y se determinó el efecto del tratamiento, mediante el método del MTT (referido en el apartado IV.1.3.1.) a las 24, 48 y 72 h.

*Efecto del M_{SD} sobre los niveles intracelulares de ROS en fibroblastos*

Se sembraron 4×10^3 células/pocillo en placa de 96 pocillos y se añadió el M_{SD} sobre los fibroblastos. Posteriormente, se administró la oxidación de 0.25 mM de H_2O_2 y se midió la evolución de los niveles de ROS (método referido en el apartado IV.1.3.3.) en una cinética con medidas puntuales cada 10 min, durante 1 h.



Efecto del M_{SD} sobre los niveles intracelulares de GSH en fibroblastos

Tras la siembra de 4×10^3 células/pocillo en placa de 96 pocillos se añadió la oxidación de 0.25 mM de H_2O_2 durante una hora y se procedió al tratamiento de los fibroblastos con M_{SD} . Se realizaron medidas puntuales de GSH intracelular (método referido en el apartado IV.1.3.2.) a los 60, 120 y 240 min a partir del inicio de la oxidación.



Efecto del M_{SD} sobre la capacidad antioxidante en fibroblastos

En un T75 se sembraron 1.2×10^6 fibroblastos y, una vez adheridos al frasco, se añadió la oxidación de 0.25 mM de H_2O_2 , durante 60 min. Posteriormente, se renovó el medio con 10 ml de M_{SD} y se determinó la capacidad antioxidante celular total a la hora y a las 6 h tras la oxidación, según el método referido en el apartado IV.1.3.4.



IV.2.2.4 Efecto de la adición de NAC a la terapia celular con AMSCs sobre la proliferación de fibroblastos oxidados

Efecto de la adición de NAC al co-cultivo con AMSCs

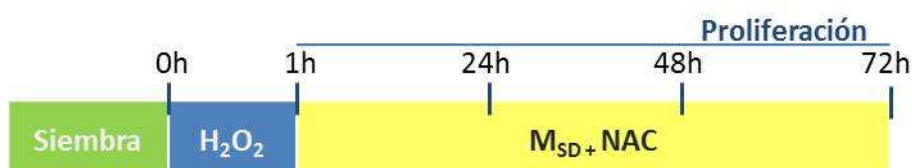
Se llevó a cabo un co-cultivo de fibroblastos con AMSCs, según lo descrito en el apartado IV.2.2.2., combinado con NAC. Tras administrar una dosis de H_2O_2 de 0.25 mM, durante 60 min, se renovó el medio con DMEM-GlutaMAX™-I libre de suero y

suplementado con 5 mM de NAC. Se contabilizaron las células a las 24, 48 y 72 h tras la oxidación.



Efecto de la adición de NAC al M_{SD}

Para determinar el efecto de la NAC combinada con el M_{SD} , se siguió el procedimiento experimental detallado en el apartado IV.2.2.3. Tras la oxidación celular con 0.25 mM de H_2O_2 , se añadió el M_{SD} combinado con 5 mM de NAC. Se evaluó su efecto sobre la proliferación celular a las 24, 48 y 72 h.



IV.2.2.5 Efecto del pre-acondicionamiento de las AMSCs con dosis bajas de H_2O_2 sobre fibroblastos oxidados

Se sembraron 1.05×10^6 AMSCs/ frasco T75 y, tras 4 h de adhesión, se procedió al proceso de pre-acondicionamiento. Dicho protocolo consiste en la exposición de las células a baja concentración de H_2O_2 (0.01 mM) durante 7 días, renovando el medio 2 veces durante el procedimiento. A dichas células, una vez pre-acondionadas, las denominamos AMSCs-P.

Para la obtención del medio derivado de las células pre-acondionadas, se sembraron las AMSCs-P a una densidad de 1.6×10^4 células/cm² en medio de crecimiento suplementado con 10% de SBF y, tras su adhesión, se sustituyó el medio de siembra por medio libre de SBF. Transcurridas 48 h se obtuvo el medio de cultivo de las AMSCs-P al

IV. Material y métodos

que denominamos MP_{SD} . El método de obtención del MP_{SD} guarda las mismas proporciones de volumen de medio y superficie de cultivo que el del M_{SD} .

Al igual que en el caso anterior, el MP_{SD} se centrifugó a 500 g durante 5 min, y se esterilizó con un filtro de 0.22 μm . Finalmente, se procedió a su utilización o bien se almacenó a -20°C .

Capacidad antioxidante total de las AMSCs-P

Se sembraron 1.6×10^4 células/ cm^2 en un frasco de 75 cm^2 y se realizó la determinación de la capacidad antioxidante celular total, según el método referido en el apartado IV.1.3.4.

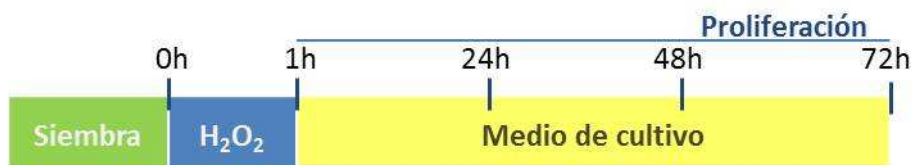
Niveles de expresión génica de las AMSCs-P

Tras la siembra de 1.6×10^4 células/ cm^2 en un frasco de 75 cm^2 se añadió la oxidación de 0.25 mM de H_2O_2 durante 1 h y se analizaron los niveles de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la inflamación en las AMSCs-P obtenidas 1 y 3 h tras el inicio de la oxidación, según el método descrito en el apartado IV.1.3.6.



Efecto de la oxidación sobre la proliferación de las AMSCs-P

En una placa de 96 pocillos se sembraron 4×10^3 AMSCs-P/pocillo y, una vez adheridas a la placa, se añadió la oxidación de 0.25 mM de H_2O_2 , durante 1 h. Se determinó la proliferación celular a las 24, 48 y 72 h, según el método descrito en el apartado IV.1.3.1.

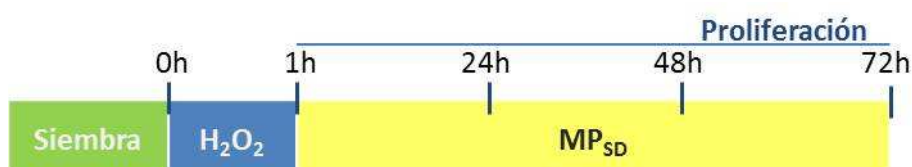


Capacidad antioxidante del MP_{SD}

Una vez obtenido el medio tras 48 h de cultivo con AMSCs-P, se midió su capacidad antioxidante (mmoles Eq. de Ácido Ascórbico), según el método referido en el apartado IV.1.3.4.

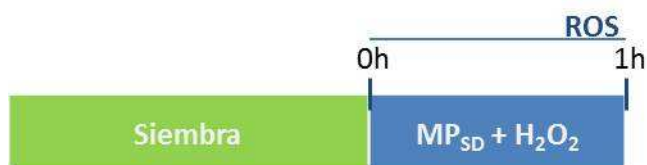
Efecto del MP_{SD} sobre la proliferación de fibroblastos

En una placa de 96 pocillos se sembraron 4×10^3 fibroblastos/pocillo y, 16 h después, se añadió la oxidación de 0.25 mM de H₂O₂, durante 60 min. Posteriormente, se renovó el medio con 100 µl de MP_{SD} y se determinó el efecto del tratamiento sobre la proliferación, mediante el método del MTT (referido en el apartado IV.1.3.1.) a las 24, 48 y 72 h.



Efecto del MP_{SD} sobre los niveles intracelulares de ROS en fibroblastos

Se sembraron 4×10^3 células/pocillo en placa de 96 pocillos y se añadió el MP_{SD} sobre los fibroblastos. Posteriormente, se administró la oxidación de 0.25 mM de H₂O₂ y se midió la evolución de los niveles de ROS (método referido en el apartado IV.1.3.3.) en una cinética con medidas puntuales cada 10 min.



Efecto del MP_{SD} sobre los niveles intracelulares de GSH en fibroblastos

Tras la siembra de 4×10^3 células/pocillo en placa de 96 pocillos, se añadió la oxidación de 0.25 mM de H₂O₂ durante una hora y se procedió al tratamiento de los fibroblastos con MP_{SD}. Se realizaron medidas puntuales de GSH intracelular (método referido en el apartado IV.1.3.2.) a los 60, 120 y 240 min a partir del inicio de la oxidación.



Efecto del MP_{SD} sobre la capacidad antioxidante en fibroblastos

En un T75 se sembraron 1.2×10^6 fibroblastos y, una vez adheridos al frasco, se añadió la oxidación de 0.25 mM de H₂O₂, durante 60 min. Posteriormente, se renovó el medio con 10 ml de MP_{SD} y se determinó la capacidad antioxidante celular total a la hora y a las 6 h tras la oxidación, según el método referido en el apartado IV.1.3.4.



IV.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los ensayos se realizaron con un mínimo de tres réplicas y en un número, al menos, de tres experiencias con diferentes cultivos celulares y muestras biológicas.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa GraphPad Prism-v4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU). Los estadísticos utilizados para la significación fueron la *t-Student* y el análisis de varianzas (ANOVA) dependiendo del caso.

Media aritmética y desviación estándar

La *media aritmética* (\bar{x}) es el valor característico de una serie de datos cuantitativos, obtenido de la suma de todos los valores observados (x_i) dividido entre el número de observaciones (N).

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

La *desviación estándar* (DE) es un indicador de la dispersión de variables que se expresa como la raíz cuadrada de la *varianza* (S^2), la cual se obtiene del promedio de los cuadrados de las desviaciones de cada valor con respecto a su media, por lo tanto:

$$DE = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

Análisis de la prueba t-Student

El *Test-t* es una prueba analítica utilizada para la comparación de medias de dos categorías cuantitativas dentro de una variable dependiente o las medias de dos grupos diferentes. Es una prueba paramétrica, es decir, sirve para comparar variables numéricas de distribución normal.

La prueba *t Student* establece el valor estadístico *t*, según el cual corresponderá un valor de significación estadística determinado.

Análisis de la varianza (ANOVA)

El ANOVA es un análisis estadístico que permite la comparación entre grupos a través de la S^2 de la variable numérica en cada grupo de la variable categórica x . El objetivo es comprobar si las diferencias entre las \bar{X} de distintos grupos son significativas.

La cifra estadística obtenida con el ANOVA es la razón F de Snedecor, determinada según la siguiente relación:

$$F = S_E^2 / S_D^2 \rightarrow F_{t-1, N-t}$$

Donde $S_E^2 = \sum_{i=1}^t n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2 / t-1$

$$y S_D^2 = \sum (x_{ij} - \bar{X}_i)^2 / N - t$$

Así, para un nivel de significación α , si $F \rightarrow F_{t-1, N-t}$ las medias de los grupos no son iguales, indicando, por lo tanto, que existen diferencias significativas entre los niveles.

Nivel de significación

Los resultados de un experimento requieren un tratamiento estadístico que permita orientar acerca de si la hipótesis de investigación debe ser rechazada o no, para lo cual se deberá establecer convencionalmente un determinado nivel de significación que permita diferenciar resultados estadísticamente significativos de aquellos que no lo son.

El *nivel de confianza* utilizado en los experimentos es del 95%, es decir, las valoraciones son estadísticamente significativas cuando la probabilidad (p) debida al azar es menor que 0.05 ($p < 0.05$).

V. RESULTADOS

V.1. EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE FIBROBLASTOS

Los fibroblastos, las células más ubicuas del tejido conjuntivo, desempeñan la función de síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular, imprescindible para garantizar la integridad de dicho tejido.

El estrés oxidativo, consecuencia del desequilibrio entre los ROS y los sistemas antioxidantes celulares –desequilibrio redox–, puede provocar daños en los componentes celulares (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) que impiden la correcta funcionalidad de la célula.

Para determinar las consecuencias del desequilibrio redox sobre los fibroblastos, éstos se expusieron a diferentes concentraciones de H_2O_2 y se evaluó el efecto de este agente antioxidante sobre los siguientes parámetros biológicos: morfología, viabilidad celular, niveles intracelulares de ROS, niveles intracelulares de GSH, apoptosis y expresión de genes vinculados con la inflamación.

V.1.1 Efecto sobre la morfología celular

Los fibroblastos muestran una buena adhesión a la superficie de cultivo y adquieren una morfología fusiforme. Como se observa en la figura 8, la oxidación (0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 mM de H_2O_2) reduce la población celular de una manera dosis y tiempo dependiente, e induce cambios morfológicos, más acusados con las concentraciones altas, destacando la pérdida del fenotipo fusiforme y un aumento del diámetro celular.

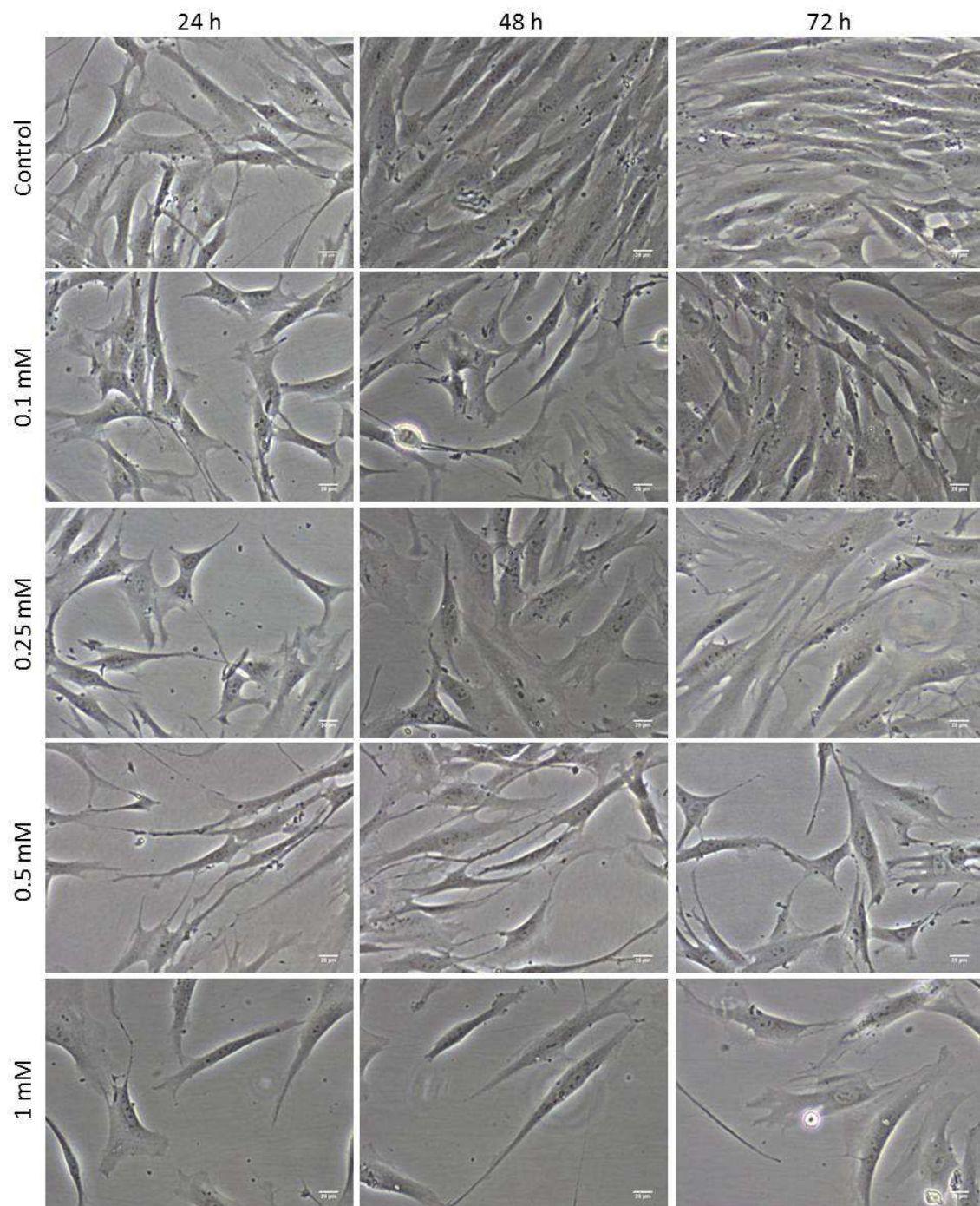


Figura 8. Imágenes de microscopía de contraste de fases de fibroblastos control y sometidos a diferentes concentraciones de H₂O₂ obtenidas a las 24, 48 y 72 h post-oxidación (100x).

V.1.2 Efecto sobre la viabilidad celular

La exposición de los fibroblastos a H_2O_2 (0.1 – 1.5 mM, durante 60 min) redujo la viabilidad celular de forma dosis dependiente. Si bien la dosis baja (0.1 mM) dio lugar a una disminución no significativa de la viabilidad celular a las 24 h, la exposición a una concentración moderada (0.25 mM) redujo la población celular 1.4 veces respecto al control ($p < 0.001$), siendo dicha reducción de 1.6, 2.4 y 4.5 veces con las concentraciones más elevadas de 0.5 mM, 1.0 mM y 1.5 mM de H_2O_2 respectivamente ($p < 0.001$; figura 9A).

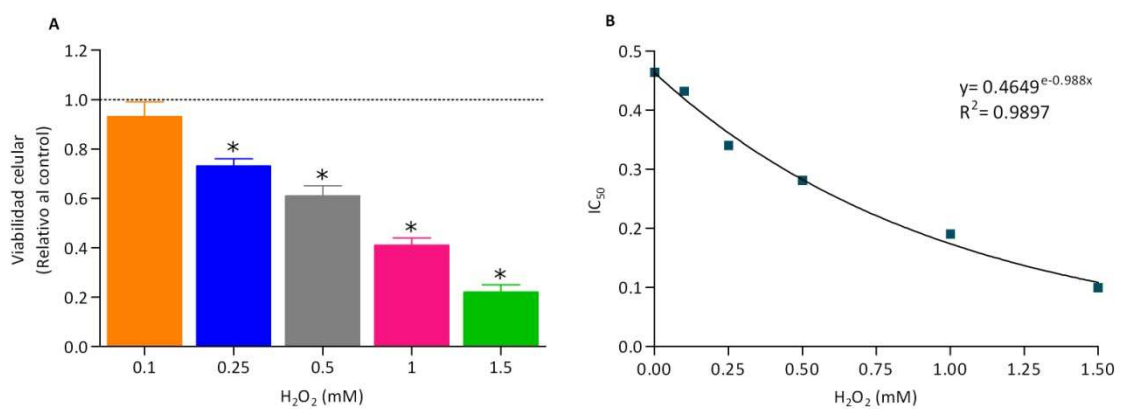


Figura 9. Viabilidad celular de los fibroblastos sometidos a concentraciones crecientes de H_2O_2 . (A) Valores de viabilidad celular relativos al control (---) a las 24 h tras la exposición al H_2O_2 . (B) Curva dosis respuesta para el cálculo de IC_{50} . * ($p < 0.001$).

A partir de los resultados obtenidos se calculó la IC_{50} , cuyo valor corresponde a 0.7 mM de H_2O_2 (Figura 9B).

V.1.3 Efecto sobre los niveles intracelulares de ROS

Se llevó a cabo una cinética de los niveles de ROS durante una hora tras la exposición al H_2O_2 . Como muestra la figura 10, la oxidación aumentó de forma dosis-dependiente los niveles intracelulares de ROS. Así, las determinaciones realizadas a los 30 y 60 min, permitieron observar un incremento de los niveles de ROS con respecto al

control de 15 y 13 veces, respectivamente, con la concentración más baja (0.1 mM; $p < 0.001$), siendo de 182 y 252 veces, respectivamente, con la concentración de 1.5 mM de H_2O_2 ($p < 0.001$).

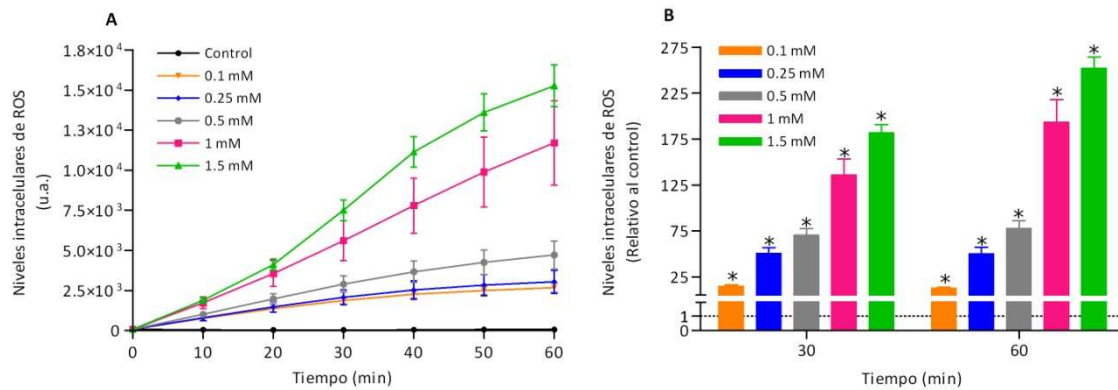


Figura 10. Niveles intracelulares de ROS de fibroblastos sometidos a dosis crecientes de H_2O_2 . (A) Valores de ROS, en UA de fluorescencia, obtenidos cada 10 min durante 1 h. (B) Valores de ROS relativizados al control (---), a los 30 y 60 min. *($p < 0.001$).

V.1.4 Efecto sobre los niveles intracelulares de GSH

El GSH es uno de los sistemas antioxidantes celulares más eficaces para eliminar el daño celular producido por el desequilibrio redox.

Se evaluó el efecto del H_2O_2 sobre los niveles intracelulares de GSH a diferentes intervalos de tiempo durante 4 h tras la aplicación de dosis crecientes de H_2O_2 (0.1 – 1.5 mM, durante una hora). La figura 11 muestra un descenso significativo de los niveles intracelulares de GSH a los 30 min en las células oxidadas respecto al control, descenso mantenido hasta las 4 h ($p < 0.001$). Sin embargo, al contrario de lo observado anteriormente en la viabilidad celular y en los niveles de ROS, se produjo una disminución similar de los niveles de GSH, tanto con las concentraciones bajas y moderadas del oxidante (0.1 y 0.25 mM), como con las altas (0.5, 1.0 y 1.5 mM); así, respecto al control, la reducción a los 60 min fue del 27, 36, 37, 36 y 35% respectivamente ($p < 0.001$).

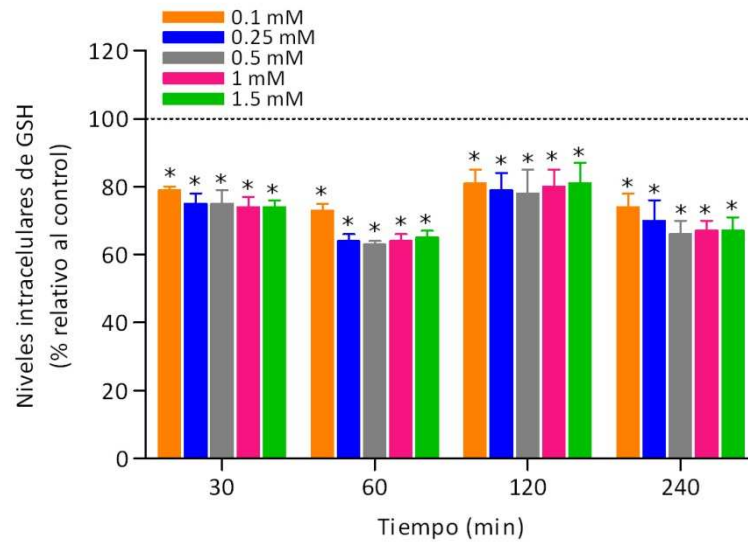


Figura 11. Niveles intracelulares de GSH en fibroblastos (expresados en porcentaje con respecto al control; ---), determinados durante las 4 h tras la exposición a concentraciones crecientes de H₂O₂. *(p<0.001).

A partir de estos resultados, para el resto de las pruebas experimentales se decidió limitar el rango de oxidación a dos concentraciones de H₂O₂, una moderada (0.25 mM) y otra alta (1.0 mM), durante un tiempo de exposición de una hora.

La determinación de la *concentración moderada* se estableció según los siguientes criterios:

- Induce una mortalidad celular inferior al 50% de la población.
- Permite una proliferación celular a largo plazo.
- Representa el nivel de oxidación detectado en procesos inflamatorios, según recoge la literatura científica (Jain y cols., 2000; Roy y cols., 2006).

La *concentración elevada* se utilizó para obtener el máximo efecto del estrés oxidativo en posteriores determinaciones (proliferación celular, apoptosis y expresión génica).

V.1.5 Efecto sobre la proliferación celular

La figura 12 muestra que la dosis elevada (1.0 mM de H_2O_2) provoca una reducción de la proliferación celular de 3.3 veces respecto al control a las 72 h ($p < 0.001$), dando lugar a una curva de proliferación plana; sin embargo, con la dosis moderada (0.25 mM) dicha reducción es de 1.4 veces ($p < 0.001$), obteniéndose una curva de proliferación celular semejante a la del control.

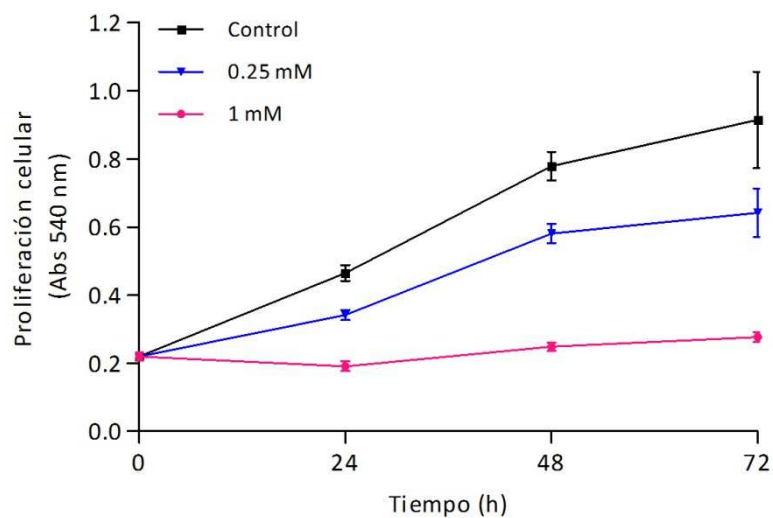


Figura 12. Curva de proliferación de fibroblastos control y oxidados con la dosis moderada (0.25 mM) y la dosis alta (1.0 mM) de H_2O_2 .

V.1.6 Efecto sobre el porcentaje de apoptosis

El porcentaje de apoptosis se determinó a las 3 y 24 h tras la exposición de los fibroblastos a la oxidación. Como se observa en la figura 13, mientras que a las 3 h no se produjeron cambios significativos, a las 24 h se observó un aumento dosis-dependiente del porcentaje de apoptosis, siendo 2.7 y 5.6 veces superior al control con las concentraciones de 0.25 mM y 1.0 mM de H_2O_2 , respectivamente ($p < 0.05$).

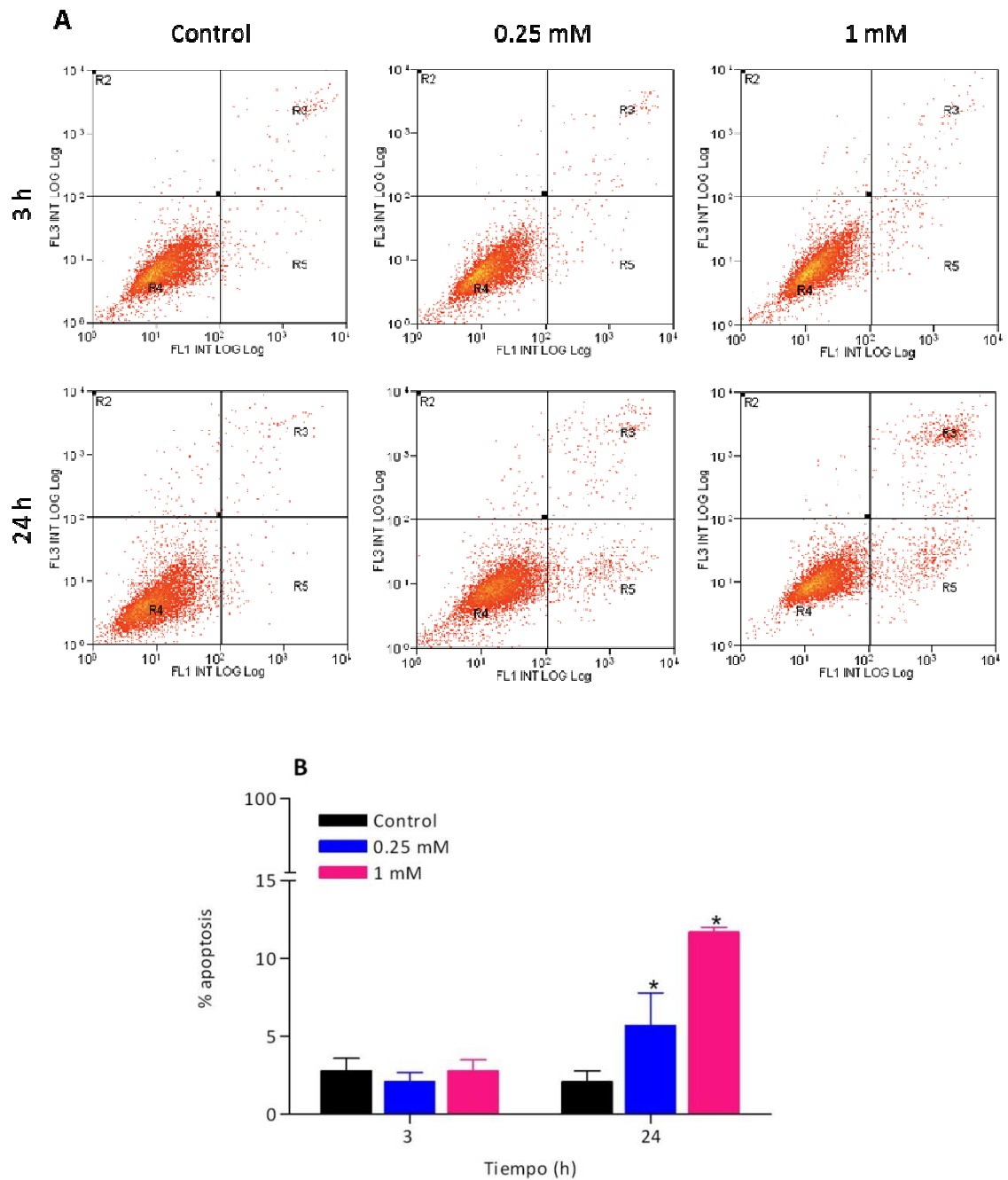


Figura 13. Efecto de la oxidación con 0.25 y 1.0 mM de H_2O_2 sobre el porcentaje de apoptosis de los fibroblastos a las 3 y 24 h. (A) Citometría de flujo; histogramas biparamétricos (Alexa-IP) divididos en cuadrantes que incluyen respectivamente: (R4) células vivas; (R5) apoptosis primaria; (R3) apoptosis avanzada y (R2) necrosis. (B) Representación gráfica del porcentaje de apoptosis (primaria y avanzada). *($p < 0.05$).

V.1.7 Efecto sobre la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo

La expresión génica de COX-2, NF- κ B, IGF-1, IL-1 β , TGF- β 1 y TNF- α se analizó mediante RT-qPCR, transcurridas 1 y 3 h de la exposición al H₂O₂.

En relación a las modificaciones de la expresión de COX-2 y NF- κ B, mientras la concentración moderada indujo un incremento significativo ($p < 0.05$) de ambos genes a las 3 h, a dicho tiempo la concentración de 1.0 mM produjo una represión de COX-2 ($p < 0.05$), sin inducir modificaciones significativas en NF- κ B (Figura 14).

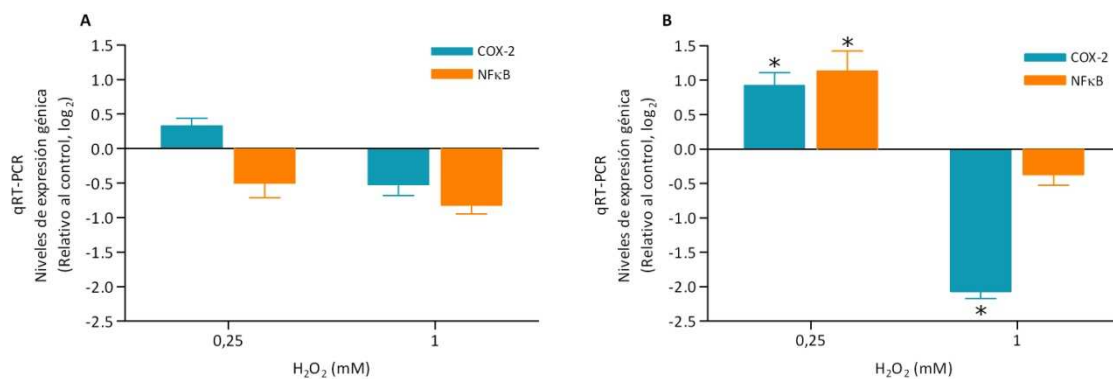


Figura 14. Niveles de expresión relativos al control (Log_2) de los genes COX-2 y NF- κ B tras (A) 1 h y (B) 3 h de la exposición de los fibroblastos a 0.25 mM y 1.0 mM de H₂O₂. * ($p < 0.05$).

El resto de genes analizados, IGF-1, IL-1 β , TGF- β 1 y TNF- α , mostraron diferentes niveles de expresión, en función de la concentración de H₂O₂ y del tiempo analizado.

En primer lugar, se produjo un incremento significativo de la expresión de TNF- α de forma dosis-dependiente ($p < 0.05$), que fue más evidente a las 3 h. Sin embargo, ambas concentraciones de H₂O₂ redujeron la expresión de IL-1 β a la hora ($p < 0.05$), que fue seguida de un incremento significativo a las 3 h ($p < 0.05$). En relación al TGF- β 1, se observó un incremento dosis-dependiente significativo a la hora ($p < 0.05$), expresión que sólo permaneció aumentada a las 3 h en el caso de la concentración moderada. Finalmente, las modificaciones significativas en la expresión de IGF-1 sólo se produjeron

con la concentración más alta, observándose un incremento a la hora, seguido de una disminución de la expresión a las 3 h ($p < 0.05$; figura 15).

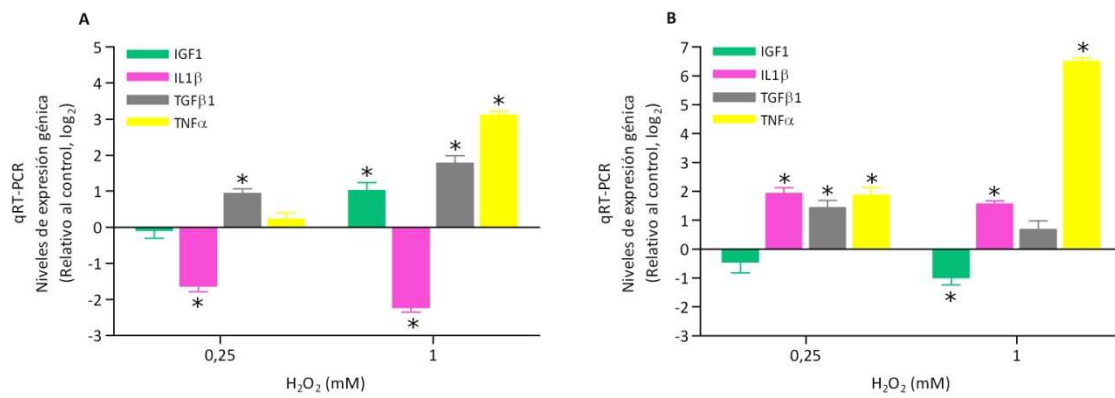


Figura 15. Niveles de expresión relativos al control (Log_2) de los genes IGF-1, IL-1 β , TGF- β 1 y TNF- α tras (A) 1 h y (B) 3 h de la exposición de los fibroblastos a 0.25 mM y 1.0 mM de H₂O₂. * ($p < 0.05$).

V.2. EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE AMSCs

Al igual que con los fibroblastos, se llevó a cabo un análisis de la respuesta de las AMSCs al estrés oxidativo evaluando el efecto de la exposición al H₂O₂ sobre morfología, viabilidad celular, niveles intracelulares de ROS, niveles intracelulares de GSH, apoptosis y expresión de genes vinculados con la inflamación.

V.2.1 Efecto sobre la morfología celular

Las AMSCs poseen una morfología fibroblastoide y un carácter adherente, creciendo en monocapa en la superficie del soporte de cultivo. La oxidación con H₂O₂ (0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 mM) produjo una disminución del número de células de forma dosis y tiempo dependiente y provocó cambios morfológicos como la aparición de fibras de estrés, un aumento del tamaño celular y, en el caso de las concentraciones más elevadas, la aparición de prolongaciones citoplasmáticas de mayor tamaño (figura 16).

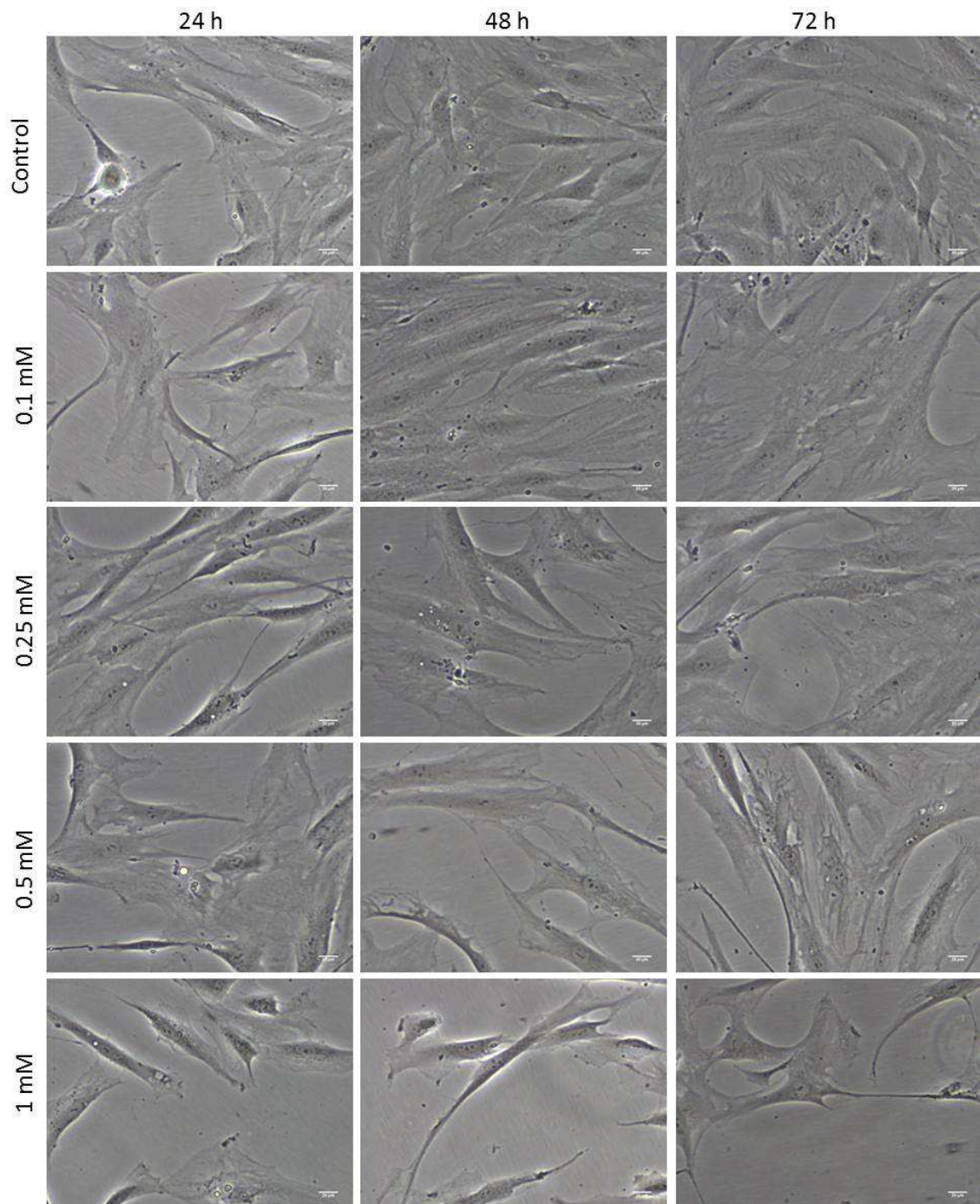


Figura 16. Imágenes de microscopía de contraste de fases de AMSCs control y sometidas a diferentes concentraciones de H_2O_2 obtenidas a las 24, 48 y 72 h post-oxidación (100x).

V.2.2 Efecto sobre la viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad celular 24 h después de la exposición del cultivo al oxidante. Como muestra la figura 17, el H₂O₂ produjo un descenso dosis-dependiente de la viabilidad celular. Si bien la menor concentración de oxidante no ocasionó cambios significativos, las concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 mM produjeron un descenso de la viabilidad de 1.3, 1.6, 1.7 y 2.9 veces respecto al control ($p < 0.001$).

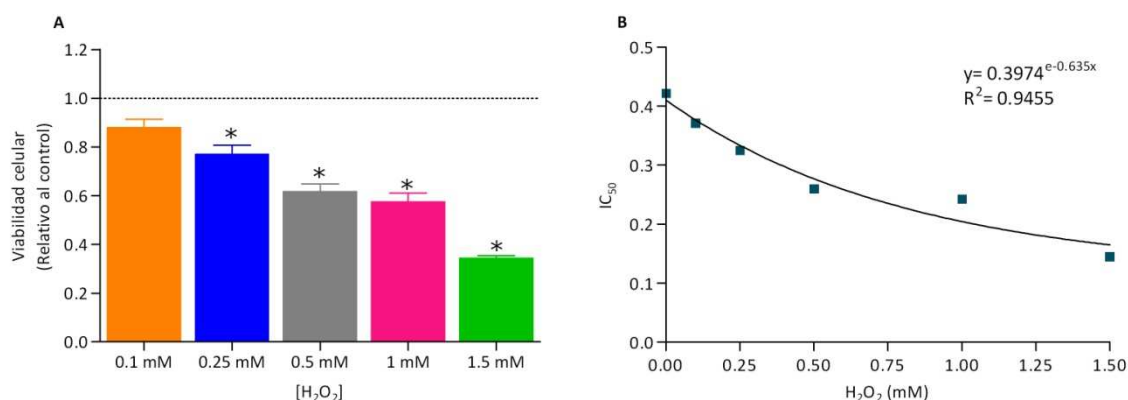


Figura 17. Viabilidad celular de las AMSCs sometidas a concentraciones crecientes de H₂O₂. (A) Valores de viabilidad celular relativos al control (---) a las 24 h tras la exposición al H₂O₂. (B) Curva dosis respuesta para el cálculo de IC₅₀. *($p < 0.001$).

A partir de los resultados obtenidos se calculó la IC₅₀, cuyo valor corresponde a 0.98 mM de H₂O₂.

V.2.3 Efecto sobre los niveles intracelulares de ROS

La oxidación aumentó de forma dosis-dependiente los niveles intracelulares de ROS a partir de la concentración moderada de H₂O₂. Así, mientras la concentración más baja (0.1 mM) no provocó cambios significativos respecto al control, la dosis de 0.25 mM aumentó 9.2 veces los niveles de ROS, tanto a los 30 como a los 60 min ($p < 0.001$), siendo este incremento de 25.3 y 29.7 veces, respectivamente ($p < 0.001$), con la máxima concentración (1.5 mM; figura 18).

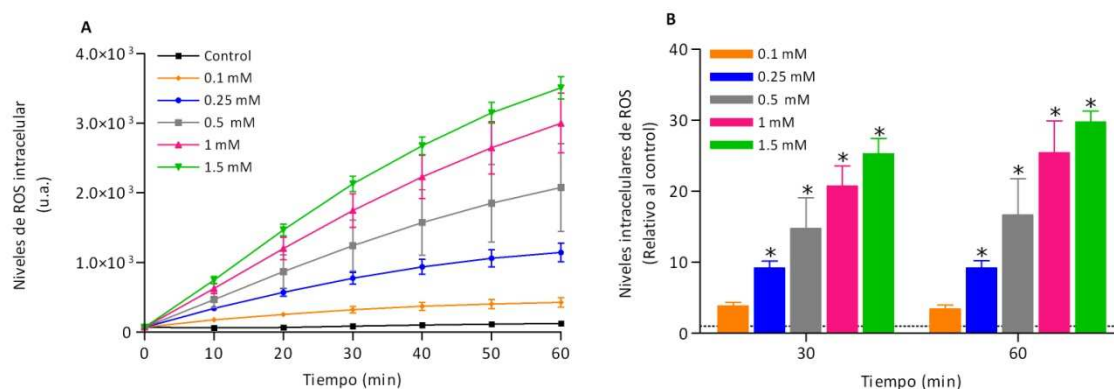


Figura 18. Niveles intracelulares de ROS de AMSCs sometidas a dosis crecientes de H_2O_2 . (A) Valores de ROS, en UA de fluorescencia, obtenidos cada 10 min durante 1 h. (B) Valores de ROS relativizados al control (---), a los 30 y 60 min. *($p < 0.001$).

V.2.4 Efecto sobre los niveles intracelulares de GSH

Como se observa en la figura 19, todas las concentraciones de H_2O_2 ensayadas dieron lugar a una disminución significativa de los niveles intracelulares de GSH. Existe, sin embargo, una diferencia notable entre la reducción inducida por la concentración de 0.1 mM (reducción del 13% a los 60 min) y el resto de las concentraciones, entre las cuales no existen diferencias significativas (26% de reducción a los 60 min). Estas diferencias entre dichas concentraciones se mantuvieron a los 240 min (16, 30, 33, 33 y 35% con las concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 mM de H_2O_2 , respectivamente).

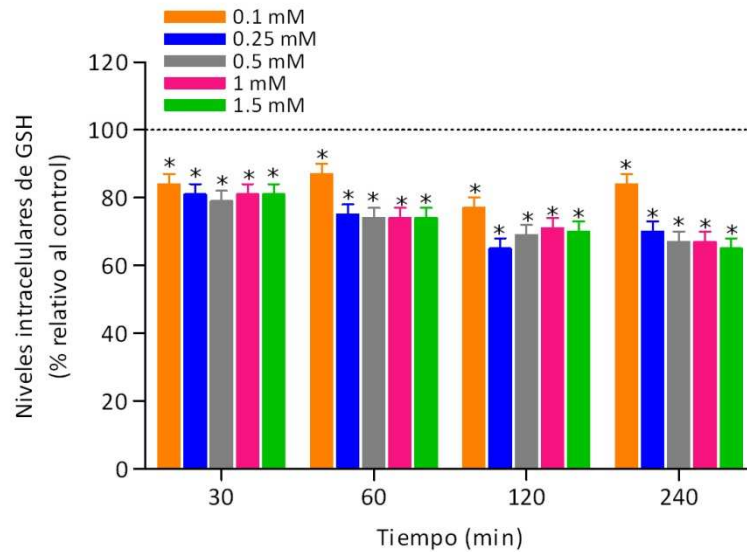


Figura 19. Niveles intracelulares de GSH en AMSCs (expresados en porcentaje con respecto al control; ---), determinados durante las 4 h tras la exposición a concentraciones crecientes de H₂O₂. *(p<0.001).

Al igual que en el caso de los fibroblastos, para el resto de las pruebas experimentales se decidió limitar el rango de oxidación a dos concentraciones de H₂O₂, una moderada (0.25 mM) y otra alta (1.0 mM), mantenida durante un tiempo de exposición de una hora.

V.2.5 Efecto sobre la proliferación celular

La figura 20 muestra que la dosis elevada (1.0 mM de H₂O₂) redujo la proliferación celular 3.8 veces respecto al control a las 72 h (p<0.001), siendo 1.5 veces la disminución en la proliferación inducida por la dosis moderada (0.25 mM; p<0.001).

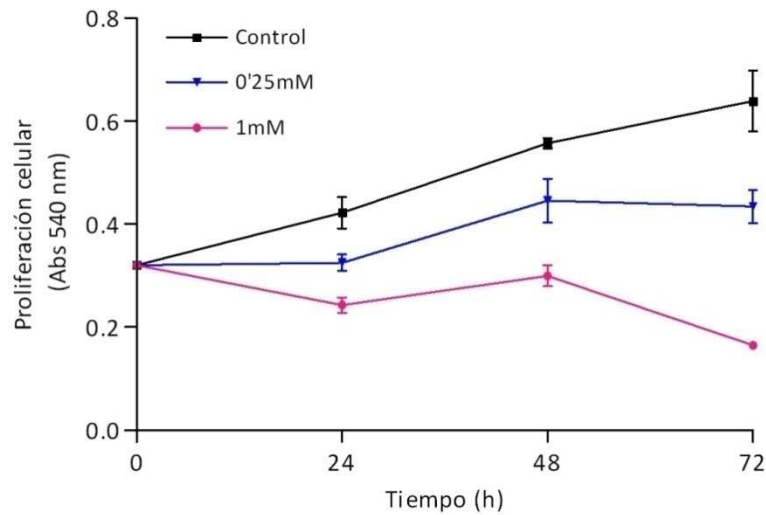


Figura 20. Proliferación de AMSCs oxidadas con la dosis moderada (0.25 mM) y la dosis alta (1.0 mM) de H_2O_2 , a las 24, 48 y 72 h.

V.2.6 Efecto sobre el porcentaje de apoptosis

Como muestra la figura 21, a las 3 h de la exposición al oxidante, sólo la concentración alta produjo un aumento de la apoptosis respecto al control ($2.9\% \pm 0.28$ vs. $1.0\% \pm 0.16$; $p < 0.05$). Sin embargo, a las 24 h dicho incremento en el porcentaje de apoptosis se produjo con ambas concentraciones de 0.25 mM y 1.0 mM de H_2O_2 , siendo de 1.3 y 2.0 veces superior al control, respectivamente ($p < 0.05$).

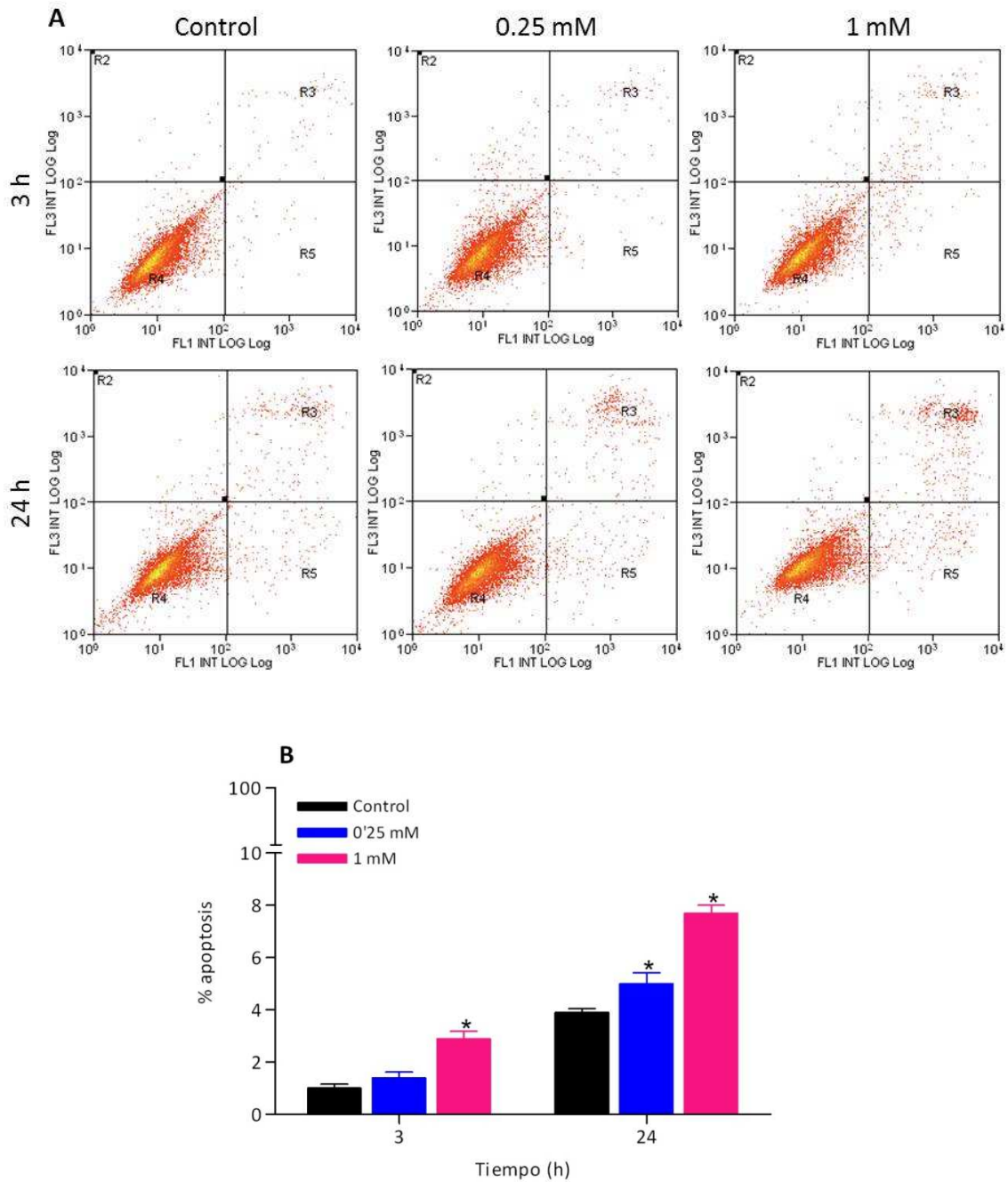


Figura 21. Efecto de la oxidación con 0.25 y 1.0 mM de H_2O_2 sobre el porcentaje de apoptosis de las AMSCs a las 3 y 24 h. (A) Citometría de flujo; histogramas biparamétricos (Alexa-IP) divididos en cuadrantes que incluyen respectivamente: (R4) células vivas; (R5) apoptosis primaria; (R3) apoptosis avanzada y (R2) necrosis. (B) Representación gráfica del porcentaje de apoptosis (primaria y avanzada). *($p < 0.05$).

V.2.7 Efecto sobre la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo

La exposición de las AMSCs al H₂O₂ no modificó la expresión de NF-κB. Por el contrario, la expresión de COX-2 aumentó de forma significativa ($p < 0.05$) a las 3 h de la exposición a las concentraciones moderada y alta de H₂O₂, siendo dicho incremento superior con la concentración de 0.25 mM (Figura 22).

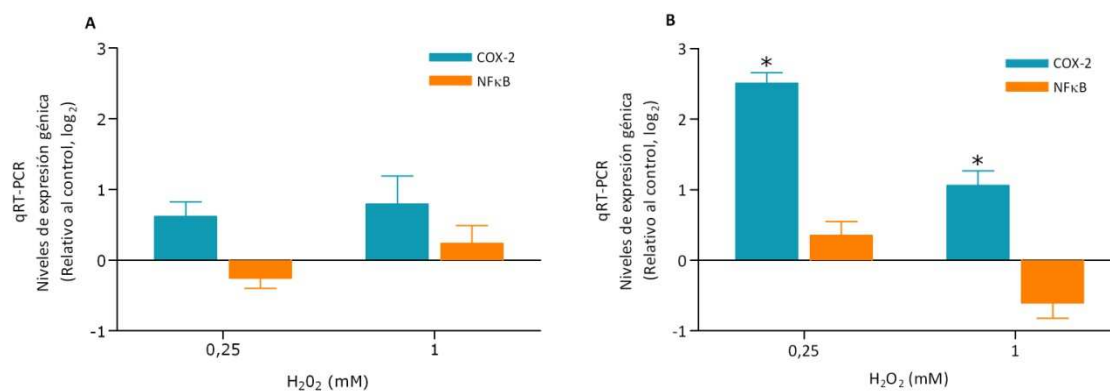


Figura 22. Niveles de expresión relativos al control (Log₂) de los genes COX-2 y NF-κB tras (A) 1 h y (B) 3 h de la exposición de las AMSCs a 0.25 mM y 1.0 mM de H₂O₂. *($p < 0.05$).

Al igual que en el caso de los fibroblastos, el resto de genes analizados mostraron diferentes niveles de expresión, en función de la concentración de H₂O₂ y del tiempo analizado. En primer lugar, la expresión de TNF-α sólo se vio incrementada (tanto a la hora como a las 3 h) con la concentración alta de H₂O₂. Sin embargo, ambas concentraciones de H₂O₂ incrementaron significativamente la expresión de IGF-1 e IL-1β en ambos tiempos analizados. Finalmente, la expresión de TGF-β1 no se vio modificada en ningún caso (figura 23).

V. Resultados

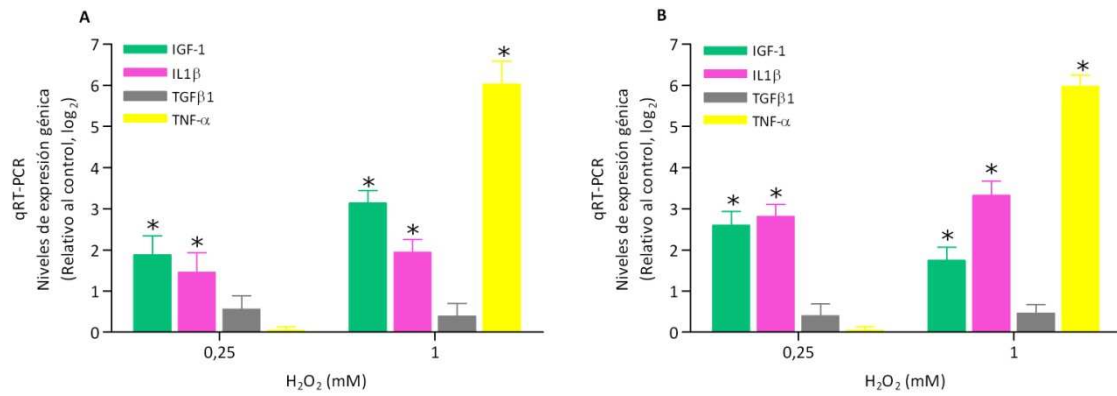


Figura 23. Niveles de expresión relativos al control (Log₂) de los genes IGF-1, IL-1β, TGF-β1 y TNF-α tras (A) 1 h y (B) 3 h de la exposición de las AMSCs a 0.25 mM y 1.0 mM de H₂O₂. *(p<0.05).

V.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA RESPUESTA DE LOS FIBROBLASTOS Y LAS AMSCs FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO

Una vez analizada, de forma individual, la respuesta de los fibroblastos y las AMSCs a diferentes concentraciones de H₂O₂, en este apartado se compara la respuesta de ambos tipos celulares a la oxidación con 0.25 y 1.0 mM de H₂O₂, tomando en consideración los mismos parámetros biológicos estudiados previamente.

En general, se puede indicar que las AMSCs tienen una mayor capacidad de respuesta que los fibroblastos al estrés oxidativo. De hecho, la IC₅₀ de las AMSCs es un 40% mayor a la de los fibroblastos.

Tras la exposición al H₂O₂, el incremento de los niveles intracelulares de ROS en los fibroblastos es muy superior a los de las AMSCs (5.5 y 7.6 veces con las concentraciones de 0.25 y 1.0 mM de H₂O₂, respectivamente; p<0.01; figura 24A), lo cual se correlaciona con un mayor nivel intracelular de GSH en las AMSCs (incremento del 17% y 15% respecto a los niveles de los fibroblastos a la hora; p<0.01; figura 24B).

A pesar de estas variaciones, no se observan diferencias significativas entre ambas poblaciones celulares en el porcentaje de apoptosis, ni en la proliferación celular, con la concentración moderada de H₂O₂. Sin embargo, las AMSCs mostraron una mayor resistencia ante la exposición a la concentración alta de H₂O₂, observándose una disminución del 35% de células apoptóticas (figura 24C; p<0.001) y un incremento de 1.4 veces en la viabilidad celular respecto a los fibroblastos (figura 24D; p<0.01).

V. Resultados

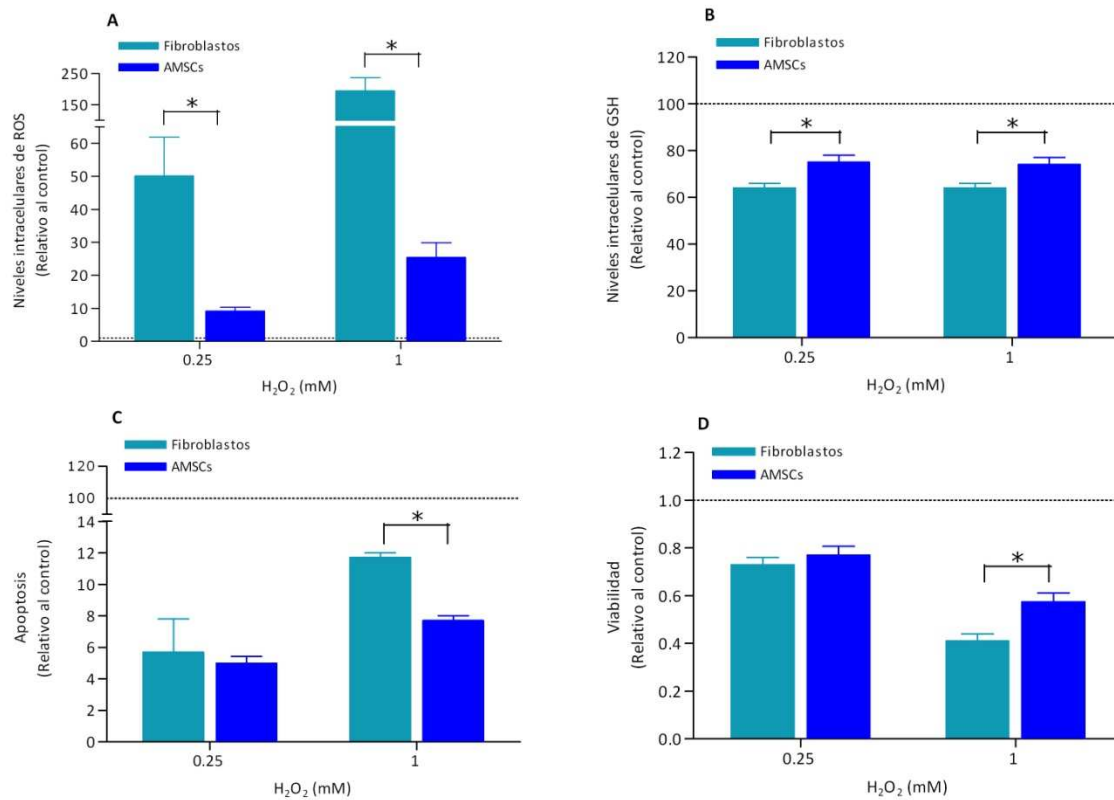


Figura 24. Comparación de la respuesta al estrés oxidativo (0.25 y 1.0 mM de H₂O₂) entre los fibroblastos y las AMSCs. (A) Niveles intracelulares de ROS *($p < 0.01$); (B) niveles intracelulares de GSH *($p < 0.01$); (C) apoptosis *($p < 0.001$) y (D) viabilidad celular *($p < 0.01$). Control (---).

Respecto a las modificaciones en la expresión génica, como se observa en la figura 25, en comparación con los fibroblastos, aumentaron los niveles de expresión de COX-2, IGF-1 e IL-1 β ($p < 0.05$) y se redujeron los niveles de expresión de NF- κ B, TGF- β 1 y TNF- α en AMSCs ($p < 0.05$). De hecho, con la concentración moderada de H₂O₂, mientras en las AMSCs estos tres últimos genes están reprimidos, en los fibroblastos existe un incremento significativo en la expresión de todos ellos.

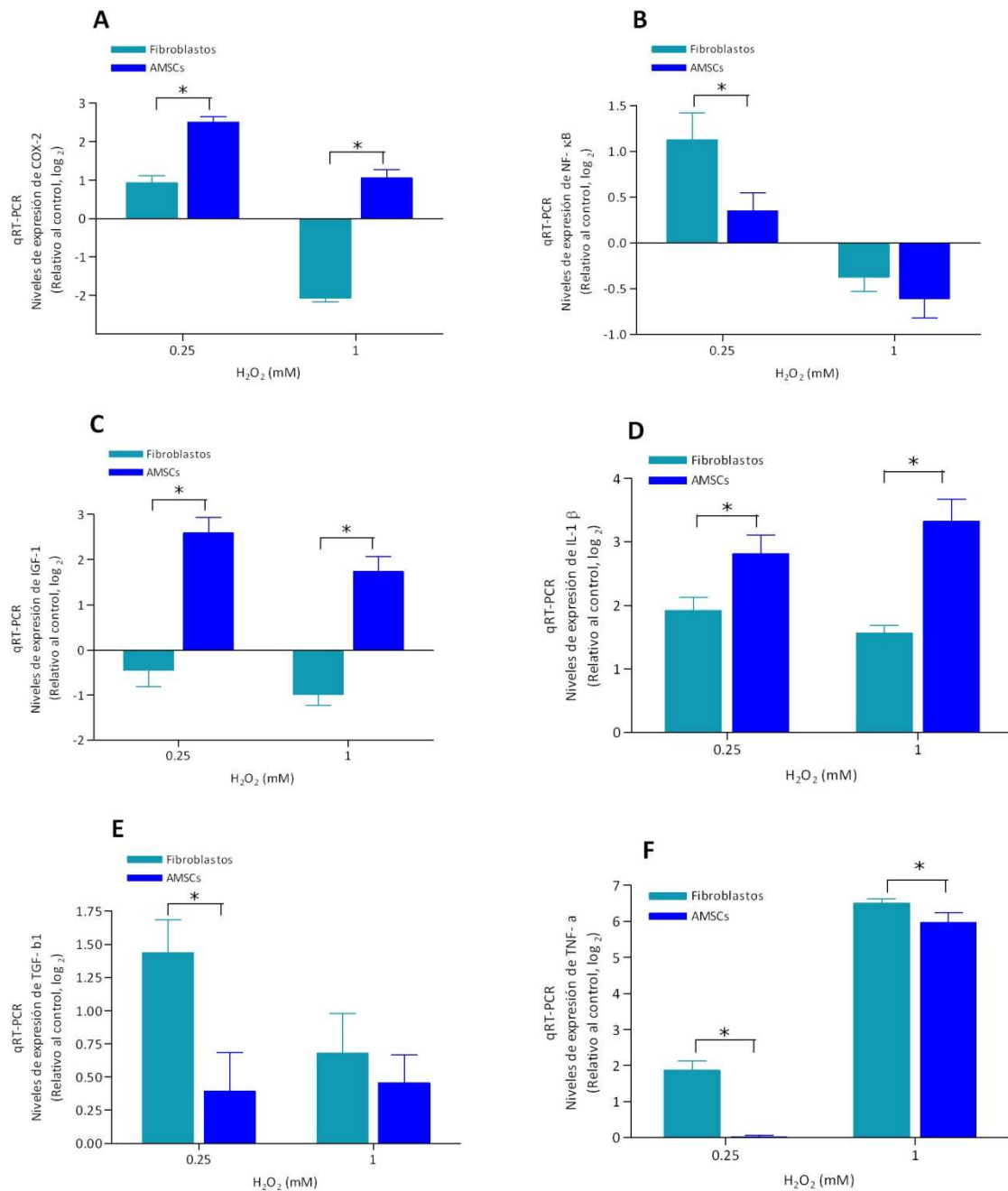


Figura 25. Comparación de las modificaciones de los niveles de expresión génica en respuesta al estrés oxidativo (0.25 y 1.0 mM de H₂O₂) entre los fibroblastos y las AMSCs. Niveles de expresión de (A) COX-2; (B) NF-κB; (C) IGF-1; (D) IL-1β; (E) TGF-β1 y (F) TNF-α. *(p<0.05).

A partir de este punto, para el resto del estudio se utilizó la dosis moderada 0.25 mM de H₂O₂, ya que es la concentración que más se asemeja a las situaciones de estrés oxidativo que se producen en los procesos inflamatorios.

V.4. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA TERAPIA FARMACOLÓGICA ANTIOXIDANTE CON NAC SOBRE FIBROBLASTOS OXIDADOS

Uno de los fármacos antioxidantes utilizados con mayor frecuencia es la NAC, cuya administración aporta cisteína a la célula para facilitar la síntesis de GSH. En función de los resultados obtenidos en estudios previos de nuestro grupo de investigación (Castro y *cols.*, 2015), se consideró la concentración de 5 mM de NAC como la idónea para administrar como tratamiento. Para determinar el efecto de dicho fármaco sobre los fibroblastos oxidados, se estudiaron los siguientes parámetros biológicos: niveles intracelulares de ROS, niveles intracelulares de GSH y proliferación celular.

Como muestra la figura 26A, el tratamiento de los fibroblastos oxidados con NAC redujo significativamente los niveles intracelulares de ROS respecto a las células oxidadas no tratadas (disminución de 265 veces a los 60 min; $p < 0.001$), dando lugar incluso a unos niveles de ROS 5 veces inferiores a los del control ($p < 0.001$). Estos datos se correlacionan con el incremento de los niveles intracelulares de GSH inducido por la NAC, siendo del 98% y 51% a los 60 y 240 min, respectivamente en comparación a las células oxidadas no tratadas ($p < 0.01$; figura 26B). Sin embargo, dicho tratamiento produjo sólo un ligero estímulo inicial de la proliferación a las 24 h respecto a las células oxidadas no tratadas (1.13 veces; $p < 0.05$), sin que se observaran diferencias significativas entre ambas poblaciones celulares a las 48 y 72 h (figura 26C).

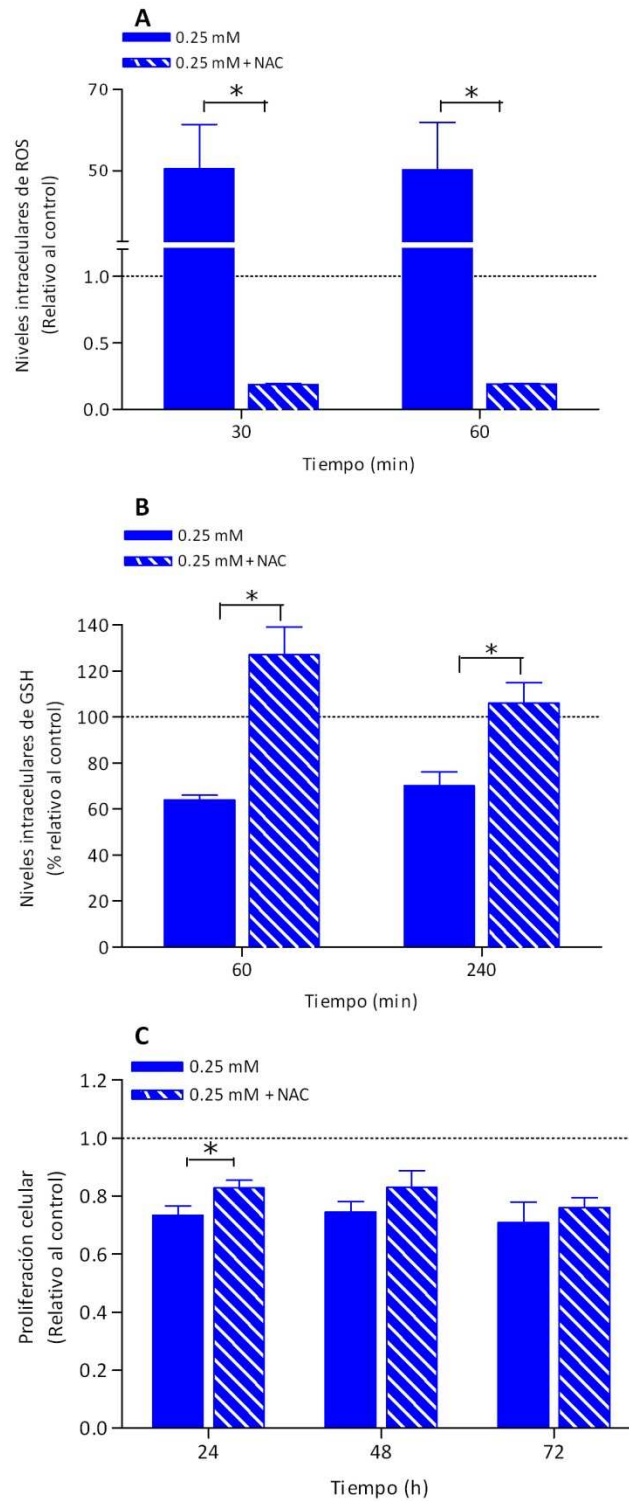


Figura 26. Efecto del tratamiento con NAC de los fibroblastos oxidados (0.25 mM de H_2O_2) sobre: (A) niveles intracelulares de ROS $*(p<0.001)$; (B) niveles intracelulares de GSH $*(p<0.01)$ y (C) proliferación celular $*(p<0.05)$. Control (---).

V.5. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA TERAPIA CELULAR CON AMSCs SOBRE FIBROBLASTOS OXIDADOS

Durante los últimos años, la terapia celular y sus derivados han sido un foco de investigación muy importante en el ámbito de la medicina regenerativa. En este estudio se analizó la capacidad de las AMSCs y sus derivados en la reparación de los fibroblastos sometidos a estrés oxidativo.

V.5.1 Efecto del co-cultivo con AMSCs sobre la proliferación de fibroblastos oxidados

El efecto del co-cultivo de AMSCs se analizó en fibroblastos no oxidados y en fibroblastos sometidos a estrés oxidativo (0.25 mM de H₂O₂ durante una hora).

Por un lado, en los fibroblastos no sometidos a oxidación, el co-cultivo con AMSCs indujo un ligero aumento de la proliferación celular respecto al control (1.1 veces a las 72 h; $p < 0.05$). Por otro lado, en los fibroblastos oxidados dicho co-cultivo incrementó de forma significativa la proliferación a partir de las 48 h, llegando a ser de 1.26 veces respecto a las células oxidadas no tratadas, a las 72 h ($p < 0.05$; figura 27).

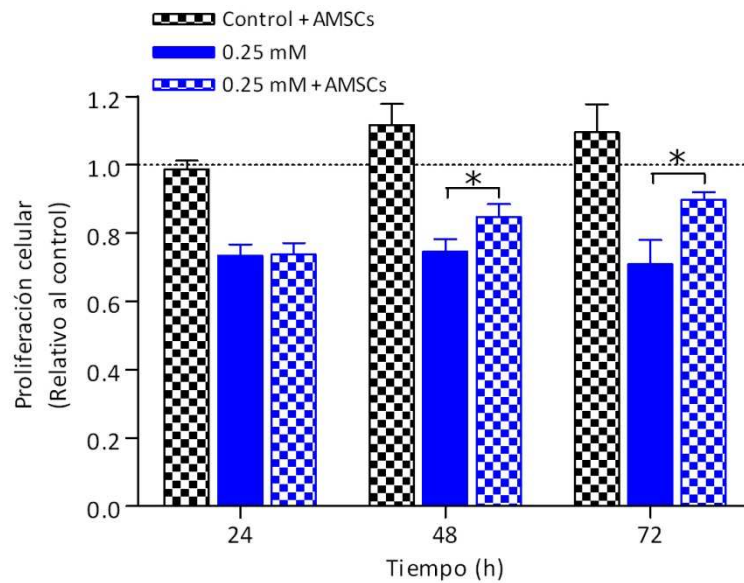


Figura 27. Proliferación de fibroblastos control y oxidados (0.25 mM H₂O₂) en co-cultivo con AMSCs a las 24, 48 y 72 h tras la oxidación.*($p < 0.05$). Control (---).

Teniendo en cuenta que estas experiencias de co-cultivo se llevaron a cabo, por un lado, sin que se estableciera un contacto directo entre ambas poblaciones celulares y, por otro lado, en ausencia de SBF, es lógico pensar que el efecto protector ejercido por las AMSCs sobre los fibroblastos expuestos a estrés oxidativo es debido, al menos en parte, a la liberación de factores biológicos solubles por parte de las AMSCs al medio de cultivo.

Para corroborar esta hipótesis, se procedió a analizar directamente el efecto del medio obtenido tras cultivar dichas células mesenquimales durante 48 h privadas de SBF.

V.5.2 Efecto del medio derivado de las AMSCs privadas de SBF

Las AMSCs fueron privadas de SBF durante 48 h –denominadas AMSCs-SD–, tras lo cual se obtuvo su medio de cultivo (M_{SD}) para analizar su posible efecto protector sobre fibroblastos sometidos a estrés oxidativo.

Se procedió al análisis de la capacidad antioxidante del M_{SD} y el efecto que éste ejerce sobre los fibroblastos oxidados y sin oxidar.

En relación a la capacidad antioxidante del M_{SD}, se observó que dicha capacidad es 1.8 veces superior que la del medio de crecimiento estándar obtenido tras 48 h en contacto con las AMSCs (7.04 ± 0.98 vs. 4 ± 0.7 ; $p < 0.01$; figura 28).

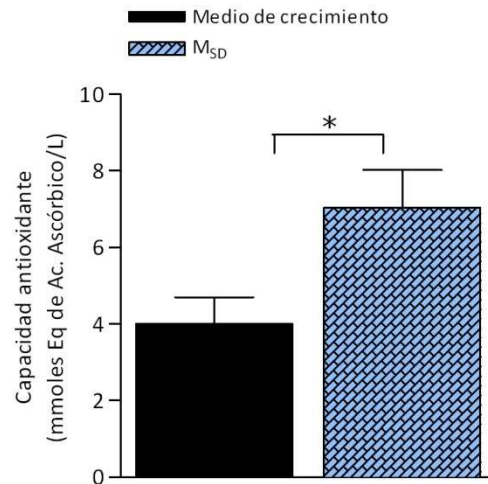


Figura 28. Capacidad antioxidante del medio obtenido tras 48 h de cultivo con AMSCs en condiciones de crecimiento con 10% SBF y del M_{SD}. *($p < 0.01$).

A continuación, se analizó el efecto del M_{SD} sobre los fibroblastos no oxidados y en aquellos sometidos a oxidación. Para ello, se estudiaron los siguientes parámetros biológicos: niveles intracelulares de ROS, niveles intracelulares de GSH, capacidad antioxidante celular total y proliferación celular.

Como muestra la figura 29, en ausencia de oxidación y respecto a los fibroblastos cultivados en condiciones estándar, en los fibroblastos cultivados con M_{SD} se redujeron los niveles de ROS (8.8 veces a los 60 min; $p < 0.05$) y se incrementaron los niveles intracelulares de GSH (17% a las 4 h; $p < 0.05$); sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la proliferación entre ambas poblaciones celulares.

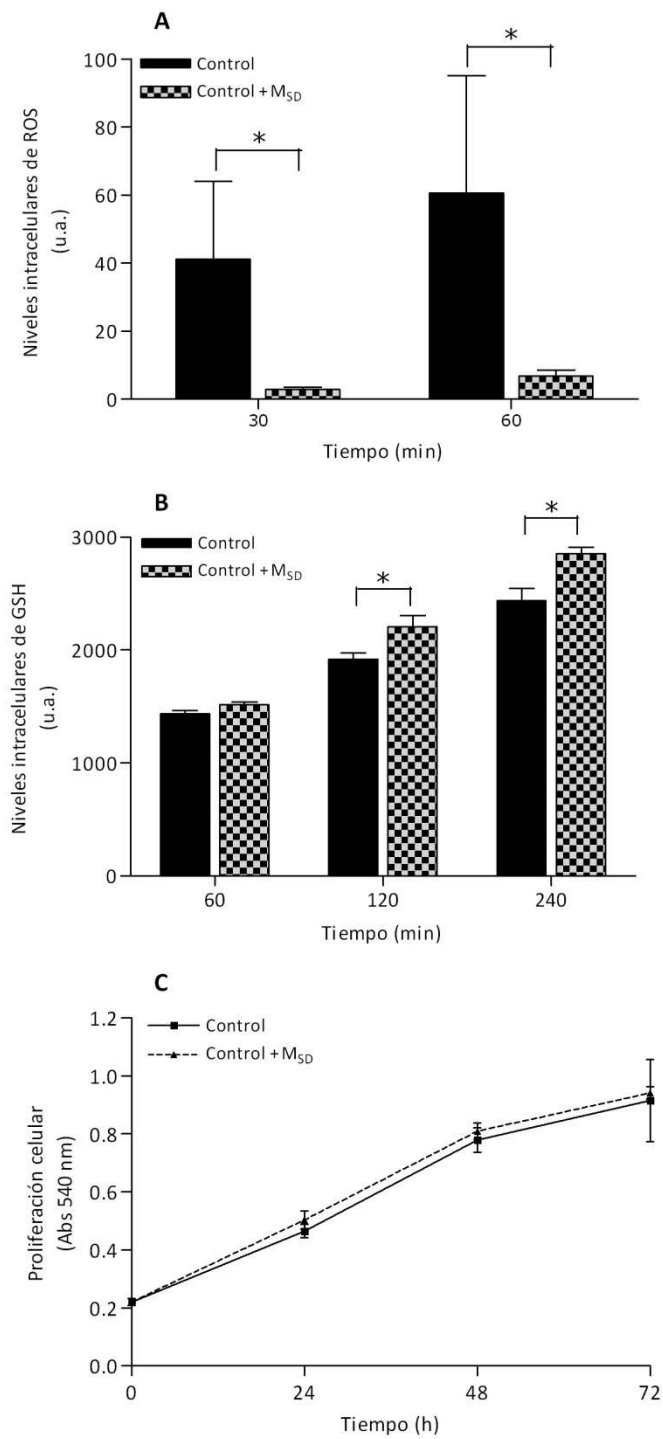
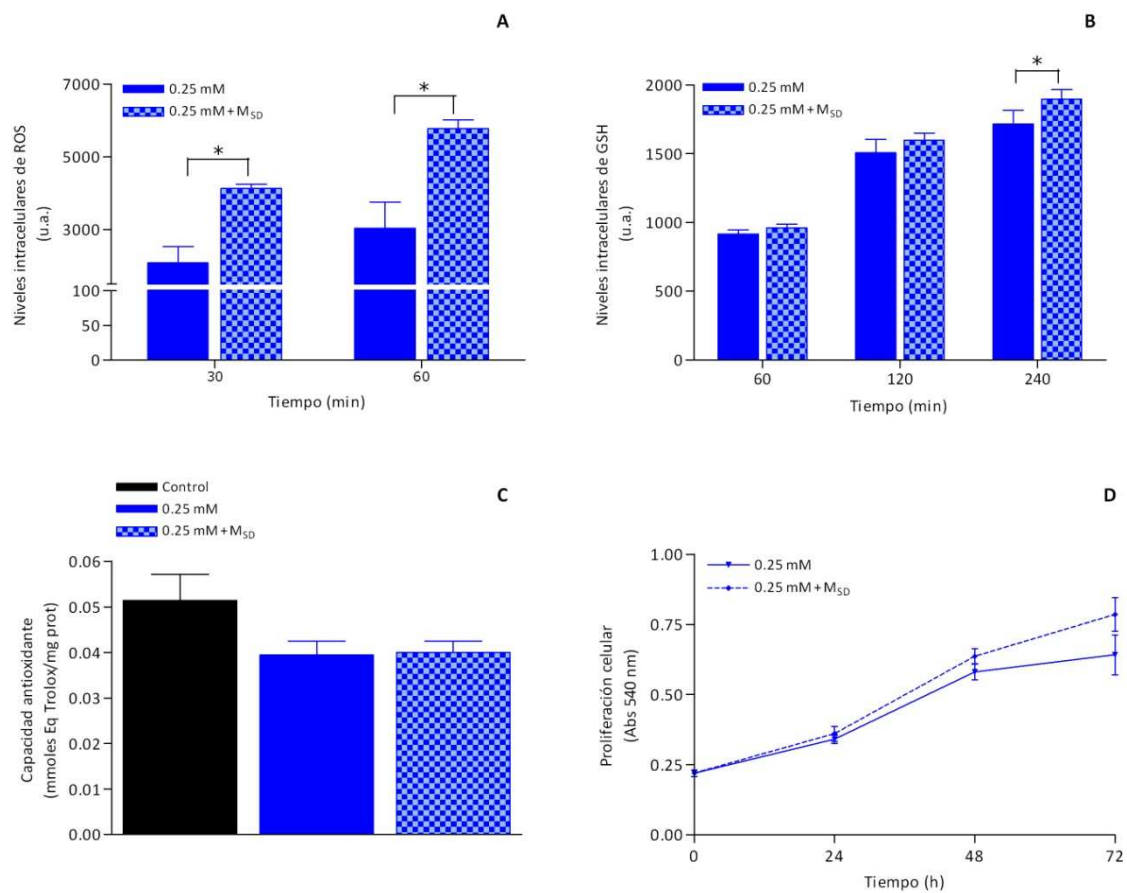


Figura 29. Efecto del tratamiento con M_{SD} sobre fibroblastos control: (A) Niveles intracelulares de ROS; (B) Niveles intracelulares de GSH y (C) Proliferación celular. *(p<0.05).

V. Resultados

En los fibroblastos sometidos a oxidación, el cultivo con M_{SD} indujo un incremento de los niveles de ROS (1.9 veces a los 60 min) y de los niveles de GSH (10% a las 4 h), respecto a los de los fibroblastos cultivados con medio estándar ($p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante total (analizada a las 6 h) entre ambas poblaciones celulares. Sin embargo, la proliferación celular de los fibroblastos cultivados con M_{SD} fue superior a la de los cultivados con medio estándar (incremento de 1.2 veces a las 72 h; $p < 0.05$; figura 30).



V.5.3 Capacidad antioxidante y de respuesta al estrés oxidativo de las AMSCs-SD

Una vez comprobadas las características del medio acondicionado (incremento de la capacidad antioxidante) y su capacidad de recuperación del daño oxidativo en fibroblastos, se procedió a analizar las modificaciones biológicas que induce la privación de SBF en las AMSCs, que justifican las propiedades regenerativas de dicho medio acondicionado.

En primer lugar, se observó que la capacidad antioxidante celular total de las AMSCs-SD era 1.45 veces mayor respecto a la de las AMSCs ($p < 0.001$; figura 31).

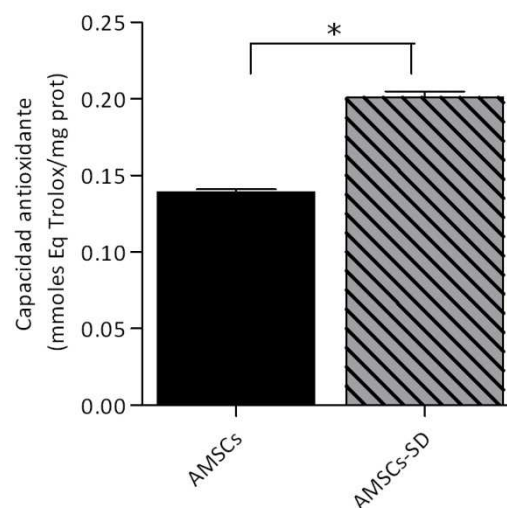


Figura 31. Comparación de la capacidad antioxidante celular total entre las AMSCs y las AMSCs-SD. * ($p < 0.001$).

En relación a la capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo, se analizó la proliferación celular de las AMSCs y las AMSCs-SD tras ser sometidas a 0.25 mM H_2O_2 durante 60 min. Como se aprecia en la figura 32, las AMSCs-SD tienen una mayor capacidad de respuesta inicial al estrés oxidativo. Así, en las primeras 24 h, mientras las AMSCs disminuyeron 1.3 veces su proliferación respecto a su control ($p < 0.001$), las AMSCs-SD mantuvieron la tasa proliferativa del control. Sin embargo, en los tiempos

posteriores (48 y 72 h), no se observaron diferencias significativas entre las AMSCs y AMSCs-SD oxidadas, llegando a disminuir la proliferación en ambas, 1.5 y 1.3 veces, respectivamente, en comparación a sus controles a las 72 h.

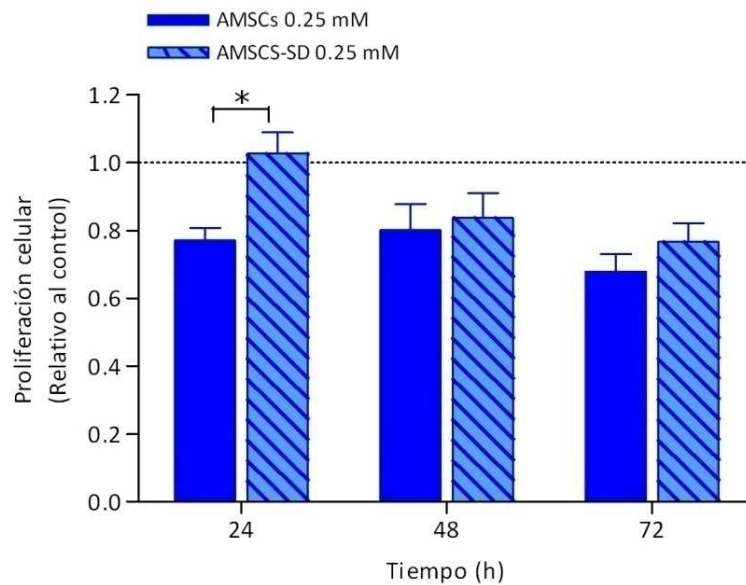


Figura 32. Proliferación de las AMSCs y las AMSCs-SD oxidadas (0.25 mM H₂O₂). Los datos están expresados en número de veces respecto al control no oxidado de cada una de las poblaciones (---). *(p<0.01).

Una vez observado de forma independiente el efecto protector ejercido por la terapia farmacológica antioxidante (apartado V.4) y por la terapia celular (apartado V.5) sobre fibroblastos sometidos a estrés oxidativo, a continuación se evalúa si dicho efecto protector puede ser potenciado por la combinación de ambas estrategias terapéuticas.

V.6. EFECTO DE LA ADICIÓN DE NAC A LA TERAPIA CELULAR SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS OXIDADOS

El efecto de la terapia combinada, farmacológica y celular, sobre la recuperación de la capacidad proliferativa de los fibroblastos sometidos a oxidación, se analizó en dos situaciones: *i*, adición de NAC al co-cultivo de AMSCs y fibroblastos oxidados y *ii*, adición de NAC a los fibroblastos oxidados cultivados con el M_{SD}.

V.6.1 Efecto de la adición de NAC al co-cultivo de fibroblastos oxidados y AMSCs

La adición de NAC al co-cultivo con AMSCs facilitó la recuperación de la capacidad proliferativa de los fibroblastos oxidados. Dicha capacidad fue superior (1.3 veces en ambos casos) a la obtenida con cada una de las terapias (farmacológica o celular) administradas de forma aislada, a las 48 h ($p < 0.001$). Sin embargo, las diferencias existentes entre la terapia celular y la terapia combinada se redujeron a las 72h (incremento de 1.13 veces; $p > 0.05$; figura 33).

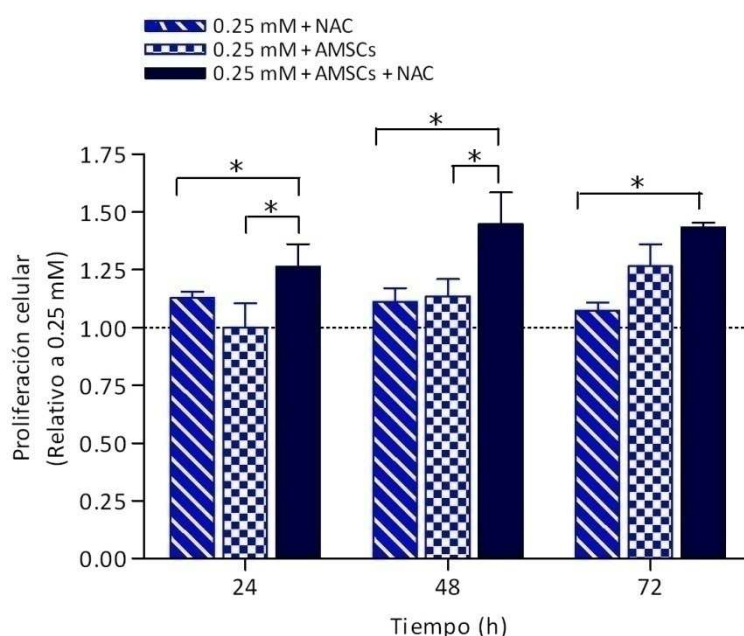


Figura 33. Proliferación de fibroblastos sometidos a estrés oxidativo y tratados con NAC, AMSCs y la combinación de ambos. $*(p < 0.05)$. 0.25 mM (---).

V.6.2 Efecto de la adición de NAC a los fibroblastos oxidados cultivados con M_{SD}

Al igual que en el caso anterior, el tratamiento con NAC+M_{SD} también facilitó la recuperación de la capacidad proliferativa de los fibroblastos oxidados. Como se observa en la figura 34, a las 48 h dicha terapia combinada aumentó 1.2 veces la proliferación de los fibroblastos oxidados respecto a los tratados con cada una de la terapias de forma individual; dichas diferencias se mantuvieron a las 72 h (aumento 1.36 y 1.2 veces respecto a los tratados sólo con NAC o con M_{SD}, respectivamente; $p < 0.05$).

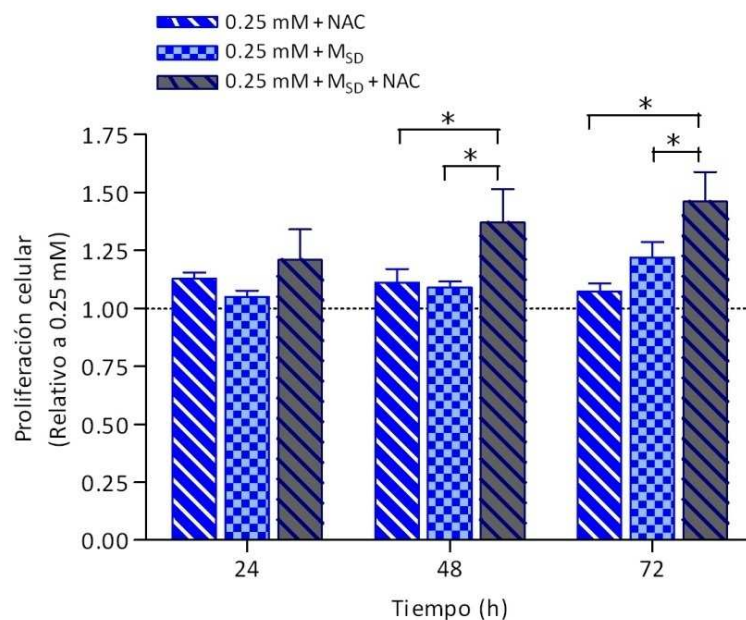


Figura 34. Proliferación de fibroblastos sometidos a estrés oxidativo y tratados con NAC, M_{SD} y la combinación de ambos. *($p < 0.05$). 0.25 mM (---).

Una vez demostrado que la adición del agente antioxidante NAC a la terapia celular con AMSCs permite incrementar el efecto protector sobre los fibroblastos sometidos a estrés oxidativo, se planteó la posibilidad de potenciar la capacidad antioxidante de las AMSCs mediante un precondicionamiento de las mismas con baja exposición a H₂O₂ repetida en el tiempo. La finalidad de esta estrategia terapéutica es conseguir una terapia celular con una mayor capacidad antioxidante, de efecto similar al producido por la combinación de la terapia celular y la farmacológica.

V.7. EFECTO DEL PREACONDICIONAMIENTO DE LAS AMSCs CON DOSIS BAJAS DE H₂O₂ SOBRE FIBROBLASTOS OXIDADOS

Para analizar la influencia del preacondicionamiento de las AMSCs con bajo nivel de estrés oxidativo sobre su capacidad terapéutica, dichas células mesenquimales fueron sometidas a baja concentración de H₂O₂ (0.01 mM) durante 7 días. Tras el preacondicionamiento, se procedió, inicialmente, a analizar la capacidad antioxidante y de respuesta de estas células, a las que denominamos AMSCs-P, frente al estrés oxidativo; en segundo lugar, se recogió su medio de cultivo tras 48 h (MP_{SD}) para determinar su posible efecto sobre fibroblastos sometidos a estrés oxidativo.

V.7.1 Capacidad antioxidante y de respuesta al estrés oxidativo de las AMSCs-P

En primer lugar, se observó que el preacondicionamiento aumentó 1.49 veces la capacidad antioxidante de las AMSCs-P, respecto al de las AMSCs ($p < 0.001$; figura 35).

En segundo lugar, se analizaron las modificaciones inducidas por el preacondicionamiento en la respuesta frente al estrés oxidativo, determinando para ello los cambios en los niveles de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y en la capacidad proliferativa de dichas células.

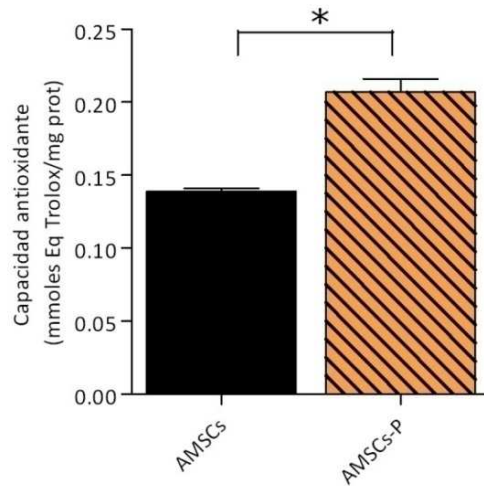


Figura 35. Comparación de la capacidad antioxidante celular total entre las AMSCs y las AMSCs-P. *($p < 0.001$).

Por un lado, se compararon los niveles de expresión génica de las AMSCs-P con los de las AMSCs en condiciones de cultivo estándar, en ausencia de estrés oxidativo. En esta situación, se observó un aumento significativo de la expresión de COX-2, IGF-1 e IL-1 β en las AMSCs-P respecto a las no precondicionadas ($p < 0.05$; figura 36). No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de NF- κ B y TGF- β 1. Por último, TNF- α no llegó a expresarse en ninguna de las dos poblaciones celulares.

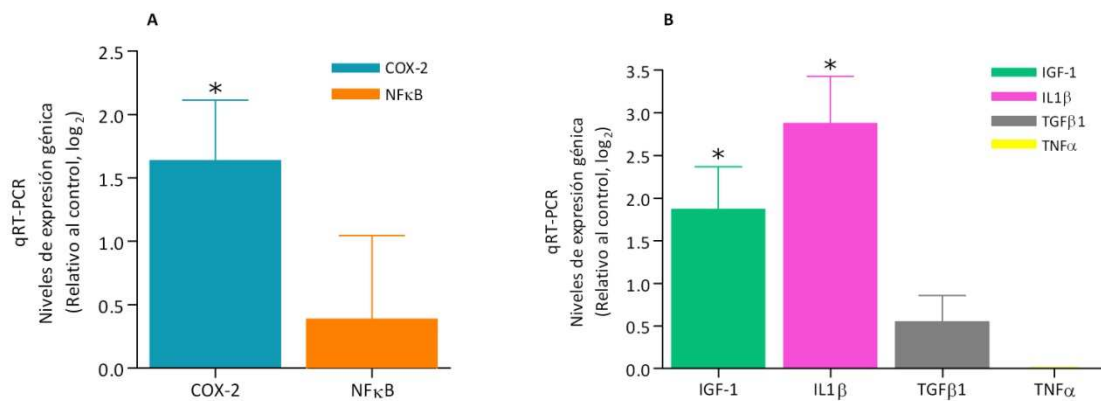


Figura 36. Niveles de expresión génica en AMSCs-P respecto a las AMSCs. (A) Niveles de expresión de COX-2 y NF- κ B; (B) Niveles de expresión de IGF-1, IL-1 β , TGF- β 1 y TNF- α . *($p < 0.05$).

A continuación, se analizó la expresión de los mismos genes tras someter a las células a 0.25 y 1.0 mM de H₂O₂, para evaluar las diferencias existentes en la respuesta a dosis moderada y alta de estrés oxidativo.

En situación de estrés oxidativo moderado, mientras la expresión de COX-2 se incrementó de forma similar en ambas poblaciones celulares (ya aumentada previamente en las AMSCs-P), los niveles de expresión de NF-κB se vieron reprimidos en las AMSCs-P de forma significativa respecto a los de las AMSCs. En relación a IGF-1, en las dos poblaciones celulares se produjo un incremento significativo en sus niveles de expresión (también aumentados previamente en las AMSCs-P), siendo dicho incremento superior en las AMSCs ($p < 0.05$). Este mismo efecto se pudo observar con la expresión de IL-1β, si bien en este caso las diferencias no llegaron a ser significativas. Al igual que en condiciones de no oxidación, la exposición a dosis moderada de H₂O₂, no produjo diferencias significativas en los niveles de expresión de TGF-β1, y no se observó expresión de TNF-α.

Por último, en situación de alto estrés oxidativo, mientras que en las AMSCs-P la expresión de los genes analizados es similar a la situación de estrés oxidativo moderado (a excepción del incremento significativo en los niveles de expresión de TNF-α), en las AMSCs se observó un menor incremento en el nivel de expresión de COX-2 e IGF-1, una represión de NF-κB y un aumento significativo de TNF-α respecto a las AMSCs sometidas a dosis moderada de H₂O₂ (figura 37).

V. Resultados

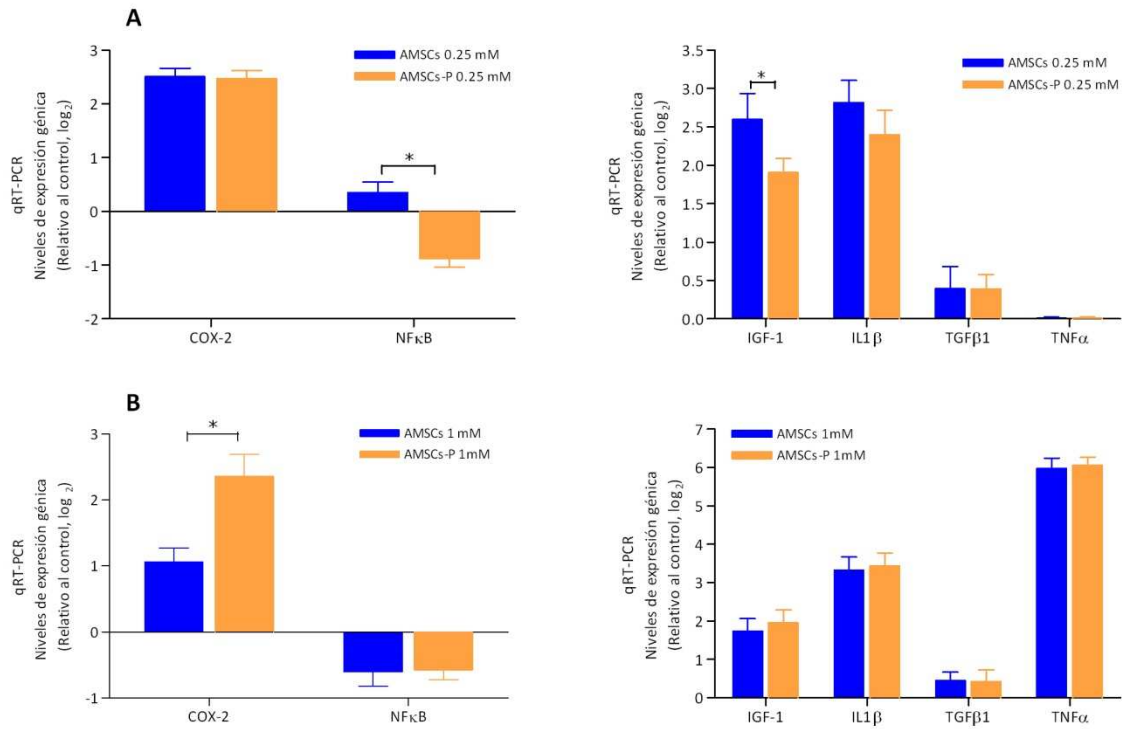


Figura 37. Comparación de las modificaciones de los niveles de expresión génica en respuesta al estrés oxidativo entre AMSCs y AMSCs-P. (A) Niveles de expresión génica tras la oxidación de las células con 0.25 mM de H₂O₂; (B) Niveles de expresión génica tras la oxidación de las células con 1.0 mM de H₂O₂. *(p<0.05).

Finalmente, el análisis comparativo de la capacidad proliferativa de las AMSCs y AMSCs-P tras ser sometidas a estrés oxidativo, demostró que las AMSCs-P mostraron una mayor capacidad de respuesta, de modo que, tras la exposición a 0.25 y 1.0 mM de H₂O₂, la proliferación celular a las 48 h fue 1.18 y 1.26 veces superior, respectivamente, que la de las AMSCs (p<0.05; figura 38).

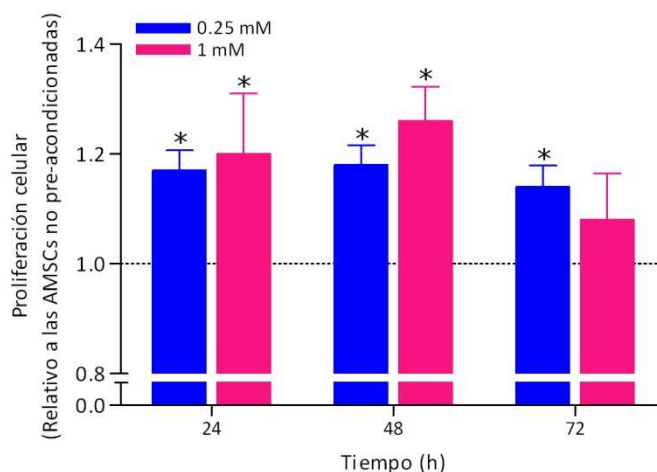


Figura 38. Proliferación de AMSCs y AMSCs-P oxidadas con 0.25 y 1.0 mM de H_2O_2 . *($p < 0.05$). AMSCs no pre-acondionadas (---).

El preacondicionamiento por dosis bajas de H_2O_2 muestra que las AMSCs-P incrementan su capacidad antioxidante y de respuesta proliferativa ante un nuevo estrés oxidativo, lo cual está asociado a la regulación de genes relacionados con el proceso inflamatorio, en particular con las modificaciones en COX-2, NF- κ B, IGF-1 e IL-1 β .

Una vez obtenidos estos resultados se procedió a analizar el efecto del medio de cultivo de dichas células (MP_{SD}).

V.7.2 Efecto del MP_{SD} sobre los fibroblastos oxidados

Tras observar que las AMSCs-P tienen una mayor capacidad de respuesta que las AMSCs frente al estrés oxidativo, se analizó la capacidad antioxidante del medio obtenido a partir de dichas células (MP_{SD}) y su efecto sobre los fibroblastos oxidados y sin oxidar.

Teniendo en cuenta que el SBF podría enmascarar la eficacia terapéutica del medio de las AMSCs-P, dicho medio se obtuvo tras 48 h de cultivo de las células en ausencia de SBF. Los datos obtenidos por el MP_{SD} se comparan con los derivados del M_{SD} .

En primer lugar, en relación a la capacidad antioxidante del MP_{SD}, se observó que dicha capacidad es 2.4 veces superior que la del medio de crecimiento estándar obtenido tras 48 h en contacto con las AMSCs y 1.4 veces superior a la del M_{SD} (9.66 ± 0.5 vs. 7.04 ± 0.98 ; $p < 0.01$; figura 39).

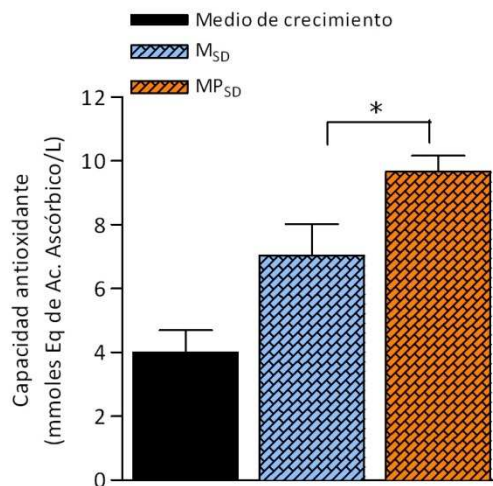


Figura 39. Capacidad antioxidante del medio obtenido tras 48 h de cultivo con AMSCs en condiciones de crecimiento con 10% SBF, del M_{SD} y del MP_{SD}. *($p < 0.01$).

En segundo lugar, se analizó el efecto del MP_{SD} sobre los fibroblastos sometidos a estrés oxidativo ($0.25 \text{ mM H}_2\text{O}_2$), evaluando para ello los siguientes parámetros biológicos: niveles intracelulares de ROS, niveles intracelulares de GSH, capacidad antioxidante celular total y proliferación celular.

Como muestra la figura 40, en situación de no oxidación y respecto a los fibroblastos cultivados en condiciones estándar, en los fibroblastos cultivados con MP_{SD} se redujeron los niveles de ROS (5 veces a los 60 min; $p < 0.05$) y se incrementaron los niveles intracelulares de GSH (20% a las 4 h; $p < 0.05$); sin embargo, no se produjeron diferencias significativas en la proliferación entre ambas poblaciones celulares. Por otro lado, tampoco se observaron diferencias en dichos parámetros evaluados entre los fibroblastos cultivados con MP_{SD} y los cultivados con M_{SD}.

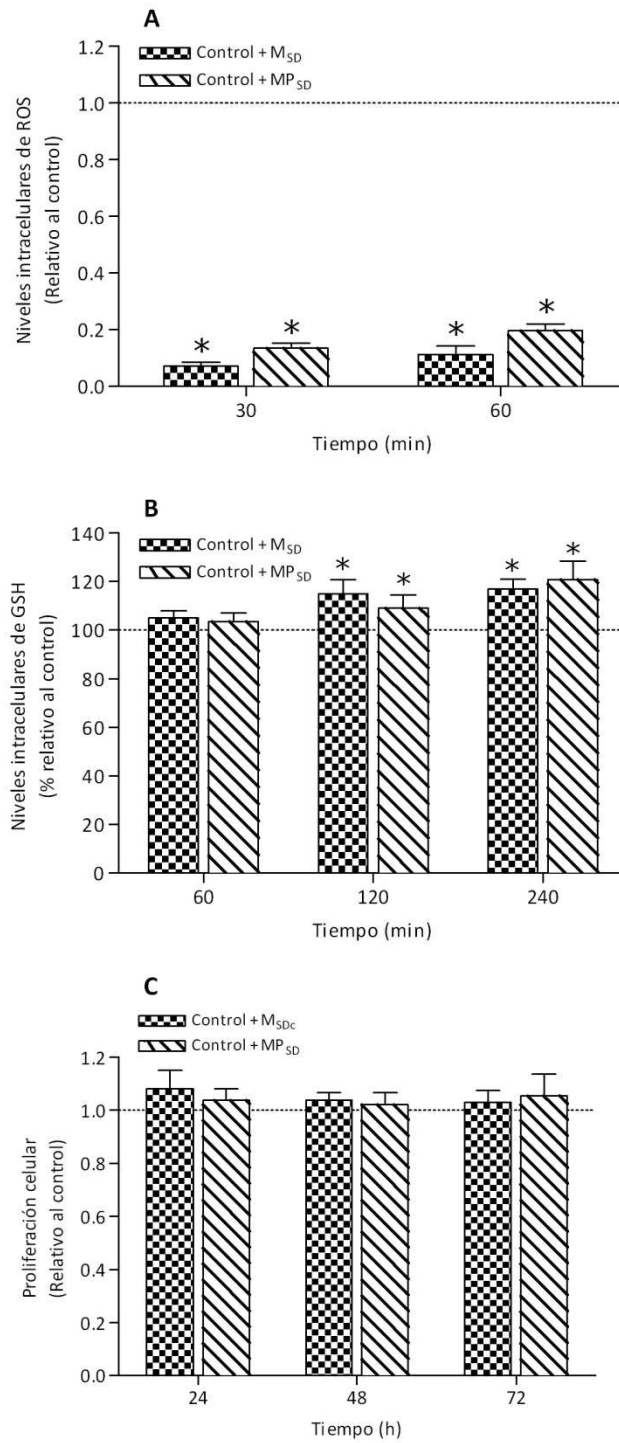


Figura 40. Comparación del tratamiento con M_{SD} y MP_{SD} sobre fibroblastos control (---): (A) Niveles intracelulares de ROS; (B) Niveles intracelulares de GSH y (C) Proliferación celular. *(p<0.01).

V. Resultados

En los fibroblastos sometidos a oxidación, el cultivo con MP_{SD} indujo un incremento significativo de los niveles de ROS (5.6 veces a los 60 min), de los niveles de GSH (8% a las 4 h) y de la capacidad antioxidante total (1.5 veces respecto al control, a las 6 h) respecto a los de los fibroblastos cultivados con medio estándar ($p < 0.05$). Además, la proliferación celular de los fibroblastos cultivados con MP_{SD} fue superior a la de los cultivados con medio estándar (incremento de 1.42 veces, a las 72 h; $p < 0.05$).

En comparación con los fibroblastos oxidados cultivados con el M_{SD}, los cultivados con el MP_{SD} vieron incrementada tanto su capacidad antioxidante (1.5 veces; $p < 0.001$) como su capacidad proliferativa, llegando a ser 1.2 veces superior a las 72 h ($p < 0.01$; figura 41).

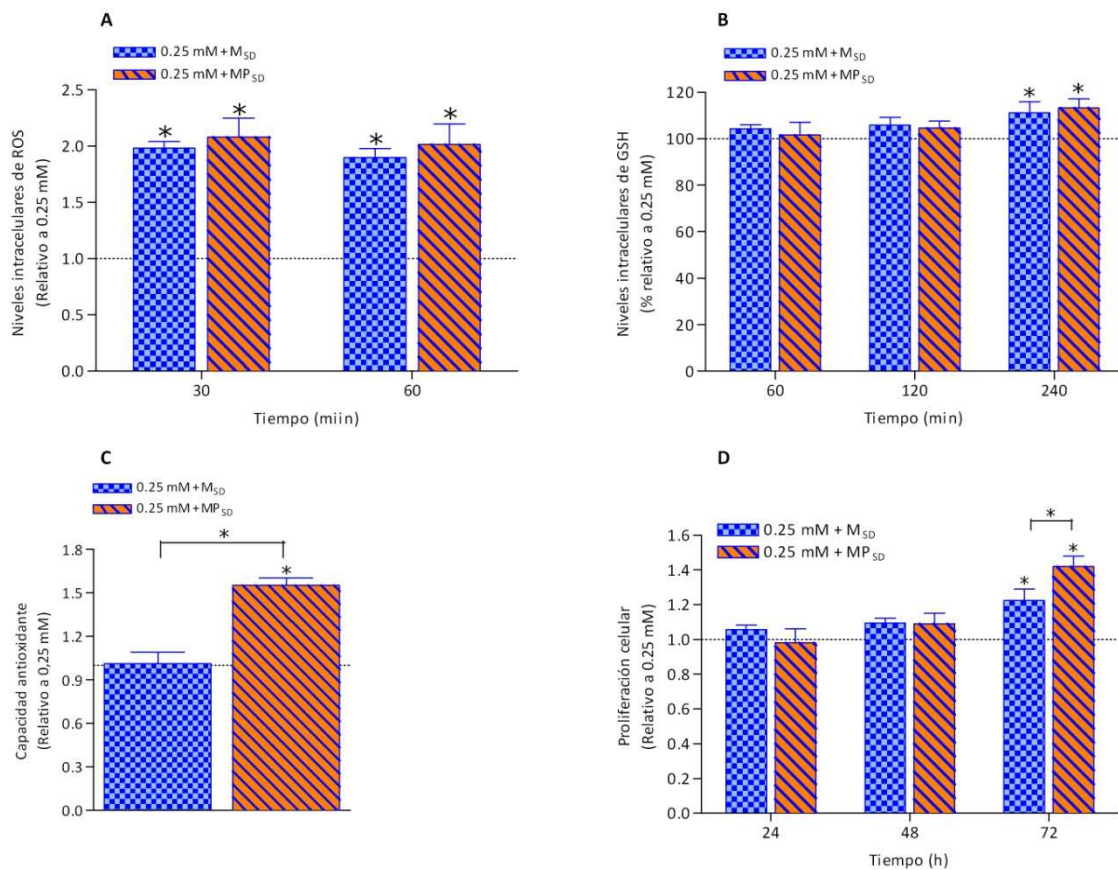


Figura 41. Comparación del tratamiento de fibroblastos sometidos a estrés oxidativo (0.25 mM de H₂O₂) con M_{SD} y con MP_{SD}. (A) Niveles intracelulares de ROS; (B) Niveles intracelulares de GSH; (C) Capacidad antioxidante celular total y (D) Proliferación celular. * ($p < 0.01$). 0.25 mM (---).

VI. DISCUSIÓN

La pérdida de control del equilibrio redox, bien por un exceso de producción de especies reactivas por parte de las células del sistema inmune o bien por un déficit en la capacidad antioxidante celular, da lugar a un estado de estrés oxidativo y, por tanto, a una persistencia de la inflamación. Esta situación mantenida en el tiempo, tiene como consecuencia el desarrollo de múltiples enfermedades como las mencionadas previamente en el apartado dedicado a la introducción. El control del estrés oxidativo es esencial, por tanto, para el tratamiento de dichas enfermedades. En este sentido, se han desarrollado diferentes terapias con el fin de regular el desequilibrio redox, entre las que se encuentran la utilización de agentes antioxidantes (Kalyanaraman, 2013; Rushworth y Megson, 2014) y la terapia celular (Kim y *cols.*, 2015; Bajek y *cols.*, 2016).

En este trabajo se ha analizado el efecto de la terapia antioxidante con NAC y de la terapia celular con AMSCs, así como la combinación de ambas, sobre un modelo de estrés oxidativo en fibroblastos humanos. Se eligieron los fibroblastos porque constituyen una población celular imprescindible para la reparación del daño tisular, ya que forman parte del estroma, lugar donde asienta la reacción inflamatoria en todos los órganos, y tienen además una función de síntesis de la matriz extracelular.

Dada la importancia de los fibroblastos en la reparación tisular, es fundamental conocer cómo responden al estrés oxidativo. Para ello se utilizó H_2O_2 como agente oxidante, administrado mediante un único pulso, a concentraciones crecientes (0.1 – 1.5 mM) durante una hora. Esta molécula está presente de forma general en el proceso inflamatorio, donde actúa como segundo mensajero, activando diferentes vías metabólicas para la correcta reparación tisular. Sin embargo, a altas concentraciones puede resultar perjudicial al transformarse, mediante la reacción de Fenton, en $OH\cdot$, una molécula altamente reactiva capaz de dañar el DNA, las proteínas y los lípidos. El H_2O_2 , además, posee una alta estabilidad en disolución y gran capacidad para difundir libremente a través de las membranas celulares, por lo que es utilizado de forma generalizada como modelo de agente inductor del estrés oxidativo (Pinteus y *cols.*, 2017; Park y *cols.*, 2017; Wang y *cols.*, 2018).

En este estudio se analizó el efecto del estrés oxidativo sobre la morfología de los fibroblastos, su viabilidad, los niveles intracelulares de ROS y GSH, la proliferación, la apoptosis y la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo.

En cuanto a la morfología de las células, se produce una pérdida de la forma de huso característica de las mismas y aparece, inicialmente, un incremento de la superficie de unión al sustrato con las concentraciones bajas de H_2O_2 , dando lugar finalmente a una forma ensanchada, aplanada e irregular con la exposición a concentraciones altas.

En relación a la viabilidad, aunque con la concentración más baja de H_2O_2 (0.1 mM) no se observaron diferencias significativas, con el resto de concentraciones se produjo una disminución dosis y tiempo-dependiente. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores con fibroblastos procedentes de la dermis (Feru y cols., 2016, Wen y cols., 2017) y fibroblastos pulmonares (Park, 2013; Pu y cols., 2015).

La disminución de la viabilidad celular se asoció a un incremento de los niveles intracelulares de ROS y a una reducción consecuente de la cantidad de GSH intracelular, en ambos casos de forma dosis-dependiente. Hay que tener presente que el GSH, principal antioxidante celular endógeno, actúa como co-sustrato de la enzima GPX para eliminar el H_2O_2 (Powers y cols., 2011). Otros autores han observado también estos mismos efectos en otros tipos celulares tras la exposición a H_2O_2 (Olatunji y cols., 2017; Zhu y cols., 2017).

Tras la obtención de estos resultados iniciales se decidió limitar el rango de oxidación a dos concentraciones de H_2O_2 para el resto de la experimentación, una moderada (0.25 mM), lejos de la IC_{50} (0.7 mM) y similar a la observada en los procesos inflamatorios (Jain y cols., 2000; Roy y cols., 2006), y otra elevada (1 mM) para inducir un mayor efecto de estrés oxidativo.

Un aumento de la producción celular de ROS se observa con frecuencia en los procesos apoptóticos. En situación de estrés oxidativo se activa la vía metabólica JNK, la cual provoca la inhibición de factores antiapoptóticos como Bcl-2 y la activación de factores proapoptóticos como Bax. Este proceso da lugar a la activación de la cascada de caspasas, dificultando así la reparación del tejido (Clark, 2008). Sin embargo, en otros

estudios se han descrito los cambios característicos de la apoptosis en las membranas celulares en ausencia de incremento de ROS (Castedo y *cols.*, 1996; Jacobson y *cols.*, 1994), indicando que una condición pro-oxidativa no es un requisito imprescindible para la apoptosis celular. En nuestro estudio, el aumento de los niveles intracelulares de ROS se produjo de forma inmediata y con bajas concentraciones de H₂O₂ (15 veces respecto al control a los 30 min), mientras que la apoptosis se produce a las 24 h de forma dosis-dependiente, sin que se observen cambios a las 3 h.

Generalmente, la exposición de las células a altas concentraciones de H₂O₂ tiene como consecuencia la desregulación de diferentes vías de señalización. Se ha observado que una oxidación celular del orden de 1 mM de H₂O₂ da lugar a un aumento de la fosforilación del residuo tirosina en numerosas proteínas (Schieven y *cols.*, 1993; Staal y *cols.*, 1994), lo que ocurre como consecuencia de la inhibición de las proteínas tirosin fosfatasas. Dichas proteínas son las encargadas de contrarrestar el efecto de las tirosin quinazas, es decir, desfosforilan los receptores de membrana tras la autofosforilación inducida por el ligando. Por ejemplo, el receptor EGF normalmente es desfosforilado en todos sus residuos de tirosina en menos de un minuto tras la unión del ligando (Knebel y *cols.*, 1996). Sin embargo, esta desfosforilación se retrasa en el tiempo con altas concentraciones de H₂O₂ (>1 mM) u otros inductores de estrés oxidativo. Las proteínas tirosin fosfatasas tienen un residuo de cisteína que les confiere su capacidad catalítica (Barford y *cols.*, 1995), la cual se puede ver inhibida bien por altas concentraciones de H₂O₂ (>1 mM) que dan lugar a la formación de derivados del ácido sulfénico, o bien por la reacción con GSSG, dando lugar a la glutationilación de dicho residuo de cisteína. La reactivación de la capacidad catalítica puede ocurrir mediante la reacción con el GSH u otros compuestos tiólicos (Denu y Tanner, 1998; Barrett y *cols.*, 1999).

La desregulación de dichas rutas metabólicas puede dar lugar a la sobreexpresión o represión de diferentes factores de transcripción y citocinas proinflamatorias, dependiendo del contexto.

En nuestro estudio analizamos la expresión génica del factor NF-κB, uno de los principales coordinadores del proceso inflamatorio y cuya regulación es clave ya que interviene en procesos biológicos esenciales como el desarrollo, la proliferación y la

supervivencia celular. Observamos una sobreexpresión de NF- κ B con la concentración moderada de H₂O₂ a las 3 h de añadir el oxidante. Otros autores también han descrito un aumento de la expresión de este factor de transcripción con concentraciones similares de H₂O₂ (Schreck y *cols.*, 1991; Manna y *cols.*, 1998), o por la acción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 o IL-6 (Powers y *cols.*, 2011). El factor NF- κ B regula numerosos genes entre los que se encuentra el gen que codifica el enzima COX-2, uno de los principales mediadores proinflamatorios, cuya sobreexpresión observamos con la concentración moderada de oxidante. Otros autores también han descrito dicha sobreexpresión en situaciones de estrés oxidativo de pacientes con osteoartritis y con colitis ulcerosa (Tsatsanis y *cols.*, 2006).

En situación de estrés oxidativo, la expresión por los fibroblastos, además de COX-2, de diferentes citocinas, como TNF- α e IL-1 β ayuda a mantener el reclutamiento de leucocitos en el tejido inflamado, y a activar genes que controlen la supervivencia celular, la angiogénesis e invasividad (Valin y Pablos, 2015). En nuestro estudio, observamos una sobreexpresión génica de TNF- α e IL-1 β a las 3 h tras la exposición a dosis moderadas y altas de H₂O₂.

Respecto al factor TGF- β 1, se ha descrito que este factor ejerce un papel regulador tanto en el inicio como en la resolución del proceso inflamatorio (Lemos y *cols.*, 2015). En nuestro caso, su expresión aumentó de forma dosis-dependiente a la hora post-exposición a H₂O₂, mantenida a las 3 h únicamente con la concentración moderada.

Finalmente se analizó la expresión del IGF-1, cuyo receptor es multifuncional y produce señales para la supervivencia, proliferación y diferenciación celular. Otros autores han demostrado que un aumento del estrés oxidativo da lugar a una disminución de IGF-1 en el plasma de pacientes con alto riesgo de desarrollar hipertensión y diabetes tipo 2 (Pouvreau y *cols.*, 2018; Butkowski y *cols.*, 2016; Teppala y Shankar, 2010; Zhang y *cols.*, 2011), mientras que un aumento de la biodisponibilidad de este factor puede proteger contra el desarrollo de estas patologías (Conti y *cols.*, 2003; Rodríguez-de la Rosa y *cols.*, 2017). En nuestro estudio, la expresión de dicho factor se

modificó únicamente con la concentración elevada de H₂O₂, incrementándose durante la primera hora y disminuyendo posteriormente a las 3 h.

Los análisis de *western blot* realizados por otros autores con fibroblastos de la dermis oxidados con 0.2 mM de H₂O₂, muestran igualmente un aumento tiempo-dependiente de los niveles proteicos de IL-1 β , IL-6, TNF- α y NF- κ B (Wen y cols., 2017). Tanto estos resultados como los obtenidos en nuestro estudio indican que el desequilibrio redox aumenta la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y, por tanto, la síntesis de las proteínas relacionadas con la inflamación en este tipo de células.

Una vez establecido el modelo de estrés oxidativo sobre los fibroblastos, se procedió a analizar la eficacia de la reparación del daño oxidativo en dicha población celular con dos enfoques terapéuticos, la terapia antioxidante y la terapia celular, tanto de forma aislada como en combinación.

En primer lugar, en relación a la terapia antioxidante, se seleccionó el agente NAC, a una dosis de 5 mM, tomando como referencia estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (Castro y cols., 2015). Este agente es uno de los más utilizados por su capacidad de aumentar los niveles intracelulares de GSH (Rushworth y Megson, 2014). Su capacidad antioxidante se debe, principalmente, a su rápida neutralización de los ROS y a la restitución del GSH reducido mediante el aporte de cisteína (Elbini Dhouib y cols., 2016). En consecuencia, es lógico observar que, tras la oxidación de los fibroblastos y su posterior tratamiento con NAC, los niveles de GSH aumentarían de forma significativa y la concentración de ROS disminuiría, incluso por debajo de la del control. Sin embargo, no se produjo una mejora de la proliferación a largo plazo. Este resultado podría deberse a que el antioxidante se añade después de haberse producido el daño oxidativo, por lo que la célula ya no es capaz de recuperarse adecuadamente. Normalmente, para que un agente antioxidante actúe como protector tiene que ser añadido antes de que ocurra el daño. De hecho, la mayoría de las investigaciones *in vitro* se realizan de esta forma (Wang y cols., 2017; Ramos-Ibeas y cols., 2017; Ren y cols., 2018).

Aunque la terapia antioxidante ha resultado ser muy eficaz en estudios *in vitro*, la seguridad y eficacia en estudios *in vivo* continúa en entredicho, ya que llevar a las células a un estado altamente reducido puede resultar igual de perjudicial que el estrés oxidativo. Así, la administración de antioxidantes a dosis elevadas puede alterar el equilibrio redox debido a una reducción excesiva de ROS, incluso por debajo del nivel óptimo requerido para el funcionamiento celular. Por otro lado, se ha descrito que el β -caroteno a dosis bajas muestra propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, mientras que a dosis elevadas ejerce un efecto prooxidante y proinflamatorio, incrementando la producción de mediadores proinflamatorios como TNF- α e IL-8 (Yeh y cols., 2009).

Por tanto, para la reparación del daño provocado por una situación de estrés oxidativo, el abordaje único con agentes antioxidantes parece insuficiente. Por este motivo, se llevó a cabo en segundo lugar el análisis del efecto de la terapia celular sobre el daño causado por dicho estrés.

Durante los últimos años, gracias a las propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antioxidantes de las MSCs, la utilización de estas células para el tratamiento de enfermedades asociadas al estrés oxidativo ha suscitado un gran interés. En particular, las AMSCs poseen una serie de ventajas sobre otros tipos de MSCs, como son su alta disponibilidad y fácil extracción con procedimientos mínimamente invasivos, lo que las hace muy atractivas para su utilización en clínica. Sin embargo, es importante tener en cuenta diferentes factores como la edad y características del donante, las condiciones de obtención del tejido, así como los medios empleados durante el cultivo de dicha células (Utsunomiya y cols., 2011). Por ejemplo, hay estudios que afirman que las AMSCs extraídas de pacientes con obesidad pueden presentar resistencia a la insulina y promover la secreción de enzimas proinflamatorias (Pérez y cols., 2013; Eljaafari y cols., 2015), lo cual podría afectar de forma negativa a los pacientes tratados con estas células.

Actualmente son más de doscientos los estudios clínicos con AMSCs, aplicadas a patologías tan diversas como la diabetes, la enfermedad de Crohn, osteoartritis, esclerosis múltiple, ELA, lesión cerebral severa, desórdenes pulmonares crónicos, úlceras

por presión, psoriasis, quemaduras cutáneas, enfermedad renal crónica y enfermedades cardiovasculares (www.clinicaltrials.gov).

Teniendo en cuenta las propiedades previamente mencionadas de las AMSCs, nos planteamos determinar la respuesta de dichas células al estrés oxidativo inducido en condiciones similares a las utilizadas previamente sobre los fibroblastos.

Pudimos observar que la exposición a H₂O₂ daba lugar a un menor aumento de los niveles intracelulares de ROS en las AMSCs respecto a los fibroblastos, lo cual se relaciona con un mayor nivel de GSH intracelular observado en dichas células madre. Además, coherente con dichos resultados es la mayor viabilidad y menor apoptosis en las AMSCs ante la exposición a dosis altas de H₂O₂ respecto a los fibroblastos. De hecho, la IC₅₀ de las AMSCs (0.98 mM) es un 40% mayor que la de los fibroblastos (0.7 mM).

Dado que las AMSCs poseen una mayor capacidad de respuesta al estrés oxidativo, parece lógico utilizar estas células para proteger otras poblaciones celulares contra el daño oxidativo. En nuestro estudio, se llevó a cabo un modelo de terapia celular *in vitro* mediante el co-cultivo de AMSCs con fibroblastos previamente sometidos a estrés oxidativo. Se pudo apreciar una recuperación de la proliferación de dichos fibroblastos, como consecuencia de la actividad de las AMSCs. Otros autores han obtenido resultados similares con BM-MSCs de rata sobre células PC12 (Zhang y cols., 2012) y sobre células endoteliales murinas de los islotes de Langerhans (Wang y cols., 2017), en ambos casos sometidas a oxidación con H₂O₂.

Existen diferentes hipótesis sobre los mecanismos de acción de las AMSCs para reparar los órganos y tejidos dañados: *i*, las interacciones célula-célula mediadas por TNT y *ii*, la actividad paracrina de los factores de crecimiento, citocinas y vesículas extracelulares (Spees y cols., 2016). Teniendo en cuenta que en nuestro estudio no existe contacto directo entre ambas poblaciones celulares, es lógico pensar que la recuperación de los fibroblastos se deba a la acción paracrina de las AMSCs, mediante la liberación de diferentes factores al medio de cultivo. Hay que tener en cuenta que dicho estudio experimental se realizó en ausencia de SBF, para evitar el enmascaramiento de éste sobre el potencial efecto paracrino de las AMSCs. Por ello, posteriormente se decidió analizar las modificaciones que se produjeron en las AMSCs tras privarlas de SBF

durante 48 h (AMSCs-SD). Pudimos comprobar que dichas células sufrieron modificaciones funcionales tales como un aumento de su capacidad antioxidante y una mejor respuesta inicial al estrés oxidativo. Otros autores han observado que la privación de nutrientes evita una generación excesiva de ROS por parte de las MSCs, disminuyendo así la apoptosis mediada por el estrés oxidativo. Estos efectos han sido correlacionados con la activación a nivel molecular de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, *mammalian Target of Rapamycin*), dando lugar a la activación de Akt, lo que promueve la supervivencia celular (Choudhery y cols., 2012).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el cocultivo AMSCs–fibroblastos, se procedió a analizar en mayor profundidad el efecto paracrino de dichas células madre estudiando el efecto del medio acondicionado por las AMSCs-SD, M_{SD}, sobre los fibroblastos oxidados.

Pudimos observar que la capacidad antioxidante total de los fibroblastos oxidados y cultivados con M_{SD} fue similar a la de los oxidados y cultivados con medio estándar; sin embargo, dicho medio acondicionado produjo un ligero incremento de los niveles de GSH y de la proliferación de los fibroblastos a largo plazo. El incremento del GSH podría deberse a la mayor capacidad antioxidante del M_{SD} comparado con el medio de cultivo estándar, de hecho, algunos autores han demostrado una mayor presencia de antioxidantes como la SOD2, la estaniocalcina-1 y la hemooxigenasa-1, y la disminución de malondialdehído (indicador de peroxidación lipídica) en diferentes tejidos tratados con medio acondicionado (Liu y cols., 2012; Li y cols., 2012). Por otro lado, el aumento del número de fibroblastos viables podría ser consecuencia de la presencia en el M_{SD} de proteínas inhibitoras de la apoptosis como Bcl-2, survivina y Akt (Okazaki y cols., 2008; Wang y cols., 2012) o a una reducción de la expresión de TGF-β1 y TNF-α (Liu y cols., 2017). Sin embargo, en contra de lo esperado, se produjo también un incremento de los niveles de ROS en los fibroblastos oxidados y tratados con M_{SD} respecto a los observados en las células oxidadas y cultivadas con medio estándar (grupo control). Otros autores han descrito, en modelos animales, que el medio acondicionado de diferentes células de gliomas induce de forma significativa la producción de la proteína iNOS y de NO en células microgliales sin alterar su viabilidad o la progresión del ciclo celular (Shen y cols., 2014). Dicho aumento de ROS podría estar compensando el incremento de los niveles

intracelulares de GSH y, por esta razón, no se observarían diferencias en la capacidad antioxidante total de las células oxidadas y cultivadas con M_{SD} respecto al control.

Una vez analizados de forma independiente los beneficios de la terapia farmacológica y la terapia celular, procedimos a combinar ambas estrategias terapéuticas para evaluar si el efecto protector contra el estrés oxidativo pudiera ser incrementado.

Mientras que con el tratamiento con NAC se produce solamente un efecto inicial (a las 24 h) sobre la recuperación de los fibroblastos oxidados y con el tratamiento con las AMSCs en co-cultivo el efecto se observa a medio (48 h) y largo plazo (72 h), al combinar ambas terapias (NAC y AMSCs en co-cultivo), se observó un beneficio terapéutico durante todo el proceso (24 - 72 h) respecto a los fibroblastos control. Algo similar ocurre cuando analizamos el efecto aislado del M_{SD} sobre la proliferación de los fibroblastos oxidados, cuyo aumento se aprecia únicamente a largo plazo (72 h), mientras que la combinación NAC + M_{SD} produjo también una mejora durante todo el proceso (24 – 72 h). Si analizamos los resultados a 72 h, observamos que el tratamiento de los fibroblastos oxidados con la terapia combinada NAC + M_{SD} aporta un beneficio adicional respecto al tratamiento con M_{SD} únicamente. Sin embargo, dicho aumento en la proliferación no se observó en la terapia combinada de NAC + AMSCs respecto a la terapia aislada de co-cultivo con AMSCs.

Tras comprobar que el beneficio de la terapia celular puede ser incrementado mediante un aumento de la capacidad antioxidante, como la ejercida por la NAC, nos planteamos mejorar la capacitación de las AMSCs con el precondicionamiento de dichas células mediante la exposición repetida a niveles bajos de estrés oxidativo. El precondicionamiento está basado en el concepto biológico de la hormesis, mediante el cual una corta exposición a bajas dosis de un agente tóxico provoca cambios metabólicos y funcionales que producen una mayor capacidad de respuesta de las células ante una nueva exposición a dicho agente (Sart y cols., 2014). Como ya se ha comentado en el apartado de la introducción, existen diferentes métodos de precondicionamiento, tanto con factores físicos como químicos, mediante los cuales se

induce la expresión de genes citoprotectores, así como la secreción de factores que contribuyen a la reparación del daño.

En nuestro estudio realizamos un precondicionamiento oxidativo de las AMSCs con dosis bajas de H₂O₂ (0.01 mM) durante siete días (AMSCs-P). Estudios *in vitro* llevados a cabo por otros autores también indican que la exposición de células madre a bajas concentraciones de oxidante durante cortos períodos de tiempo promueve la supervivencia de dichas células (Sharma y cols., 2008). A nivel molecular, la exposición crónica al estrés oxidativo da lugar a la producción de ROS por parte de la mitocondria, lo que provoca la activación de la ruta ERK, activando la expresión de proteínas anti-apoptóticas (Sart y cols., 2014). Del mismo modo, se ha descrito que diferentes tipos celulares también se adaptan a un aumento de la exposición a oxidantes para reducir el riesgo del daño derivado de la exposición a mayores concentraciones de oxidación. Por ejemplo, los linfocitos aumentan su actividad SOD, CAT y GPX como mecanismo adaptativo (Khassaf y cols., 2003). Incluso, en modelos animales con infarto de miocardio se ha observado un aumento de la supervivencia y una mejora de las funciones cardíacas tras el precondicionamiento celular con H₂O₂ (Pendergrass y cols., 2013; Zhang y cols., 2012).

Procedimos a analizar los cambios provocados por dicho precondicionamiento en las AMSCs-P y observamos un aumento de su capacidad antioxidante y, en consecuencia, una evidente recuperación de la proliferación en situación de estrés oxidativo respecto a las AMSCs no precondicionadas. Estos resultados pueden estar relacionados con las modificaciones moleculares de las AMSCs-P; en situación de estrés oxidativo no se observan cambios en la expresión de IGF-1, IL-1 β y COX-2 respecto a las AMSCs-P sin oxidar, probablemente debido a que se encuentran en una situación de activación inducida por el precondicionamiento, es decir, las AMSCs-P oxidadas han activado su mecanismo de respuesta gracias al precondicionamiento y, por lo tanto, ya están preparadas para afrontar una nueva situación de estrés oxidativo. Sin embargo, las AMSCs no tienen activado dicho mecanismo y, en consecuencia, su capacidad de respuesta a la oxidación puede estar más limitada, lo que se traduce en una reducción de su capacidad proliferativa.

Una vez observado el efecto positivo del precondicionamiento oxidativo sobre las AMSCs, se analizó el medio acondicionado por dichas células (MP_{SD}) y su efecto sobre los fibroblastos. Dicho medio se obtuvo tras 48 h de cultivo de las AMSCs-P en ausencia de SBF, para evitar enmascarar el posible efecto inductor de la proliferación de dicho SBF. Por lo tanto, la obtención del MP_{SD} conlleva un doble precondicionamiento, en primer lugar oxidativo y, en segundo lugar, de privación de nutrientes.

El resultado del tratamiento con MP_{SD} sobre la proliferación de los fibroblastos no expuestos a oxidación fue similar al obtenido con M_{SD}. Sin embargo, en los fibroblastos oxidados y cultivados con MP_{SD} se observó un aumento de la capacidad antioxidante celular total (aunque no detectamos un incremento del GSH) y proliferativa respecto a los oxidados y cultivados con M_{SD}. Esto es debido, al menos en parte, al incremento de la capacidad antioxidante del MP_{SD} respecto al M_{SD}. Otros autores también señalan un aumento de la capacidad antioxidante del secretoma de las AMSCs tras su precondicionamiento con deferoxamina, un agente quelante que mimetiza una situación de hipoxia, así como una disminución de la tasa apoptótica de las neuronas incubadas con dicho secretoma (Oses y cols., 2017). Estudios en animales también indican que los exosomas obtenidos tras el precondicionamiento con hipoxia de las AMSCs, promueven la neovascularización y atenúan la inflamación (Han y cols., 2018).

En definitiva, nuestros resultados sugieren que el precondicionamiento de las AMSCs con dosis bajas de H₂O₂ aumenta la capacitación de dichas células para hacer frente a una nueva situación de estrés oxidativo y modifica la composición de su secretoma, aumentando su capacidad antioxidante. La eficacia de dicho secretoma para mantener el equilibrio redox y, por tanto, mejorar la recuperación celular tras el daño ejercido por el estrés oxidativo, sugiere una alternativa terapéutica a la utilización de las propias células, minimizando así el riesgo de formación de tumores y la variabilidad biológica.

VII. CONCLUSIONES

1. El estrés oxidativo inducido mediante la exposición *in vitro* a H₂O₂, reduce la viabilidad de los fibroblastos de forma dosis dependiente, situándose la IC₅₀ en nuestro modelo en 0.7 mM.
2. El tratamiento de los fibroblastos oxidados con NAC permite aumentar los niveles intracelulares de GSH y disminuir los niveles de ROS, pero no produce una recuperación de la proliferación celular a largo plazo.
3. Las AMSCs, en condiciones de co-cultivo en ausencia de SBF, inducen una recuperación de la proliferación de los fibroblastos previamente sometidos a estrés oxidativo.
4. Las AMSCs privadas de SBF incrementan su capacidad antioxidante y mejoran su capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo.
5. El tratamiento con M_{SD} de los fibroblastos sometidos a estrés oxidativo, produce un aumento de la viabilidad celular y de los niveles intracelulares de GSH.
6. En los fibroblastos sometidos a oxidación, la eficacia de la terapia celular con AMSCs, tanto en co-cultivo como con el tratamiento con M_{SD}, se ve incrementada con la adición de NAC al medio de cultivo.
7. El precondicionamiento de las AMSCs mediante la exposición repetida a niveles bajos de H₂O₂, provoca cambios funcionales y metabólicos en dichas células. Se produce un aumento de su capacidad antioxidante y de respuesta proliferativa ante un nuevo estrés oxidativo, lo cual está asociado a la regulación de la expresión de genes relacionados con el proceso inflamatorio (COX-2, NF-κB, IGF-1 e IL-1β).
8. El MP_{SD} ejerce un mayor efecto terapéutico sobre los fibroblastos oxidados que el M_{SD} debido, al menos en parte, a un incremento en la capacidad antioxidante del MP_{SD}.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abd-El-Aleem SA, Ferguson MW, Appleton I, Bhowmick A, McCollum CN, Ireland GW. Expression of cyclooxygenase isoforms in normal human skin and chronic venous ulcers. *J Pathol* 2001;195(5):616-23.

Abdollahzad H, Aghdashi MA, Asghari Jafarabadi M, Alipour B. Effects of coenzyme Q supplementation on inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6) and oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: a randomized controlled trial. *Arch Med Res* 2015;46(7):527-33.

Abreu IA, Cabelli DE. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804(2):263-74.

Ahmadinejad F, Geir Moller S, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Bidkhorji G, Jami MS. Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress. *Antioxidants (Basel)* 2017;6(3).

Akdis CA. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. *Nat Med* 2012;18(5):736-49.

Amer MH, Rose FR, White LJ, Shakesheff KM. A detailed assessment of varying ejection rate on delivery efficiency of mesenchymal stem cells using narrow-bore needles. *Stem Cells Transl Med* 2016;5(3):366-78.

Andreadis AA, Hazen SL, Comhair SA, Erzurum SC. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med* 2003;35(3):213-25.

Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* 2001;20(19):2413-23.

Angoulvant D, Ivanes F, Ferrera R, Matthews PG, Nataf S, Ovize M. Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 2011;30(1):95-102.

Arpa J, Sanz-Gallego I, Rodríguez-de-Rivera FJ, Domínguez-Melcón FJ, Prefasi D, Oliva-Navarro J, et al. Triple therapy with deferiprone, idebenone and riboflavin in Friedreich's ataxia-open-label trial. *Acta Neurol Scand* 2014;129(1):32-40.

Aslanabadi N, Safaie N, Asgharzadeh Y, Houshmand F, Ghaffari S, Garjani A, et al. The randomized clinical trial of coenzyme Q10 for the prevention of periprocedural myocardial injury following elective percutaneous coronary intervention. *Cardiovasc Ther* 2016;34(4):254-60.

Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int* 2012;2012:812693.

Bahorun T, Soobrattee MA, Luximon-Ramma V, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *IJMU* 2006;1:1-17.

Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-derived stem cells as a tool in cell-based therapies. *Arch Immunol Ther Exp* 2016;64(6):443-54.

Barbieri E, Sestili P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct* 2012;2012:982794.

Barford D, Jia Z, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases take off. *Nat Struct Biol* 1995;2(12):1043-53.

Barrett WC, DeGnore JP, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, Chock PB. Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 1999;274(49):34543-6.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16(5):585-601.

Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26(7):812-20.

Bentzinger CF, Wang YX, von Maltzahn J, Rudnicki MA. The emerging biology of muscle stem cells: implications for cell-based therapies. *Bioessays* 2013;35(3):231-41.

Bhabak KP, Mugesh G. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. *Acc Chem Res* 2010;43(11):1408-19.

- Bollrath J, Greten FR. IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep* 2009;10(12):1314-9.
- Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 2007;581(19):3582-91.
- Bruick RK. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev* 2003;17(21):2614-23.
- Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol* 2001;22(4):199-204.
- Butkowski EG, Brix LM, Al-Aubaidy HA, Kiat H, Jelinek HJ. Diabetes, oxidative stress and cardiovascular risk. *J Med Clin Sci* 2016;5(1):17-23.
- Butterfield DA. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res* 2002;36(12):1307-13.
- Buyse GM, Voit T, Schara U, Straathof CS, D'Angelo MG, Bernert G, et al. Treatment effect of idebenone on inspiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Pulmonol* 2017;52(4):508-15.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1993;14(3):303-11.
- Capelli C, Gotti E, Morigi M, Rota C, Weng L, Dazzi F, et al. Minimally manipulated whole human umbilical cord is a rich source of clinical-grade human mesenchymal stromal cells expanded in human platelet lysate. *Cytotherapy* 2011;13(7):786-801.
- Caramori G, Papi A. Oxidants and asthma. *Thorax* 2004;59(2):170-3.

Carrière A, Ebrahimian TG, Dehez S, Augé N, Joffre C, André M, et al. Preconditioning by mitochondrial reactive oxygen species improves the proangiogenic potential of adipose-derived cells-based therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(7):1093-9.

Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Marchetti P, Macho A, et al. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 1996;157(2):512-21.

Castro B, Palomares T, Azcoitia I, Bastida F, del Olmo M, Soldevilla JJ, et al. Development and preclinical evaluation of a new galactomannan-based dressing with antioxidant properties for wound healing. *Histol Histopathol* 2015;30(12):1499-512.

Cefalo MG, Carai A, Miele E, Po A, Ferretti E, Mastronuzzi A, et al. Human iPSC for therapeutic approaches to the nervous system: present and future applications. *Stem Cells Int* 2016;2016:4869071.

Cencioni C, Melchionna R, Straino S, Romani M, Cappuzzello C, Annesse V, et al. Ex vivo acidic preconditioning enhances bone marrow ckit+ cell therapeutic potential via increased CXCR4 expression. *Eur Heart J* 2013;34(26):2007-16.

Cereda C, Gagliardi S, Cova E, Diamanti L, Ceroni M. The role of TNF- α in ALS: New hypotheses for future therapeutic approaches. Amyotrophic Lateral Sclerosis, Prof. Martin Maurer (Ed), *InTech*, 2012;doi: 10.5772/31223.

Ceriello A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care* 2008;31 Suppl 2:S181-4.

Chacko SM, Ahmed S, Selvendiran K, Kuppusamy ML, Khan M, Kuppusamy P. Hypoxic preconditioning induces the expression of prosurvival and proangiogenic markers in mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;299(6):C1562-70.

Chang HR, Kim HJ, Xu X, Ferrante AW Jr. Macrophage and adipocyte IGF1 maintain adipose tissue homeostasis during metabolic stresses. *Obesity* 2016;24(1):172-83.

Chatterjee M, Saluja R, Kanneganti S, Chinta S, Dikshit M. Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Biol* 2007;53(1):84-93.

Chin MP, Reisman SA, Bakris GL, O'Grady M, Linde PG, McCullough PA, et al. Mechanisms contributing to adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus and stage 4 chronic kidney disease treated with bardoxolone methyl. *Am J Nephrol* 2014;39(6):499-508.

Choudhery MS, Khan M, Mahmood R, Mohsin S, Akhtar S, Ali F, et al. Mesenchymal stem cells conditioned with glucose depletion augments their ability to repair-infarcted myocardium. *J Cell Mol Med* 2012;16(10):2518-29.

Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71(2):621S-629S.

Ciancarelli I, Di Massimo C, De Amicis D, Carolei A, Tozzi Ciancarelli MG. Evidence of redox unbalance in post-acute ischemic stroke patients. *Curr Neurovasc Res* 2012;9(2):85-90.

Clark RA. Oxidative stress and "senescent" fibroblasts in non-healing wounds as potential therapeutic targets. *J Invest Dermatol* 2008;128(10):2361-4.

Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2 Suppl 2):S53-72.

Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature* 1954;174(4432):689-91.

Conti E, Pitocco D, Capoluongo E, Zuppi C, Ghirlanda G, Crea F, Andreotti F. IGF-1 and macrovascular complications of diabetes. *Diabetes Care* 2003;26(5):1653-4.

Das R, Jahr H, van Osch GJ, Farrel E. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16(2):159-68.

de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2005;6(8):844-51.

De Trizio E, Brennan CS. The business of human embryonic stem cell research and an international analysis of relevant laws. *J Biolaw Bus* 2004;7(4):14-22.

de Zeeuw D, Akizawa T, Audhya P, Bakris GL, Chin M, Christ-Schmidt H, et al; BEACON Trial Investigators. Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2013;369(26):2492-503.

Dennis JM, Witting PK. Protective role for antioxidants in acute kidney disease. *Nutrients* 2017;9(7).pii:E718.

Denu JM, Tanner KG. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 1998;37(16):5633-42.

Derosa G, D'Angelo A, Romano D, Maffioli P. A clinical trial about a food supplement containing α -lipoic acid on oxidative stress markers in type 2 diabetic patients. *Int JMol Sci* 2016;17(11).pii:E1802.

Deschepper M, Oudina K, David B, Myrtil V, Collet C, Bensidhoum M, et al. Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *J Cell Mol Med* 2011;15(7):1505-14.

Dietrich I, Crescenzi A, Chaib E, D'Albuquerque LA. Trophic effects of adipose derived stem cells on Langerhans islets viability—Review. *Transplant Rev (Orlando)* 2015;29(3):121-6.

Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11(8):633-52.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82(1):47-95.

Dysken MW, Guarino PD, Vertrees JE, Asthana S, Sano M, Llorente M, et al. Vitamin E and memantine in Alzheimer's disease: clinical trial methods and baseline data. *Alzheimers Dement* 2014;10(1):36-44.

Eastlack RK, Garfin SR, Brown CR, Meyer SC. Osteocel Plus cellular allograft in anterior cervical discectomy and fusion: evaluation of clinical and radiographic outcomes from a prospective multicenter study. *Spine* 2014;39(22):E1331-7.

Elbini Dhouib I, Jallouli M, Annabi A, Gharbi N, Elfazaa S, Lasram MM. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci* 2016;151:359-63.

Eljaafari A, Robert M, Chehimi M, Chanon S, Durand C, Vial G, et al. Adipose tissue-derived stem cells from obese subjects contribute to inflammation and reduced insulin response in adipocytes through differential regulation of the Th1/Th17 balance and monocyte activation. *Diabetes* 2015; 64(7):2477-88.

Emet S, Memis D, Pamukçu Z. The influence of N-acetyl-L-cystein infusion on cytokine levels and gastric intramucosal pH during severe sepsis. *Crit Care* 2004;8(4):R172-9.

Ezquer M, Urzua CA, Montecino S, Leal K, Conget P, Ezquer F. Intravitreal administration of multipotent mesenchymal stromal cells triggers a cytoprotective microenvironment in the retina of diabetic mice. *Stem Cell Res Ther* 2016;7:42.

Farsi F, Mohammadshahi M, Alavinejad P, Rezazadeh A, Zarei M, Engali KA. Functions of coenzyme Q10 supplementation on liver enzymes, markers of systemic inflammation, and adipokines in patients affected by nonalcoholic fatty liver disease: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Am Coll Nutr* 2016;35(4):346-53.

Feldman N, Rotter-Maskowitz A, Okun E. DAMPs as a mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res Rev* 2015;24(Pt A):29-39.

Feng Y, Huang W, Meng W, Jegga AG, Wang Y, Cai W, et al. Heat shock improves Sca-1+ stem cell survival and directs ischemic cardiomyocytes toward a prosurvival phenotype via exosomal transfer: a critical role for HSF1/miR-34a/HSP70 pathway. *Stem Cells* 2014;32(2):462-72.

Feru J, Delobbe E, Ramont L, Brassart B, Terryn C, Dupont-Deshorgue A, et al. Aging decreases collagen IV expression in vivo in the dermo-epidermal junction and in vitro in dermal fibroblasts: possible involvement of TGF- β 1. *Eur J Dermatol* 2016;26(4):350-60.

Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 2007;42(2):153-64.

Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24(4):150-4.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6(2):230-47.

Fujii S, Akaike T. Redox signaling by 8-nitro-cyclic guanosine monophosphate: Nitric oxide- and reactive oxygen species-derived electrophilic messenger. *Antioxid Redox Signal* 2013;19(11):1236-46.

Fujisawa S, Ishihara M, Atsumi T, Kadoma Y. A quantitative approach to the free radical interaction between alpha-tocopherol or ascorbate and flavonoids. *In Vivo* 2006;20(4):445-52.

Galle J. Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(11):2135-7.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 2013;39(6):1003-18.

Ghaedi M, Niklason LE. Human pluripotent stem cells (iPSC) generation, culture, and differentiation to lung progenitor cells. *Methods Mol Biol* 2016;doi:10.1007/7651_2016_11.

Ghaffari J, Farid Hossiani R, Khalilian A, Nahanmoghadam N, Salehifar E, Rafatpanah H. Vitamin e supplementation, lung functions and clinical manifestations in children with moderate asthma: a randomized double blind placebo-controlled trial. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2014;13(2):98-103.

- Ghosh S, Erzurum SC. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 2011;1810(11):1008-16.
- Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006;25(51):6680-4.
- Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med* 2015;87:84-97.
- Gokbel H, Turk S, Okudan N, Atalay H, Belviranli M, Gaipov A, et al. Effects of coenzyme Q10 supplementation on exercise performance and markers of oxidative stress in hemodialysis patients: a double-blind placebo-controlled crossover trial. *Am J Ther* 2016;23(6):e1736-43.
- Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(12):931-47.
- Goszcz K, Deakin SJ, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL. Antioxidants in cardiovascular therapy: panacea or false hope? *Front Cardiovasc Med* 2015;2:29.
- Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21(1):11-9.
- Guadix JA, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy. *Med Clin* 2017;148(9):408-14.
- Gumral N, Naziroglu M, Ongel K, Beydilli ED, Ozguner F, Sutcu R, et al. Antioxidant enzymes and melatonin levels in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease during stable and exacerbation periods. *Cell Biochem Funct* 2009;27(5):276-83.
- Guo Q, Packer L. Ascorbate-dependent recycling of the vitamin E homologue Trolox by dihydrolipoate and glutathione in murine skin homogenates. *Free Radic Biol Med* 2000;29(3-4):368-74.

Guo RF, Ward PA. Role of oxidants in lung injury during sepsis. *Antiox Redox Signal* 2007;9(11):1991-2002.

Guo Y, Tang CY, Man XF, Tang HN, Tang J, Zhou CL, et al. Insulin-like growth factor-1 promotes osteogenic differentiation and collagen I alpha 2 synthesis via induction of mRNA-binding protein LARP6 expression. *Dev Growth Differ* 2017;59(2):94-103.

Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol* 2007;179(3):1855-63.

Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. Oxford Press; Oxford: 2007. p. 936.

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001;18(9):685-716.

Han YD, Bai Y, Yan XL, Ren J, Zeng Q, Li XD, et al. Co-transplantation of exosomes derived from hypoxia-preconditioned adipose mesenchymal stem cells promotes neovascularization and graft survival in fat grafting. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;497(1):305-12.

Haque N, Kasim NH, Rahman MT. Optimization of pre-transplantation conditions to enhance the efficacy of mesenchymal stem cells. *Int J Biol Sci* 2015;11(3):324-34.

Hasegawa S, Jao TM, Inagi R. Dietary metabolites and chronic kidney disease. *Nutrients* 2017;9(4).pii:E358.

Hassiotou F, Beltran A, Chetwynd E, Stuebe AM, Twigger AJ, Metzger P, et al. Breastmilk is a novel source of stem cells with multilineage differentiation potential. *Stem Cells* 2012;30(10):2164-74.

Havrdova E, Giovannoni G, Gold R, Fox RJ, Kappos L, Phillips JT, et al. Effect of delayed-release dimethyl fumarate on no evidence of disease activity in relapsing-remitting multiple sclerosis: integrated analysis of the phase III DEFINE and CONFIRM studies. *Eur J Neurol* 2017;24(5):726-33.

He G, Karin M. NF-kappaB and STAT3-Key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res* 2011;21(1):159-68.

He N, Xu Y, Du W, Qi X, Liang L, Wang Y, et al. Extracellular matrix can recover the downregulation of adhesion molecules after cell detachment and enhance endothelial cell engraftment. *Sci Rep* 2015;5:10902.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002;13(10):572-84.

Hernández JC, Urcuqui S. Activación y regulación del inflammasoma NLRP3 en las enfermedades infecciosas. *Iatreia* 2012;25(4):380-90.

Herrmann JL, Wang Y, Abarbanell AM, Weil BR, Tan J, Meldrum DR. Preconditioning mesenchymal stem cells with transforming growth factor-alpha improves mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection. *Shock* 2010;33(1):24-30.

Hochberg I, Berinstein EM, Milman U, Shapira C, Levy AP. Interaction between the haptoglobin genotype and vitamin E on cardiovascular disease in diabetes. *Curr Diab Rep* 2017;17(6):42.

Hoffmann C, Dietrich M, Herrmann AK, Schacht T, Albrecht P, Methner A. Dimethyl fumarate induces glutathione recycling by upregulation of glutathione reductase. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:6093903.

Hoshino Y, Mishima M. Redox-based therapeutics for lung diseases. *Antiox Redox Signal* 2008;10(4):701-4.

Hu C, Cao H, Pan X, Li J, He J, Pan Q, et al. Adipogenic placenta-derived mesenchymal stem cells are not lineage restricted by withdrawing extrinsic factors: developing a novel visual angle in stem cell biology. *Cell Death Dis* 2016;7:e2141.

Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, Wang JA, et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135(4):799-808.

Hurst GA, Shaw PB, LeMaistre CA. Laboratory and clinical evaluation of the mucolytic properties of acetylcysteine. *Am Rev Respir Dis* 1967;96(5):962-70.

Im GI. Bone marrow-derived stem/stromal cells and adipose tissue-derived stem/stromal cells: Their comparative efficacies and synergistic effects. *J Biomed Mater Res A* 2017;105(9):2640-8.

Imtiyaz HZ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;345:105-20.

Iniaghe LO, Krafft PR, Klebe DW, Omogbai EKI, Zhang JH, Tang J. Dimethyl fumarate confers neuroprotection by casein kinase 2 phosphorylation of Nrf2 in murine intracerebral hemorrhage. *Neurobiol Dis* 2015;82:349-58.

Jaber S, Polster BM. Idebenone and neuroprotection: antioxidant, pro-oxidant, or electron carrier? *J Bioenerg Biomembr* 2015;47(1-2):111-8.

Jacobson MD, Burne JF, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J* 1994;13(8):1899-910.

Jain M, Aneja S, Mehta G, Ray GN, Batra S, Randhava VS. CSF interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and free radicals production in relation to clinical outcome in acute bacterial meningitis. *Indian Pediatr* 2000;37(6):608-14.

Jana S, Maiti AK, Bagh MB, Banerjee K, Das A, Roy A, et al. Dopamine but not 3,4-dihydroxy phenylacetic acid (DOPAC) inhibits brain respiratory chain activity by autoxidation and mitochondria catalyzed oxidation to quinone products: implications in Parkinson's disease. *Brain Res* 2007;1139:195-200.

Jia YP, Sun L, Yu HS, Liang LP, Li W, Ding H, et al. The pharmacological effects of lutein and zeaxanthin on visual disorders and cognition diseases. *Molecules* 2017;22(4).pii:E610.

Jin SM, Han KA, Yu JM, Sohn TS, Choi SH, Chung CH, et al. Probucol in albuminuric type 2 diabetes mellitus patients on renin-angiotensin system blockade: a 16-week,

randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arteriol Thromb Vasc Biol* 2016;36(19):2108-14.

Jing X, Shi H, Zhang C, Ren M, Han M, Wei X, et al. Dimethyl fumarate attenuates 6-OHDA-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells and in animal model of Parkinson's disease by enhancing Nrf2 activity. *Neuroscience* 2015;286:131-40.

Kagan VE, Serbinova EA, Forte T, Scita G, Packer L. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1992;33(3):385-97.

Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 2013;1:244-57.

Kamata H, Manabe T, Oka Si, Kamata K, Hirata H. Hydrogen peroxide activates I κ B kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *FEBS Lett* 2002;519(1-3):231-7.

Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BH. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Anal Biochem* 2000;286(1):35-7.

Kaste M, Murayama S, Ford GA, Dippel DW, Walters MR, Tatlisumak T; MCI-186 study group. Safety, tolerability and pharmacokinetics of MCI-186 in patients with acute ischemic stroke: new formulation and dosing regimen. *Cerebrovasc Dis* 2013;36(3):196-204.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells* 2006;24(5):1294-301.

Khalili M, Azimi A, Izadi V, Eghtesadi S, Mirshafiey A, Sahraian MA, et al. Does lipoic acid consumption affect the cytokine profile in multiple sclerosis patients: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Neuroimmunomodulation* 2014;21(6):291-6.

Khan M, Akhtar S, Mohsin S, N Khan S, Riazuddin S. Growth factor preconditioning increases the function of diabetes-impaired mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2011;20(1):67-75.

Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, et al. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J Neurosci Res* 2004;76(4):519-27.

Khassaf M, McArdle A, Esanu C, Vasilaki A, McArdle F, Griffiths RD, et al. Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *J Physiol* 2003;549(Pt 2):645-52.

Khatami PG, Soleimani A, Sharifi N, Aghadavod E, Asemi Z. The effects of high-dose vitamin E supplementation on biomarkers of kidney injury, inflammation, and oxidative stress in patients with diabetic nephropathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Lipidol* 2016;10(4):922-9.

Kim NH, Choi S, Han EJ, Hong BK, Choi SY, Kwon HM, et al. The xanthine oxidase-NFAT5 pathway regulates macrophage activation and TLR-induced inflammatory arthritis. *Eur J Immunol* 2014;44(9):2721-36.

Kim Y, Jo SH, Kim WH, Kweon OK. Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:229.

Klopstock T, Metz G, Yu-Wai-Man P, Büchner B, Gallenmüller C, Bailie M, et al. Persistence of the treatment effect of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 2013;136(Pt 2):e230.

Knebel A, Rahmsdorf HJ, Ullrich A, Herrlich P. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J* 1996;15(19):5314-25.

Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 2004;24(16):7130-9.

Koepfen M, Eckle T, Eltzschig HK. The hypoxia-inflammation link and potential drug targets. *Curr Opin Anaesthesiol* 2011;24(4):363-9.

Koerner J, Nesic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan SP. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24(6):1613-9.

Kozakowska M, Pietraszek-Gremplewicz K, Jozkowicz A, Dulak J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J Muscle Res Cell Motil* 2015;36(6):377-93.

Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24(2):386-98.

Kushiya A, Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamoto T, Mori K, Ueda K, et al. Role of uric acid metabolism-related inflammation in the pathogenesis of metabolic syndrome components such as atherosclerosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Mediators Inflamm* 2016;2016:8603164.

Lander HM, Milbank AJ, Tauras JM, Hajjar DP, Hempstead BL, Schwartz GD, et al. Redox regulation of cell signalling. *Nature* 1996;381(6581):380-1.

Lara-Diaz VJ, Castilla-Cortazar I, Martín-Estal I, García-Magariño M, Aguirre GA, Puche JE, et al. IGF-1 modulates gene expression of proteins involved in inflammation, cytoskeleton, and liver architecture. *J Physiol Biochem* 2017;73(2):245-58.

Lass A, Sohal RS. Electron transport-linked ubiquinone-dependent recycling of alpha-tocopherol inhibits autooxidation of mitochondrial membranes. *Arch Biochem Biophys* 1998;352(2):229-36.

Lee JK, Jin HK, Endo S, Schuchman EH, Carter JE, Bae JS. Intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta deposition and rescues memory deficits in Alzheimer's disease mice by modulation of immune responses. *Stem Cells* 2010;28(2):329-43.

Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009; 5(1):54-63.

Lee SC, Kim JO, Kim SJ. Secretome from human adipose-derived stem cells protects mouse liver from hepatic ischemia-reperfusion injury. *Surgery* 2015;157(5):934-43.

Lee SH, Kim JS, Ravichandran K, Gil HW, Song HY, Hong SY. P-Glycoprotein induction ameliorates colistin induced nephrotoxicity in cultured human proximal tubular cells. *PLoS One* 2015;10(8):e0136075.

Lei Y, Wang K, Deng L, Chen Y, Nice EC, Huang C. Redox regulation of inflammation: old elements, a new story. *Med Res Rev* 2015;35(2):306-40.

Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, Chang CK, Lee ST, Fiore D, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med* 2015; 21(7):786-94.

Leslie NR. The redox regulation of PI 3-kinase-dependent signaling. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(9-10):1765-74.

Li F, Guo X, Chen SY. Function and Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med* 2017;4:32.

Li J, Li D, Liu X, Tang S, Wei F. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce systemic inflammation and attenuate LPS-induced acute lung injury in rats. *J Inflamm* 2012;9(1):33.

Liang X, Ding Y, Zhang Y, Tse HF, Lian Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant* 2014;23(9):1045-59.

Lijnen R, Otters E, Balak D, Thio B. Long-term safety and effectiveness of high-dose dimethylfumarate in the treatment of moderate to severe psoriasis: a prospective single-blinded follow-up study. *J Dermatolog Treat* 2016;27(1):31-6.

Linnane AW, Kios M, Vitetta L. Healthy aging: regulation of the metabolome by cellular redox modulation and prooxidant signaling systems: the essential roles of superoxide anion and hydrogen peroxide. *Biogerontology* 2007;8(5):445-67.

Liu B, Ding FX, Liu Y, Xiong G, Lin T, He DW, et al. Human umbilical cord-derived stem cells conditioned medium attenuate interstitial fibrosis and stimulate the repair of tubular epithelial cells in an irreversible model of unilateral ureteral obstruction. *Nephrology* 2017;doi:10.1111/nep.13099.

Liu D, Huang L, Wang Y, Wang W, Wehrens XH, Belousova T, et al. Human stanniocalcin-1 suppresses angiotensin II-induced superoxide generation in cardiomyocytes through UCP3-mediated anti-oxidant pathway. *PLoS One* 2012;7(5):e36994.

Liu L, Gao J, Yuan Y, Chang Q, Liao Y, Lu F. Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. *Cell Biol Int* 2013;37(6):551-60.

Liu P, Wang H, Zhang F, Chen Y, Wang D, Wang Y. The effects of allopurinol on the carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes and asymptomatic hyperuricemia: a three-year randomized parallel-controlled study. *Intern Med* 2015;54(17):2129-37.

Liu SS, Zhang C, Zhang X, Chen XH. Human umbilical cord blood-derived stromal cells: a new source of stromal cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014;90(2):93-8.

Lloret A, Badía MC, Mora NJ, Pallardó FV, Alonso MD, Viña J. Vitamin E paradox in Alzheimer's disease: it does not prevent loss of cognition and may even be detrimental. *J Alzheimers Dis* 2009;17(1):143-9.

MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol* 2001;429(1-3):195-207.

Madar S, Goldstein I, Rotter V. "Cancer associated fibroblasts"-more than meets the eye. *Trends Mol Med* 2013;19(8):447-53.

Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY, Baldwin AS Jr. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem* 2001;276(22):18934-40.

Mahajan A, Tandon VR. Antioxidants and rheumatoid arthritis. *Journal of Indian Rheumatology Association* 2004;12:139-42.

Mallis RJ, Buss JE, Thomas JA. Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines. *Biochem J* 2001;355(Pt 1):145-53.

Mancuso M, Orsucci D, Volpi L, Calsolaro V, Siciliano G. Coenzyme Q10 in neuromuscular and neurodegenerative disorders. *Curr Drug Targets* 2010;11(1):111-21.

Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiram Y, Morinaga C, Daimon T, et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med* 2017;376(11):1038-46.

Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW, Aggarwal BB. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem* 1998;273(21):13245-54.

Marchiani A, Rozzo C, Fadda A, Delogu G, Ruzza P. Curcumin and curcumin-like molecules: from spice to drugs. *Curr Med Chem* 2014;21(2):204-22.

Marshall HE, Stamler JS. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry* 2001;40(6):1688-93.

Massicot F, Martin C, Dutertre-Catella H, Ellouk-Achard S, Pham-Huy C, et al. Modulation of energy status and cytotoxicity induced by FK506 and cyclosporine A in a renal epithelial cell line. *Arch Toxicol* 1997;71(8):529-31.

Matsuzawa A, Ichijo H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 2005;7(3-4):472-81.

Matthews JR, Wakasugi N, Virelizier JL, Yodoi J, Hay RT. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* 1992;20(15):3821-30.

Medzhitov R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell* 2010;140(6):771-6.

Mehrabani D, Nazarabadi RB, Kasraeian M, Tamadon A, Dianatpour M, Vahdati A, et al. Growth kinetics, characterization, and plasticity of human menstrual blood stem cells. *Iran J Med Sci* 2016;41(2):132-9.

Mehrdadi P, Kolahehdouz Mohammadi R, Alipoor E, Eshraghian MR, Esteghamati A, Hosseinzadeh-Attar MJ. The effect of coenzyme Q10 supplementation on circulating levels of novel adipokine adipolin/CTRP12 in overweight and obese patients with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2017;125(3):156-62.

Menasché P, Vanneaux V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Parouchev A, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitors for severe ischemic left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2018;71(4):429-38.

Michal Freedman D, Kuncl RW, Weinstein SJ, Malila N, Virtamo J, Albanes D. Vitamin E serum levels and controlled supplementation and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2013;14(4):246-51.

Miguel FM, Schemitt EG, Colares JR, Hartmann RM, Morgan-Martins MI, Marroni NP. Action of vitamin E on experimental severe acute liver failure. *Arq Gastroenterol* 2017;54(2):123-9.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ. A new method for measuring antioxidant activity. *Biochem Soc Trans* 1993;21(2):95S.

Mirtaheri E, Gargari BP, Kolahi S, Dehghan P, Asghari-Jafarabadi M, Hajalilou M, et al. Effects of alpha-lipoic acid supplementation on inflammatory biomarkers and matrix metalloproteinase-3 rheumatoid arthritis patients. *J Am Coll Nutr* 2015;34(4):310-7.

Mitchell DA, Marletta MA. Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nat Chem Biol* 2005;1(3):154-8.

Mitchell DA, Morton SU, Fernhoff NB, Marletta MA. Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(28):11609-14.

Mitomo K, Nakayama K, Fujimoto K, Sun X, Seki S, Yamamoto K. Two different cellular redox systems regulate the DNA-binding activity of the p50 subunit of NF-kappa B in vitro. *Gene* 1994;145(2):197-203.

Mizukami A, Iso Y, Sato C, Sasai M, Spees JL, Toyoda M, et al. Priming with erythropoietin enhances cell survival and angiogenic effect of mesenchymal stem cell implantation in rat limb ischemia. *Regen Ther* 2016;4:1-8.

Mohammadi V, Khalili M, Eghtesadi S, Dehghani S, Jazayeri S, Aghababae SK, et al. The effect of alpha-lipoic acid (ALA) supplementation on cardiovascular risk factors in men with chronic spinal cord injury: a clinical trial. *Spinal Cord* 2015;53(8):621-4.

Mokhtari V, Afsharian P, Shahhoseini M, Kalantar SM, Moini A. A review on various uses of N-Acetyl Cysteine. *Cell J* 2017;19(1):11-7.

Monti DA, Zabrecky G, Kremens D, Liang TW, Wintering NA, Cai J, et al. N-Acetyl cysteine may support dopamine neurons in Parkinson's disease: preliminary clinical and cell line data. *PLoS One* 2016;11(6):e0157602.

Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, Gutteridge JM. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett* 1987;213(1):23-8.

Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res* 2011;21(1):103-15.

Morini M, Cai T, Aluigi MG, Noonan DM, Masiello L, De Flora S, et al. The role of the thiol N-acetylcysteine in the prevention of tumor invasion and angiogenesis. *Int J Biol Markers* 1999;14(4):268-71.

Moya A, Larochette N, Paquet J, Deschepper M, Bensidhoum M, Izzo V, et al. Quiescence preconditioned human multipotent stromal cells adopt a metabolic profile favorable for enhanced survival under ischemia. *Stem Cells* 2017;35(1):181-96.

Murata D, Miyakoshi D, Hatazoe T, Miura N, Tokunaga S, Fujiki M, et al. Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid. *Vet J* 2014;202(1):53-61.

Mutlu L, Hufnagel D, Taylor HS. The endometrium as a source of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Biol Reprod* 2015;92(6):138.

Mütze S, Hebling U, Stremmel W, Wang J, Arnhold J, Pantopoulos K, et al. Myeloperoxidase-derived hypochlorous acid antagonizes the oxidative stress-mediated activation of iron regulatory protein 1. *J Biol Chem* 2003;278(42):40542-9.

Nagase M, Yamamoto Y, Miyazaki Y, Yoshino H. Increased oxidative stress in patients with amyotrophic lateral sclerosis and the effect of edaravone administration. *Redox Rep* 2016;21(3):104-12.

Nascimento MM, Suliman ME, Silva M, Chinaglia T, Marchioro J, Hayashi SY, et al. Effect of oral N-acetylcysteine treatment on plasma inflammatory and oxidative stress markers in peritoneal dialysis patients: a placebo-controlled study. *Perit Dial Int* 2010;30(3):336-42.

Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell* 2010;140(6):871-82.

National Institutes of Health (NIH). <https://clinicaltrials.gov>

Nemoto S, DiDonato JA, Lin A. Coordinate regulation of I κ B kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF- κ B-inducing kinase. *Mol Cell Biol* 1998;18(12):7336-43.

Nishi K, Oda T, Takabuchi S, Oda S, Fukuda K, Adachi T, et al. LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(5):983-95.

Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J* 2007;21(7):1345-57.

Oka S, Kamata H, Kamata K, Yagisawa H, Hirata H. N-acetylcysteine suppresses TNF-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B kinases. *FEBS Lett* 2000;472(2-3):196-202.

Okafor ON, Farrington K, Gorog DA. Allopurinol as a therapeutic option in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 2017;172:139-50.

Okazaki T, Magaki T, Takeda M, Kajiwara Y, Hanaya R, Sugiyama K, et al. Intravenous administration of bone marrow stromal cells increases surviving and Bcl-2 protein expression and improves sensorimotor function following ischemia in rats. *Neurosci Lett* 2008;430(2):109-14.

Olatunji OJ, Chen H, Zhou Y. Neuroprotective effect of trans-N-caffeoyltyramine from *Lycium chinense* against H₂O₂ induced cytotoxicity in PC12 cells by attenuating oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 2017;93:895-902.

Omara FO, Blakley BR, Bernier J, Fournier M. Immunomodulatory and protective effects of N-acetylcysteine in mitogen-activated murine splenocytes in vitro. *Toxicology* 1997;116(1-3):219-26.

Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE, Abdel-Aleem S. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism* 1999;48(11):1414-7.

Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(26):11002-7.

Oses C, Olivares B, Ezquer M, Acosta C, Bosch P, Donoso M, et al. Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferoxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. *PLoS One* 2017;12(5):e0178011.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001;49(10):4619-26.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87(1):315-424.

Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 2003;22(1):18-35.

Pajonk F, Riess K, Sommer A, McBride WH. N-acetyl-cysteine inhibits 26S proteasome function: implications for effects on NF-kappaB activation. *Free Radic Biol Med* 2002;32(6):536-43.

Pantano C, Reynaert NL, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(9-10):1791-806.

Park MH, Jo M, Kim YR, Lee CK, Hong JT. Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases. *Pharmacol Ther* 2016;163:1-23.

Park SK, Kang JY, Kim JM, Park SH, Kwon BS, Kim GH, et al. Protective effect of fucoidan extract from *Ecklonia cava* on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity. *J Microbiol Biotechnol* 2018;28(1):40-9.

Park WH. H₂O₂ inhibits the growth of human pulmonary fibroblast cells by inducing cell death, GSH depletion and G1 phase arrest. *Mol Med Rep* 2013;7(4):1235-40.

Patlevič P, Vašková J, Švorc P Jr, Vaško L, Švorc P. Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integr Med Res* 2016;5(4):250-8.

Pendergrass KD, Boopathy AV, Seshadri G, Maiellaro-Rafferty K, Che PL, Brown ME, et al. Acute preconditioning of cardiac progenitor cells with hydrogen peroxide enhances angiogenic pathways following ischemia-reperfusion injury. *Stem Cells Dev* 2013;22(17):2414-24.

Peppers TA, Bullard DE, Vanichkachorn JS, Stanley SK, Arnold PM, Waldorff EI, et al. Prospective clinical and radiographic evaluation of an allogeneic bone matrix containing stem cells (Trinity Evolution® Viable Cellular Bone Matrix) in patients undergoing two-level anterior cervical discectomy and fusion. *J Orthop Surg Res* 2017;12(1):67.

Pérez LM, Bernal A, San Martín N, Lorenzo M, Fernández-Veledo S, Gálvez BG. Metabolic rescue of obese adipose-derived stem cells by Lin28/Let7 pathway. *Diabetes* 2013;62(7):2368-79.

Pergola PE, Raskin P, Toto RD, Meyer CJ, Huff JW, Grossman EB, et al; BEAM Study Investigators. Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2011;365(4):327-36.

Petersen RC, Thomas RG, Grundman M, Bennet D, Doody R, Ferris S, et al. Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *N Engl J Med* 2005;352(23):2379-88.

Peto R, Doll R, Buckley JD, Sporn MB. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* 1981;290(5803):201-8.

Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007;25(11):2896-902.

Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 2005;80(6):836-42.

Pineda-Molina E, Klatt P, Vazquez J, Marina A, Garcia de Lacoba M, Perez-Sala D, et al. Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* 2001;40(47):14134-42.

Pinteus S, Lemos MFL, Silva J, Alves C, Neugebauer A, Freitas R, et al. An insight into sargassum muticum cytoprotective mechanisms against oxidative stress on a human cell in vitro model. *Mar Drugs* 2017;15(11).pii:E353.

Pouvreau C, Dayre A, Butkowski EG, de Jong B, Jelinek HF. Inflammation and oxidative stress markers in diabetes and hypertension. *J Inflamm Res* 2018;11:61-8.

Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol* 2011;1(2):941-69.

Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther* 2012;20(1):14-20.

Pu X, Yu S, Fan W, Liu L, Ma X, Ren J. Guiqi polysaccharide protects the normal human fetal lung fibroblast WI-38 cells from H₂O₂-induced premature senescence. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(5):4398-407.

Qiao PF, Yao L, Zhang XC, Wu DQ. Heat shock pretreatment improves stem cell repair following ischemia-reperfusion injury via autophagy. *World J Gastroenterol* 2015;21(45):12822-34.

Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 2001;30(5):463-88.

Ramos-Ibeas P, Barandalla M, Colleoni S, Lazzari G. Pyruvate antioxidant roles in human fibroblasts and embryonic stem cells. *Mol Cell Biochem* 2017;429(1-2):137-50.

Rees MD, McNiven TN, Davies MJ. Degradation of extracellular matrix and its components by hypobromous acid. *Biochem J* 2007;401(2):587-96.

Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:376-86.

Ren H, Meng Q, Yepuri N, Du X, Sarpong JO, Cooney RN. Protective effects of glutathione on oxidative injury induced by hydrogen peroxide in intestinal epithelial cells. *J Surg Res* 2018;222:39-47.

Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett* 2008;582(13):1783-7.

Rochette L, Ghibu S, Muresan A, Vergely C. Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 2015;93(12):1021-7.

Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol* 2010;28:321-42.

Rodríguez-de la Rosa L, Lassaletta L, Calvino M, Murillo-Cuesta S, Varela-Nieto I. The role of insulin-like growth factor 1 in the progression of age-related hearing loss. *Front Aging Neurosci* 2017;9:411.

Rosenfeldt FL, Haas SJ, Krum H, Hadj A, Ng K, Leong JY, et al. Coenzyme Q10 in the treatment of hypertension: a meta-analysis of the clinical trials. *J Hum Hypertens* 2007;21(4):297-306.

Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt TK, Sen CK. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol Ther* 2006;13(1):211-20.

Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther* 2014;141(2):150-9.

Safa J, Ardalan MR, Rezazadehsaatlou M, Mesgari M, Mahdavi R, Jadid MP. Effects of alpha lipoic acid supplementation on serum levels of IL-8 and TNF- α in patient with ESRD undergoing hemodialysis. *Int Urol Nephrol* 2014;46(8):1633-8.

Salem HK, Thiernemann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 2010;28(3):585-96.

Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010;5(2):103-10.

Salinthon S, Yadav V, Bourdette DN, Carr DW. Lipoic acid: a novel therapeutic approach for multiple sclerosis and other chronic inflammatory diseases of the CNS. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2008;8(2):132-42.

Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, et al. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* 1997;336(17):1216-22.

Sanoobar M, Dehghan P, Khalili M, Azimi A, Seifar F. Coenzyme Q10 as a treatment for fatigue and depression in multiple sclerosis patients: a double blind randomized clinical trial. *Nutr Neurosci* 2016;19(3):138-43.

Sart S, Ma T, Li Y. Preconditioning stem cells for in vivo delivery. *Biores Open Access* 2014;3(4):137-49.

Satirapoj B, Wirajit O, Burata A, Supasyndh O, Ruangkanchnasetr P. Benefits of allopurinol treatment on blood pressure and renal function in patients with early stage of chronic kidney disease. *J Med Assoc Thai* 2015;98(12):1155-61.

Schieven GL, Kiriwara JM, Myers DE, Ledbetter JA, Uckun FM. Reactive oxygen intermediates activate NF-kappa B in a tyrosine kinase-dependent mechanism and in combination with vanadate activate the p56lck and p59fyn tyrosine kinases in human lymphocytes. *Blood* 1993;82(4):1212-20.

Schmidt D, Achermann J, Odermatt B, Genoni M, Zund G, Hoerstrup SP. Cryopreserved amniotic fluid-derived cells: a lifelong autologous fetal stem cell source for heart valve tissue engineering. *J Heart Valve Dis* 2008;17(4):446-55.

Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res* 2005;49(1):7-30.

Schonhaler HB, Guinea-Viniegra J, Wagner EF. Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. *Ann Rheum Dis* 2011;70(Suppl 1):i109-12.

Schrag M, Mueller C, Zabel M, Crofton A, Kirsch WM, Ghribi O, et al. Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. *Neurobiol Dis* 2013;59:100-10.

Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10(8):2247-58.

Schulman IH, Hare JM. Regulation of cardiovascular cellular processes by S-nitrosylation. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820(6):752-62.

Segal-Gavish H, Karvat G, Barak N, Barzilay R, Ganz J, Edry L, et al. Mesenchymal Stem Cell Transplantation Promotes Neurogenesis and Ameliorates Autism Related Behaviors in BTBR Mice. *Autism Res* 2016;9(1):17-32.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* 2007; 2007(407).

Separham A, Ghaffari S, Najafi H, Ghaffari R, Ziaee M, Babaei H, et al. The impact of allopurinol on patients with acute ST elevation myocardial infarction undergoing thrombolytic therapy. *J Cardiovasc Pharmacol* 2016;68(4):265-8.

Serbinova E, Kagan V, Han D, Packer L. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radic Biol Med* 1991;10(5):263-75.

Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: The beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005;6(12):1191-7.

Sharma RK, Zhou Q, Netland PA. Effect of oxidative preconditioning on neural progenitor cells. *Brain Res* 2008;1243:19-26.

Sheikh AM, Nagai A, Wakabayashi K, Narantuya D, Kobayashi S, Yamaguchi S, et al. Mesenchymal stem cell transplantation modulates neuroinflammation in focal cerebral ischemia: contribution of fractalkine and IL-5. *Neurobiol Dis* 2011;41(3):717-24.

Shen SC, Wu MS, Lin HY, Yang LY, Chen YH, Chen YC. Reactive oxygen species-dependent nitric oxide production in reciprocal interactions of glioma and microglial cells. *J Cell Physiol* 2014;229(12):2015-26.

Shepler B, Nash C, Smith C, Dimarco A, Petty J, Szewciw S. Update on potential drugs for the treatment of diabetic kidney disease. *Clin Ther* 2012;34(6):1237-46.

Shinto L, Quinn J, Montine T, Dodge HH, Woodward W, Baldauf-Wagner S, et al. A randomized placebo-controlled pilot trial of omega-3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014;38(1):111-20.

Singh AK, Vinayak M. Resveratrol alleviates inflammatory hyperalgesia by modulation of reactive oxygen species (ROS), antioxidant enzymes and ERK activation. *Inflamm Res* 2017;66(10):911-21.

Singh U, Devaraj S, Jialal I. Coenzyme Q10 supplementation and heart failure. *Nutr Rev* 2007;65(6 Pt 1):286-93.

Smythies LE, Shen R, Bimczok D, Novak L, Clements RH, Eckhoff DE, et al. Inflammation anergy in human intestinal macrophages is due to Smad-induced I κ B α expression and NF- κ B inactivation. *J Biol Chem* 2010;285(25):19593-604.

Song JW, Shim JK, Soh S, Jang J, Kwak YL. Double-blinded, randomized controlled trial of N-acetylcysteine for prevention of acute kidney injury in high risk patients undergoing off-pump coronary artery bypass. *Nephrology* 2015;20(2):96-102.

Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J* 2004;18(9):980-2.

Song WK, Park KM, Kim HJ, Lee JH, Choi J, Chong SY, et al. Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients. *Stem Cell Reports* 2015;4(5):860-72.

Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther* 2016;7(1):125.

Squires RH, Dhawan A, Alonso E, Narkewicz MR, Shneider BL, Rodriguez-Baez N, et al. Intravenous N-acetylcysteine in pediatric patients with nonacetaminophen acute liver failure: a placebo-controlled clinical trial. *Hepatology* 2013;57(4):1542-9.

Sriram G, Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *Eur J Cell Biol* 2015;94(11):483-512.

Staal FJ, Anderson MT, Staal GE, Herzenberg LA, Gitler C, Herzenberg LA. Redox regulation of signal transduction: tyrosine phosphorylation and calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(9):3619-22.

Stamp LK, Chapman PT, Barclay ML, Horne A, Frampton C, Tan P, et al. A randomized controlled trial of the efficacy and safety of allopurinol dose escalation to achieve target serum urate in people with gout. *Ann Rheum Dis* 2017;76(9):1522-8.

Sugiura H, Ichinose M. Nitrate stress in inflammatory lung diseases. *Nitric Oxide* 2011;25(2):138-44.

Szkudlinska MA, von Frankenberg AD, Utschneider KM. The antioxidant N-Acetylcysteine does not improve glucose tolerance or β -cell function in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 2016;30(4):618-22.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131(5):861-72.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblasts cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663-76.

Temraz S, Mukherji D, Shamseddine A. Potential targets for colorectal cancer prevention. *Int J Mol Sci* 2013;14(9):17279-303.

Teppala S, Shankar A. Association between serum IGF-1 and diabetes among U.S. adults. *Diabetes Care* 2010;33(10):2257-9.

Thal LJ, Grundman M, Berg J, Ernstrom K, Margolin R, Pfeiffer E, et al. Idebenone treatment fails to slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurology* 2003;61(11):1498-502.

Tibullo D, Li Volti G, Giallongo C, Grasso S, Tomassoni D, Anfuso CD, et al. Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and antiinflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. *Inflamm Res* 2017;66(11):947-59.

Tögel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289(1):F31-42.

Toledano MB, Leonard WJ. Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(10):4328-32.

Tonkin J, Temmerman L, Sampson RD, Gallego-Colon E, Barberi L, Bilbao D, et al. Monocyte/macrophage-derived IGF-1 orchestrates murine skeletal muscle regeneration and modulates autocrine polarization. *Mol Ther* 2015;23(7):1189-200.

Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009;8(7):579-91.

Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(8):1343-74.

Traynor K. FDA approves edaravone for amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Health Syst Pharm* 2017;74(12):868.

Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38(10):1654-61.

Utsunomiya T, Shimada M, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Mori H, et al. Human adipose-derived stem cells: potential clinical applications in surgery. *Surg Today* 2011;41(1):18-23.

Valenzuela C, Ancochea J. Treatment switching in idiopathic pulmonary fibrosis: from triple therapy to enrollment into a clinical investigational drug trial. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2013;30(1):44-7.

Valin A, Pablos JL. The role of transcriptional regulation of stromal cells in chronic inflammation. *Biomolecules* 2015;5(4):2723-57.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.

Van Landeghem L, Santoro MA, Mah AT, Krebs AE, Dehmer JJ, McNaughton KK, et al. IGF1 stimulates crypt expansion via differential activation of 2 intestinal stem cell populations. *FASEB J* 2015;29(7):2828-42.

Varela-López A, Giampieri F, Battino M, Quiles JL. Coenzyme Q and its role in the dietary therapy against aging. *Molecules* 2016;21(3):373.

Védrenes A. Cornelius Celsus A, *Traité de Médecine*, Traduction nouvelle par A. Védrenes, *Libre III, Paris, G. Masson Éditeur* 1876;136-48.

Vítek L. Bilirubin and atherosclerotic diseases. *Physiol Res* 2017;66(Suppl 1):S11-S20.

Volarevic V, Markovic BS, Gazdic M, Volarevic A, Jovicic N, Arsenijevic N, et al. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *Int J Med Sci* 2018;15(1):36-45.

Wagner EF. Bone development and inflammatory disease is regulated by AP-1 (Fos/Jun). *Ann Rheum Dis* 2010;69(Suppl 1):i86-8.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis* 2002;7(5):449-59.

Walston J, Xue Q, Semba RD, Ferrucci L, Cappola AR, Ricks M, et al. Serum antioxidants, inflammation, and total mortality in older women. *Am J Epidemiol* 2006;163(1):18-26.

Wang A, Al-Kuhlani M, Johnston SC, Ojcius DM, Chou J, Dean D. Transcription factor complex AP-1 mediates inflammation initiated by Chlamydia pneumoniae infection. *Cell Microbiol* 2012;15(5):779-94.

Wang J, Gong HM, Zou HH, Liang L, Wu XY. Isorhamnetin prevents H₂O₂-induced oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells. *Mol Med Rep* 2018;17(1):648-52.

Wang L, Bassiri M, Najafi R, Najafi K, Yang J, Khosrovi B, et al. Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part I. Stabilized hypochlorous acid: a component of the inorganic armamentarium of innate immunity. *J Burns Wounds* 2007;6:e5.

Wang L, Qing L, Liu H, Liu N, Qiao J, Cui C, et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate oxidative stress-induced islet endothelium apoptosis and functional impairment via Wnt4- β -catenin signaling. *Stem Cell Res Ther* 2017;8(1):188.

Wang SP, Wang ZH, Peng DY, Li SM, Wang H, Wang XH. Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in rats with intracerebral hemorrhage: reduced apoptosis and enhanced neuroprotection. *Mol Med Rep* 2012;6(4):848-54.

Wang W, Li D, Ding X, Zhao Q, Chen J, Tian K, et al. N-Acetylcysteine protects inner ear hair cells and spiral ganglion neurons from manganese exposure by regulating ROS levels. *Toxicol Lett* 2017;279:77-86.

Wang XL, Li T, Li JH, Miao SY, Xiao XZ. The effects of resveratrol on inflammation and oxidative stress in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease. *Molecules* 2017;22(9).pii:E1529.

Wang Y, Liu J, Tan X, Li G, Gao Y, Liu X, et al. Induced pluripotent stem cells from human hair follicle mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 2013;9(4):451-60.

Wang Y, Zeigler MM, Lam GK, Hunter MG, Eubank TD, Khramtsov VV, et al. The role of the NADPH oxidase complex, p38 MAPK, and Akt in regulating human monocyte/macrophage survival. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36(1):68-77.

Wei X, Du Z, Zhao L, Feng D, Wei G, He Y, et al. IFATS collection: The conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats. *Stem Cells* 2009;27(2):478-88.

Wen SY, Chen JY, Weng YS, Aneja R, Chen CJ, Huang CY, et al. Galangin suppresses H₂O₂-induced aging in human dermal fibroblasts. *Environ Toxicol* 2017;32(12):2419-27.

Wu W, Niklason L, Steinbacher DM. The effect of age on human adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2013;131(1):27-37.

Xia Y, Wang J, Xu S, Johnson GL, Hunter T, Lu Z. MEKK1 mediates the ubiquitination and degradation of c-Jun in response to osmotic stress. *Mol Cell Biol* 2007;27(2):510-7.

Yamahara K, Nakagawa T, Ito J, Kinoshita K, Omori K, Yamamoto N. Netrin 1 mediates protective effects exerted by insulin-like growth factor 1 on cochlear hair cells. *Neuropharmacology* 2017;119:26-39.

Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, Wakabayashi J, Maher J, Motohashi H, et al. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol Cell Biol* 2008;28(8):2758-70.

Yamashita S, Masuda D, Matsuzawa Y. Did we abandon probucol too soon? *Curr Opin Lipidol* 2015;26(4):304-16.

Yamashita S, Masuda D, Ohama T, Arai H, Bujo H, Kagimura T, et al. Rationale and design of the PROSPECTIVE trial: Probuco trial for secondary prevention of atherosclerotic events in patients with prior coronary heart disease. *J Atheroscler Thromb* 2016;23(6):746-56.

Yang ZQ, Zhang HL, Duan CC, Geng S, Wang K, Yu HF, et al. IGF1 regulates RUNX1 expression via IRS1/2: Implications for antler chondrocyte differentiation. *Cell Cycle* 2017;16(6):522-32.

Yao L, Li ZR, Su WR, Li YP, Lin ML, Zhang WX, et al. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One* 2012;7(2):e30842.

Yao Y, Zhang F, Wang L, Zhang G, Wang Z, Chen J, et al. Lipopolysaccharide preconditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci* 2009;16:74.

Yeh SL, Wang HM, Chen PY, Wu TC. Interactions of beta-carotene and flavonoids on the secretion of proinflammatory mediators in an in vitro system. *Chem Biol Interact* 2009;179(2-3):386-93.

Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 2003;115(3):281-92.

Yoritaka A, Kawajiri S, Yamamoto Y, Nakahara T, Ando M, Hashimoto K, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial of reduced coenzyme Q10 for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2015;21(8):911-6.

Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009;9(11):798-809.

Yu SP, Wei Z, Wei L. Preconditioning strategy in stem cell transplantation therapy. *Transl Stroke Res* 2013;4(1):76-88.

Yu Y, Cui Y, Niedernhofer LJ, Wang Y. Occurrence, biological consequences, and human health relevance of oxidative stress-induced DNA damage. *Chem Res Toxicol* 2016;29(12):2008-39.

Zdanov S, Bernard D, Debacq-Chainiaux F, Martien S, Gosselin K, Vercamer C, et al. Normal or stress-induced fibroblast senescence involves COX-2 activity. *Exp Cell Res* 2007;313(14):3046-56.

Zdanov S, Toussaint O, Debacq-Chainiaux F. p53 and ATF-2 partly mediate the overexpression of COX-2 in H₂O₂-induced premature senescence of human fibroblasts. *Biogerontology* 2009;10(3):291-8.

Zhang F, Lau SS, Monks TJ. The cytoprotective effect of N-acetyl-L-cysteine against ROS-induced cytotoxicity is independent of its ability to enhance glutathione synthesis. *Toxicol Sci* 2011;120(1):87-97.

Zhang J, Chen GH, Wang YW, Zhao J, Duan HF, Liao LM, et al. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Chin Med J* 2012;125(19):3472-8.

Zhang L, Curhan GC, Forman JP. Plasma insulin-like growth factor-1 level and risk of incident hypertension in non-diabetic women. *J Hypertens* 2011;29(2):229-35.

Zhang Y, McNeill E, Tian H, Soker S, Andersson KE, Yoo JJ, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J Urol* 2008;180(5):2226-33.

Zhang Y, Yang Y, Bi Y, Gong M, Jiang W, Wei X, et al. Mesenchymal stromal cell neuroprotection of hydrogen peroxide -challenged pheochromocytoma cells through reducing apoptosis and releasing cytokines. *Cytotherapy* 2012;14(8):954-66.

Zhao X, Sun G, Zhang J, Ting SM, Gonzales N, Aronowski J. Dimethyl fumarate protects brain from damage produced by intracerebral hemorrhage by mechanism involving Nrf2. *Stroke* 2015;46(7):1923-8.

Zhu C, Dong Y, Liu H, Ren H, Cui Z. Hesperetin protects against H₂O₂-triggered oxidative damage via upregulation of the Keap1-Nrf2/HO-1 signal pathway in ARPE-19 cells. *Biomed Pharmacother* 2017;88:124-33.

Zirafi O, Kim KA, Roan NR, Kluge SF, Müller JA, Jiang S, et al. Semen enhances HIV infectivity and impairs the antiviral efficacy of microbicides. *Sci Transl Med* 2014;6(262):262ra157.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12):4279-95.