



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE
JALISCO, A.C.**



**EVALUACIÓN DEL DISEÑO BOX BEHNKEN EN MOLÉCULAS CON
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMALES HUMANAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA**

PRESENTA

NERISSA FERRER CARRERA

DIRECTOR:

DR. NÉSTOR EMMANUEL DÍAZ MARTÍNEZ

CO-DIRECTORES:

DR. NÉSTOR FABIÁN DÍAZ MARTÍNEZ

DR. JOSÉ MIGUEL FLORES FERNÁNDEZ

ASESORES:

DR. EDUARDO PADILLA CAMBEROS

DRA. INÉS JIMÉNEZ PALOMAR

GUADALAJARA, JALISCO, 23 JUNIO, 2022



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Guadalajara, Jalisco, a 02 de junio de 2022
Ref. CP/801/2022

NERISSA FERRER CARRERA
ESTUDIANTE DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1903MF6492
PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis **“Evaluación del diseño Box Behnken en moléculas con actividad antioxidante en la proliferación de células troncales mesenquimales humanas”** desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dr. Néstor Emmanuel Díaz Martínez. Director de tesis
Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez Co-director de tesis
Dr. José Miguel Flores Fernández. Co-director de tesis
Dr. Eduardo Padilla Camberos. Asesor de tesis
Dra. Inés Jiménez Palomar. Asesora de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención de grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo
Directora Adjunta de Investigación y Posgrado





Guadalajara, Jalisco a 27 de Mayo de 2022

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante **Nerissa Ferrer Carrera**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “EVALUACIÓN DEL DISEÑO BOX BEHNKEN EN MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES HUMANAS” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica como opción terminal Biotecnología Médica Farmacéutica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 16 del mes de Mayo del año dos mil veintidós.

Dr. Néstor Emmanuel Díaz Martínez
Director de tesis

Dr. José Miguel Flores Fernández
Co-director de tesis

Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez
Co-director de tesis

Dr. Eduardo Padilla Camberos
Asesor

Dra. Inés Jiménez Palomar
Asesora

JUNTA DIRECTIVA

DIRECTOR DE TESIS: DR. NÉSTOR EMMANUEL DÍAZ MARTÍNEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. NÉSTOR FABIÁN DÍAZ MARTÍNEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ MIGUEL FLORES FERNÁNDEZ

ASESOR: DR. EDUARDO PADILLA CAMBEROS

ASESORA: DRA. INÉS JIMÉNEZ PALOMAR

AGRADECIMIENTOS

A Guadalupe Carrera Vasconcelos y Ramón Ferrer Abalos por siempre creer en mí, impulsarme a crecer y brindarme su apoyo incondicional.

A Ángela Vasconcelos Hernández, tías, hermana y amigos por motivarme siempre.

A Luis Antonio Burgos Maldonado por compartir mi sueño, motivarme y ayudarme a lograrlo.

Al Dr. Emmanuel Díaz Martínez por la oportunidad y los conocimientos brindados para concluir satisfactoriamente con el proyecto.

Al Dr. Oscar René Hernández Pérez por el apoyo técnico en la realización de los experimentos y los análisis empleados para el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. José Miguel Flores Fernández y el Dr. Eduardo Padilla Camberos por sus contribuciones en los análisis e interpretación estadística.

Al Dr. Fabián Díaz Martínez y la Dra. Inés Jiménez Palomar por sus aportaciones en la revisión y correcciones en seminarios y en la escritura de la tesis.

A mis compañeras Ing. Karen Jaqueline Juárez Navarro y la M.C. Carla Patricia Barragán Álvarez por sus enseñanzas y contribuciones a la investigación.

A las instituciones que proporcionaron los recursos necesarios para la investigación:

- **COECYTJAL.** Fondo de Desarrollo Científico de Jalisco (FODECIJAL) para Atender Problemas Estatales 2019. Proyecto: 8084 – 2019
- **CONACYT.** Convocatoria 2019. Apoyos para la Adquisición y Mantenimiento de Infraestructura en Instituciones y Laboratorios de Investigación Especializada. Proyecto: 300638
- **LCELLS** Foundation <https://www.lcells.com/bank.php>

DEDICATORIA

A mi padre Ramón Ferrer Abalos por la ilusión compartida de convertirme en una maestra en ciencias, por todo tu amor y enseñanzas a lo largo de mi vida, por impulsarme a crecer, por siempre creer en mí a pesar de todas las veces que llegue a dudar de mí misma y por darme la fuerza para despertar cada día, seguir adelante y cumplir cada uno de nuestros sueños a pesar de tu pronta partida. Vivirás para siempre en mi corazón cada día de mi vida. Todo mi amor, reconocimiento, admiración y gratitud hasta el cielo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Células troncales mesenquimales.....	3
MSCs derivadas de la placenta y de las membranas fetales	7
Poblaciones de MSCs aisladas de placenta	8
Aplicaciones terapéuticas y estudio de las MSCs	10
Aplicación de MSCs en el desarrollo de fármacos y terapias	13
Nutracéuticos como aplicación terapéutica emergente	14
Diseño Box Behnken	15
Estrés oxidativo	17
Enfermedades relacionadas al estrés oxidativo	18
Moléculas con efecto antioxidante	22
Resveratrol.....	23
Coenzima Q10	25
Ácido α -lipoico.....	27
Moléculas antioxidantes en enfermedades	33
Efecto del estrés oxidativo en las MSCs	34
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
JUSTIFICACIÓN	38
OBJETIVOS	41
General.....	41
Específicos	41
MÉTODOS	42
Cultivo y expansión de células troncales mesenquimales humanas	42
Caracterización Celular.....	43
Optimización de tratamientos mediante el Diseño Box Behnken.....	45
Tratamiento antioxidante	46
Cinética de crecimiento.....	46
Análisis estadístico	46
RESULTADOS	47
Caracterización Celular.....	47
Citometría de flujo.....	47
Inmunofluorescencia.....	48
Diseño de mezclas Box Behnken.....	51
Efecto de las moléculas antioxidantes sobre la proliferación de MSCs humanas.....	54

DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	64
PERSPECTIVAS	64
REFERENCIAS	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de diferentes fuentes de células troncales mesenquimales, ventajas y desventajas	6
Tabla 2. Relación del estrés oxidativo con la fisiopatología de diversas enfermedades.....	19
Tabla 3. Efecto de moléculas antioxidantes sobre el estrés oxidativo... ..	30
Tabla 4. Concentraciones de moléculas antioxidantes que incrementan la proliferación celular	32
Tabla 5. Variables empleadas en el diseño Box-Behnken para la optimización de la proliferación celular de MSCs derivadas de placenta humana	45
Tabla 6. Corridas experimentales para la optimización de la proliferación celular de MSCs derivadas de placenta humana mediante el diseño de Box-Behnken	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesos de diferenciación de células troncales mesenquimales (MSCs)	4
Figura 2. Composición de la placenta humana, de los anexos fetales y sitios para la derivación de MSCs... ..	9
Figura 3. Efecto del estrés oxidativo en las mitocondrias... ..	21
Figura 4. Mecanismo antioxidante del resveratrol a través de la activación de SIRT1... ..	24
Figura 5. Mecanismo antioxidante de CoQ10 a través de las vías AMPK y Nrf-2.....	27
Figura 6. Mecanismo antioxidante del ácido α -lipoico a través de la vía Nrf-2.....	28
Figura 7. Microfotografías de células troncales mesenquimales (MSCs) derivadas de placenta humana... ..	42
Figura 8. Obtención de MSCs para experimentación del presente estudio	43
Figura 9. Expresión de marcadores de superficie celular analizados por citometría de flujo	47
Figura 10. Tinción de inmunofluorescencia representativa de células troncales mesenquimales (MSCs)	48

Figura 11. Caracterización de células troncales mesenquimales (MSCs) por inmunofluorescencia	49
Figura 12. Inmunofluorescencia de células troncales mesenquimales (MSCs).....	50
Figura 13. Gráfico de superficie de respuesta tridimensional del resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico a una dosis de 75 μ M.....	52
Figura 14. Gráfico de superficie de respuesta tridimensional de las variables independientes resveratrol, ácido α -lipoico y coenzima Q10 a una dosis de 7.5 μ M.....	53
Figura 15. Gráfico de superficie de respuesta tridimensional de las variables independientes coenzima Q10, ácido α -lipoico y resveratrol a una dosis de 2.55 μ M.....	53
Figura 16. Valores proporcionados por el diseño Box Behnken para optimizar la respuesta antioxidante... ..	54
Figura 17. Cinética de crecimiento de células troncales mesenquimales (MSCs) tratadas con antioxidantes (resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico).....	55
Figura 18. Efecto de antioxidantes (resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico) en las células troncales mesenquimales (MSCs) derivadas de placenta humana	56

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

AKT: Vía de señalización de la proteína quinasa B

ALA: Ácido α -lipoico

AMKP: Proteína quinasa activada por AMP

APAF1: proteasa apoptótica 1

ARE: Elemento de respuesta antioxidante

ATP: Adenosín trifosfato

BCL2: Regulador de apoptosis

BCL2L1: Proteína 1 similar a BCL2

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BrdU: Bromodesoxiuridina

CD105: Endoglina

CD14: Cúmulo de diferenciación 14

CD19: Cúmulo de diferenciación 19

CD34: Cúmulo de diferenciación 34

CD45: Cúmulo de diferenciación 45

CD73: Ecto 5'-nucleotidasa

CD90: Antígeno de células del timo 1

CDK: Quinasa dependiente de ciclina

CDK4: Quinasa dependiente de ciclina 4

CDK6: Quinasa dependiente de ciclina 6

CNTF: Factor neurotrófico ciliar

CO₂: Dióxido de carbono

CoQ10: Coenzima Q10

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FGF-2: Factor de crecimiento de fibroblastos 2

GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía

GF: Factor de crecimiento

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

HLA-DR: Antígeno leucocitario humano isotipo DR

hMSCs: Células troncales mesenquimales humanas

HO-1: Hemo oxigenasa

HORAC: Ensayo de capacidad de absorbanca de radicales hidroxilos

IL-1: interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

iPSCs: Células troncales pluripotentes inducidas

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular

Keap 1: Proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch

MAPK: Vía de señalización de proteína quinasa activada por mitógenos

MPP: 1-metil-4-fenilpiridinio

MPTP: 1-metil-4-fenil, 6-tetrahidropiridina

MSCs: Células troncales mesenquimales

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero

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

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF- κ B: Factor nuclear Kappa B

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NQO-1: Quinona oxidorreductasa

Nrf-2: Factor nuclear eritroide 2

OCT4: Factor de transcripción 4 de unión a octámero

ORAC: Ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno

PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PDK1: Quinasa dependiente de fosfoinositol 1

PGC-1 α : El coactivador del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas 1-alfa

PI3K: Vías de señalización de fosfatidilinositol-3-quinasa

pRB: Proteína de retinoblastoma

Rb: Proteína supresora de tumores de retinoblastoma

Redox: Reacciones de óxido-reducción

Resv: Resveratrol

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RUNX2: Factor de transcripción de la familia RUNX 2

SARS-CoV-2: Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2

SCF: Factor de células troncales

SDF-1: Factor derivado del estroma 1

SIRT1: Sirtuina 1

SSEA-4: Antígeno embrionario específico de etapa 4

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

α -tocoferol: Alfa-tocoferol

β -caroteno: Betacaroteno

RESUMEN

Las células troncales mesenquimales humanas (hMSCs, por sus siglas en inglés), se caracterizan por poseer propiedades específicas como multipotencialidad, localización (habilidad de dirigirse y permanecer en sitios de lesión e inflamación), producción de factores tróficos y proliferación en condiciones *in vitro*, por lo que son utilizadas ampliamente como modelo de estudio para padecimientos crónico-degenerativos en el campo de la medicina. Sin embargo, estas capacidades que hacen atractivo su uso pueden verse interrumpidas a causa del estrés oxidativo, fenómeno que surge con el desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante de neutralizarlos, lo que provoca un deterioro en el desarrollo de las células hasta inducir un estado de senescencia prematura y apoptosis, comprometiendo su funcionalidad y posible aplicabilidad. Para contrarrestar las consecuencias del exceso de oxidación, las moléculas antioxidantes como resveratrol, coenzima Q10 y el ácido α -lipoico han surgido como una opción para neutralizar los radicales libres en modelos celulares, cualidades por las que fueron seleccionadas para evaluar sus efectos sobre hMSCs derivadas de la placenta con la finalidad de incrementar la proliferación celular. Para tal fin, se utilizó el diseño de mezclas Box Behnken (metodología para estudiar el comportamiento de las respuestas que influyen en las variables independientes) para establecer las concentraciones del tratamiento compuesto por resveratrol 2.55 μ M, coenzima Q10 10 μ M y ácido α -lipoico 50 μ M. Para la etapa experimental se realizaron dos grupos: 1) control (sin tratamiento) y 2) resveratrol + coenzima Q10+ ácido α -lipoico (con tratamiento) y sus efectos fueron monitoreados en un lapso de 14 días, contabilizando la cantidad de células/cm² cada dos días. El grupo con tratamiento presentó incrementos en la proliferación celular los días 2, 8 y 12 respecto al grupo control, lo que sugiere la existencia de una interacción sinérgica entre los componentes de la mezcla. Estos resultados comprueban la efectividad del diseño Box Behnken para seleccionar una combinación de antioxidantes capaz de promover la proliferación de hMSCs de placenta humana mediante la optimización de mezclas terapéuticas.

INTRODUCCIÓN

Las células troncales mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés) fueron identificadas y aisladas por primera vez en la médula ósea (Friedenstein et al, 1970). Dentro de sus principales propiedades destacan a) su capacidad de dar origen a diferentes linajes celulares diferenciados (adipogénicos, osteogénicos y condrogénicos; Chen et al, 2005), b) la secreción de moléculas antiinflamatorias como citocinas (interleucina 10), c) la producción de factores de crecimiento (el factor derivado de células estromales 1, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (Ullah et al, 2015) y d) su actividad inmunomoduladora. Por estas características las MSCs han sido consideradas como un recurso celular terapéutico prometedor (Shi et al, 2012) y un excelente modelo para simular y estudiar los mecanismos subyacentes a enfermedades como el cáncer, la diabetes y neurodegeneraciones como Parkinson o Alzheimer (Kitambi & Chandrasekar, 2011).

En dichas patologías, se ha demostrado que las alteraciones en el sistema oxidoreducción incrementan los niveles del estrés oxidativo como consecuencia de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés; Liguori et al, 2018). El estrés oxidativo, surge como resultado del desequilibrio entre los niveles de ROS y la capacidad de neutralizar los radicales libres, lo que ocasiona daño en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (que son la base de todos los procesos celulares), provocando alteraciones en el funcionamiento adecuado de las células (García-Sánchez et al, 2020). La mayor parte de la producción de ROS se realiza en las mitocondrias y ocurre en dos principales puntos de la cadena de transporte de electrones (complejo I y III) por lo que son más susceptibles a los efectos del estrés oxidativo (Selivanov et al, 2011).

Este daño puede reflejarse en lesiones al ADN mitocondrial y contribuir a la inestabilidad genómica, lesión celular, disminución de proteínas involucradas en el transporte de electrones, alteraciones de organelos y apoptosis (Van Houten et al, 2006).

Por otra parte, desde su descubrimiento, las células troncales han demostrado ser una herramienta efectiva para comprender los mecanismos que subyacen a las enfermedades humanas relacionadas con el estrés oxidativo, permitiendo el desarrollo de líneas celulares que modelan enfermedades específicas (Sterneckert et al, 2014); sin embargo, dichos modelos son proclives al estrés oxidativo que acelera el proceso de senescencia prematura, limita el número de divisiones celulares y compromete el proceso de diferenciación celular (von Bahr et al, 2012; Denu & Hematti, 2016). Por ello, ante la creciente necesidad de identificar estrategias que permitan reducir los niveles de ROS durante el cultivo de MSCs el uso de moléculas antioxidantes surge como una opción para contrarrestar los daños causados por el exceso de reacciones oxidativas (Denu & Hematti, 2016). Siguiendo esta línea de investigación Wang y colaboradores demostraron que la suplementación durante seis días del antioxidante resveratrol a MSCs derivadas de cordón umbilical, permitió incrementar su proliferación a concentraciones de 0.1, 1 y 2.5 μM , reduciendo la senescencia celular previamente identificada por la tinción con β -galactosidasa (Wang et al, 2016).

De igual forma, la administración de coenzima Q10 por 48 horas a MSCs derivadas de médula ósea, provocó una disminución en el número de células positivas a β -galactosidasa y en las ROS (evaluadas por la intensidad de fluorescencia de DCFH-DA; Zhang et al, 2015). Por otra parte, el ácido α -lipoico incrementó el marcador de proliferación Ki-67 en MSCs derivadas de médula ósea (Bashiri et al, 2016). Estos antioxidantes han demostrado previamente que de forma individual, han sido capaces de promover la proliferación celular (Ferretta et al, 2014; Zheng et al, 2018; Bashiri et al, 2016). Sin embargo, la combinación de antioxidantes podría incrementar los efectos benéficos sobre cultivos celulares (Zhang & Peng, 2019).

ANTECEDENTES

Células troncales mesenquimales

Las MSCs se definen como células del estroma (Majka et al, 2017) caracterizadas por poseer: 1) capacidad proliferativa celular, 2) multipotencialidad, 3) localización (trasladarse a sitios de lesión) y 4) presentar una función trófica (Chen et al, 2016). Desde su descubrimiento en 1970 donde se encontró que las células de médula ósea fueron capaces de inducir y reconstituir la formación de hueso (Friedenstein et al, 1970), las MSCs han adquirido un papel importante dentro de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa llegando a ser empleadas para tratamientos como la osteoartritis (Gao et al, 2016). Este creciente interés en su estudio y sus aplicaciones han hecho que se establezcan los criterios mínimos para su caracterización. De esta forma, las MSCs humanas (hMSCs) deben ser adherentes en condiciones de cultivo estándar, expresar los marcadores CD105, CD73, CD44 y CD90, carecer de los marcadores CD45, CD34, CD14, CD19 o HLA-DR y tener la capacidad de diferenciarse en osteocitos, adipocitos y condrocitos (Dominici et al, 2006).

Una de sus principales propiedades es la proliferación, que se define como la capacidad de una célula para dividirse y dar origen a dos células idénticas (Biehl & Russel, 2009) que a su vez posean la habilidad de multiplicarse en condiciones *in vitro*. De esta forma, en el mantenimiento de MSCs *in vitro*, se busca aislar y/o expandir las células en un microambiente óptimo para su desarrollo, por lo que es necesario considerar factores como la selección de una matriz apropiada para su adhesión celular, un medio de cultivo que aporte los requerimientos nutrimentales necesarios, así como niveles controlados de temperatura y CO₂ (De Bruyn et al, 2011). Otra de sus características es la multipotencia lo que permite a las células diferenciarse en adipocitos (adipogénesis), condrocitos (condrogénesis) y osteocitos (osteogénesis) en respuesta a una adecuada estimulación *in vitro* (Chen et al, 2016).

Adicionalmente, por su plasticidad pueden dar origen a células musculares cardíacas, lisas y del músculo esquelético a través de la miogénesis y en astrocitos, oligodendrocitos y neuronas por neurogénesis (Schulze & Tobiasch, 2011) como se muestra en la Figura 1.

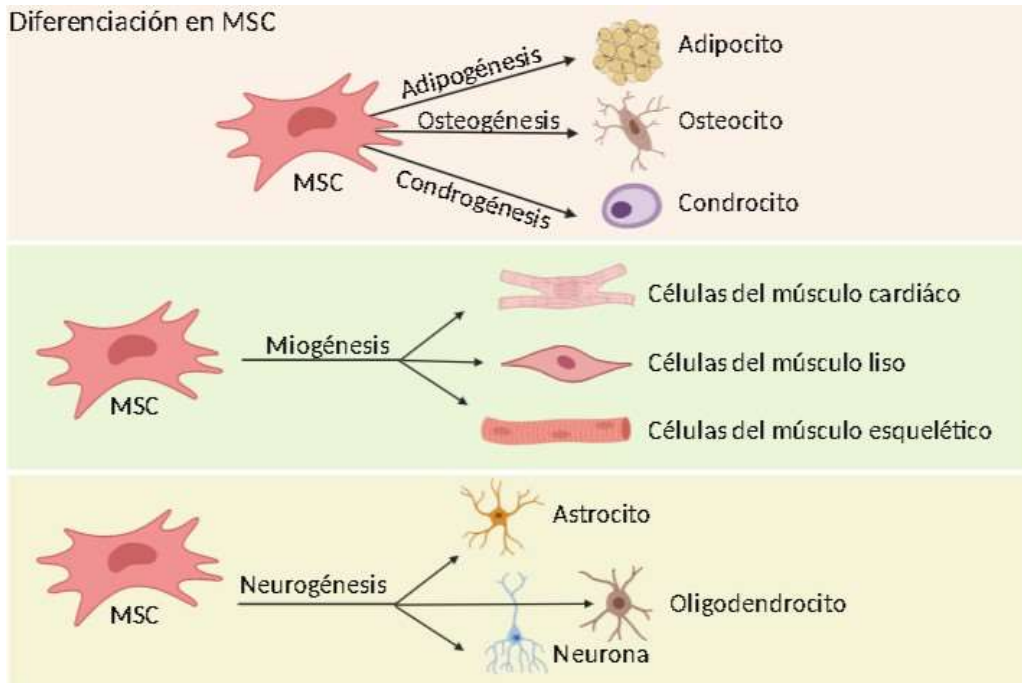


Figura 1. Procesos de diferenciación de células troncales mesenquimales (MSCs). Las MSCs son capaces de dar origen principalmente a linajes adipogénicos, condrogénicos y osteogénicos y puede evaluarse mediante la formación de cuerpos lipídicos (adipogénesis), la producción de proteoglicanos y síntesis de colágeno tipo II (condrogénesis) y la mineralización de calcio e incremento de la fosfatasa alcalina (osteogénesis). Sin embargo, existen otros mecanismos de diferenciación que permiten obtener células del músculo cardíaco (miogénesis) y células neurales como los astrocitos y las neuronas (neurogénesis). Tomado de Schulze & Tobiasch, 2011.

Por otra parte, las MSCs tienen la capacidad de moverse a través de los vasos sanguíneos, atravesar la pared del endotelio, regresar a sus nichos de origen y migrar hacia tejidos dañados, esta característica es fundamental para que las terapias de reemplazo celular puedan dirigirse a su destino (Brooks et al, 2018; Nitzsche et al, 2017). La habilidad de las MSCs para migrar desde la sangre periférica hacia un órgano específico se atribuye a la expresión de integrinas

(moléculas de adhesión), quimiocinas (responsables de la migración y movimiento celular; como el factor derivado del estroma 1 (SDF-1)) e interleucinas (3 y 6) que regulan la señalización celular y las respuestas inmunitarias (Hofer & Tuan 2016; Laird et al, 2008).

Por lo que se refiere a su secretoma, las MSCs son capaces de producir moléculas que promueven el crecimiento celular como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de células troncales (SCF) y moléculas que promueven la neurogénesis como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Tfilin et al, 2010). De esta forma, las MSCs han sido utilizadas para reducir la inflamación inducida por neurotoxinas y liberar factores neuroprotectores como el factor neurotrófico ciliar (CNTF; Caplan, 2009 & Uccelli et al, 2012). Tomando en cuenta todas las características anteriormente mencionadas, se resalta la importancia de las MSCs como posible fuente de tratamiento terapéutico y un excelente modelo de estudio (Naji et al, 2019).

Aislamiento de células troncales mesenquimales

La obtención de MSCs se puede realizar desde la médula ósea, el tejido adiposo, la pulpa dental, el líquido sinovial, el endometrio, el músculo, la piel y la sangre periférica (Berebichez-Fridman y Montero-Olvera, 2018). No obstante, para seleccionar una fuente adecuada, se deben considerar diversos aspectos como la técnica para su obtención, los posibles efectos adversos en el donante y las características como proliferación y diferenciación en condiciones *in vitro* (Hass et al, 2011). En la tabla 1 se describen ventajas y desventajas de la derivación de MSCs a partir de tejidos adultos y neonatales.

Tabla 1. Comparación de diferentes fuentes de células troncales mesenquimales, ventajas y desventajas.

Origen	Obtención	Ventajas	Desventajas	Referencias
Médula Ósea	Aisladas del aspirado de médula ósea (generalmente de la cresta iliaca de un donante) ₁	<p>-El tiempo medio de duplicación es de 40 horas₂</p> <p>-Son capaces de diferenciarse en células de las capas germinales₅</p>	<p>-Los métodos de obtención son invasivos, dolorosos y con riesgo de infecciones₃</p> <p>-Los factores como rendimiento celular, longevidad y potencial de diferenciación dependen de condiciones del donante como su edad₂</p> <p>-Las células son más propensas a senescencia anticipada, detienen su crecimiento y expresan proteínas proapoptóticas como p53, p21 y p16₄</p> <p>-Únicamente del 0.001 al 0.01% del aspirado de médula ósea corresponden a MSCs₁</p>	<p>Pittenger, 2008₁</p> <p>Berebichez-Fridman y Montero-Olvera, 2018₂</p> <p>Hass et al, 2011₃</p> <p>Jin et al, 2013₄</p> <p>Zakrzewsk et al, 2019₅</p>
Tejido adiposo	Aisladas de material biológico generado de liposucción, lipoplastia o lipectomía ₆	<p>-Un gramo de tejido es capaz de producir aproximadamente 5,000 células₆</p> <p>-Es un recurso abundante y su obtención no conlleva inconvenientes éticos (subproducto de desechos quirúrgicos₇).</p> <p>-Aproximadamente del 98-100% de las células obtenidas son viables₇</p>	<p>-Tiempo medio de duplicación de \pm 4 días₈</p> <p>-Su expansión y diferenciación son afectadas por las características del donante, particularmente en linajes osteogénicos y condrogénicos₇</p>	<p>Kuhbier et al, 2010₆</p> <p>Choudhery et al, 2014₇</p> <p>Van Harmelen et al, 2004₈</p>

<p>Cordón Umbilical</p>	<p>Son aisladas de la gelatina de Wharton (tejido que rodea los vasos umbilicales), la sangre del cordón umbilical y del subendotelio de la vena umbilical⁹</p>	<p>-El tiempo medio de duplicación es de 30 horas²</p> <p>-Método de recolección no invasivo¹⁰</p> <p>-El perfil de expresión génica es similar al de las células troncales embrionarias y poseen una autorrenovación más rápida que las células troncales derivadas de médula ósea¹¹</p>	<p>- En cultivo exhiben senescencia replicativa en el pase 10¹²</p> <p>-Tienen bajo potencial de diferenciación adipogénica²</p> <p>-No hay un procedimiento de aislamiento uniforme²⁰</p>	<p>Venugopal et al, 2011²⁰</p> <p>Weiss & Troyer, 2006⁹</p> <p>Nagamura-Inoue & He, 2014¹⁰</p> <p>Fong et al, 2011¹¹</p> <p>Heo et al, 2016¹²</p>
<p>Placenta y Membranas fetales</p>	<p>Aisladas de regiones de la placenta: epitelial amniótica, mesenquimatosa amniótica, mesenquimatosa coriónica y trofoblástica coriónica¹³</p>	<p>-Son tejidos descartados del nacimiento¹⁴</p> <p>-Las células mantienen un cariotipo normal en pasajes tardíos¹⁵</p> <p>-Expresan marcadores de células troncales embrionarias como Oct-4 y SSEA-4¹⁶</p> <p>-La expansión de las células placentarias es mayor que las células derivadas de médula ósea¹⁶</p> <p>-Se han logrado expandir con éxito hasta el pase 14¹⁷</p> <p>- Bajo riesgo para desarrollar tumores¹⁹</p> <p>-Liberan citosinas antiinflamatorias como interleucinas 4, 5, 9, 10 y 13¹⁹</p>	<p>-Tienen menor potencial de diferenciación a linajes adipogénicos¹⁷</p> <p>-Falta de estudios comparativos entre las diversas fuentes de obtención de hMSCs¹⁸</p> <p>-Aún no se identifica la fuente óptima para aplicaciones clínicas específicas¹⁸</p>	<p>Parolini et al, 2008¹³</p> <p>Pittenger et al, 2019¹⁴</p> <p>Pipino et al, 2013¹⁵</p> <p>In 't Anker et al, 2004¹⁶</p> <p>Barlow et al, 2008¹⁷</p> <p>Prockop et al, 2012¹⁸</p> <p>Siddesh et al, 2021¹⁹</p>

MSCs derivadas de la placenta y de las membranas fetales

Como se puede apreciar en los datos de la tabla 1, las MSCs derivadas de placenta y de las membranas fetales poseen ventajas respecto a las células derivadas de médula ósea como la ausencia de procedimientos quirúrgicos dolorosos y riesgosos ya que son tejidos destinados a ser un desecho quirúrgico posterior al parto (Pittenger, 2008) y tiene un mayor potencial de proliferación (hasta 14 pases por 160 días) en comparación con MSCs derivadas de médula ósea (3 pases por 60

días; Barlow et al, 2008). Otra de sus ventajas es la gran cantidad de MSCs que se pueden llegar a obtener, por ejemplo, se ha reportado que a partir de una sola placenta se producen hasta 7,000 dosis clínicas de MSCs para terapia (Timmins et al, 2012), sus propiedades no se comprometen por factores del donante como su edad (Choudhery et al, 2014) y comparten características de células troncales embrionarias al expresar los marcadores Oct-4 y SSEA-4 (In 't Anker et al, 2004), a diferencia de las células obtenidas del cordón umbilical (Heo et al, 2016) y médula ósea (Jin et al, 2013) que presentan senescencia prematura, lo que conduce a procesos de apoptosis (Sabapathy et al, 2012).

Poblaciones de MSCs aisladas de placenta

El desarrollo de la placenta humana inicia a partir del trofotodermo (capa externa del embrión previa a la implantación) que se forma cinco días posteriores a la fertilización. En esta etapa el embrión es segregado en la masa celular interna y el trofotodermo polar que se adhiere al endometrio. Posterior a la implantación, el sincitio primario hace que el endometrio se transforme en la decidua, mientras que las células citotrofoblásticas proliferan para formar vellosidades que se convierten en el espacio intervelloso, haciendo que el blastocisto se encuentre cubierto por tres capas: la placa coriónica, las vellosidades (encargadas de transportar los nutrientes y el oxígeno de la madre al embrión) y la cubierta formada por el citotrofoblasto. Cuando la cubierta entra en contacto con la decidua, las células migran de la cubierta a la decidua y de esta manera al finalizar el primer trimestre se establece la placenta (Turco & Moffett, 2019).

Con el avance en el estudio de la estructura y funcionamiento de la placenta, se estableció el primer taller internacional de células troncales derivadas de placenta donde determinaron la división de la placenta en cuatro regiones: epitelial amniótica, mesenquimatosa amniótica, mesenquimatosa coriónica y trofoblástica coriónica (Figura 2). De las regiones se pueden obtener cuatro poblaciones celulares con características de células troncales: las células epiteliales amnióticas, las células

estromales del mesenquimal amniótico y coriónico y las células trofoblásticas coriónicas humanas (Parolini et al, 2008).

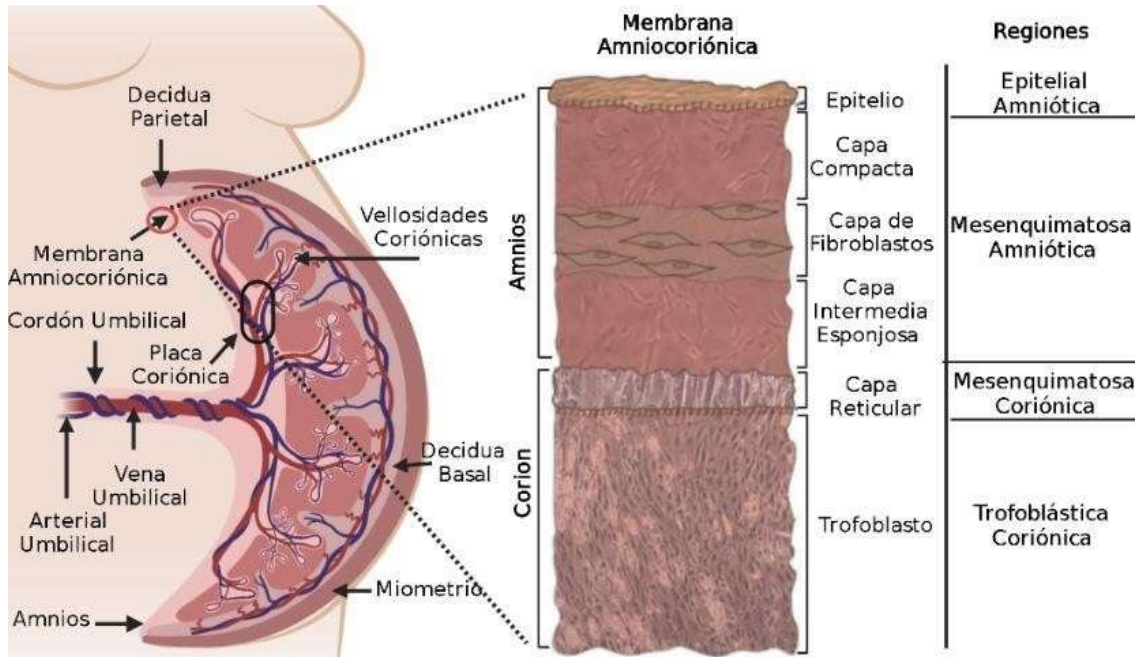


Figura 2. Composición de la placenta humana, de los anexos fetales y sitios para la derivación de MSCs. La placenta humana está formada por una zona fetal (placa coriónica) y una zona materna (placa basal). En la membrana amniocoriónica se encuentran el amnios que a su vez está constituido por una capa de epitelio estratificado y el mesénquima amniótico que se subdivide en el epitelio, la capa compacta, la capa de fibroblastos y la capa intermedia esponjosa. De igual forma en la membrana se localiza el corion que comprende la región mesenquimatosa coriónica (capa reticular) y la zona trofoblástica coriónica que origina a los trofoblastos. La placa basal es una superficie que surge de la separación entre la placenta y la pared uterina durante el parto y se compone de trofoblastos fetales extravelosos, células inmunitarias y células estromales deciduales.

La región epitelial amniótica surge del epiblasto antes de que inicie la gastrulación y ocho días después del proceso de fertilización, se encuentra cercana al feto y conserva la plasticidad de las células embrionarias (Miki et al, 2005), la región mesenquimatosa amniótica juega un papel fundamental en el mantenimiento de la tolerancia materno-neonatal, su morfología es similar a los fibroblastos y tiene propiedades inmunomoduladoras (Li et al, 2020). Por otra parte, en el área

mesenquimatosa coriónica se encuentra una membrana unida al amnios por medio de una capa esponjosa de fibras de colágeno (Koo et al, 2012). En la región trofoblástica coriónica se localizan las células trofoectodérmicas que pueden derivarse en sincitiotrofoblastos que son una capa celular que cubre la superficie externa de las vellosidades y su función es intercambiar nutrientes y gases en la placenta humana y producir hormonas como la gonadotropina (Yabe et al, 2016), mientras que los trofoblastos extravellosos tienden a migrar hacia el tejido decidua o los vasos sanguíneos maternos para que la arteria materna mantenga un flujo sanguíneo en los espacios intervillosos suficiente para una adecuada función placentaria (Fujiwara et al, 2005).

Las MSCs derivadas de placenta han demostrado representar una población homogénea de células con potencial para el desarrollo terapéutico por sus propiedades inmunológicas, diferenciación, proliferación y un bajo riesgo en la formación de tumores, por lo tanto, han sido consideradas como un recurso seguro para aplicaciones como la ingeniería de tejidos (Siddesh et al, 2021).

Aplicaciones terapéuticas y estudio de las MSCs

Como ya se ha mencionado, las MSCs representan un recurso emergente para la terapia celular regenerativa que contribuye a comprender los mecanismos que envuelven a las enfermedades y proporcionar alternativas de tratamientos (Bai, 2020). A continuación, se citarán ejemplos de su uso en diversas ramas médicas.

En el desarrollo de modelos de cáncer (sarcomagénesis), han proporcionado información sobre su etiología y patogénesis relacionada al estrés oxidativo y muerte celular con lo cual eventualmente se planea implementar terapias más efectivas (Rodríguez et al, 2012). En enfermedades cardiovasculares, se ha demostrado que las MSCs son capaces de estimular la formación de redes vasculares al promover la actividad de los pericitos que ayudan a las células endoteliales en su proceso de maduración y contribuyen a la vascularización (Cai et al, 2009). A su vez, en modelos de lesión cardíaca de ratón las MSCs derivadas

de médula ósea, promovieron la reparación cardíaca y la liberación de factores que estimularon procesos de angiogénesis y arteriogenesis (Gomes et al, 2013). En estudios posteriores, Ju y colaboradores evidenciaron la capacidad de las células para secretar exosomas cardíacos con la finalidad de incrementar la angiogénesis y restablecer la función cardíaca a través de la proliferación de los cardiomiocitos (Ju et al, 2018). Por otra parte, un estudio de meta-análisis confirmó los efectos terapéuticos de las MSCs en afecciones cardíacas como infarto agudo al miocardio y miocardiopatía isquémica crónica (Jeong et al, 2018).

En padecimientos neurodegenerativos, las MSCs promueven la neurogénesis en modelos neurotóxicos y disminuyen el tiempo de progresión de enfermedades como Parkinson y Alzheimer (Urrutia et al, 2019). Ejemplo de ello es la administración de MSCs que impulsó la diferenciación de precursores neurales a neuronas dopaminérgicas e incrementó la supervivencia neuronal, en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* de la enfermedad de Parkinson mediante el uso de las neurotoxinas MPP (1-metil-4-fenilpiridinio) y MPTP (1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina). Asimismo, se observó un aumento significativo en la expresión de EGF (regulador en el proceso de neurogénesis) y se consideró como el principal responsable de los efectos neuroprotectores en ambas condiciones (Park et al, 2012).

En padecimientos como la esclerosis lateral amiotrófica, la inyección de MSCs autólogas en siete pacientes contribuyó a disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad sin la presencia de efectos adversos característicos de las terapias farmacológicas, confirmando que las células fueron seguras y funcionales hasta los doce meses de seguimiento (Oh et al, 2015). Por otra parte, en un modelo de la enfermedad de Alzheimer mediante la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y, las MSCs indujeron una actividad neuroprotectora al aumentar la viabilidad celular, la cantidad de autofagosomas y mitigar los niveles de la toxina β -amiloide (Shin et al, 2014).

Investigaciones posteriores han sugerido el uso de las MSCs como una posible fuente de células troncales neurales, por medio de la inducción neuronal de

poblaciones aisladas a partir de la gelatina de Wharton, las cuales fueron cultivadas con FGF, EGF, y suplementos asociados a la neurogénesis como N2 y B27 (Kruminis-Kaszkiel et al, 2020). Asimismo, se ha comprobado su habilidad para diferenciarse a destinos neuronales (astrocitos, oligodendrocitos y neuronas) y modelar afecciones neurológicas (Urrutia et al, 2019) como la esclerosis lateral amiotrófica (Joyce et al, 2010), la esclerosis múltiple (Wilkins et al, 2009), la enfermedad de Parkinson y el Alzheimer con resultados prometedores (Paradisi et al, 2014).

Recientemente, en la lesión pulmonar causada por el SARS-CoV-2, en donde se ha reportado un incremento de las respuestas inflamatorias y en la producción de mediadores proinflamatorios (IL-6, IL-1, TNF- α e interferón) asociados al estrés oxidativo (Sun et al, 2020), las MSCs se han posicionado como una alternativa de tratamiento a la neumonía (uno de los síntomas más graves en la enfermedad) ya que la administración intravenosa a siete pacientes por un lapso de 14 días, provocó una disminución significativa en los síntomas desde el segundo día de tratamiento. Los resultados demostraron que el trasplante fue seguro y eficaz para tratar a pacientes con neumonía provocada por el SARS-CoV-2 (Leng et al, 2020).

Por lo que se refiere a su posible uso clínico, existe evidencia que ha demostrado la seguridad de las MSCs, ejemplo de ello es el estudio de Hernigou y colaboradores que realizaron el seguimiento a 1,873 personas que recibieron progenitores estromales autólogos procedentes de médula ósea en un periodo de 12.5 años. El grupo de investigadores no encontró un aumento en el riesgo de la formación de tumores en los sitios de tratamiento o áreas subsecuentes, concluyendo que la aplicación de MSCs en humanos es segura (Hernigou et al, 2013).

Finalmente, es importante mencionar el impacto terapéutico que han demostrado las MSCs *in vitro* e *in vivo*, el cual puede verse reflejado a través de los numerosos ensayos clínicos registrados en ClinicalTrials.gov, cuya última consulta en el año

2021 indicó un total de 1,285 estudios en diferentes fases (fase I a fase IV) que evalúan el potencial terapéutico de las MSCs en todo el mundo. Para ser más específicos, 258 se encontraban en reclutamiento, 55 estaban suspendidos o retirados, 435 ya habían finalizado y el resto se encontraban en fase activa. Como se puede apreciar, la aparición de MSCs en estudios clínicos ha incrementado en el transcurso de los años, ya que en el año 2015 el total de estudios registrados fue de 463 y únicamente siete tenían resultados finales concluyentes, a diferencia del año 2021 (Ullah et al, 2015).

Aplicación de MSCs en el desarrollo de fármacos y terapias

Debido a sus características, la comunidad científica ha dirigido sus esfuerzos al descubrimiento, desarrollo y validación de fármacos u objetivos terapéuticos (Nirmalanandhan & Sittampalam, 2009). Como ejemplo de ello se encuentran los modelos de enfermedades que emplean células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) que permiten generar MSCs específicas de pacientes para estudiar y tratar padecimientos de interés en forma personalizada (Yang et al, 2019). Por ejemplo, en pacientes con fibrodisplasia osificante progresiva, las iPSCs derivadas de MSCs permitieron representar fenotípicamente dicha condición para evaluar la actividad de la molécula activina A, dando como resultado el incremento en su expresión y a su vez posicionándola como una opción para promover la condrogénesis en modelos celulares (Hino et al, 2015).

Las MSCs también pueden ser utilizadas como una plataforma para identificar la toxicidad de compuestos terapéuticos, garantizando que los fármacos sean seguros y disminuyendo la posibilidad de no ser aprobados al llegar a la etapa de ensayos clínicos (Sharma et al, 2015). En el año 2016, Lo Cicero y colaboradores realizaron un estudio en MSCs derivadas de iPSCs para investigar terapias efectivas contra el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford causado por una mutación genética que produce una forma anormal de la proteína progerina. Los resultados de la investigación permitieron identificar cuatro moléculas capaces de disminuir la

expresión de la proteína. Por otro lado, con el avance en estudios acerca de islotes pancreáticos, científicos han conseguido generar clústeres semejantes a islotes derivados de MSCs y emplearlos como modelos *in vitro* para análisis de citotoxicidad, detección de fármacos y evaluación de sus efectos terapéuticos con el objetivo de establecer tratamientos eficaces para pacientes con diabetes mellitus (Kharat et al, 2021).

Con los avances en el desarrollo tecnológico y las evidencias mostradas en estudios previos, es posible considerar a las MSCs como un modelo útil y eficaz para descubrir y optimizar candidatos terapéuticos (Kitambi & Chandrasekar, 2011). Sin embargo, con el desarrollo de enfermedades cada vez más complejas relacionadas al estrés oxidativo, las terapias actuales no han sido capaces de abarcar los múltiples mecanismos responsables del origen y desarrollo de este tipo de enfermedades, así que es necesario implementar nuevas estrategias que logren detener los daños oxidativos al incidir en la mayor cantidad de objetivos posibles (DiMasi et al, 2016). Por lo tanto, investigadores han dirigido su interés en compuestos capaces de reducir las ROS y el estrés oxidativo como los nutraceuticos, que son alimentos que brindan beneficios para la salud más allá de sus funciones nutricionales básicas sin provocar efectos secundarios que afecten la calidad de vida de los pacientes (DeFelice, 1995).

Nutraceuticos como aplicación terapéutica emergente

Desde el desarrollo de la industria farmacéutica a finales del siglo XX, la medicina se centraba en la producción de fármacos bajo un modelo de monoterapia en el que buscaban dirigir los medicamentos a un objetivo y con un solo fármaco (Efferth & Koch, 2011). Dicho método consiste en la identificación y aislamiento del principio activo, el cual se fabrica, sintetiza o se modifica para incrementar sus propiedades, seguridad y eficacia (Lila & Raskin, 2005). Este tipo de tratamientos pueden aliviar los síntomas, pero son muy costosos, conllevan efectos secundarios y con el surgimiento de enfermedades cada vez más complejas (crónico-degenerativas), fue

inevitable modificar el enfoque predominante desde el siglo XX para dirigir las investigaciones al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas capaces de actuar sobre múltiples objetivos y ser más accesibles (DiMasi et al, 2016).

Por lo tanto, los investigadores han utilizado los antioxidantes como una fuente de nutraceuticos por su capacidad para neutralizar los radicales libres a través de mecanismos como el metabolismo de los lípidos, la restauración del funcionamiento de las membranas oxidadas, la disminución en la producción de ROS y así proporcionar un mecanismo de defensa efectivo contra los daños ocasionados por el estrés oxidativo (Berger, 2005). Este tipo de enfoque posee ventajas al ser natural, seguro para consumo, menos costoso y puede utilizarse de forma preventiva o como terapia contra padecimientos crónico-degenerativos (Santana et al, 2019). Como consecuencia, ha surgido una nueva área de investigación que estudia combinaciones de compuestos antioxidantes para generar efectos más potentes al atacar diferentes síntomas u objetivos de forma simultánea, lo cual podría proporcionar una opción de tratamiento a enfermedades complejas relacionadas al estrés oxidativo mitocondrial como cáncer, Alzheimer y lesiones cardiovasculares (Efferth & Koch, 2011). Sin embargo, su utilización debe acompañarse con herramientas de análisis estadístico que permitan una selección adecuada de las concentraciones de cada componente en la mezcla con la finalidad de reducir la cantidad de experimentos, incrementar las propiedades de cada molécula y evitar que las interacciones entre ellas no limiten su funcionalidad (Ye et al, 2016).

Diseño Box Behnken

Las herramientas quimiométricas son consideradas como una disciplina que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para el diseño, selección de procedimientos y optimización de experimentos para proporcionar mayor información mediante el análisis de datos, por lo que reducen el número de experimentos, disminuyen los gastos y el tiempo para la obtención de resultados (Ferreira et al, 2007). Estos métodos permiten evaluar la relevancia y significancia estadística de los objetos de

estudio mediante el uso de estrategias de optimización univariada o multivariada (Box et al, 2005). Este tipo de técnicas son conocidas como análisis de superficies de respuesta, los cuales mediante un diseño de experimentos tienen como objetivo seleccionar los puntos adecuados donde se establece la respuesta, lo que ofrece la determinación de la interacción entre variables independientes, un modelo matemático del sistema y la reducción de ensayos como se mencionó anteriormente (Boyacı, 2005).

Los diseños de Box Behnken son análisis de superficie de respuesta que proporcionan información sobre los efectos de las variables independientes utilizadas en un experimento con un número mínimo de corridas requeridas. Estos diseños se componen por tres niveles -1, 0, 1 (bajo, medio y alto), pueden aplicarse para un rango de factores entre 3 y 21, y es posible utilizar factores numéricos o categóricos, siendo estos últimos los que generan un mayor número de corridas (Zhu et al, 2009). Para realizar un procedimiento de optimización de múltiples variables, es necesario identificar los dos tipos de variables: la dependiente (variable de respuesta) y las independientes (factores que inciden en la respuesta; Ferreira et al, 2007). Al utilizar el diseño se logran evitar los experimentos realizados en condiciones extremas que pueden brindar resultados insatisfactorios (Ferreira et al, 2007), por lo que este tipo de análisis estadístico en el área farmacéutica se ha dirigido a mejorar el rendimiento de los tratamientos terapéuticos (Zhu et al, 2009). Como ejemplo de ello, ha sido empleado para optimizar métodos de extracción de antioxidantes (Abd-El-Aziz et al, 2022), realizar formulaciones farmacéuticas que han permitido incrementar la disponibilidad, solubilidad (Nagaraj et al, 2017; Kumari et al, 2021) y mejorar la administración de fármacos al reducir el tiempo de liberación y desintegración de compuestos terapéuticos (Venkata et al, 2021; Sharaf et al, 2021).

Por otra parte, con la creciente demanda de pacientes que presentan enfermedades relacionadas al estrés oxidativo, el diseño ha sido aplicado al estudio de moléculas antioxidantes capaces de reducir las ROS y el daño producido por exceso de

reacciones oxidativas mediante la optimización en métodos para su extracción como el empleo para obtener el polisacárido de *Rhododendron arboreum*, cuyo incremento del 11,56% confirmó que el modelo es confiable, adecuado y preciso (Ahmad et al, 2020). Sin embargo, hasta donde se tiene conocimiento, el diseño Box Behnken no ha sido utilizado para formulaciones terapéuticas de compuestos antioxidantes.

Estrés oxidativo

En los procesos biológicos las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el radical hidroxilo, anión superóxido y peróxido de hidrógeno, se producen por medio del oxígeno molecular como resultado del metabolismo celular normal y pueden dividirse en los radicales libres que son moléculas con uno o más electrones desapareados que dan reactividad a la molécula y en formas no radicales cuando dos radicales libres comparten sus electrones desapareados (Birben et al, 2012).

El anión superóxido se origina con la adición de un electrón al oxígeno molecular por la enzima NADPH oxidasa o la xantina oxidasa, esta reacción ocurre principalmente en las mitocondrias por ser el sitio donde se produce el ATP y como consecuencia del 1 al 3% de los electrones que participan en el metabolismo energético se escapan de la cadena de transporte de electrones mitocondrial para convertirse en superóxido (Miller et al, 1990). Posteriormente, por la enzima superóxido dismutasa, el superóxido se transforma en peróxido de hidrógeno para difundirse a través de la membrana plasmática (Dupuy et al, 1991). Por medio de la reacción de Fenton y en presencia de metales como hierro o cobre, el peróxido de hidrógeno puede descomponerse en el radical hidroxilo (la molécula más reactiva de las ROS) y causar daños en proteínas (fragmentación de cadenas peptídicas, alteración de la carga eléctrica, el mal plegamiento de las proteínas y la oxidación de aminoácidos) lípidos, carbohidratos y el ADN (degradación de bases, rupturas de cadena, mutaciones, deleciones o translocaciones; Liochev & Fridovich, 2002).

Estas moléculas son generadas como subproductos metabólicos y su actividad es necesaria para procesos como la fosforilación oxidativa, la activación de factores transcripcionales, los procesos de diferenciación y la apoptosis, por lo que son fundamentales para el desarrollo celular (Navarro-Yepes et al, 2014). Sin embargo, cuando existe una sobreproducción de las ROS, los niveles de antioxidantes disminuyen y se produce un desequilibrio que tiene como consecuencia la destrucción de macromoléculas (Roehrs et al, 2011).

Los antioxidantes son la principal línea de defensa contra el estrés oxidativo por su capacidad para controlar la autooxidación al interrumpir la formación y propagación de los radicales libres a través de mecanismos como la eliminación de especies (anión superóxido) que dan inicio a la peroxidación, lo que detiene la formación de peróxidos y radicales hidroxilos (Gaschler & Stockwell, 2017). Motivo por el que han sido utilizados como tratamiento para contrarrestar los daños provocados por el exceso de reacciones oxidativas (Pizzino et al, 2017).

Enfermedades relacionadas al estrés oxidativo

El estrés oxidativo provoca que las vías de señalización y múltiples procesos biológicos se vean afectados al modificar proteínas, promover reacciones inflamatorias, inducir apoptosis y producir la desregulación de la autofagia. Adicionalmente, afecta la función mitocondrial, haciendo que la progresión patológica se acelere, exacerbando los síntomas de las enfermedades (Forman & Zhang, 2021).

El estrés oxidativo está relacionado a diversos padecimientos como las enfermedades neurodegenerativas; induciendo una disfunción progresiva y muerte de células neurológicas por el plegamiento incorrecto de proteínas como α -sinucleína y β -amiloide asociadas a padecimientos como Parkinson y Alzheimer (Wang & Michaelis, 2010), enfermedades cardiovasculares mediante el incremento en la producción de ROS y la apoptosis de cardiomiocitos (Senoner & Dichtl, 2019),

así como en padecimientos como el cáncer, provocando una alteración en las vías de transducción de señales que conlleva a daños en el ADN, activando procesos inflamatorios, transformando las células normales en tumorales y aumentando su proliferación y metástasis (Tabla 2; Hayes et al, 2020).

Tabla 2. Relación del estrés oxidativo con la fisiopatología de diversas enfermedades

Padecimiento	Efectos del estrés oxidativo	Referencias
Enfermedades neurodegenerativas	<p>Las células del cerebro son más vulnerables a los efectos adversos del estrés oxidativo, principalmente por sus altos requerimientos energéticos que son obtenidos a través de la fosforilación oxidativa, lo que expone a las células a altas concentraciones de oxígeno y procesos oxidativos¹.</p> <p>La acumulación de iones metálicos catalizadores de ROS, el exceso de oxidación de ácidos grasos polinsaturados y el bajo contenido de defensas antioxidantes del cerebro provocan una pérdida de la homeostasis celular, lo que promueve la acumulación de ROS, disfunción mitocondrial y muerte neuronal².</p> <p>En las mitocondrias la liberación del citocromo C, desencadena la acción del factor de activación de proteasa apoptótica 1 (Apaf1) capaz de unirse al apoptosoma en el citoplasma. Dicha unión activa las vías de las caspasas 3, 9 y las proteínas proapoptóticas que permiten la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, provocando la muerte neuronal³.</p>	<p>Dinkova-Kostova et al, 2010¹</p> <p>Finkel & Holbrook, 2000²</p> <p>Wu et al, 2019³</p>
Enfermedades Cardiovasculares	<p>El mal funcionamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial provoca la sobreproducción de ROS y con ello la oxidación de lípidos y proteínas, causando daño celular que se refleja en padecimientos como la aterogénesis que involucra disfunción endotelial, inflamación de vasos sanguíneos y acumulación de lipoproteínas⁴.</p> <p>El miocardio tiene la capacidad de cambiar el consumo de lípidos a glucosa como recurso energético para mantener una estabilidad en la producción de ATP por medio de los cardiomiocitos, actividad regulada por señalizaciones dependientes de insulina. Sin embargo, en pacientes con insuficiencia cardíaca la señalización se interrumpe generando la pérdida de flexibilidad metabólica y con ello compromete la estabilidad de los niveles de ATP, provocando su agotamiento⁵.</p>	<p>Victor et al, 2009⁴</p> <p>Stanley, 2005⁵</p> <p>Mughal et al, 2012⁶</p>

Enfermedades cardiovasculares	La disfunción mitocondrial provocada por un aumento del estrés oxidativo y la depleción del ATP conllevan al incremento del calcio citosólico, lo que induce la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y la reducción de la autofagia ⁶ . Como consecuencia las mitocondrias defectuosas se acumulan en los cardiomiocitos causando apoptosis y dando origen a procesos de isquemia por la muerte de células del músculo cardíaco ⁷ .	Campos et al, 2016 ⁷
Cáncer	<p>El estrés oxidativo y las citosinas inflamatorias como el TNFα y la IL-6 son capaces de activar el factor de transcripción NF-kB y aumentar la tasa de proliferación de células cancerígenas⁸. La respuesta inflamatoria induce la activación de células epiteliales e inmunes que desencadenan una mayor generación de ROS a través de la NADPH oxidasa que pueden dañar el ADN, causando mutaciones que dan inicio a la formación de tumores⁹.</p> <p>La disfunción mitocondrial contribuye al desarrollo del cáncer a través de los siguientes mecanismos:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Generación de ROS que provocan defectos del ADN mediante la activación de vías de señalización oncogénica¹⁰ -Acumulación de oncometabolitos como el fumarato, succinato y 2-hidroxi-glutarato¹¹ -Función aberrante de procesos como la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la permeabilidad mitocondrial, ambos necesarios para la supervivencia de precursores oncogénicos¹² 	<p>Hussain et al, 2003⁸</p> <p>Landskron et al, 2014⁹</p> <p>Gaude & Frezza, 2014¹⁰</p> <p>Izzo et al, 2016¹¹</p> <p>Porporato et al, 2018¹²</p>

Como se menciona anteriormente, las enfermedades comparten un mecanismo en común denominado estrés oxidativo, el cual incide directamente en las mitocondrias (Reddy & Reddy, 2011) y se manifiesta con el incremento en la actividad de vías inflamatorias (Landskron et al, 2014), el mal funcionamiento en la cadena de transporte de electrones (Stanley, 2005), la sobreproducción de ROS (Victor et al, 2009) y la muerte celular (Campos et al, 2016).

Las mitocondrias como organelo blanco de las ROS

Las mitocondrias son las responsables de la producción de energía y están involucradas en diversos procesos celulares, por lo tanto, un mal funcionamiento puede resultar en una pérdida del mantenimiento del potencial de membrana, alteraciones en la cadena de transporte de electrones o una reducción en el traslado de metabolitos indispensables, resultando en una fosforilación oxidativa deficiente, la reducción en la producción de ATP y disfunción mitocondrial (Nicolson, 2014).

Las mitocondrias son altamente vulnerables a los efectos del estrés oxidativo por tres razones principales: 1) son la maquinaria energética celular encargada de generar ROS continuamente como producto de sus reacciones, haciendo que sus componentes como el ADN, proteínas y las membranas sean susceptibles a daños por agresiones oxidativas como se muestra en la figura 3 (Martin, 2012), 2) las proteínas mitocondriales debido a la presencia de grupos de hierro-azufre en su estructura, las hace candidatas a la inactivación oxidante (Dahm et al, 2006) y 3) los fosfolípidos que conforman las membranas mitocondriales se componen de ácidos grasos insaturados, los cuales son propensos a la peroxidación lipídica inducida por ROS (Haines & Dencher, 2002).

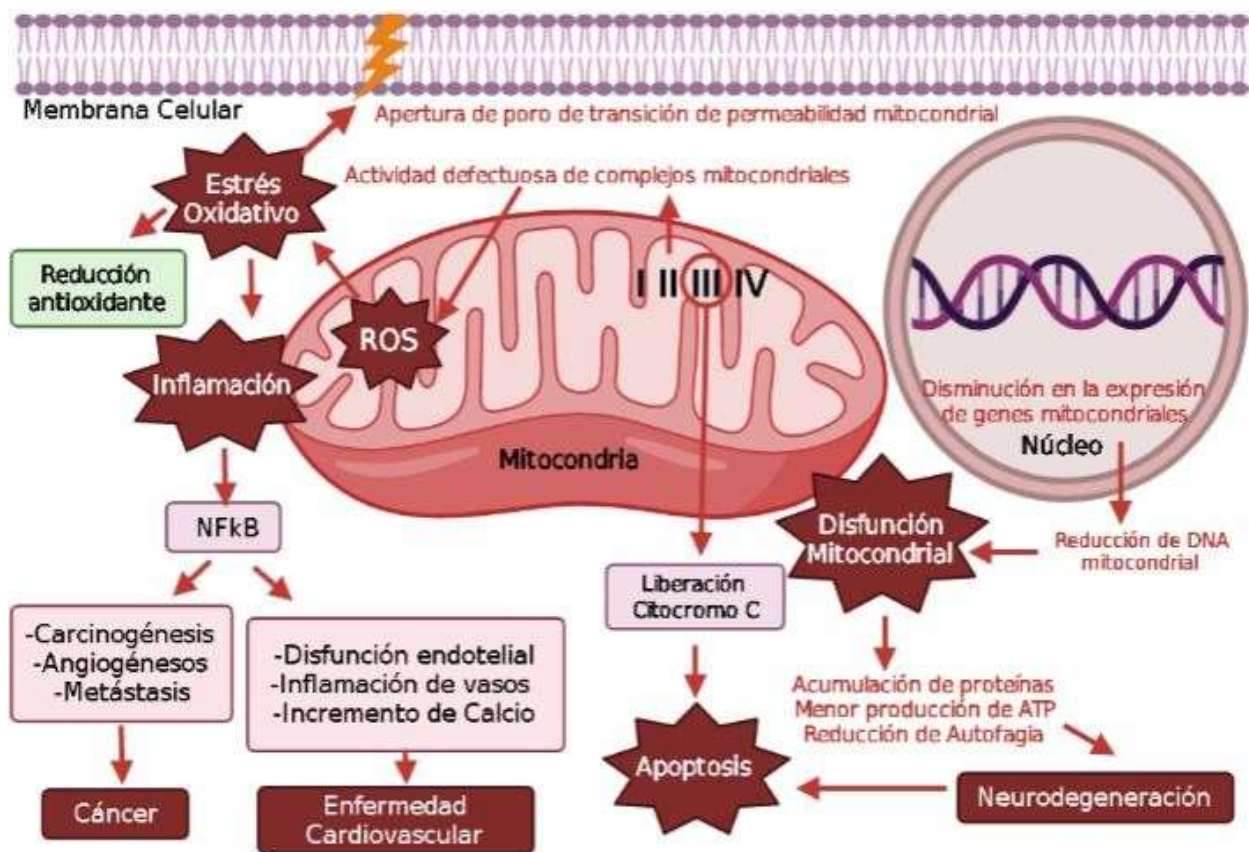


Figura 3. Efecto del estrés oxidativo en las mitocondrias. La sobreproducción de ROS provoca el mal funcionamiento en las mitocondrias por la actividad defectuosa de los complejos mitocondriales II y III, lo que incrementa la liberación del citocromo C, desencadenando la apoptosis. Por otra parte, ROS promueve la actividad de citosinas proinflamatorias (TNF- α e interleucinas 8 y 12) que activan la vía inflamatoria NF-kB involucrada en enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer. A nivel nuclear el estrés oxidativo disminuye la

expresión de genes mitocondriales que repercuten en la producción de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y en una menor producción de ATP, causando disfunción mitocondrial.

A través de la evolución, el cuerpo humano ha desarrollado un organelo que posee un mecanismo de defensa antioxidante capaz de neutralizar los radicales libres, mantener un estado de homeostasis en el organismo y evitar que los subproductos reactivos se acumulen y detonen el estrés oxidativo, conocido como mitocondria (Tan et al, 2018). Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo las defensas antioxidantes producidas por este organelo no son capaces de mantener la homeostasis celular y se produce la disfunción mitocondrial (Apostolova & Victor, 2015). Este fenómeno ha provocado un interés por comprender el funcionamiento de los antioxidantes a nivel celular para transformarlos en terapias que permitan restaurar la fisiología normal en entornos prooxidantes, a través del uso de modelos celulares como las MSCs, donde se ha demostrado que procesos como la proliferación y el envejecimiento están fuertemente relacionado con el estrés oxidativo, por ello la neutralización de ROS es fundamental para conservar un estado de equilibrio indispensable para su proliferación *in vitro* (Liao et al, 2019).

Moléculas con efecto antioxidante

Los antioxidantes son moléculas que tienen la capacidad de disminuir la producción de radicales libres o neutralizarlos al absorber el electrón desapareado para transformarlo en un radical menos reactivo (Tan et al, 2018). Los antioxidantes endógenos son enzimas como glutatión peroxidasa y catalasa, cuya expresión está determinada de manera genética por lo que es difícil incrementarla con fármacos sintéticos (Roehrs et al, 2011). En cambio, antioxidantes exógenos son capaces de suministrarse en los alimentos o de forma comercial con la finalidad de estimular las defensas antioxidantes a nivel celular (Huber et al, 2007). Como se puede apreciar, los mecanismos endógenos son fundamentales para contrarrestar el daño inducido por el estrés oxidativo, pero son superados por la producción excesiva de ROS, por ello antioxidantes exógenos han sido empleados para fortalecer las defensas del

organismo (Roehrs et al, 2011). Dentro de las moléculas exógenas más estudiadas por demostrar efectos protectores contra el estrés oxidativo destacan el resveratrol (Salehi et al, 2018), la coenzima Q10 (Gutierrez et al, 2020) y el ácido α -lipoico (Huang et al, 2017).

Resveratrol

Es un compuesto fenólico natural que se encuentra en una amplia variedad de especies de plantas, dentro de sus propiedades destacan la expresión de genes involucrados en la biogénesis mitocondrial, la fosforilación oxidativa, la defensa antioxidante endógena y la regulación de vías de señalización celular dirigidas a controlar la homeostasis como la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), la sirtuina 1 (SIRT1) y genes relacionados al co-activador (PGC-1 α) descrito como el regulador por excelencia de las funciones mitocondriales y el metabolismo oxidativo (Ferretta et al, 2014).

En modelos neurodegenerativos, la actividad antioxidante de resveratrol se atribuye a sus efectos protectores contra la neurotoxicidad inducida, al reducir la liberación de componentes proinflamatorios como TNF- α mediante la inhibición de la vía NF- κ B y la inhibición de la vía apoptótica p38 (Zhang et al, 2010). Por otra parte, se ha reportado que activa el factor de transcripción Nrf-2 responsable de regular la producción de antioxidantes como glutatión y hemo oxigenasa (HO-1; Chen et al, 2005) y el gen SIRT 1 cuya sobreexpresión es capaz de reducir la muerte celular (Albani et al, 2009).

En MSCs derivadas de médula ósea, la suplementación con resveratrol estimuló la diferenciación osteoblástica, regulando positivamente la expresión de genes osteogénicos y disminuyó la apoptosis al bloquear la vía p38 (Dai et al, 2007; Li et al, 2019¹). En estudios posteriores, su efecto antioxidante ha sido evaluado sobre la senescencia, autorrenovación y multipotencia, cuyos resultados demostraron una reducción en el envejecimiento, un aumento en la proliferación y la reducción en la muerte celular mediante la activación de SIRT1 y la inhibición de p53 y p16 (Hu &

Li, 2019). Por otra parte, el resveratrol promovió la división celular y la secreción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en cultivos de MSCs (Prakoewa et al, 2020).

Los efectos asociados al resveratrol son posibles por su capacidad de activar la vía AMPK (Figura 4) conocida por funcionar como un regulador de energía celular y supervivencia en condiciones de estrés oxidativo, acción que se refleja al inhibir la inflamación producida por la vía NFkB, reducir proteínas proapoptóticas (p38, p53 y p16) y estimular la producción de antioxidantes y coactivadores que controlan la biogénesis mitocondrial como el PGC-1 α (Chiang et al, 2018).

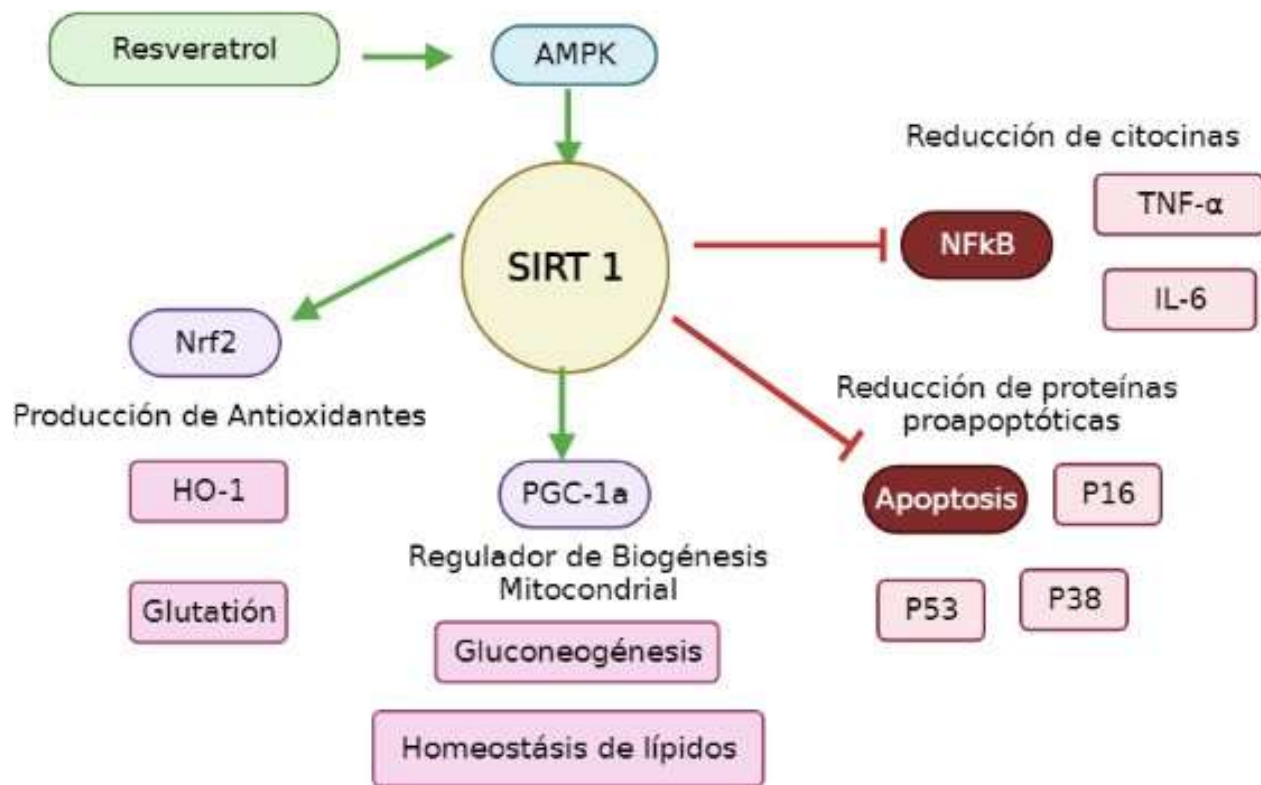


Figura 4. Mecanismo antioxidante del resveratrol a través de la activación de SIRT1. El resveratrol mediante la vía AMPK activa SIRT1 (enzima desacetilasa involucrada en la regulación celular), la cual promueve la actividad antioxidante al incrementar la expresión de enzimas antioxidantes (glutación y superóxido dismutasa), disminuir la producción de proteínas proapoptóticas (p53, p38 y p16) y reducir la producción de citosinas (TNF- α e IL-6) responsables de activar la vía inflamatoria NF-kB, logrando restablecer la biogénesis mitocondrial.

Coenzima Q10

Es una molécula lipofílica presente en todos los tejidos y células, se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial interna y es la encargada de transportar electrones del complejo I y II al complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial permitiendo el paso continuo de electrones, lo cual es esencial para el proceso de fosforilación oxidativa (Quinzii & Hirano, 2010). Por su participación a nivel mitocondrial, CoQ10 ha demostrado ser beneficiosa en el tratamiento de trastornos asociados a disfunciones mitocondriales causadas por exceso de ROS (Cornelius et al, 2017). Otra de sus propiedades consiste en proteger a las membranas celulares y las lipoproteínas plasmáticas contra la oxidación inducida por radicales libres, atribuyendo el efecto neuroprotector a su forma ubiquinol reducida (Quinzii & Hirano, 2010). La actividad antioxidante de esta molécula fue analizada años más tarde en un experimento donde provocaron la senescencia en MSCs mediante la toxina D-galactosa. El tratamiento consiguió reducir los niveles de ROS y la expresión de genes proapoptóticos como p53, p21 y p16, demostrando una protección eficaz contra el envejecimiento de células troncales (Zhang et al, 2015).

En otro estudio, la administración exógena de CoQ10 fue evaluada sobre MSCs expuestas a estrés oxidativo inducido por hierro. Los resultados mostraron un incremento en la cantidad de células y la reducción de la apoptosis (Kooncumchoo et al, 2006). Investigaciones más recientes sobre el papel antioxidante de la CoQ10 permitieron estudiar su relación con la producción de otros antioxidantes, descubriendo que la molécula promueve la expresión de enzimas como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, HO-1 e impulsa las propiedades del factor de transcripción Nrf-2, cuya función es unirse a secuencias específicas de ADN denominadas elementos de respuesta antioxidante para codificar enzimas antioxidantes responsables de conformar el mecanismo de defensa celular (S-Yousef et al, 2019). En MSCs derivadas de médula ósea, las propiedades de CoQ10 fueron evidenciadas por el aumento en la proliferación celular, la diferenciación osteogénica y la expresión de marcadores osteoblastogénicos (Zheng et al, 2018).

De igual forma, se ha demostrado que la CoQ10 es capaz de inhibir el estrés oxidativo, previniendo la senescencia celular e impulsando la división celular (Wu et al, 2020; Zhang et al, 2015).

Por otra parte, las MSCs suplementadas con CoQ10 al ser trasplantadas en un modelo de lesión en medula espinal y con la activación de la vía de señalización factor nuclear eritroide 2 (Nrf-2) consiguieron disminuir la expresión de proteínas proapoptóticas como Bax y caspasa-3, incrementar la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y al mismo tiempo estimular la producción de antioxidantes como el glutatión en condiciones oxidativas provocadas por la exposición a peróxido de hidrógeno (Li et al, 2019²). Todos estos hallazgos convergen en dos vías que hacen posible la acción antioxidante de CoQ10 (Figura 5), la primera es la vía AMPK que funciona como un sensor altamente especializado en los niveles de nucleótidos de adenosina intracelulares, este sensor reconoce una disminución en la producción de ATP y activa la vía, promoviendo reacciones catabólicas para incrementar la generación de ATP como la glicólisis y reduciendo reacciones anabólicas como la gluconeogénesis (Mihaylova & Shaw, 2011).

La segunda vía de señalización es la Nrf-2, que en presencia del estrés oxidativo Nrf-2 es liberada de la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelck (Keap-1) para translocarse al núcleo donde se une a una secuencia específica de ADN conocida como elemento de respuesta antioxidante (ARE) y se activa la transcripción dependiente de ARE, produciendo enzimas antioxidantes como la HO-1 y NQO-1 que reducen el estrés oxidativo mitocondrial (Zhao et al, 2019). Ambos mecanismos dan como resultado un incremento en las defensas antioxidantes y son capaces de restaurar la función mitocondrial al restablecer los niveles de ATP necesarios para que la función celular no se vea afectada, haciendo que el pretratamiento con CoQ10 adquiera mayor utilidad para estimular el crecimiento celular y mantener un estado de homeostasis en las células (Apostolova & Victor, 2015).

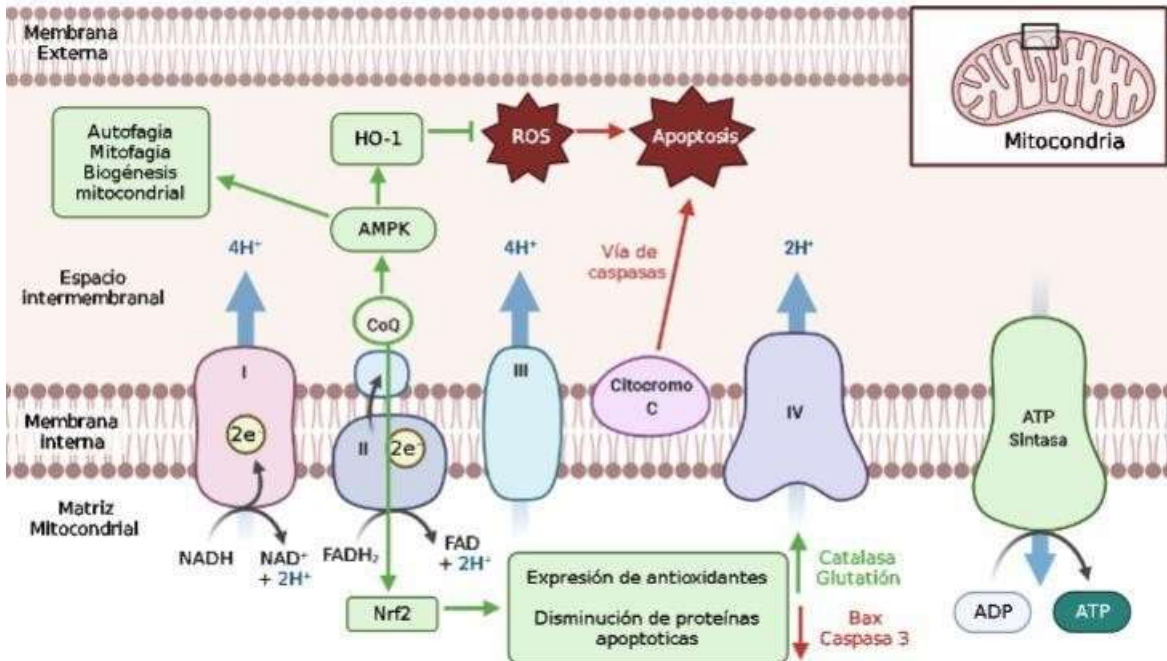


Figura 5. Mecanismo antioxidante de CoQ10 a través de las vías AMPK y Nrf-2. La coenzima Q10 es capaz de actuar mediante dos vías de acción 1) la vía AMPK que induce la expresión de enzimas antioxidantes que neutralizan el exceso de ROS y 2) la activación del factor de transcripción Nrf-2 responsable de regular la expresión de enzimas antioxidantes. En esta vía la subunidad adaptadora de la ubiquitina ligasa E3 (Keap1) funciona como un sensor de estrés oxidativo que en condiciones basales hace posible la ubiquitinación y degradación de Nrf-2, pero en presencia de estrés oxidativo Keap1 pierde esa capacidad y permite que Nrf-2 ingrese al citoplasma, se acumule en el núcleo y active la secuencia ARE para producir defensas antioxidantes.

Ácido α -lipoico

Es un compuesto disulfuro que se encuentra naturalmente en las mitocondrias como una coenzima para la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) y la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa (Maczurek et al, 2008). Esta molécula y su forma reducida, el ácido dihidrolipoico, actúan contra ROS al inhibir su formación debido a su propiedad para quelar metales tóxicos como el hierro, disminuyendo el estrés oxidativo (Camiolo et al, 2019).

De igual forma, se ha reportado que el ácido α -lipoico está involucrado en funciones críticas de múltiples procesos biológicos que incluyen la estabilización y regulación

de complejos mitocondriales presentes en la cadena de transporte de electrones, la eliminación de ROS, la oxidación de moléculas como carbohidratos y aminoácidos y la coordinación del metabolismo energético (Park et al, 2014).

Se ha descubierto que esta molécula antioxidante está involucrada en la vía Nrf-2 al inhibir la actividad de PDK1 (quinasa dependiente de fosfoinositol), haciendo que la PDH pueda reducirse y liberar a Keap1 unido a Nrf-2 para que, al disociarse, Nrf-2 esté disponible e ingrese al núcleo para unirse a una secuencia específica de ADN y promover la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular y enzimas antioxidantes como glutatión, hemo oxigenasa y superóxido dismutasa (Yue et al, 2021) como se describe en la Figura 6.

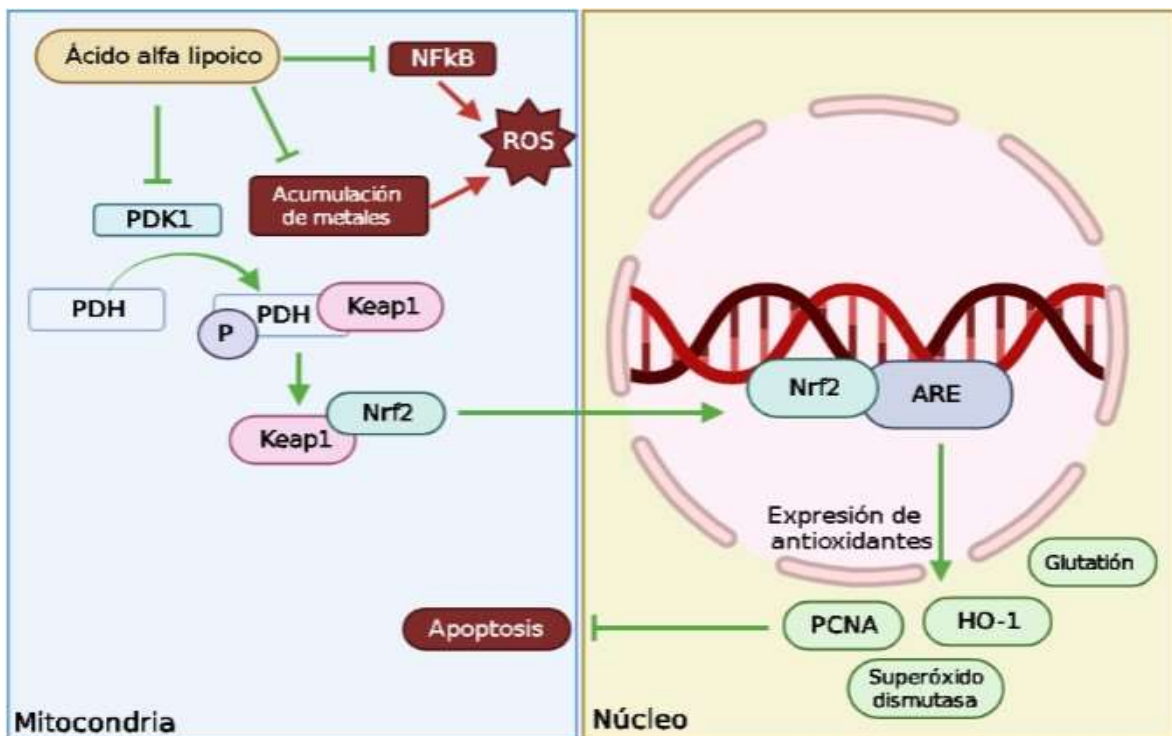


Figura 6. Mecanismo antioxidante del ácido α -lipoico a través de la vía Nrf-2. El ácido α -lipoico actúa contra el estrés oxidativo mediante la inhibición de la vía PDK1, permitiendo que la PDH pueda liberar la subunidad Keap1 para unirse a Nrf2 y activar la expresión de enzimas antioxidantes como glutatión, superóxido dismutasa, PCNA, HO-1 y a su vez disminuir la muerte celular. Tomado de Yue et al, 2021.

En modelos neurotóxicos el ácido α -lipoico destaca por su capacidad para reducir el exceso de ROS al restablecer la proliferación celular posterior a la exposición a peróxido de hidrógeno (Li et al, 2013). Otra de sus propiedades ha sido la actividad antiinflamatoria, ya que inhibe la activación de la vía NF-kB (Li et al, 2015). En cuanto a la apoptosis Li y colaboradores mediante la neurotoxina MPTP evaluaron la actividad de la molécula antioxidante sobre la expresión del antígeno nuclear de células en proliferación, cuya suplementación provocó un incremento en su actividad (Li et al, 2013).

En MSCs derivadas de médula ósea de rata se evaluó la capacidad antioxidante de ALA (1mM durante 48 h) mediante ensayos de MTT para analizar la supervivencia y proliferación celular, así como la expresión del marcador de proliferación Ki-67. El ALA aumentó significativamente la división celular y la expresión de Ki-67 en los grupos que recibieron el tratamiento antioxidante respecto al control (Bashiri et al, 2016). Asimismo, en otro estudio más reciente se evaluaron los efectos antioxidantes del ALA (2 μ M por 24 horas) sobre MSCs derivadas de tejido adiposo (hepatocitos de rata) implantadas en un microambiente de hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono. El tratamiento antioxidante redujo significativamente los indicadores de estrés oxidativo como la liberación de lactato deshidrogenasa, los niveles de fosfatasa alcalina y la expresión de genes proapoptóticos como Bax, estos resultados fueron posibles mediante la inhibición de la peroxidación lipídica, la restauración de la viabilidad celular, el incremento en la expresión de la vía Nrf-2, la sobreproducción de glutatión y la reparación de daños en el ADN (Yaqub et al, 2021).

Por otra parte, se ha identificado que el ácido α -lipoico a una concentración de 50 μ M en cultivos primarios de astrocitos a partir de cerebros de ratas albinas recién nacidas (cepa Wistar de 1 a 2 días de edad) es capaz de promover la proliferación celular mediante la reducción de ROS y a su vez incrementar las defensas antioxidantes como el glutatión (Grasso et al, 2014). En un estudio más reciente, las MSCs tratadas con el antioxidante mostraron restaurar la cantidad de ROS y

hierro intracelular a niveles basales, la recuperación de la integridad de la membrana mitocondrial, el aumento en la expresión de defensas antioxidantes como HO-1 y glutatión (Camiolo et al, 2019), así como una disminución de la actividad inflamatoria y la apoptosis (Abd El-Fattah et al, 2019). Por tal motivo, en los últimos años se han utilizado moléculas antioxidantes con la finalidad de restablecer la función normal en las mitocondrias cuyos mecanismos de acción se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto de moléculas antioxidantes sobre el estrés oxidativo

Moléculas Antioxidantes				
Efectos	Resveratrol	Coenzima Q10	Ácido α -lipoico	Referencias
Inhibe ROS y apoptosis	✓ ₁	✓ ₂	✓ ₃	Wang et al, 2020 ₁ Zhang et al, 2015 ₂ Park et al, 2014 ₃
Evita la peroxidación lipídica		✓ ₂		Zhang et al, 2015 ₂
Reduce la expresión de p16, p21, p38 y p53	✓ ₄	✓ ₂	✓ ₅	Zhang et al, 2015 ₂ Chiang et al, 2018 ₄ Abd El-Fattah et al, 2019 ₅
Disminuye la expresión de caspasa 3, malondialdehído y óxido nítrico			✓ ₅	Abd El-Fattah et al, 2019 ₅
Inhibe la vía inflamatoria NF-kB	✓ ₆		✓ ₇	Zhang et al, 2010 ₆ Li et al, 2015 ₇
Reduce citosinas inflamatorias (TNF- α e IL-6)		✓ ₈		Xie et al, 2020 ₈
Impulsa la biogénesis mitocondrial por AMPK, SIRT1 y PGC-1 α	✓ ₉	✓ ₁₀		Ferretta et al, 2014 ₉ Mihaylova & Shaw, 2011 ₁₀
Promueve expresión de proteínas antiapoptóticas		✓ ₁₁	✓ ₁₂	Kooncumchoo et al, 2006 ₁₁ Yaqub et al, 2021 ₁₂

Activa la vía antioxidante Nrf-2	✓ ₁₃	✓ ₁₄	✓ ₁₅	Chen et al, 2005 ¹³ S-Yousef et al, 2019 ¹⁴ Yue et al, 2021 ¹⁵
Protege contra el envejecimiento celular	✓ ₁₆	✓ ₁₇		Hu & Li, 2019 ¹⁶ Wu et al, 2020 ¹⁷
Reduce toxinas y metales pesados	✓ ₆	✓ ₁₁	✓ ₁₈	Zhang et al, 2010 ⁶ Kooncumchoo et al, 2006 ¹¹ Camiolo et al, 2019 ¹⁸
Aumenta la expresión de PCNA			✓ ₁₉	Li et al, 2013 ¹⁹
Incrementa enzimas antioxidantes metalotioneínas, ferritina, glutatión, HO-1, superóxido dismutasa y catalasa	✓ ₉	✓ ₁₁	✓ ₁₂	Ferretta et al, 2014 ⁹ Kooncumchoo et al, 2006 ¹¹ Yaqub et al, 2021 ¹²
Promueve la proliferación y diferenciación celular	✓ ₂₀	✓ ₂₁	✓ ₂₂	Li et al, 2019 ²⁰ Zheng et al, 2018 ²¹ Bashiri et al, 2016 ²²

El efecto antioxidante de las moléculas es dirigido principalmente a las mitocondrias debido a su capacidad para determinar la función y destino de las células y puedan desempeñan su actividad en rutas de fosforilación oxidativa, el metabolismo energético, la señalización celular y biosíntesis de intermediarios (Sorrentino et al, 2018).

Por la participación en múltiples procesos, se ha identificado el fenómeno de disfunción mitocondrial como un común denominador de enfermedades metabólicas, cardiovasculares y crónico-degenerativas, las cuales pueden presentarse como la causa directa o secundaria (cuando la patología inicial conlleva como efecto posterior el mal funcionamiento de las mitocondrias) lo que conlleva a una muerte celular inminente. (Suomalainen & Battersby, 2018). A raíz de la importancia de los antioxidantes y su papel en las mitocondrias, se han producido

nuevos enfoques terapéuticos que permiten actuar sobre ellas para promover su funcionamiento adecuado, lo que conlleva a un aumento en la proliferación de las células, el cual puede verse reflejado en los resultados de investigaciones que han utilizado el resveratrol, la coenzima Q10 y el ácido α -lipoico para tal fin, como se puede mostrar en la tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones de moléculas antioxidantes que incrementan la proliferación celular

Molécula	Concentración	Referencias
Resveratrol	0.1, 2.5, 5 μ M	Wang et al, 2016
	1 μ M	Yoon et al, 2015
	0.1 μ M	Peltz et al, 2012
	5, 20 μ M	Niu et al, 2011
	0.1, 0.5, 0.8 μ M	Prakoewa et al, 2020
Coenzima Q10	1, 10 μ M	Zhang et al, 2015
	5, 10, 20 μ M	Tsai et al, 2017
	5, 10 μ M	Zheng et al, 2018
	10 μ M	Huo et al, 2018
Ácido α-lipoico	25, 50, 100 μ M	Yang et al, 2016
	50 μ M	Grasso et al, 2014
	50 μ M	Uberti et al, 2021

Investigaciones como las mencionadas anteriormente han demostrado de forma individual promover la división en modelos celulares a distintas concentraciones (Wang et al, 2016; Tsai et al, 2017; Yang et al, 2016). Estos resultados hacen posible considerar el uso combinado de las moléculas para actuar sobre múltiples objetivos asociados a las enfermedades multifactoriales y lograr un efecto sinérgico entre todos los componentes (Sanz et al, 2007).

Moléculas antioxidantes en enfermedades

En los seres humanos, el estrés oxidativo producido por el exceso de los radicales libres está asociado con una serie de enfermedades como alteraciones cardiovasculares (Cai et al, 2009), Alzheimer (Choi et al, 2013), cáncer (Rodríguez et al, 2012), enfermedad ocular (Sanz et al, 2007), diabetes (Giacco & Brownlee, 2010) y Parkinson (Paradisi et al, 2014). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado el beneficio de los antioxidantes en la prevención o retraso del curso de estas enfermedades (Hajhashemi et al, 2010).

La suplementación de antioxidantes ha sido evaluada mediante un modelo de la enfermedad de Alzheimer a través de las células troncales neurales humanas. Los investigadores inhibieron la proliferación celular a través de la adición de oligómeros amiloides y demostraron la capacidad de la coenzima Q10 para restaurar la proliferación mediante la activación de la vía PI3K cuyos resultados fueron sustentados con marcaje de BrdU (Bromodesoxiuridina), ensayos formadores de colonias y la expresión de marcadores de proliferación celular como Ki-67 (Choi et al, 2013). Al explorar nuevas estrategias y obtener mejores resultados, los investigadores han empleado combinaciones de antioxidantes que demostraron ejercer mayores efectos en la disminución del estrés oxidativo y en el incremento de la proliferación celular (Shafi et al, 2019). En la enfermedad de Parkinson para evaluar el efecto neuroprotector del resveratrol, investigadores prepararon cultivos neuronales primarios a partir del mesencéfalo ventral diseccionado de embriones de rata E15 (Sprague-Dawley) para someterlos a la neurotoxina MPP+ (10 μ M por 24 horas) provocando la pérdida del 70% de células. Sin embargo, el tratamiento con resveratrol logró conservar hasta el 72% de neuronas vivas, ejerciendo un efecto neuroprotector (Stull et al, 2002).

En investigaciones relacionadas con el cáncer fueron seleccionados 96 ratones y los dividieron en cuatro grupos 1) ratones control, 2) ratones control tratados con resveratrol, 3) ratones con tumores y 4) ratones con tumores tratados con resveratrol. Por vía subcutánea se les inyectaron 750.000 células de

adenocarcinoma y a partir del día 6 los ratones recibieron vía oral el tratamiento con resveratrol. El estudio pudo demostrar que el antioxidante fue capaz de evitar la atrofia cardíaca inducida por la presencia de tumores de adenocarcinoma C26 al inhibir la actividad de la vía inflamatoria NF-kB (Shadfar et al, 2011).

En las enfermedades oculares se utilizaron ratones para evaluar la actividad antioxidante de moléculas como luteína, zeaxantina, ácido α -lipoico y glutatión. Los ratones fueron alimentados vía oral con un tratamiento de 0.67 mg de zeaxantina y luteína, y 10 mg de ácido α -lipoico y glutatión por kg de peso corporal. Los resultados de la administración combinada de los antioxidantes mostraron una disminución en el daño del ADN y la reducción de reacciones TUNEL positivo, lo que permite retrasar la muerte de células fotorreceptoras y así disminuir la progresión de la pérdida ocular en comparación a los animales control (Sanz et al, 2007). En investigaciones más recientes Çolak y Uysal (2017) utilizando CoQ10 y resveratrol pudieron prevenir la toxicidad inducida en un modelo de *Drosophila melanogaster* al inhibir la peroxidación lipídica, asociando dicha respuesta con la capacidad de las moléculas para eliminar radicales libres.

Efecto del estrés oxidativo en las MSCs

A largo plazo los cultivos de MSCs, pueden sufrir envejecimiento celular, disminución en la capacidad de autorrenovación, diferenciación prematura y apoptosis (Hu & Li et al, 2019). Además, son susceptibles a un entorno carente de nutrientes, estrés oxidativo y a factores citotóxicos a los que pueden estar expuestas durante el cultivo y expansión. Por ello, ha incrementado la búsqueda constante de factores protectores que permitan a las MSCs desarrollarse frente a microambientes desfavorables (Halabian et al, 2013).

Las MSCs pueden reducir sus propiedades (la división celular, el potencial de diferenciación, la secreción de factores tróficos, la multipotencialidad y sus efectos inmunomoduladores) a causa del estrés oxidativo, cuyo fenómeno se manifiesta por

un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante de un sistema biológico para neutralizar los productos reactivos como se mencionó previamente (Pizzino et al, 2017). Por medio de modelos citotóxicos utilizados para inducir estrés oxidativo en las células, se ha logrado establecer una relación directa entre el estrés oxidativo y las propiedades de las MSCs, ya que a mayor estrés los efectos benéficos de las células se reducen (Choo et al, 2014) y fenómenos como el envejecimiento celular y la apoptosis se aceleran (Rajendran et al, 2014; Wu et al, 2013).

El envejecimiento se caracteriza por la interrupción del ciclo celular, lo que compromete el uso de las MSCs por la reducción significativa de funciones como la secreción de factores tróficos, migración, el potencial de diferenciación y un limitado número de duplicaciones, lo que dificulta obtener la cantidad de células necesarias para la aplicación clínica (Murphy & Hartley, 2018). Investigadores se han dado a la tarea de realizar experimentos sobre MSCs derivadas de tejido adiposo con la finalidad estudiar los efectos de este proceso en las células. Para tal fin, se mantuvieron los cultivos en condiciones de crecimiento normales hasta la senescencia (pase 23). Para evaluar dicha condición se analizó la actividad de la enzima β -galactosidasa (estándar de oro para la identificación de células envejecidas), la cual incrementó desde $4.23 \pm 1,6 \%$ en el pase 2 hasta un $90.48 \pm 3.29 \%$ en el pase 20, a diferencia de las células jóvenes que carecían de la actividad detectable de la enzima (Estrada et al, 2013).

A nivel molecular, los autores monitorearon la expresión de indicadores típicos de senescencia p53, p21 y p16, lo cual demostró un aumento progresivo de células apoptóticas ($0.75 \pm 0.23\%$ en células jóvenes y $5.99 \pm 2.63\%$ en células senescentes) y una disminución en la cantidad de células replicantes (7.38 ± 1.26 y 2.29 ± 0.332 respectivamente). Por otra parte, el envejecimiento celular promueve telómeros disfuncionales o cortos que producen disfunciones como puentes de anafase, cromosomas dicéntricos y la ruptura de cromátidas que contribuyen a la generación de aneuploidías e inestabilidad genética durante la expansión de los

cultivos, comprometiendo el funcionamiento adecuado de las células e impulsándolas a rutas apoptóticas (Estrada et al, 2013).

En estudios posteriores se demostró que la exposición de MSCs derivadas de médula ósea a estrés oxidativo inducido por una mezcla de pesticidas (clorpirifós, dimetoato, diazinón, iprodiona, imazalil, maneb y mancozeb) durante 21 días fue capaz de provocar modificaciones fenotípicas como la sobreexpresión de proteínas apoptóticas que incrementaron la muerte celular, la disminución de la división celular y diferenciación adipogénica, lo cual coincide con el proceso de envejecimiento celular debido a que las células de la médula ósea al ingresar a la etapa de senescencia, son remplazadas por tejido adiposo y conlleva a una fragilidad ósea progresiva. De igual forma con estudios *in vivo* en ratones confirmaron que la exposición al estrés oxidativo provocó un fenotipo tumorigénico en 3 de los 9 ratones 169 días posteriores a la exposición (Leveque et al, 2019).

Para los procesos de diferenciación celular, es necesario contar con el adecuado funcionamiento de factores como la biogénesis mitocondrial, la respiración mitocondrial y el potencial de membrana (regulados por los niveles de ROS), por ende si existe un mal funcionamiento en la cadena de transporte de electrones, la disminución en la respiración mitocondrial impacta directamente en una reducción de la capacidad de diferenciación en las células (Chen et al, 2008). En la diferenciación adipogénica, el potencial de diferenciación se reduce significativamente por dos razones principales: 1) los procesos como la biogénesis y el metabolismo mitocondrial que son factores claves para la diferenciación de MSCs disminuyen por el estrés oxidativo y 2) la sobreproducción de ROS incrementa la senescencia celular, lo que provoca la inhibición de la diferenciación celular (Alt et al, 2012). Por otra parte, en la diferenciación osteogénica, la inducción de la osteogénesis en MSCs humanas ha sido posible por la regulación positiva del ADN mitocondrial, el incremento de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa y la disminución de ROS, lo cual sugiere que el estrés oxidativo debe disminuir para propiciar el ambiente adecuado para que las células puedan

diferenciarse (Chen et al, 2008), lo cual coincide con la necesidad de garantizar un equilibrio entre las ROS y las defensas antioxidantes para la diferenciación condrogénica (Bai et al, 2019).

Como el estrés oxidativo altera procesos de proliferación, expansión, diferenciación y longevidad en las MSCs, es necesario identificar estrategias que permitan prevenir el estrés oxidativo y la senescencia prematura para evitar comprometer la funcionalidad de las células (Denu & Hematti, 2016). Por otra parte, la comprensión de los mecanismos que involucran la actividad de las ROS es fundamental para contribuir al diseño de enfoques experimentales que permitan retrasar, prevenir o revertir el daño celular, haciendo que las MSCs puedan incrementar su capacidad proliferativa mediante el uso de técnicas dirigidas al estrés oxidativo como la administración endógena de moléculas antioxidantes que sean capaces de neutralizar los componentes oxidados liberados durante el cultivo y así lograr mantener la homeostasis requerida para que las células puedan desarrollarse adecuadamente (Choo et al, 2014).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido que las enfermedades cardiovasculares (2 a 8.9 millones), enfermedades neurodegenerativas (2 millones), y cáncer (1 millón; OMS, 2020) presentan como común denominador la disfunción mitocondrial y un desequilibrio causado por el estrés oxidativo (Lechanteur et al, 2016) que se manifiesta con la pérdida del potencial transmembrana y un mal funcionamiento en la cadena de transporte de electrones, afectando directamente procesos celulares como la proliferación, diferenciación y metabolismo energético que conducen a una senescencia prematura y muerte celular (Nicolson, 2014).

En los últimos años las investigaciones en MSCs han permitido el descubrimiento de nuevas herramientas para su proliferación y diferenciación *in vitro* con objetivos terapéuticos, logrando introducir protocolos cada vez más innovadores (Mastrolia et al, 2019). No obstante, es primordial lograr un estado de homeostasis que permita

un desarrollo adecuado; ya que en ambientes donde se pierde el equilibrio entre la capacidad antioxidante y la producción de ROS se genera el estrés oxidativo, considerado como el principal factor de induce la senescencia prematura y reduce la proliferación y viabilidad celular (Holmström & Finkel, 2014).

Las moléculas con actividad antioxidante son capaces de mantener la homeostasis en las reacciones de óxido-reducción al neutralizar la producción excesiva de ROS (Kothari et al, 2010). En MSCs se ha evidenciado que los antioxidantes generan un incremento en la resistencia celular ante el estrés oxidativo inducido, promueven la proliferación, mejoran la capacidad de adhesión celular y aumentan el potencial de diferenciación (Halabian et al, 2013). Por ello, el siguiente paso en la investigación ha sido explorar combinaciones de antioxidantes que sean capaces de incrementar las propiedades de MSCs a través de la optimización de mezclas terapéuticas (Geçotek et al, 2019). Sin embargo, es fundamental establecer adecuadamente las concentraciones de cada molécula que permita alcanzar los resultados deseados (Ferreira et al, 2007). Por ende en este estudio se propuso el uso de un diseño de mezclas Box Behnken con la finalidad de establecer una mezcla de los antioxidantes resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico que permita optimizar la proliferación en MSCs derivadas de placenta humana sin realizar numerosos experimentos o invertir tiempo y recursos innecesarios

JUSTIFICACIÓN

La evidencia apunta que el exceso de ROS y el estrés oxidativo son uno de los principales factores que promueven la aparición y progresión de enfermedades crónico-degenerativas como cáncer, Alzheimer, Parkinson, arritmias y enfermedad arterial debido a los daños que el exceso de oxidación provoca en las mitocondrias (Taniyama & Griendling, 2003). Por otra parte, se ha descrito que uno de los principales efectos adversos que presentan las MSCs es la senescencia, lo que compromete su aplicabilidad hacia cualquier área al no permitir que las células se dividan de forma adecuada (Borodkina et al, 2014).

Para contrarrestar dicho fenómeno que puede estar presente en el ambiente y que no permite el crecimiento óptimo de las células *in vitro*, se ha sugerido que la suplementación de antioxidantes a las células a través del medio de cultivo puede reducir el estrés oxidativo al incrementar las defensas antioxidantes y neutralizar las ROS, lo que resulta en una alta tasa de crecimiento, un aumento en el potencial de diferenciación y la prolongación de la vida útil de las MSCs (Wang et al, 2009). En modelos neurodegenerativos como el Alzheimer, la suplementación con CoQ10 y ácido lipoico restauró la producción de ATP, promovió la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y disminuyó los fragmentos del péptido β -amiloide, la proteína tau fosforilada y la inflamación (Federico et al, 2012). En enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, los polifenoles como el resveratrol actúan al quelar iones metálicos como el cobre y el hierro que están involucrados en la producción de peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. De igual forma han sido capaces de inhibir la acción de enzimas oxidativas como la xantina oxidasa y la proteína quinasa C (Quideau et al, 2011).

Los antioxidantes como el resveratrol, coenzima Q10 y el ácido α -lipoico han demostrado sus efectos benéficos a través de distintos objetivos celulares como la inhibición de la vía NF-kB que disminuye reacciones inflamatorias (Li et al, 2015), la reducción en la expresión de proteínas proapoptóticas a través de la vía de las caspasas (Wu et al, 2019), el incremento de defensas antioxidantes (HO-1, glutatión, superóxido dismutasa y catalasa) por la activación de la vía Nrf-2 (Chen et al, 2005), la regulación energética y la sobreexpresión de enzimas antiapoptóticas asociadas a la biogénesis mitocondrial (Chen et al, 2008) que dan como resultado un aumento en la proliferación de las células y la recuperación de las funciones mitocondriales normales (Bashiri et al, 2016) al actuar sobre distintas rutas metabólicas, obteniendo un mayor alcance y permitiendo minimizar el estrés oxidativo (Makanjuola et al, 2015).

Estudios han evidenciado que emplear antioxidantes estimula la división de las células (Shafi et al, 2019). Sin embargo, para lograr un efecto mayor, es necesario

establecer cuidadosamente las concentraciones adecuadas de cada componente en la mezcla, ya que realizar una mala formulación puede comprometer la efectividad de los resultados (Santana et al, 2019). Por ello, el diseño de mezclas Box Behnken es una alternativa viable para establecer valores en las variables que permitan la optimización de mezclas terapéuticas con la finalidad de alcanzar mejores resultados (Yadav et al, 2020) y a su vez reducir considerablemente el número de experimentos (Ferreira et al, 2007).

Para demostrar los efectos que los antioxidantes han revelado a lo largo de numerosos estudios como reducir la apoptosis, promover la división celular, producir precursores de antioxidantes como glutatión en células PC12 (Li et al, 2016), regular negativamente procesos de senescencia en MSCs (Hu & Li, 2019), inhibir la producción excesiva de ROS y conservar la biogénesis mitocondrial en células endoteliales aórticas humanas expuestas a estrés oxidativo inducido (Xie et al, 2020) se estableció un un tratamiento antioxidante (resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico) mediante el diseño Box Behnken para determinar las concentraciones adecuadas de cada antioxidante con la finalidad de optimizar la variable de respuesta (proliferación celular) y obtener resultados rápidos y confiables para determinar si existe efecto sobre las MSCs derivadas de placenta humana.

HIPÓTESIS

El diseño de Box Behnken proporcionará una combinación optimizada de las moléculas antioxidantes resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico que incrementará la proliferación de células troncales mesenquimales derivadas de placenta humana.

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto que ejerce la mezcla optimizada establecida por el diseño de Box Behnken de los antioxidantes resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico sobre la proliferación de células troncales mesenquimales derivadas de placenta humana.

Específicos

- Caracterizar las MSCs derivadas de placenta humana.
- Proponer el diseño de mezclas Box Behnken como un método eficaz para optimizar combinaciones de antioxidantes.
- Evaluar el efecto antioxidante del resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico sobre la proliferación de MSCs derivadas de placenta humana.

MÉTODOS

Cultivo y expansión de células troncales mesenquimales humanas

Las MSCs derivadas de placenta humana de pasaje 3 fueron adquiridas a través del banco de células troncales LCELLS® con el número de licencia sanitaria expedida por COFEPRIS: 12-T2-14-039-0001. Un total de 3×10^3 células/cm² se sembraron y proliferaron en matraces T25 utilizando medio para MSCs con la siguiente composición: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma Aldrich), suero fetal bovino al 10% v/v (Byproducts) y penicilina/estreptomicina al 1% (Sigma Aldrich). Las MSCs se cultivaron en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia entre el 80 y 90% (Figura 7). A continuación, las MSCs fueron disociadas empleando tripsina (0.025%) durante 5 minutos para su uso en los experimentos posteriores (Figura 8).

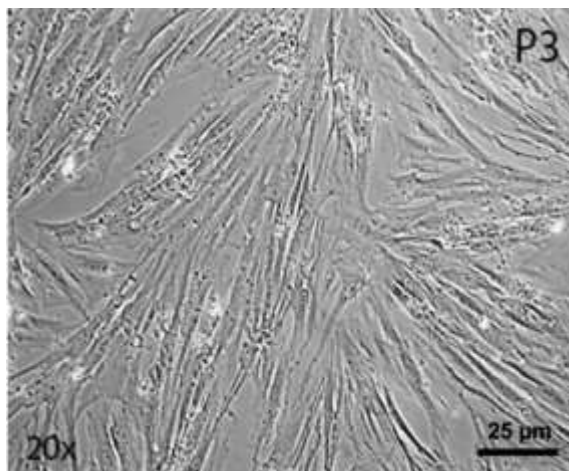


Figura 7. Microfotografías de células troncales mesenquimales (MSCs) derivadas de placenta humana. Se observan MSCs del pase 3 (P3) utilizadas en este estudio. Las células se encuentran adheridas a la placa de cultivo con una morfología en forma de huso con 2 o 3 nucléolos con una distribución de crecimiento lateral y una expansión. Fotografía tomada en microscopio invertido bajo filtro de contraste de fase a un aumento de 20x.

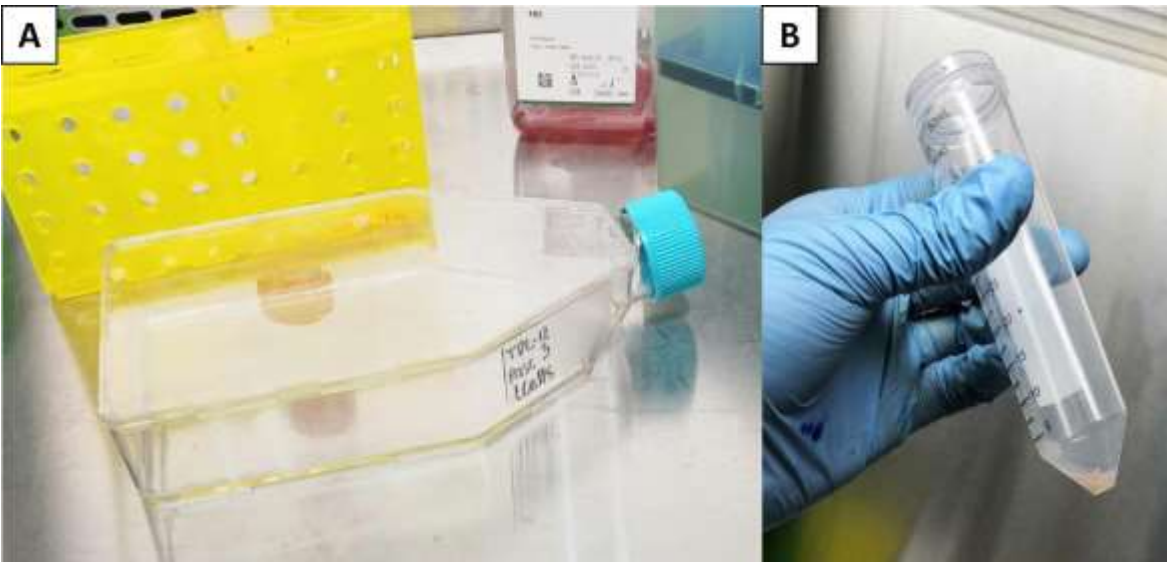


Figura 8. Obtención de MSCs para experimentación del presente estudio. A) Crecimiento de MSCs en matraces T25 con una confluencia entre el 80-90%. B) Obtención del pellet después de la disociación celular por tripsina y centrifugación.

Caracterización Celular

Citometría de flujo

Las MSCs se separaron usando la enzima tripsina (0.025%) y se incubaron durante 5 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo la enzima fue inactivada con medio DMEM. Las células fueron centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Se realizó un conteo celular con cámara de Neubauer y se utilizaron 2 000 000 de células. El sedimento celular restante se resuspendió en paraformaldehído al 4% y se dejó en agitación a 120 rpm por 20 minutos.

Se agregó albumina de suero fetal bovino (BSA en PBS al 1%) se centrifugaron nuevamente a 1000 rpm durante 5 minutos para suspender el pelet nuevamente (BSA en PBS al 1%). Posteriormente, las células se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 60 minutos con agitación continua con los anticuerpos conjugados PE mouse anti-human CD44, FITC mouse anti-human CD90 y PerCP-Cy5.5 mouse anti-human CD105. Después se lavaron con la solución BSA en PBS al 1%. Finalmente, las células se analizaron mediante el citómetro de flujo BD FACS Melody™ Cell Sorter (BD Biosciences; EE.UU) y las imágenes se procesaron con el software FCS Express 7 Research Edition™.

Inmunofluorescencia

Las células se sembraron en placas de 8 pozos (3×10^3 células/cm²). En el séptimo día de cultivo se realizó un lavado con PBS, fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y se lavaron con PBS. Para la permeabilización las células fueron incubadas durante 30 minutos en Tritón 100X al 0.05% disuelto en PBS, mientras el bloqueo se realizó utilizando BSA al 3% disuelto en PBS durante 90 minutos. Las células se lavaron con PBS y se incubaron por 24 horas a 4°C con anticuerpos primarios contra CD44 (Ab6124, mouse monoclonal 1mg/ml, 1:200; ABCAM), CD105 (Ab44967, mouse monoclonal 0.2 mg/ml, 1:200; ABCAM), CD90 (Ab23894, mouse monoclonal 0.1 mg/ml, 1:200; ABCAM), y β -Integrina (Ab52971, rabbit monoclonal 1.083 mg/ml, 1:200, ABCAM) diluidos en PBS. Después las células fueron lavadas con PBS y se incubaron en oscuridad durante 90 minutos con los anticuerpos secundarios Alexa 488 (Ab150077, goat anti-rabbit monoclonal, 1:200, ABCAM), Alexa 568 (Ab175473, goat anti-mouse monoclonal, 1:200, ABCAM) y los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (1:2000) por 20 minutos. Finalmente, se obtuvieron imágenes con el microscopio Carl Zeiss Axio Vert A1 (Zeiss; EE.UU) y el software Zen 2.3 lite.

Cell Tracker

Para monitorear la morfología durante la proliferación se utilizó el marcaje con CellTracker™ Green CMFDA (Life Technologies, EE.UU) en células sembradas en placas de 24 pozos (3×10^3 células/cm²). Primero se retiró el medio para MSCs del recipiente de cultivo; las células fueron enjuagadas dos periodos de 5 minutos utilizando PBS 1X (Gibco, EE.UU) y se les colocó la solución de CellTracker™ Green CMFDA (1:1000 v/v utilizando DMEM; C7025, Invitrogen). Posteriormente, las células se incubaron durante 30 minutos a 37°C, se lavaron con PBS y se observaron con el microscopio Carl Zeiss Axio Vert A1 (Zeiss; EE.UU) y el software Zen 2.3 lite.

Optimización de tratamientos mediante el Diseño Box Behnken

Se aplicó un diseño de mezclas Box Behnken para establecer la combinación óptima de tres factores (concentraciones de cada molécula) con tres niveles (bajo, medio y alto) para incrementar la proliferación de las MSCs. El análisis se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.I. La concentración de resveratrol (X1), coenzima Q10 (X2) y ácido α -lipoico (X3) fueron las variables independientes seleccionadas para este diseño experimental y la proliferación celular (Y1) se estableció como la variable dependiente o de respuesta.

Las concentraciones utilizadas para el diseño fueron seleccionadas como los valores mínimos y máximos de los efectos antioxidantes sobre la proliferación celular reportados en modelos de estudio mencionados previamente en la tabla 4. Mientras que en la tabla 5 se especifican los valores utilizados para el desarrollo del diseño Box Behnken.

Tabla 5. Variables empleadas en el diseño Box-Behnken para la optimización de la proliferación celular de MSCs derivadas de placenta humana

Variables independientes	Unidades	Niveles		
		Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (+1)
X1: Resveratrol	μ M	0.1	2.55	5
X2: Coenzima Q10	μ M	5	7.5	10
X3: Ácido α -lipoico	μ M	50	75	100
Variable dependiente		Restricciones		
Y1: Proliferación celular (cel/cm ²)		Maximizar		

Posterior al establecimiento de las variables se realizó la creación del diseño, la cual proporcionó un total de 15 corridas pre-experimentales que fueron realizadas bajo las siguientes condiciones: grupo 1 sin tratamiento (Medio MSCs + DMSO) y grupo 2 con tratamiento. La suplementación del medio con moléculas antioxidantes se agregó al cultivo celular a las 24 horas posteriores a la siembra (3×10^3 células/cm²). El conteo celular se realizó en los 15 pre-experimentos el día 2 y los datos obtenidos de cada pre-experimento se colocaron en el software para analizar el diseño.

Tratamiento antioxidante

El análisis del diseño de mezclas Box Behnken con el resultado de la pre-experimentación permitió seleccionar e identificar la concentración adecuada de cada antioxidante para alcanzar los efectos deseados sobre la variable dependiente (el incremento en la proliferación celular; Yadav et al, 2020). Los grupos de estudio para tal fin, se establecieron de la siguiente forma: grupo 1 control sin tratamiento (Medio MSCs + DMSO) y grupo 2 con tratamiento (Medio MSCs + combinación de antioxidantes resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico). La suplementación del medio con moléculas antioxidantes se añadió al cultivo celular a las 24 horas posteriores a la siembra de 3×10^3 células/cm² y se realizó cambio de medio cada dos días durante 14 días.

Cinética de crecimiento

Posterior a las 24 horas de la siembra, el medio para MSCs fue remplazado cada dos días por medio suplementado con antioxidantes y la proliferación celular se estimó mediante conteos realizados desde el momento de la siembra y en cada cambio de medio hasta el día catorce. Para realizar la cuantificación, las células se disociaron utilizando la enzima tripsina (0.025 % v/v; PBS) incubándolas durante 5 minutos a 37°C para realizar los conteos utilizando el contador de células automatizado Scepter 2.0 (Handheld Automated Cell Counter, Millipore; EE.UU).

Análisis estadístico

Para determinar cómo dos factores distintos (con tratamiento antioxidante o sin tratamiento antioxidante a diferentes días) incidieron sobre la respuesta (proliferación celular) se utilizó el análisis estadístico ANOVA de dos vías para examinar el tratamiento y los días y como prueba post hoc para establecer las diferencias significativas se utilizó la prueba de Bonferroni para la comparación múltiple. Los datos proporcionados por los experimentos se procesaron mediante el software GraphPad Prism 8.

RESULTADOS

Caracterización Celular

Para caracterizar las células se utilizaron las técnicas de análisis celular como la citometría de flujo cuya función principal es medir las características físicas y bioquímicas de las moléculas biológicas (Jaroszeski & Radcliff, 1999) y la inmunofluorescencia que emplea la especificidad de los anticuerpos a los antígenos basado en el uso de fluorocromos para su visualización (Brehm-Steche & Johnson, 2004).

Citometría de flujo

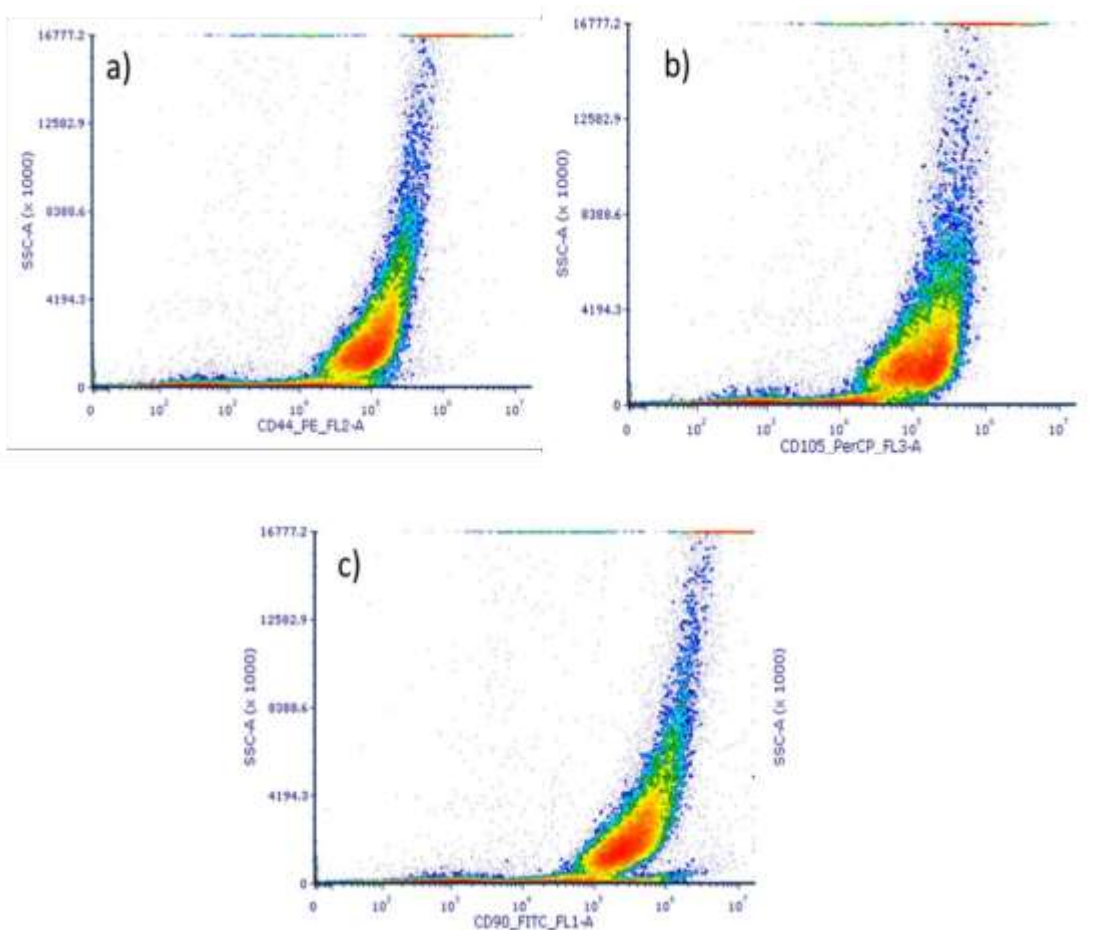


Figura 9. Expresión de marcadores de superficie celular analizados por citometría de flujo. El marcador A) CD44 se expresó un 93.6%, el B) CD105 al 93.5% y el C) CD90 tuvo un 93% de positividad. Resultados obtenidos automáticamente con el software FCS Express 7 Research Edition.

Como se observa en la figura 9, la evaluación de la presencia de marcadores de MSCs por citometría de flujo indicó altas tasas de expresión positiva de los marcadores CD44: 93.6%, CD105: 93.5% y CD90: 93%. Por otra parte, demostró un porcentaje de positividad nula para marcadores hematopoyéticos CD34, CD11, CD45 y HLA-DR (datos no mostrados).

Inmunofluorescencia

Uno de los principales criterios para la caracterización de MSCs es la expresión de marcadores de superficie celular, por lo que examinamos su expresión en cultivo para confirmar los resultados de la citometría de flujo a través de la tinción por inmunofluorescencia, la cual reveló la presencia de marcadores de superficie como la glicoproteína CD44, integrina, los núcleos por medio de DAPI y el empalme de los anticuerpos utilizados (merge; Figura 10).

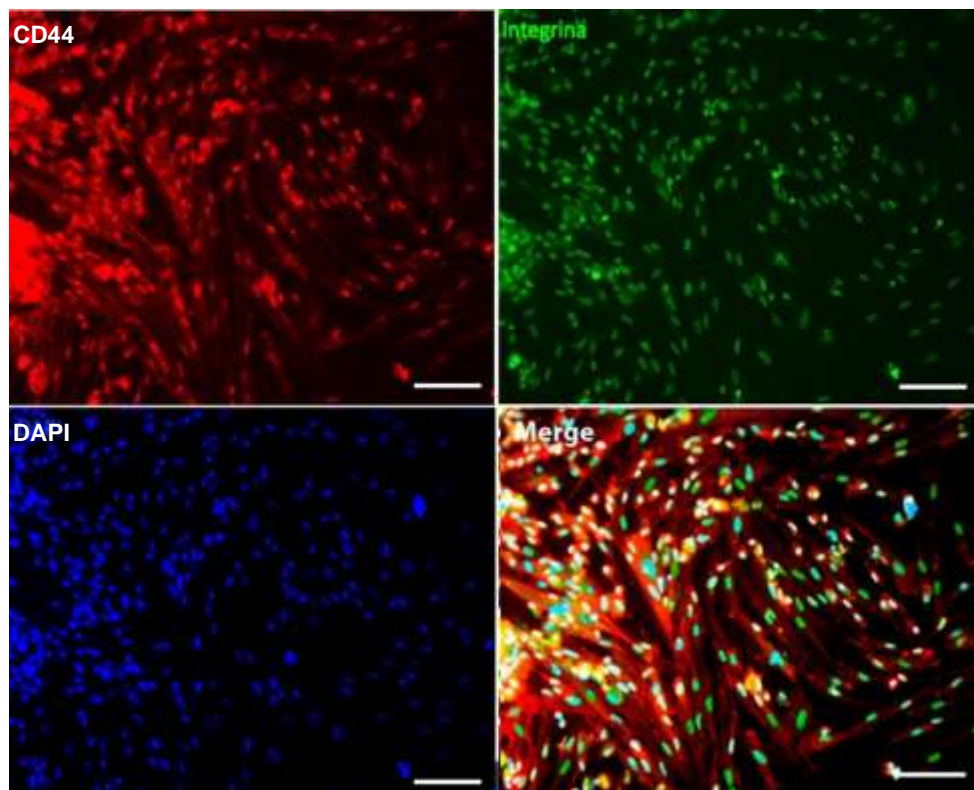


Figura 10. Tinción de inmunofluorescencia representativa de células troncales mesenquimales (MSCs). Microfotografías en donde se observan MSCs positivas a los marcadores característicos de superficie CD44 (rojo), integrina (verde) y el marcador nuclear DAPI (azul); así como su colocalización (merge). Se observa una adecuada expresión en las MSCs. Las

fotografías se adquirieron bajo microscopia de epifluorescencia a un aumento de 10X. Barra de escala 100 μ M.

Por otra parte, las glicoproteínas CD90 y CD105 que se expresan en la superficie de las MSCs también estuvieron presentes en las células empleadas en este estudio (Figura 11 y 12), confirmando una adherencia adecuada a la placa de cultivo.

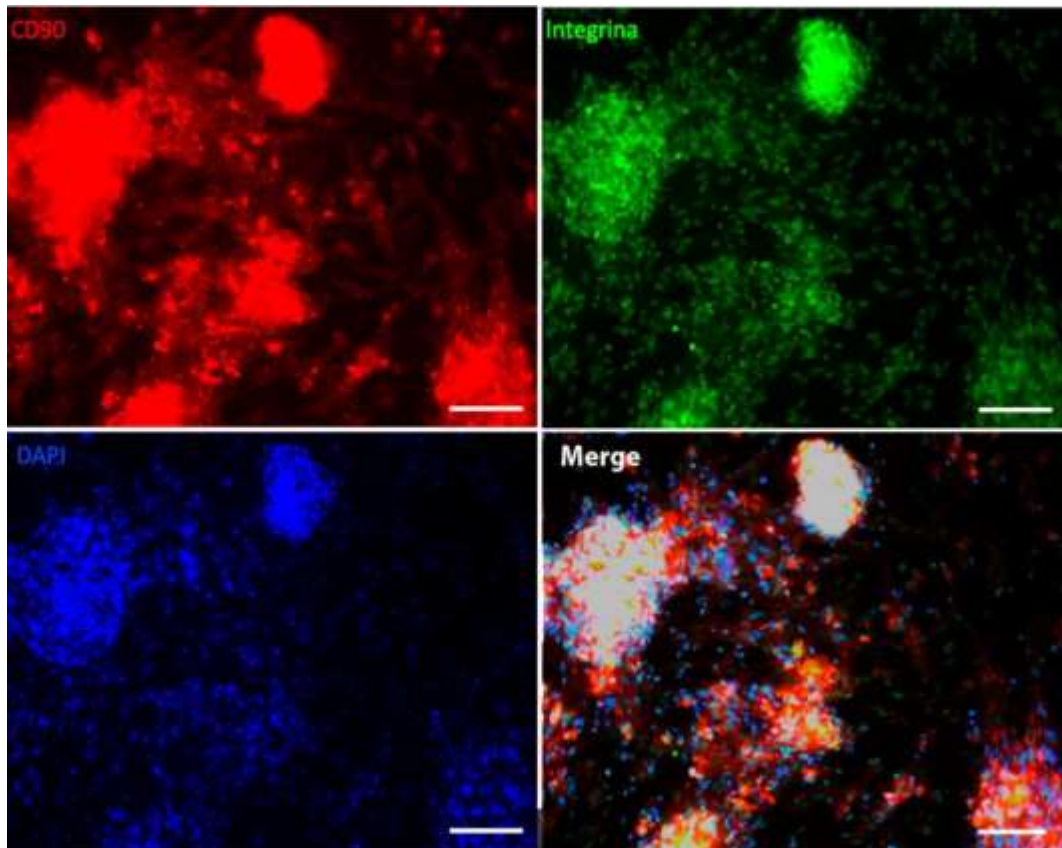


Figura 11. Caracterización de células troncales mesenquimales (MSCs) por inmunofluorescencia. Microfotografías en donde se observan MSCs positivas a los marcadores característicos de superficie CD90 (rojo), integrina (verde) y el marcador nuclear DAPI (azul); así como su colocalización (merge). Se observa una adecuada expresión en las MSCs. Las fotografías se adquirieron bajo microscopia de epifluorescencia a un aumento de 10X. Barra de escala 100 μ M.

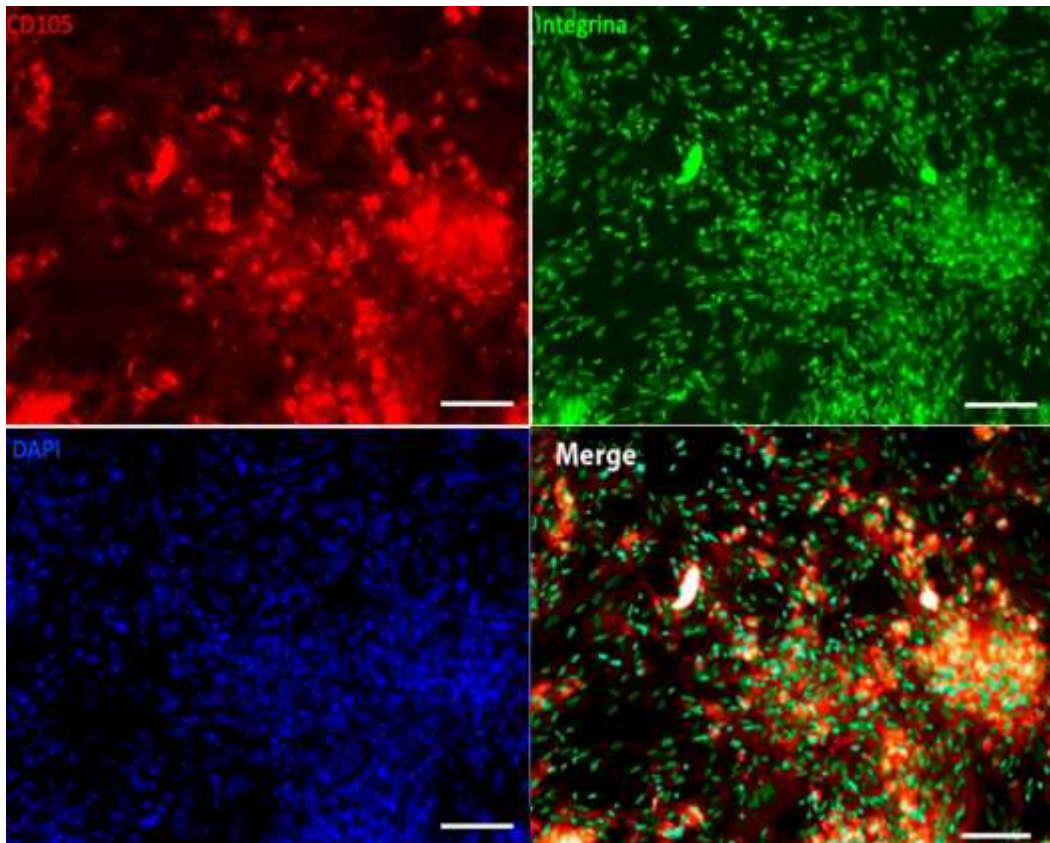


Figura 12. Inmunofluorescencia de células troncales mesenquimales (MSCs). Microfotografías en donde se observan MSCs positivas a los marcadores característicos de superficie CD105 (rojo), integrina (verde) y la tinción de núcleos mediante DAPI (azul); así como su colocalización (merge). Las fotografías se adquirieron bajo microscopia de epifluorescencia a un aumento de 10X. Barra de escala 100 μ M.

La presencia de los marcadores expresados en las células caracterizadas por citometría de flujo e inmunofluorescencia permitieron identificar las células obtenidas como MSCs al cumplir con los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT por sus siglas en inglés).

Diseño de mezclas Box Behnken

Se realizaron 15 corridas experimentales, mismas que fueron empleadas para alimentar el diseño de mezclas Box Behnken. El tratamiento para cada corrida experimental se elaboró con una mezcla diferente en cuanto a concentraciones de los antioxidantes, resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico, y a las 24 horas de la aplicación del tratamiento se realizó el conteo de las MSCs y se registraron como el número de células/cm² (Tabla 6).

Tabla 6. Corridas experimentales para la optimización de la proliferación celular de MSCs derivadas de placenta humana mediante el diseño de Box-Behnken

Resveratrol	Coenzima Q10	Ácido α -lipoico	MSCs Células/cm ² (Día 2)
0.1	7.5	100	9200
5	5	75	8000
5	7.5	50	11300
5	7.5	100	9500
0.1	7.5	50	11200
2.55	7.5	75	13400
2.55	10	100	13000
0.1	10	75	12500
2.55	10	50	16000
2.55	7.5	75	15300
0.1	5	75	8700
5	10	75	12400
2.55	5	50	14300
2.55	7.5	75	13500
2.55	5	100	11600

Variable dependiente: Proliferación celular (Número de células/cm²)

Variabes independientes: Resveratrol, Coenzima Q10 y Ácido α -lipoico

Los análisis de superficie de respuesta obtenidos del diseño Box-Behnken se representan en gráficos de modelos tridimensionales que permiten visualizar los efectos de los factores (concentración de las moléculas antioxidantes) sobre la respuesta (aumento en la cantidad de células en cultivo). Como se muestra en la figura 13 cuando el antioxidante ácido α -lipoico se administra a una dosis de 75 μ M se puede observar que la proliferación celular incrementa cuando la concentración

empleada de coenzima Q10 es mayor a 5 μM , pero entre 9 y 10 μM el número de células obtenido es similar. Sin embargo, cuando la dosis del antioxidante resveratrol se administra a una menor o mayor de 2.55 μM la proliferación celular se ve afectada disminuyendo el número de las MSCs obtenidas.

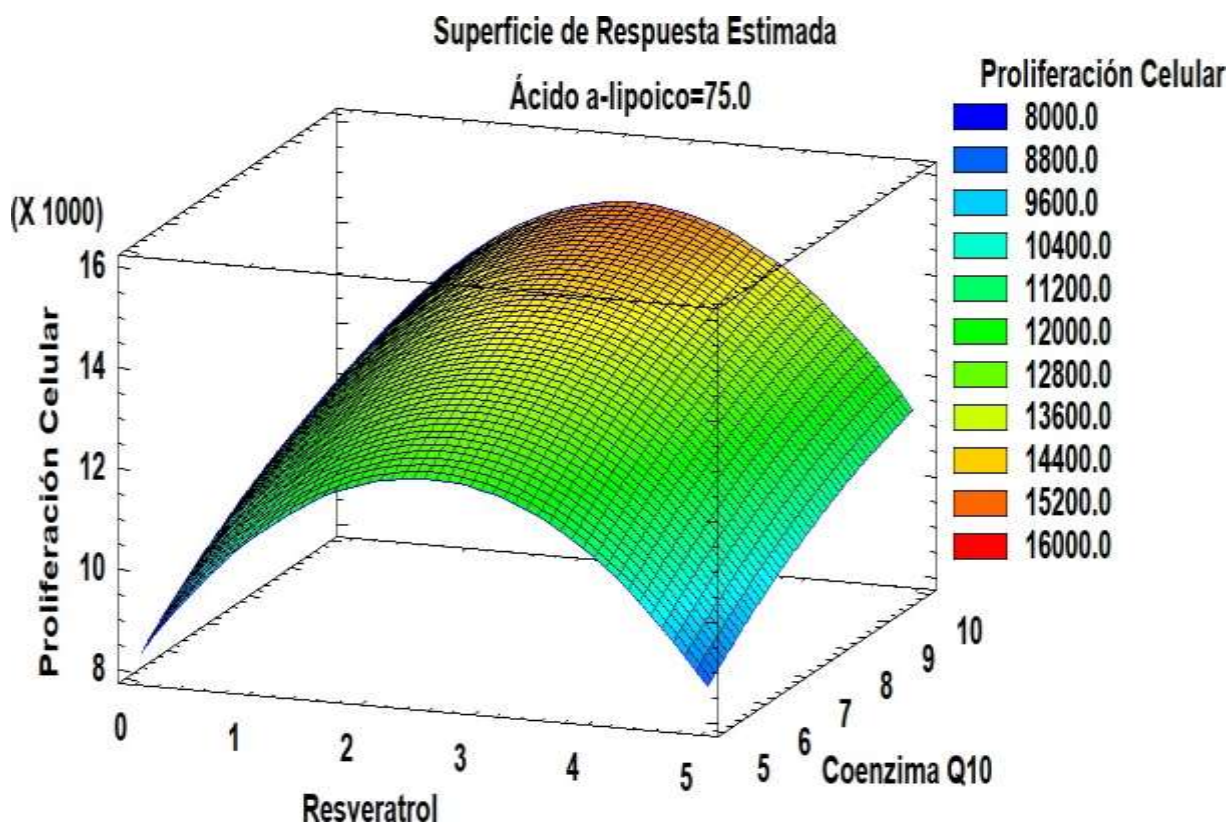


Figura 13. Gráfico de superficie de respuesta tridimensional del resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico a una dosis de 75 μM . Evaluación de la actividad de los antioxidantes (variables independientes) sobre la proliferación celular (variable dependiente).

Por otra parte, al administrar coenzima Q10 a una dosis fija de 7.5 μM , el efecto de proliferación celular de las MSCs disminuye cuando la dosis del ácido α -lipoico se incrementa (Figura 14). Mientras que el disminuir o aumentar la dosis del resveratrol de 2.55 μM reduce la proliferación celular.

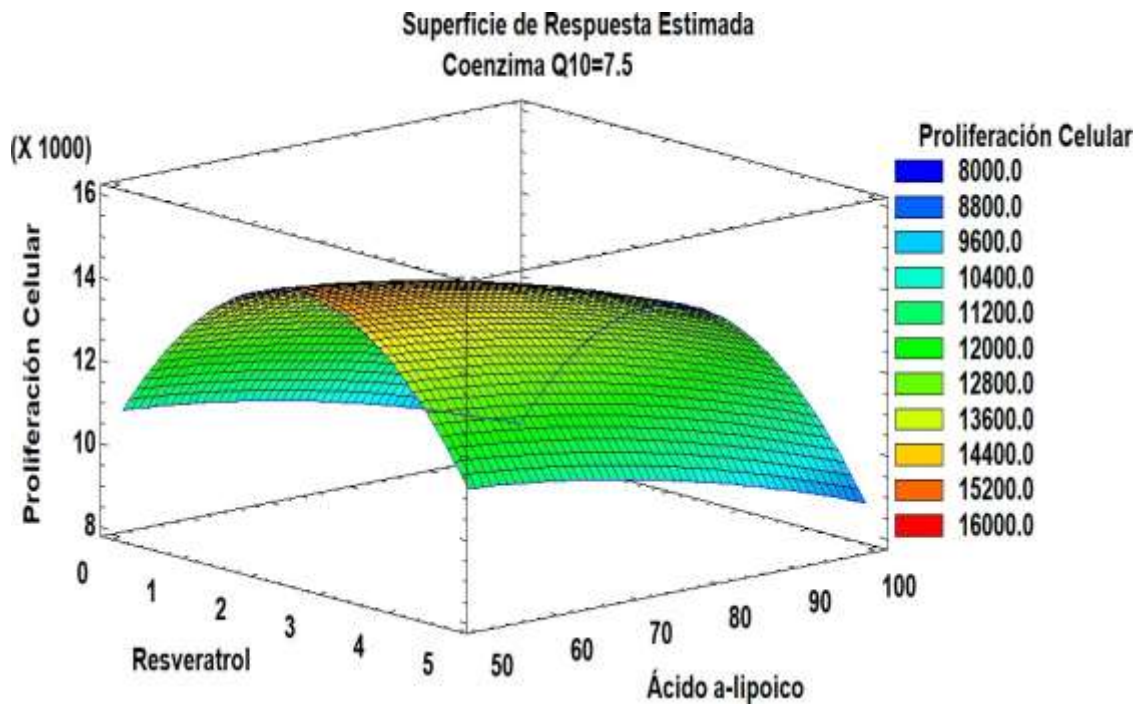


Figura 14. Gráfico de superficie de respuesta tridimensional de las variables independientes resveratrol, ácido α -lipoico y coenzima Q10 a una dosis de 7.5 μ M. Efecto sobre la variable dependiente proliferación celular.

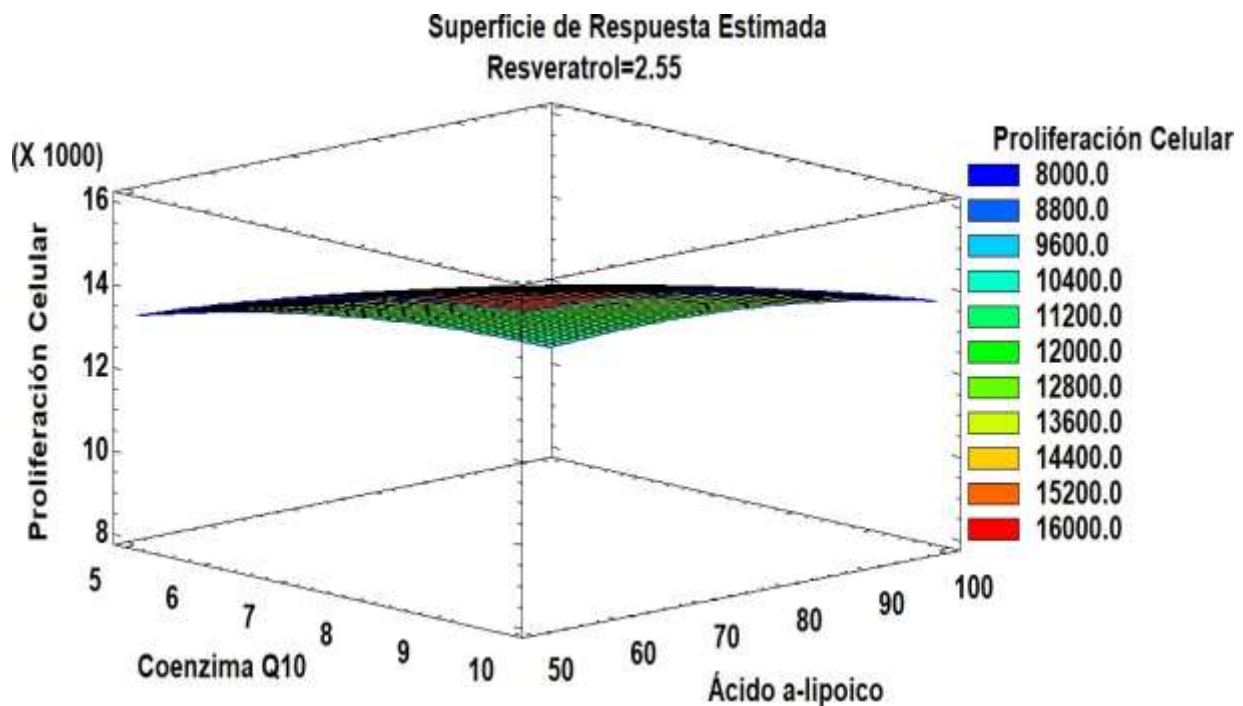


Figura 15: Gráfico de superficie de respuesta tridimensional de las variables independientes coenzima Q10, ácido α -lipoico y resveratrol a una dosis de 2.55 μ M. Efecto sobre la variable dependiente proliferación celular.

Asimismo cuando el antioxidante resveratrol es administrado a una dosis de 2.55 μM se observa que a mayor concentración de coenzima Q10 y menor concentración de ácido α -lipoico se obtiene un incremento en la proliferación celular (Figura 15).

Al realizar el análisis Box Behnken con la opción de optimización para maximizar la cantidad de células en el cultivo, se logró determinar la concentración óptima para cada uno de los antioxidantes que fueron utilizadas en la cinética de crecimiento de los experimentos posteriores para evaluar el efecto de la combinación antioxidante sobre la proliferación celular (Figura 16).

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Resveratrol	0.1	5.0	2.55
Coenzima Q10	5.0	10.0	10.0
Ácido α -lipoico	50.0	100.0	50.0

Figura 16: Valores proporcionados por el diseño Box Behnken para optimizar la respuesta antioxidante.

Efecto de las moléculas antioxidantes sobre la proliferación de MSCs humanas

El análisis ANOVA de dos vías demostró que el factor: tratamiento antioxidante ($P=0.0004$), el factor: día ($P<0.0001$), así como su interacción ($P<0.0001$) inducen efectos significativos en el número de células MSCs durante la cinética de crecimiento. Posteriormente la prueba de comparación múltiple de Bonferroni demostró incrementos significativos en el número de MSCs en los grupos tratados con antioxidantes en los días 2 (24 horas posteriores a la exposición con el tratamiento; 16,000 vs. 6,000 células/cm²; $P<0.01$), día 8 (35,000 vs. 20,650 células/cm²; $P<0.01$) y día 12 (38,800 vs. 29,167 células/cm²; $P<0.05$) en comparación con sus respectivos grupos control a los cuales no se le adicionó tratamiento alguno. Los resultados obtenidos evidencian que el tratamiento promovió la división celular de MSCs derivadas de placenta humana respecto a las células que no recibieron el tratamiento.

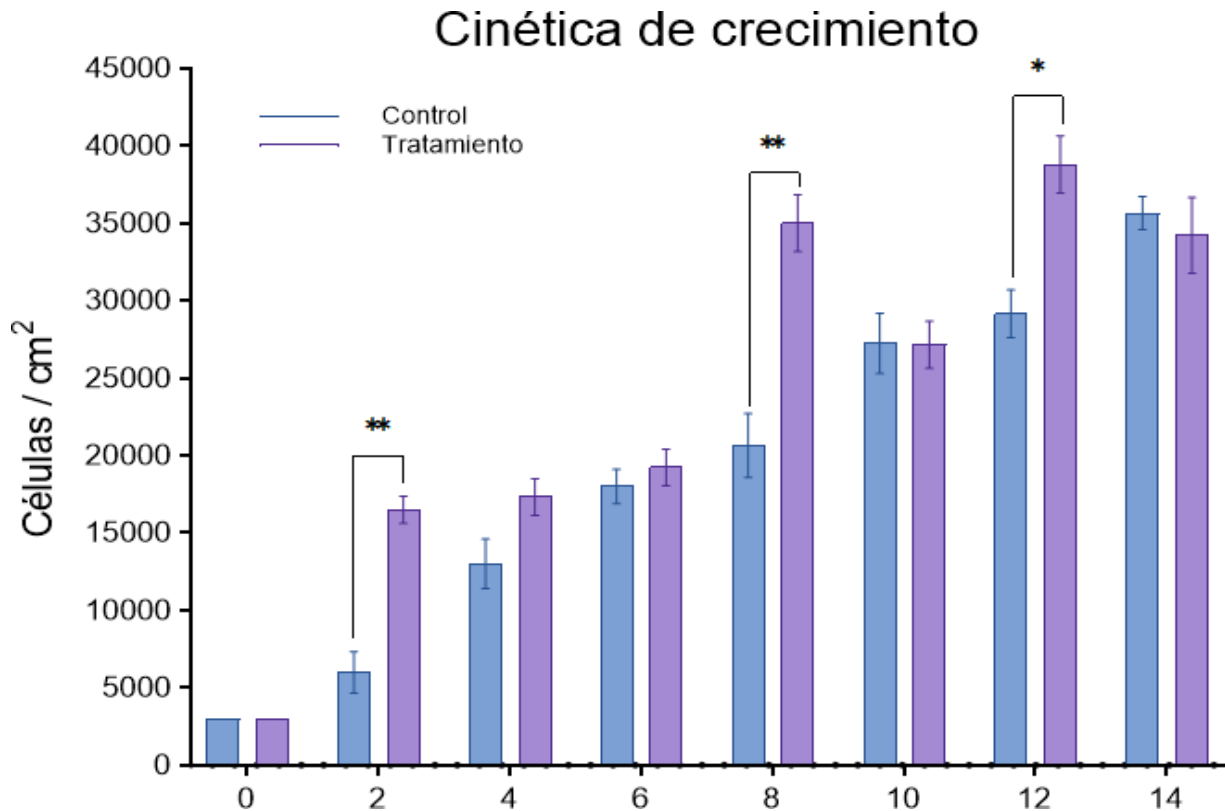


Figura 17. Cinética de crecimiento de células troncales mesenquimales (MSCs) tratadas con antioxidantes (resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico). La administración de los antioxidantes incrementó significativamente el número de células en el día dos, ocho y doce. Los conteos celulares se realizaron utilizando el Scepter 2.0 Handheld Automated Cell Counter (Millipore; EE.UU). El análisis estadístico se realizó empleando un análisis ANOVA de dos vías, seguido de la prueba Bonferroni de comparaciones múltiples para establecer las diferencias entre los grupos con el software GraphPad Prism 8. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Por otra parte, para monitorear la morfología de las células del grupo 2 (con tratamiento) durante la cinética de crecimiento (14 días) se utilizó el marcaje por medio de Cell Tracker™ para obtener una serie de imágenes (Figura 18) donde se puede observar la morfología de las células en los días dos, ocho y doce del experimento.

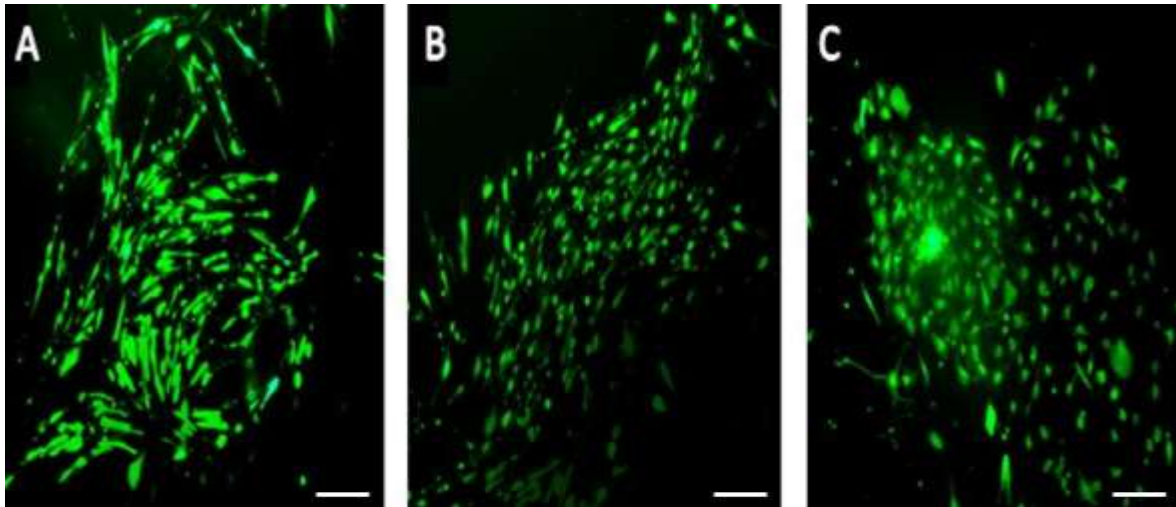


Figura 18. Efecto de antioxidantes (resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico) en las células troncales mesenquimales (MSCs) derivadas de placenta humana. Se observan fotografías de MSCs marcadas con Cell tracker® A) Día dos de tratamiento B) Día ocho de tratamiento C) Día doce de tratamiento. Las fotografías fueron adquiridas con ayuda de un microscopio de epifluorescencia bajo un aumento 10X. Barra de escala 100 μ M.

DISCUSIÓN

Las MSCs son células que poseen capacidades de autorrenovación, multipotencia, son de fácil acceso y pueden expandirse *in vitro* conservando su estabilidad genómica sin presentar controversias éticas, por lo que su importancia ha incrementado en las últimas décadas en áreas como terapia celular, medicina regenerativa y bioingeniería de tejidos (Horwitz et al, 2005). Sin embargo, para que su uso sea considerado, es fundamental que las células logren expandirse en condiciones *in vitro* en cortos periodos de tiempo, conserven su funcionalidad celular (Wang et al, 2012 y Noronha et al, 2019) y sean resistentes a eventos de estrés oxidativo a los que puedan estar expuestas durante su desarrollo (Stavely & Nurgali, 2020).

En primera instancia es necesario contar con un protocolo de caracterización celular que garantice la identidad de MSCs (Dominici et al, 2006). Para tal fin se utilizó la citometría de flujo que permitió la detección de los principales marcadores de superficie celular que se han descrito para las MSCs como CD44 que es una molécula de adhesión que funciona como una plataforma de señalización y está relacionada a la multipotencia, proliferación, migración y apoptosis (Figura 9:A; Zhu et al, 2006), CD105 que influye en la actividad del factor TGF- β y regula los procesos fisiológicos que definen las características morfológicas de las MSCs (Figura 9B; Morine et al, 2016) y CD90 cuya función es regular las interacciones entre célula-célula y célula-matriz y está relacionada con la adhesión y migración celular (Figura 9C; Rege & Hagoood, 2006). Para confirmar la presencia de los marcadores se realizaron tinciones por inmunofluorescencia donde se observa una expresión positiva del marcador CD44, integrina (que está involucrada en la adhesión de las MSCs a la matriz extracelular, en la proliferación y conformación del citoesqueleto; Connelly et al, 2011), los núcleos por medio de DAPI y su colocalización (Figura 10). De igual forma en la Figura 11 y 12 se aprecian la expresión de los marcadores CD105 y CD90 respectivamente, lo que indica el establecimiento de un protocolo adecuado de caracterización celular que les permitió su desarrollo en condiciones *in vitro* (Schmelzer et al, 2019). Nuestros hallazgos coinciden con la presencia de

los marcadores de superficie celular (reportados previamente en MSCs; Mushahary et al, 2018) con un nivel de positividad superior al 90%, la positividad nula de marcadores hematopoyéticos como CD14, CD34, CD45 y HLA-DR (datos no mostrados) y la expresión de los marcadores por inmunofluorescencia confirman la identidad de MSCs al cumplir con los requisitos establecidos por la ISCT.

Como ha sido demostrado a lo largo de la historia, durante su cultivo, las MSCs son influenciadas por factores químicos, físicos y biológicos que inciden en su funcionalidad y supervivencia (Zhou et al. 2017). Los niveles de ROS son un claro ejemplo de ello, ya que repercuten directamente en funciones celulares como la división, producción de energía, migración y apoptosis (Hu et al, 2018). Estas especies se generan principalmente en los complejos mitocondriales y son necesarias para procesos de señalización, metabolismo y supervivencia celular. No obstante, su acumulación ocasiona estrés oxidativo, el cual desencadena daños en biomoléculas como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, lo que resulta en la interrupción de la división celular, senescencia prematura (Atashi et al, 2015) y en el surgimiento de enfermedades crónico degenerativas cuyos tratamientos actuales no han podido detener o revertir los daños causados por el exceso de reacciones oxidativas (Roehrs et al, 2011), lo que compromete directamente la funcionalidad de las MSCs.

En el desarrollo de la industria farmacéutica, la producción de fármacos estaba principalmente enfocada en combatir las enfermedades mediante modelos de monoterapia, es decir, atacar un objetivo en específico, lo que implica la identificación y el aislamiento del extracto activo de bacterias, hongos o plantas para ser fabricado, sintetizado o modificado químicamente para incrementar su seguridad y eficacia (Lila & Raskin, 2005). A pesar de que la estrategia fue altamente exitosa para la implementación de muchas terapias, existe una disminución considerable en el número de medicamentos basados en este modelo (Efferth & Koch, 2011). Una de las principales razones surge con el descubrimiento de enfermedades multifactoriales complejas (cáncer, diabetes, cardiopatías,

accidentes cerebrovasculares y parkinson) cuyos mecanismos de acción son de naturaleza multifactorial (Sheikh et al, 2013). Hoy en día, este tipo de padecimientos son las principales causas de muerte en todo el mundo y los enfoques para combatirlas son la prevención y el tratamiento. Sin embargo, en la gran mayoría de casos no hay una forma efectiva para prevenirse, no tienen cura o los tratamientos existentes solo alivian los síntomas, son costosos y conllevan efectos secundarios (Santana et al, 2019). Como consecuencia surgió un campo de investigación que se dedica al estudio de combinaciones de compuestos capaces de interactuar en conjunto para tratar las enfermedades de manera más efectiva, el cual se basa en dos preceptos principales: 1) las enfermedades crónico degenerativas son multifactoriales y con las combinaciones de moléculas es posible dirigir sus efectos a múltiples objetivos y 2) los compuestos y las interacciones entre ellos pueden producir un efecto terapéutico de mayor potencia que su uso de forma individual (Efferth & Koch, 2011).

En la actualidad los nutraceuticos como el resveratrol, la coenzima Q10 y el ácido α -lipoico han sido aplicados individualmente como un tratamiento alternativo sobre MSCs para el estudio de este tipo de enfermedades (Yoon et al, 2015) por ser compuestos naturales, seguros de consumir, menos costosos que los fármacos y por sus efectos preventivos y terapéuticos (Santana et al, 2019), lo que permite a las células restaurar su potencial de autorrenovación, pluripotencia y diferenciación (Hu et al, 2018). Es por ello que sus propiedades han sido evaluadas en modelos celulares para analizar su respuesta con la finalidad de impulsar estrategias que permitan a las células sobrevivir, dividirse y expandirse para ser consideradas como una opción terapéutica viable (Zhou et al. 2017).

Con los excelentes resultados de la actividad antioxidante de las moléculas resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico de forma individual, recientemente se ha planteado su utilización en conjunto para potencializar sus propiedades sin la necesidad de recurrir a numerosos experimentos de prueba y error que requieren tiempo y recursos humanos, materiales y económicos (Ahman et al, 2015). Para tal

fin se utilizó un diseño de mezclas Box Behnken basado en un análisis estadístico aleatorio que estableció un total de 15 pre-experimentos, cuyos resultados permitieron determinar la concentración de cada componente de la mezcla mediante un análisis de superficie de respuesta, cuya optimización proporcionó los valores de resveratrol 2.55 μM , coenzima Q10 10 μM y ácido α -lipoico 50 μM (Figura 13-16) capaces de influir sobre la variable dependiente y maximizar la cantidad de células/cm².

Los resultados mostrados en la figura 17 demuestran que el tratamiento antioxidante promueve la proliferación de MSCs en expansión *in vitro* desde el día 2 donde inicia la fase de crecimiento exponencial, hasta el día 8 de cultivo, con una ligera disminución en la proliferación el día 10 y un crecimiento exponencial el día 12. Al comparar la cinética de crecimiento con otros autores, el comportamiento de resveratrol de forma individual alcanzó su fase exponencial desde el día 2 al día 8 lo cual coincide con nuestros resultados, pero diferimos en el inicio de su fase estacionaria ya que Peltz y colaboradores alcanzaron este estado a partir del día 9 (Peltz et al, 2012), sin embargo como se pudo observar en la figura 17 la combinación de las moléculas retrasa esta fase estacionaria ya que en el día 12 las células continúan creciendo de forma exponencial, lo que indica un efecto mayor del resveratrol en combinación. Respecto a la actividad individual de coenzima Q10 sobre las células Zheng y asociados han reportado que la etapa exponencial de la cinética de crecimiento se manifestó desde el día 2 y se prolongó hasta el día 7 donde finalizaron el estudio con las células en crecimiento exponencial. Este comportamiento es similar a los efectos de la coenzima Q10 en combinación pero únicamente hasta el día 7 ya que no fue posible hacer el análisis comparativo debido a que las células del grupo de Zheng no alcanzaron una fase estacionaria o de muerte (Zheng et al, 2018). En lo que respecta al ácido α -lipoico hasta donde se tiene conocimiento no se ha reportado previamente una cinética de crecimiento para estudiar el comportamiento del antioxidante de forma individual pero en combinación se puede inferir que es capaz de establecer interacciones sinérgicas entre los otros componentes de la mezcla al incrementar la proliferación celular.

Por otra parte, mediante el diseño de box behnken pudimos confirmar y proponer concentraciones de antioxidantes con la finalidad de alcanzar un mayor alcance. Por ejemplo, en los gráficos de superficie de respuesta (Figura 13) fue posible observar el rango específico donde el resveratrol ejerció un efecto positivo sobre la proliferación celular ya que a concentraciones menores a 2 μM o mayores a 3 μM se produce una disminución de la cantidad de células, lo que implicó seleccionar la concentración dentro de ese rango para lograr alcanzar la región de máxima proliferación. La superficie de respuesta dada por el resveratrol coincide con estudios previos donde evaluaron diversas concentraciones de la molécula y llegaron a la conclusión de que valores de 0.1 μM promovían la división celular hasta llegar a su máxima actividad a 2.55 μM , sin embargo este efecto se disminuyó al utilizar valores de 5 μM .

Para la coenzima Q10 en la figura 13 el gráfico de superficie de respuesta nos indicó que a mayor concentración de coenzima mayor el número de células, sin embargo a menor concentración (a partir de 7 μM) ocurre el efecto contrario. El estudio realizado previamente por Zheng abarcó una mayor concentración de coenzima Q10 (20 μM) y logró aumentar la división celular, confirmando con ello que la molécula de forma individual y en combinación incide de forma positiva sobre la cantidad de células a concentraciones de 10 a 20 μM , pero a diferencia de nuestro tratamiento combinado donde obtuvimos más células a 10 μM , a nivel individual la coenzima Q10 no fue capaz de producir un efecto significativo en la cantidad de células (Zheng et al, 2018).

En el caso del ácido α -lipoico se puede observar su mayor efecto a 50 μM , sin embargo la orientación de la curva presente en el gráfico de superficie de respuesta podría indicar eventos como una estabilidad, la prolongación de la curva hacia arriba lo que indicaría mayor proliferación o el declive de la curva hacia abajo lo que significaría una disminución, por lo que son necesarios mayores estudios que involucren distintas concentraciones si se requiere establecer algún rango donde la molécula sea capaz de ejercer mejores resultados. El grupo conformado por Yang

investigó previamente el papel del α -lipoico a nivel individual, cuyo resultado apuntó a una disminución en la cantidad de células a partir de una concentración de 25 μM , lo que podría abrir camino hacia una nueva propuesta que permita estudiar concentraciones entre 26-100 μM para definir o confirmar la opción más adecuada (Yang et al, 2018).

Con el aumento en la cantidad de células producido por la actividad antioxidante del tratamiento, los resultados permiten sugerir la presencia de interacciones sinérgicas entre los componentes de la mezcla. Este tipo de reacciones entre antioxidantes han sido reportados previamente entre el resveratrol y la CoQ10, cuyo tratamiento en *Drosophila melanogaster*, logró prevenir la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo inducido por dioxinas al neutralizar los radicales libres. Los investigadores concluyeron que los efectos de las moléculas combinadas son capaces de proveer mayores beneficios que utilizar cada antioxidante de forma individual y resaltaron la capacidad de los antioxidantes endógenos de interactuar con los exógenos para incrementar las defensas antioxidantes (Çolak & Uysal, 2017).

Otro estudio más reciente coincidió en que la combinación de compuestos antioxidantes ejerció mejores efectos en comparación al uso de los antioxidantes de forma individual, haciendo que el tratamiento aumentara el número de células en fase S y por ende la proliferación celular (Shafi et al, 2019). Este fenómeno presente en ambas investigaciones se le conoce como interacciones sinérgicas, las cuales consisten en la correlación entre dos o más componentes cuya acción conjunta es mayor que la suma de la acción de cada componente por separado. Estas interacciones logran disminuir los requerimientos de dosis y reducir considerablemente los efectos secundarios provocados por altas concentraciones de un solo fármaco por lo que son ampliamente utilizados en formulaciones farmacéuticas debido a que estimulan la potencialización de las propiedades de cada componente al combinarlos (Sonam & Guleria, 2017).

Bajo esta directriz, la información obtenida con el tratamiento propuesto en nuestra investigación sugiere la existencia de una interacción sinérgica entre los tres componentes (resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico). Este resultado está asociado a la actividad antioxidante de cada componente de la mezcla, cuyas interacciones pudieron influir de forma simultánea en la inhibición del principal mecanismo regulador de senescencia Akt/mTOR al suprimir la señalización del factor NF- κ B (Zhou et al, 2019), logrando inactivar la vía de las caspasas (3 y 6) y reducir la expresión de proteínas proapoptóticas como p53, p21, 26 (Zhang et al, 2015). Asimismo, fue posible que lograran incidir en la activación de la vía de señalización PI3K/AKT responsable del proceso de multiplicación celular, promovió la producción de factores de crecimiento, impulsó la actividad de proteínas antiapoptóticas como Bcl2 (Sandhir et al, 2014), aceleró la división celular mediante la acción de PCNA (Wang et al, 2016), provocó la expresión de factores de crecimiento (EGF, HGF y PDGF; Prakoeswa et al, 2020) e incrementó antioxidantes (glutación mediante la vía AMPK), enzimas (HO-1, NOQO-1 y cisteína glutamato ligasa por la vía Nrf-NQO-1; Zhao et al, 2019) y vitaminas (E y C a través de la ciclina D-CDK4/6 ;Grasso et al, 2014), haciendo que la combinación antioxidante sea dirigida a los puntos responsables de la regulación del estrés oxidativo en las células y con ello proponer una aplicación terapéutica (Santana et al, 2019) que preserve la integridad mitocondrial, disminuya los niveles de ROS e impulse la división celular (Rochette et al, 2013).

Coincidiendo con lo anteriormente reportado, el incremento en la cantidad de células/cm² hace posible sugerir que en procesos de gran complejidad como la división celular y el estrés oxidativo, la mezcla de compuestos antioxidantes son capaces de ejercer una mayor bioactividad que un solo compuesto ya que al generar una mezcla, los componentes tienen la capacidad de repercutir en múltiples objetivos de forma simultánea (Schmidt et al, 2008), fenómeno que se demostró con el aumento de la capacidad proliferativa de las MSCs derivadas de placenta humana.

CONCLUSIONES

El diseño Box Behnken es una herramienta útil para combinar diferentes variables (antioxidantes) con el propósito de maximizar la proliferación celular.

El diseño de mezclas Box Behnken estableció que 2.55 μM de resveratrol, 10 μM de coenzima Q10 y 50 μM de ácido α -lipoico son las concentraciones óptimas para incrementar la proliferación celular.

La mezcla optimizada establecida por el diseño Box Behnken de los antioxidantes resveratrol, coenzima Q10 y ácido α -lipoico incrementa la proliferación de las células troncales mesenquimales derivadas de placenta.

PERSPECTIVAS

Se sugiere ampliar el alcance del estudio mediante el empleo de modelos de estrés oxidativo inducido que permitan evaluar y confirmar la efectividad de las dosis antioxidantes propuestas, así como determinar la etapa más adecuada para adicionar los tratamientos con la finalidad de potencializar los efectos antioxidantes sobre las MSCs *in vitro* para posteriormente escalar las condiciones experimentales *in vivo*.

Para corroborar el estrés oxidativo producido por ROS se recomienda utilizar métodos de determinación como las sondas fluorescentes sensibles a agentes oxidantes (dihidroetidio, diacetato de dihidro dicloro fluoresceína y Amplex Red), sondas sensibles a la oxidación y la cromatografía.

Adicionalmente, resulta de interés incluir pruebas como ORAC y HORAC, que miden la capacidad de absorción de radicales de oxígeno y radicales hidroxilos respectivamente; así como análisis electroquímicos por voltamperometría para medir corrientes de pico catódico o anódico y la amperometría en la que se puede cuantificar la corriente generada por procesos de oxidación y reducción de analitos electroactivos.

Ante el potencial que tiene el uso de antioxidantes para contrarrestar el estrés oxidativo celular, es indispensable continuar con los estudios sobre los efectos producidos por la suplementación de antioxidantes a los medios de cultivo con la finalidad de proporcionar mayor información que permita dilucidar sus mecanismos de acción e implementar nuevas técnicas de medición para que los antioxidantes puedan ser considerados como una opción factible a implementar en el desarrollo de protocolos efectivos y eficaces para la obtención de MSCs humanas.

REFERENCIAS

Abd-El-Aziz, N.M., Hifnawy, M.S., El-Ashmawy, A.A., Lotfy, R.A., & Youni, I.Y. (2022). Application of Box-Behnken design for optimization of phenolics extraction from *Leontodon hispidulus* in relation to its antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities. *Scientific Reports* 12, 8829. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12642-2>

Abd El-Fattah, A. I., Zaghloul, M. S., Eltablawy, N. A., & Rashed, L. A. (2019). α -Lipoic acid and amlodipine/perindopril combination potentiate the therapeutic effect of mesenchymal stem cells on isoproterenol induced cardiac injury in rats. *Biochimie*, 156, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.002>

Ahmad, A., Rehman, M. U., Wali, A. F., El-Serehy, H. A., Al-Misned, F. A., Maooda, S. N., Aljawdah, H. M., Mir, T. M., & Ahmad, P. (2020). Box-Behnken Response Surface Design of Polysaccharide Extraction from *Rhododendron arboreum* and the Evaluation of Its Antioxidant Potential. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(17), 3835. <https://doi.org/10.3390/molecules25173835>

Ahman, A., Alkharfy, K. M., Wani, T. A., & Raish, M. (2015). Application of Box-Behnken design for ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Paeonia emodi*. *International journal of biological macromolecules*, 72, 990-997. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.011>

Albani, D., Polito, L., Batelli, S., De Mauro, S., Fracasso, C., Martelli, G., Colombo, L., Manzoni, C., Salmona, M., Caccia, S., Negro, A., & Forloni, G. (2009). The SIRT1 activator resveratrol protects SK-N-BE cells from oxidative stress and against toxicity caused by alpha-synuclein or amyloid-beta (1-42) peptide. *Journal of neurochemistry*, 110(5),:1445–1456. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06228.x>

Alt, E. U., Senst, C., Murthy, S. N., Slakey, D. P., Dupin, C. L., Chaffin, A. E., Kadowitz, P. J., & Izadpanah, R. (2012). Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem cell research*, 8(2), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.11.002>

Apostolova, N., & Victor, V. M. (2015). Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. *Antioxidants & redox signaling*, 22(8), 686–729. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5952>

Atashi, F., Modarressi, A., & Pepper, M. S. (2015). The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem cells and development*, 24(10): 1150–1163. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0484>

Bai, X. (2020). Stem Cell-Based Disease Modeling and Cell Therapy. *Cells*, 9(10), 2193. <https://doi.org/10.3390/cells9102193>

Bai, Y., Gong, X., Dou, C., Cao, Z., & Dong, S. (2019). Redox control of chondrocyte differentiation and chondrogenesis. *Free radical biology & medicine*, 132, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.443>

Barlow, S., Brooke, G., Chatterjee, K., Price, G., Pelekanos, R., Rossetti, T., Doody, M., Venter, D., Pain, S., Gilshenan, K., & Atkinson, K. (2008). Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, 17(6): 1095–1107. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0154>

Bashiri, T., Ghorbanian, M. T., & Zavareh, S. (2016). Influence of alpha-lipoic acid on survival and proliferation of mesenchymal stem cells. *Feyz*, 20(2), 133-140.

Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. (2018). Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos University medical journal*, 18(3), e264–e277. <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>

Berger M. M. (2005). Can oxidative damage be treated nutritionally?. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 24(2), 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.10.003>

Biehl, J.K & Russel, B. (2009). Introduction to stem cell therapy. *The Journal of Cardiovascular Nursing*, 24(2), 98-195. <https://doi.org/10.1097/JCN.0b013e318197a6a5>

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

Borodkina, A., Shatrova, A., Abushik, P., Nikolsky, N., & Burova, E. (2014). Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging*, 6(6), 481–495. <https://doi.org/10.18632/aging.100673>

Box, G.E.P., Hunter, J.S., & Hunter, W.G. (second edition). (2005). *Statistics for Experimenters*. Wiley-Interscience.

Boyacı, İ. H. (2005). A new approach for determination of enzyme kinetic constants using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 25(1), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.001>

Brehm-Stecher, B. F., & Johnson, E. A. (2004). Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 68(3), 538–559. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.538-559.2004>

Brooks, A., Futrega, K., Liang, X., Hu, X., Liu, X., Crawford, D., Doran, M. R., Roberts, M. S., & Wang, H. (2018). Concise Review: Quantitative Detection and Modeling the In Vivo Kinetics of Therapeutic Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Stem cells translational medicine*, 7(1), 78–86. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0209>

Cai, X., Lin, Y., Friedrich, C. C., Neville, C., Pomerantseva, I., Sundback, C. A., Zhang, Z., Vacanti, J. P., Hauschka, P. V., & Grottkau, B. E. (2009). Bone marrow derived pluripotent cells are pericytes which contribute to vascularization. *Stem cell reviews and reports*, 5(4), 437–445. <https://doi.org/10.1007/s12015-009-9097-6>

Camiolo, G., Tibullo, D., Giallongo, C., Romano, A., Parrinello, N. L., Musumeci, G., Di Rosa, M., Vicario, N., Brundo, M. V., Amenta, F., Ferrante, M., Copat, C., Avola, R., Li Volti, G., Salvaggio, A., Di Raimondo, F., & Palumbo, G. A. (2019). α -Lipoic Acid Reduces Iron-induced Toxicity and Oxidative Stress in a Model of Iron Overload. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 609. <https://doi.org/10.3390/ijms20030609>

Campos, J. C., Bozi, L. H., Bechara, L. R., Lima, V. M., & Ferreira, J. C. (2016). Mitochondrial Quality Control in Cardiac Diseases. *Frontiers in physiology*, 7, 479. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00479> 13

Caplan, A. I. (2009). Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of pathology*, 217(2), 318–324. <https://doi.org/10.1002/path.2469>

Chen, C. T., Shih, Y. R., Kuo, T. K., Lee, O. K., & Wei, Y. H. (2008). Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(4), 960–968. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0509>

Chen, C. Y., Jang, J. H., Li, M. H., & Surh, Y. J. (2005). Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(4), 993–1000. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.237>

Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Jiang, M., Cao, G., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Velletri, T., Zhang, X., Xu, C., Zhang, L., Yang, H., Hou, J., Wang, Y., & Shi, Y. (2016). Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts?. *Cell death and differentiation*, 23(7), 1128–1139. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.168>

Chiang, M. C., Nicol, C. J., & Cheng, Y. C. (2018). Resveratrol activation of AMPK-dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against amyloid-beta-induced inflammation and oxidative stress. *Neurochemistry international*, 115, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.10.002>

Choi, H., Park, H. H., Lee, K. Y., Choi, N. Y., Yu, H. J., Lee, Y. J., Park, J., Huh, Y. M., Lee, S. H., & Koh, S. H. (2013). Coenzyme Q10 restores amyloid beta-inhibited proliferation of neural stem cells by activating the PI3K pathway. *Stem cells and development*, 22(15), 2112–2120. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0604>

Choo, K. B., Tai, L., Hymavathiee, K. S., Wong, C. Y., Nguyen, P. N., Huang, C. J., Cheong, S. K., & Kamarul, T. (2014). Oxidative stress-induced premature senescence in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *International journal of medical sciences*, 11(11), 1201–1207. <https://doi.org/10.7150/ijms.8356>

Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J., & Harris, D. T. (2014). Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *Journal of translational medicine*, 12, 8. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-8>

Çolak, D. A., & Uysal, H. (2017). Protective effects of coenzyme Q10 and resveratrol on oxidative stress induced by various dioxins on transheterozigot larvae of *Drosophila melanogaster*. *Toxicology research*, 6(4), 521–525. <https://doi.org/10.1039/c7tx00027h>

Connelly, J. T., Petrie, T. A., García, A. J., & Levenston, M. E. (2011). Fibronectin- and collagen-mimetic ligands regulate bone marrow stromal cell chondrogenesis in three-dimensional hydrogels. *European cells & materials*, 22, 168–177. <https://doi.org/10.22203/ecm.v022a13>

Cornelius, N., Wardman, J. H., Hargreaves, I. P., Neergheen, V., Bie, A. S., Tümer, Z., Nielsen, J. E., & Nielsen, T. T. (2017). Evidence of oxidative stress and mitochondrial dysfunction in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) patient fibroblasts: Effect of coenzyme Q10 supplementation on these parameters. *Mitochondrion*, 34, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.03.001>

Dahm, C. C., Moore, K., & Murphy, M. P. (2006). Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite: implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 281(15), 10056–10065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512203200>

Dai, Z., Li, Y., Quarles, L. D., Song, T., Pan, W., Zhou, H., & Xiao, Z. (2007). Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 14(12), 806–814. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.04.003>

De Bruyn, C., Najar, M., Raicevic, G., Meuleman, N., Pieters, K., Stamatopoulos, B., Delforge, A., Bron, D., & Lagneaux, L. (2011). A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. *Stem cells and development*, 20(3), 547–557. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0260>

DeFelice, S. L. (1995). The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends in Food Science & Technology*, 6(2), 59-61. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)88944-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88944-X).

Denu, R. A., & Hematti, P. (2016). Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 2989076. <https://doi.org/10.1155/2016/2989076>

Dinkova-Kostova, A. T., Talalay, P., Sharkey, J., Zhang, Y., Holtzclaw, W. D., Wang, X. J., David, E., Schiavoni, K. H., Finlayson, S., Mierke, D. F., & Honda, T. (2010). An exceptionally potent inducer of cytoprotective enzymes: elucidation of the structural features that determine inducer potency and

reactivity with Keap1. *The Journal of biological chemistry*, 285(44), 33747–33755. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.163485>

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

Dupuy, C., Virion, A., Ohayon, R., Kaniewski, J., Dème, D., & Pommier, J. (1991). Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *The Journal of biological chemistry*, 266(6), 3739–3743.

Efferth, T., & Koch, E. (2011). Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. *Current drug targets*, 12(1), 122–132. <https://doi.org/10.2174/138945011793591626>

Estrada, J. C., Torres, Y., Benguría, A., Dopazo, A., Roche, E., Carrera-Quintanar, L., Pérez, R. A., Enríquez, J. A., Torres, R., Ramírez, J. C., Samper, E., & Bernad, A. (2013). Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell death & disease*, 4(6), e691. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.211>

Federico, A., Cardaioli, E., Da Pozzo, P., Formichi, P., Gallus, G. N., & Radi, E. (2012). Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the neurological sciences*, 322(1-2), 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.05.030>

Ferreira, S. L., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., & dos Santos, W. N. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, 597(2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>

Ferretta, A., Gaballo, A., Tanzarella, P., Piccoli, C., Capitano, N., Nico, B., Annese, T., Di Paola, M., Dell'aquila, C., De Mari, M., Ferranini, E., Bonifati, V., Pacelli, C., & Cocco, T. (2014). Effect of resveratrol on mitochondrial function: implications in parkin-associated familial Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(7), 902–915. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.02.010>

Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>

Fong, C. Y., Chak, L. L., Biswas, A., Tan, J. H., Gauthaman, K., Chan, W. K., & Bongso, A. (2011). Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem cell reviews and reports*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9166-x>

Forman, H. J., & Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature reviews. Drug discovery*, 20(9), 689–709. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>

Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*, 3(4), 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>

Fujiwara, H., Higuchi, T., Sato, Y., Nishioka, Y., Zeng, B. X., Yoshioka, S., Tatsumi, K., Ueda, M., & Maeda, M. (2005). Regulation of human extravillous trophoblast function by membrane-bound peptidases. *Biochimica et biophysica acta*, 1751(1), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.04.007>

Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. L., Tse, H. F., Fu, Q. L., & Lian, Q. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell death & disease*, 7(1), e2062. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>

García-Sánchez, A., Miranda-Díaz, A. G., & Cardona-Muñoz, E. G. (2020). The Role of Oxidative Stress in Physiopathology and Pharmacological Treatment with Pro- and Antioxidant Properties in Chronic Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 2082145.

Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(3), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>

Gaude, E., & Frezza, C. (2014). Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer & metabolism*, 2, 10. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-10>

Gęgotek, A., Ambrożewicz, E., Jastrząb, A., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2019). Rutin and ascorbic acid cooperation in antioxidant and antiapoptotic effect on human skin keratinocytes and fibroblasts exposed to UVA and UVB radiation. *Archives of dermatological research*, 311(3), 203–219. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-01898>

- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*, 107(9), 1058–1070. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>
- Gomes, S. A., Rangel, E. B., Premer, C., Dulce, R. A., Cao, Y., Florea, V., Balkan, W., Rodrigues, C. O., Schally, A. V., & Hare, J. M. (2013). S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) enhances vasculogenesis by mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8), 2834–2839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220185110>
- Grasso, S., Bramanti, V., Tomassoni, D., Bronzi, D., Malfa, G., Traini, E., Napoli, M., Renis, M., Amenta, F., & Avola, R. (2014). Effect of lipoic acid and α -glyceryl-phosphoryl-choline on astroglial cell proliferation and differentiation in primary culture. *Journal of neuroscience research*, 92(1), 86–94. <https://doi.org/10.1002/jnr.23289>
- Gutierrez-Mariscal, F. M., Arenas-de Larriva, A. P., Limia-Perez, L., Romero-Cabrera, J. L., Yubero-Serrano, E. M., & López-Miranda, J. (2020). Coenzyme Q₁₀ Supplementation for the Reduction of Oxidative Stress: Clinical Implications in the Treatment of Chronic Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 7870. <https://doi.org/10.3390/ijms21217870>
- Haines, T. H., & Dencher, N. A. (2002). Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS letters*, 528(1-3), 35–39. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03292-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03292-1)
- Hajhashemi, V., Vaseghi, G., Pourfarzam, M., & Abdollahi, A. (2010). Are antioxidants helpful for disease prevention?. *Research in pharmaceutical sciences*, 5(1), 1–8.
- Halabian, R., Tehrani, H. A., Jahanian-Najafabadi, A., & Habibi Roudkenar, M. (2013). Lipocalin-2-mediated upregulation of various antioxidants and growth factors protects bone marrow-derived mesenchymal stem cells against unfavorable microenvironments. *Cell stress & chaperones*, 18(6), 785–800. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0430-2>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell communication and signaling: CCS*, 9, 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative Stress in Cancer. *Cancer cell*, 38(2), 167–197. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>

Heo, J. S., Choi, Y., Kim, H. S., & Kim, H. O. (2016). Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *International journal of molecular medicine*, 37(1), 115–125. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2413>

Hernigou, P., Homma, Y., Flouzat-Lachaniette, C. H., Pognard, A., Chevallier, N., & Rouard, H. (2013). Cancer risk is not increased in patients treated for orthopaedic diseases with autologous bone marrow cell concentrate. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 95(24), 2215–2221. <https://doi.org/10.2106/JBJS.M.00261>

Hino, K., Ikeya, M., Horigome, K., Matsumoto, Y., Ebise, H., Nishio, M., Sekiguchi, K., Shibata, M., Nagata, S., Matsuda, S., & Toguchida, J. (2015). Neofunction of ACVR1 in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(50), 15438–15443. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510540112>

Hofer, H. R., & Tuan, R. S. (2016). Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem cell research & therapy*, 7(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0394-0>

Holmström, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(6), 411–421. <https://doi.org/10.1038/nrm3801>

Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R. J., Krause, D. S., Keating, A., & International Society for Cellular Therapy (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393–395. <https://doi.org/10.1080/14653240500319234>

Hu, C., & Li, L. (2019). The application of resveratrol to mesenchymal stromal cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(307). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1412-9>

Hu, C., Zhao, L., Peng, C., & Li, L. (2018). Regulation of the mitochondrial reactive oxygen species: Strategies to control mesenchymal stem cell fates ex vivo and in vivo. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(11), 5196–5207. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13835>

Huo, J., Xu, Z., Hosoe, K., Kubo, H., Miyahara, H., Dai, J., Mori, M., Sawashita, J., & Higuchi, K. (2018). Coenzyme Q10 Prevents Senescence and Dysfunction Caused by Oxidative Stress in Vascular Endothelial Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 3181759. <https://doi.org/10.1155/2018/3181759>

- Huang, Y. P., Jin, H. Y., & Yu, H. P. (2017). Inhibitory effects of alpha-lipoic acid on oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla in rats with salt-induced hypertension. *International journal of molecular medicine*, 39(2), 430–436. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2846>
- Huber, A., Bürkle, A., & Münch, G. (2007). Neuroprotective Mechanisms: Oxidative Stress as a Target for Neuroprotective Therapies in Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, 77–102. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30377-2_6
- Hussain, S. P., Hofseth, L. J., & Harris, C. C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature reviews. Cancer*, 3(4), 276–285. <https://doi.org/10.1038/nrc1046>
- In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M., Claas, F. H., Fibbe, W. E., & Kanhai, H. H. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 22(7), 1338–1345. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0058>
- Izzo, V., Bravo-San Pedro, J. M., Sica, V., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2016). Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. *Trends in cell biology*, 26(9), 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.04.006>
- Jarozeski, M. J., & Radcliff, G. (1999). Fundamentals of flow cytometry. *Molecular biotechnology*, 11(1), 37–53. <https://doi.org/10.1007/BF02789175>
- Jeong, H., Yim, H. W., Park, H. J., Cho, Y., Hong, H., Kim, N. J., & Oh, I. H. (2018). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Ischemic Heart Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *International journal of stem cells*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.15283/ijsc17061>
- Jin, H. J., Bae, Y. K., Kim, M., Kwon, S. J., Jeon, H. B., Choi, S. J., Kim, S. W., Yang, Y. S., Oh, W., & Chang, J. W. (2013). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 17986–18001. <https://doi.org/10.3390/ijms140917986>
- Joyce, N., Annett, G., Wirthlin, L., Olson, S., Bauer, G., & Nolte, J. A. (2010). Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regenerative medicine*, 5(6), 933–946. <https://doi.org/10.2217/rme.10.72>
- Ju, C., Shen, Y., Ma, G., Liu, Y., Cai, J., Kim, I. M., Weintraub, N. L., Liu, N., & Tang, Y. (2018). Transplantation of Cardiac Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promotes Repair in Ischemic Myocardium. *Journal of cardiovascular translational research*, 11(5), 420–428. <https://doi.org/10.1007/s12265-018-9822-0>

Kharat, A., Chandravanshi, B., Sanap, A., Kheur, S., & Bhonde, R. (2021). Human postnatal Mesenchymal Stem Cell Derived Islets as a Model for Diabetes Research. *Current diabetes reviews*, 17(5), e101220189128. <https://doi.org/10.2174/1573399817999201214224559>

Kitambi, S. S., & Chandrasekar, G. (2011). Stem cells: a model for screening, discovery and development of drugs. *Stem cells and cloning: advances and applications*, 4, 51–59. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S16417>

Koo, B. K., Park, I. Y., Kim, J., Kim, J. H., Kwon, A., Kim, M., Kim, Y., Shin, J. C., & Kim, J. H. (2012). Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stromal cells from human full term placenta. *Journal of Korean medical science*, 27(8), 857–863. <https://doi.org/10.3346/jkms.2012.27.8.857>

Kooncumchoo, P., Sharma, S., Porter, J., Govitrapong, P., & Ebadi, M. (2006). Coenzyme Q(10) provides neuroprotection in iron-induced apoptosis in dopaminergic neurons. *Journal of molecular neuroscience: MN*, 28(2), 125–141. <https://doi.org/10.1385/JMN:28:2:125>

Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., & du Plessis, S. S. (2010). Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian journal of experimental biology*, 48(5), 425–435.

Kruminis-Kaszkiel, E., Osowski, A., Bejer-Oleńska, E., Dziekoński, M., & Wojtkiewicz, J. (2020). Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly Towards Neural Stem Cells Using A Feasible and Repeatable Protocol. *Cells*, 9(3), 739. <https://doi.org/10.3390/cells9030739>

Kuhbier, J. W., Weyand, B., Radtke, C., Vogt, P. M., Kasper, C., & Reimers, K. (2010). Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 123, 55–105. https://doi.org/10.1007/10_2009_24

Kumari P.V.K., Yarraguntla, S.R., & Gulibindala, E. (2021). Application of Box-Behnken Design for Formulation Parameters of Eslicarbazepine Tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(3), 575-583. <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.808>

Laird, D. J., von Andrian, U. H., & Wagers, A. J. (2008). Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell*, 132(4), 612–630. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.041>

Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., & Hermoso, M. A. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of immunology research*, 2014, 149185. <https://doi.org/10.1155/2014/149185>

Lechanteur, C., Briquet, A., Giet, O., Delloye, O., Baudoux, E., & Beguin, Y. (2016). Clinical-scale expansion of mesenchymal stromal cells: a large banking experience. *Journal of translational medicine*, *14*(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0892-y>

Leng, Z., Zhu, R., Hou, W., Feng, Y., Yang, Y., Han, Q., Shan, G., Meng, F., Du, D., Wang, S., Fan, J., Wang, W., Deng, L., Shi, H., Li, H., Hu, Z., Zhang, F., Gao, J., Liu, H., Li, X., ... & Zhao, R. C. (2020). Transplantation of ACE2⁺ Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging and disease*, *11*(2), 216–228. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0228>

Leveque, X., Hochane, M., Geraldo, F., Dumont, S., Gratas, C., Oliver, L., Gaignier, C., Trichet, V., Layrolle, P., Heymann, D., Herault, O., Vallette, F.M & Olivier, C. (2019). Low-Dose Pesticide Mixture Induces Accelerated Mesenchymal Stem Cell Aging In Vitro. *Stem Cells*, *37*(8), 1083-1094. <https://doi.org/10.1002/stem.3014>

Li, D. W., Li, G. R., Lu, Y., Liu, Z. Q., Chang, M., Yao, M., Cheng, W., & Hu, L. S. (2013). α -lipoic acid protects dopaminergic neurons against MPP⁺-induced apoptosis by attenuating reactive oxygen species formation. *International journal of molecular medicine*, *32*(1), 108–114. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1361>

Li, D. W., Wang, Y. D., Zhou, S. Y., & Sun, W. P. (2016). α -lipoic acid exerts neuroprotective effects on neuronal cells by upregulating the expression of PCNA via the P53 pathway in neurodegenerative conditions. *Molecular medicine reports*, *14*(5), 4360–4366. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5754>

¹Li, J., Xin, Z., & Cai, M. (2019). The role of resveratrol in bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with osteoporosis. *Journal of cellular biochemistry*, *120*(10), 16634–16642. <https://doi.org/10.1002/jcb.28922>

Li, J., Zhou, Z., Wen, J., Jiang, F., & Xia, Y. (2020). Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells Promote Endogenous Bone Regeneration. *Frontiers in endocrinology*, *11*, 543623. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.543623>

¹Li, J., Xin, Z., & Cai, M. (2019). The role of resveratrol in bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with osteoporosis. *Journal of cellular biochemistry*, *120*(10), 16634–16642. <https://doi.org/10.1002/jcb.28922>

²Li, X., Zhan, J., Hou, Y., Hou, Y., Chen, S., Luo, D., Luan, J., Wang, L., & Lin, D. (2019). Coenzyme Q10 Regulation of Apoptosis and Oxidative Stress in H₂O₂ Induced BMSC Death by Modulating the Nrf-2/NQO-1 Signaling Pathway and Its Application in a Model of Spinal Cord Injury. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 6493081. <https://doi.org/10.1155/2019/6493081>

Li, Y. H., He, Q., Yu, J. Z., Liu, C. Y., Feng, L., Chai, Z., Wang, Q., Zhang, H. Z., Zhang, G. X., Xiao, B. G., & Ma, C. G. (2015). Lipoic acid protects dopaminergic neurons in LPS-induced Parkinson's disease model. *Metabolic brain disease*, 30(5), 1217–1226. <https://doi.org/10.1007/s11011-015-9698-5>

Liao, N., Shi, Y., Zhang, C., Zheng, Y., Wang, Y., Zhao, B., Zeng, Y., Liu, X., & Liu, J. (2019). Antioxidants inhibit cell senescence and preserve stemness of adipose tissue-derived stem cells by reducing ROS generation during long-term in vitro expansion. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 306. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1404-9>

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 13, 757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>

Lila, M. A., & Raskin, I. (2005). *Health-related Interactions of Phytochemicals*. *Journal of Food Science*, 70(1), R20–R27. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb09054.x

Liochev, S. I., & Fridovich, I. (2002). The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox report : communications in free radical research*, 7(1), 55–60. <https://doi.org/10.1179/135100002125000190>

lDiMasi, J. A., Grabowski, H. G., & Hansen, R. W. (2016). Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of health economics*, 47, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>

Lo Cicero, A., Jaskowiak, A. L., Egesipe, A. L., Tournois, J., Brinon, B., Pitrez, P. R., Ferreira, L., de Sandre-Giovannoli, A., Levy, N., & Nissan, X. (2016). A High Throughput Phenotypic Screening reveals compounds that counteract premature osteogenic differentiation of HGPS iPS-derived mesenchymal stem cells. *Scientific reports*, 6, 34798. <https://doi.org/10.1038/srep34798>

López, L.C., Quinzii, C.M., Area, E., Naini, A., Rahman, S., Schuelke, M., Salviati, L., Dimauro, S., & Hirano, M. (2010). Treatment of CoQ(10) deficient fibroblasts with ubiquinone, CoQ analogs, and vitamin C: time-and compound-dependent effects. *PloS one*, 5(7), e11897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011897>

Maczurek, A., Hager, K., Kenklies, M., Sharman, M., Martins, R., Engel, J., Carlson, D. A., & Münch, G. (2008). Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Advanced drug delivery reviews*, 60(13-14), 1463–1470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.04.015>

Majka, M., Sułkowski, M., Badyra, B., & Musiałek, P. (2017). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells in Cardiovascular Regeneration: Emerging Research Directions and Clinical Applications. *Stem cells translational medicine*, 6(10), 1859–1867. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0484>

Makanjuola, S. A., Enujiugha, V. N., Omoba, O. S., & Sanni, D. M. (2015). Combination of Antioxidants from Different Sources Could Offer Synergistic Benefits: A Case Study of Tea and Ginger Blend. *Natural product communications*, 10(11), 1829–1832.

Martin L. J. (2012). Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Progress in molecular biology and translational science*, 107, 355–415. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385883-2.00005-9>

Mastrolia, I., Foppiani, E. M., Murgia, A., Candini, O., Samarelli, A. V., Grisendi, G., Veronesi, E., Horwitz, E. M., & Dominici, M. (2019). Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Concise Review. *Stem cells translational medicine*, 8(11), 1135–1148. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0044>

Mihaylova, M. M., & Shaw, R. J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature cell biology*, 13(9), 1016–1023. <https://doi.org/10.1038/ncb2329>

Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D. B., & Strom, S. C. (2005). Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 23(10), 1549–1559. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0357>

Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free radical biology & medicine*, 8(1), 95–108. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90148-c](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90148-c)

Morine, K. J., Paruchuri, V., Qiao, X., Aronovitz, M., Huggins, G. S., DeNofrio, D., Kiernan, M. S., Karas, R. H., & Kapur, N. K. (2016). Endoglin selectively modulates transient receptor potential channel expression in left and right heart failure. *Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 25(6), 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2016.08.004>

Mughal, W., Dhingra, R., & Kirshenbaum, L. A. (2012). Striking a balance: autophagy, apoptosis, and necrosis in a normal and failing heart. *Current hypertension reports*, 14(6), 540–547. <https://doi.org/10.1007/s11906-012-0304-5>

Murphy, M. P., & Hartley, R. C. (2018). Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nature reviews. Drug discovery*, 17(12), 865–886. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.174>

Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 93(1), 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.2324>

Nagamura-Inoue, T., & He, H. (2014). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World journal of stem cells*, 6(2), 195–202. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i2.195>

Nagaraj, K., Narendar, D., & Kishan, V. (2017). Development of olmesartan medoxomil optimized nanosuspension using the Box-Behnken design to improve oral bioavailability. *Drug development and industrial pharmacy*, 43(7), 1186–1196. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1304955>

Naji, A., Eitoku, M., Favier, B., Deschaseaux, F., Rouas-Freiss, N., & Suganuma, N. (2019). Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 76(17), 3323–3348. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03125-1>

Navarro-Yepes, J., Zavala-Flores, L., Anandhan, A., Wang, F., Skotak, M., Chandra, N., Li, M., Pappa, A., Martinez-Fong, D., Del Razo, L. M., Quintanilla-Vega, B., & Franco, R. (2014). Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. *Pharmacology & therapeutics*, 142(2), 206–230. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.12.007>

Nicolson G. L. (2014). Mitochondrial Dysfunction and Chronic Disease: Treatment With Natural Supplements. *Integrative medicine (Encinitas, Calif.)*, 13(4), 35–43.

Nirmalanandhan, V. S., & Sittampalam, G. S. (2009). Stem cells in drug discovery, tissue engineering, and regenerative medicine: emerging opportunities and challenges. *Journal of biomolecular screening*, *14*(7), 755–768. <https://doi.org/10.1177/1087057109336591>

Nitzsche, F., Müller, C., Lukomska, B., Jolkkonen, J., Deten, A., & Boltze, J. (2017). Concise Review: MSC Adhesion Cascade-Insights into Homing and Transendothelial Migration. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *35*(6), 1446–1460. <https://doi.org/10.1002/stem.2614>

Niu, X. F., Liu, B. Q., Du, Z. X., Gao, Y. Y., Li, C., Li, N., Guan, Y., & Wang, H. Q. (2011). Resveratrol protects leukemic cells against cytotoxicity induced by proteasome inhibitors via induction of FOXO1 and p27Kip1. *BMC cancer*, *11*, 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-99>

Noronha, N. C., Mizukami, A., Caliári-Oliveira, C., Cominal, J. G., Rocha, J., Covas, D. T., Swiech, K., & Malmegrim, K. (2019). Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem cell research & therapy*, *10*(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1224-y>

Oh, K. W., Moon, C., Kim, H. Y., Oh, S. I., Park, J., Lee, J. H., Chang, I. Y., Kim, K. S., & Kim, S. H. (2015). Phase I trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Stem cells translational medicine*, *4*(6), 590–597. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0212>

Organización Mundial de la Salud (2020). Enfermedades no transmisibles. Consultado el 20 de diciembre de 2021. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>

Paradisi, M., Alviano, F., Pironi, S., Lanzoni, G., Fernandez, M., Lizzo, G., Giardino, L., Giuliani, A., Costa, R., Marchionni, C., Bonsi, L., & Calza, L. (2014). Human mesenchymal stem cells produce bioactive neurotrophic factors: source, individual variability and differentiation issues. *International journal of immunopathology and pharmacology*, *27*(3), 391–402. <https://doi.org/10.1177/039463201402700309>

Park, H. J., Shin, J. Y., Lee, B. R., Kim, H. O., & Lee, P. H. (2012). Mesenchymal stem cells augment neurogenesis in the subventricular zone and enhance differentiation of neural precursor cells into dopaminergic neurons in the substantia nigra of a parkinsonian model. *Cell transplantation*, *21*(8), 1629–1640. <https://doi.org/10.3727/096368912X640556>

Park, S., Karunakaran, U., Jeoung, N. H., Jeon, J. H., & Lee, I. K. (2014). Physiological effect and therapeutic application of alpha lipoic acid. *Current medicinal chemistry*, 21(32), 3636–3645. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140706141806>

Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G. P., Bilic, G., Bühring, H. J., Evangelista, M., Hennerbichler, S., Liu, B., Magatti, M., Mao, N., Miki, T., Marongiu, F., Nakajima, H., Nikaido, T., Portmann-Lanz, C. B., Sankar, V., Soncini, M., Stadler, G., Surbek, D., Takahashi, T. A., & Strom, S. C. (2008). Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(2), 300–311. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0594>

Peltz, L., Gomez, J., Marquez, M., Alencastro, F., Atashpanjeh, N., Quang, T., Bach, T., & Zhao, Y. (2012). Resveratrol exerts dosage and duration dependent effect on human mesenchymal stem cell development. *PloS one*, 7(5), e37162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037162>

Pipino, C., Shangaris, P., Resca, E., Zia, S., Deprest, J., Sebire, N. J., David, A. L., Guillot, P. V., & De Coppi, P. (2013). Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource?. *British medical bulletin*, 105, 43–68. <https://doi.org/10.1093/bmb/lds033>

Pittenger M. F. (2008). Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 449, 27–44. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-169-1_2

Pittenger, M. F., Discher, D. E., Péault, B. M., Phinney, D. G., Hare, J. M., & Caplan, A. I. (2019). Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regenerative medicine*, 4, 22. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>

Porporato, P. E., Filigheddu, N., Pedro, J., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2018). Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell research*, 28(3), 265–280. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.155>

Prakoeswa, C., Rindiastuti, Y., Wirohadidjojo, Y. W., Komaratih, E., Nurwasis, Dinaryati, A., Lestari, N., & Rantam, F. A. (2020). Resveratrol promotes secretion of wound healing related growth factors of mesenchymal stem cells originated from adult and fetal tissues. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 48(1), 1160–1167. <https://doi.org/10.1080/21691401.2020.1817057>

- Prockop, D. J., & Oh, J. Y. (2012). Medical therapies with adult stem/progenitor cells (MSCs): a backward journey from dramatic results in vivo to the cellular and molecular explanations. *Journal of cellular biochemistry*, 113(5), 1460–1469. <https://doi.org/10.1002/jcb.24046>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Quinzii, C. M., & Hirano, M. (2010). Coenzyme Q and mitochondrial disease. *Developmental disabilities research reviews*, 16(2), 183–188. <https://doi.org/10.1002/ddrr.108>
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasaiah, U., Gopas, J., & Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 436, 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>
- Reddy, P. H., & Reddy, T. P. (2011). Mitochondria as a therapeutic target for aging and neurodegenerative diseases. *Current Alzheimer research*, 8(4), 393–409. <https://doi.org/10.2174/156720511795745401>
- Rege, T. A., & Hagood, J. S. (2006). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(8), 1045–1054. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5460rev>
- Rochette, L., Ghibu, S., Richard, C., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2013). Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Molecular nutrition & food research*, 57(1), 114–125. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200608>
- Rodríguez, R., Rubio, R., & Menendez, P. (2012). Modeling sarcomagenesis using multipotent mesenchymal stem cells. *Cell research*, 22(1), 62–77. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.157>
- Roehrs, M., Valentini, J., Paniz, C., Moro, A., Charão, M., Bulcão, R., Freitas, F., Brucker, N., Duarte, M., Leal, M., Burg, G., Grune, T., & Garcia, S. C. (2011). The relationships between exogenous and endogenous antioxidants with the lipid profile and oxidative damage in hemodialysis patients. *BMC nephrology*, 12, 59. <https://doi.org/10.1186/1471-2369-12-59>
- Sabapathy, V., Ravi, S., Srivastava, V., Srivastava, A., & Kumar, S. (2012). Long-term cultured human term placenta-derived mesenchymal stem cells of maternal origin displays plasticity. *Stem cells international*, 2012, 174328. <https://doi.org/10.1155/2012/174328>

- Salehi, B., Mishra, A. P., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., Fokou, P., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2018). Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines*, *6*(3), 91. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6030091>
- Sandhir, R., Sethi, N., Aggarwal, A., & Khera, A. (2014). Coenzyme Q10 treatment ameliorates cognitive deficits by modulating mitochondrial functions in surgically induced menopause. *Neurochemistry international*, *74*, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.04.011>
- Santana, G. J., Cisneros, Z. L., & Jacobo, V. A. (2019). A practical guide for designing effective nutraceutical combinations in the form of foods, beverages, and dietary supplements against chronic degenerative diseases. *Trends in Food Science & Technology*, *88*, 179-193. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.026>.
- Sanz, M. M., Johnson, L. E., Ahuja, S., Ekström, P. A., Romero, J., & van Veen, T. (2007). Significant photoreceptor rescue by treatment with a combination of antioxidants in an animal model for retinal degeneration. *Neuroscience*, *145*(3), 1120–1129. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.12.034>
- Schmelzer, E., McKeel, D. T., & Gerlach, J. C. (2019). Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells from Different Tissues and Their Membrane Encasement for Prospective Transplantation Therapies. *BioMed Research International*, *2019*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/637627>
- Schmidt, B., Ribnicky, D. M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W. T., & Raskin, I. (2008). A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism: clinical and experimental*, *57*(7 Suppl 1), S3–S9. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.03.001>
- Schulze, M., & Tobiasch, E. (2011). Tissue engineering III: cell-surface interactions for tissue culture.
- Selivanov, V. A., Votyakova, T. V., Pivtoraiko, V. N., Zeak, J., Sukhomlin, T., Trucco, M., Roca, J., & Cascante, M. (2011). Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain. *PLoS computational biology*, *7*(3), e1001115. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001115>
- Senoner, T., & Dichtl, W. (2019). Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target?. *Nutrients*, *11*(9), 2090. <https://doi.org/10.3390/nu11092090>
- Shadfar, S., Couch, M. E., McKinney, K. A., Weinstein, L. J., Yin, X., Rodríguez, J. E., Guttridge, D. C., & Willis, M. (2011). Oral resveratrol therapy inhibits cancer-induced skeletal muscle and cardiac atrophy in vivo. *Nutrition and cancer*, *63*(5), 749–762. <https://doi.org/10.1080/01635581.2011.563032>

Shafi, S., Ansari, H. R., Bahitham, W., & Aouabdi, S. (2019). The Impact of Natural Antioxidants on the Regenerative Potential of Vascular Cells. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 6, 28. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00028>

Sharaf, N. S., Shetta, A., Elhalawani, J. E., & Mamdouh, W. (2021). Applying Box-Behnken Design for Formulation and Optimization of PLGA-Coffee Nanoparticles and Detecting Enhanced Antioxidant and Anticancer Activities. *Polymers*, 14(1), 144. <https://doi.org/10.3390/polym14010144>

Sharma, S., Venkatesan, V., Prakhya, B. M., & Bhonde, R. (2015). Human mesenchymal stem cells as a novel platform for simultaneous evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals. *Mutagenesis*, 30(3), 391–399. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu086>

Sheikh, S., Safia, Haque, E., & Mir, S. S. (2013). Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions. *Journal of neurodegenerative diseases*, 2013, 563481. <https://doi.org/10.1155/2013/563481>

Shi, Y., Su, J., Roberts, A. I., Shou, P., Rabson, A. B., & Ren, G. (2012). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends in immunology*, 33(3), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.11.004>

Shin, J. Y., Park, H. J., Kim, H. N., Oh, S. H., Bae, J. S., Ha, H. J., & Lee, P. H. (2014). Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase β -amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy*, 10(1), 32–44. <https://doi.org/10.4161/auto.26508>

Siddesh, S. E., Gowda, D. M., Jain, R., Gulati, A., Patil, G. S., Anudeep, T. C., Jeyaraman, N., Muthu, S., & Jeyaraman, M. (2021). Placenta-derived mesenchymal stem cells (P-MSCs) for COVID-19 pneumonia-a regenerative dogma. *Stem cell investigation*, 8, 3. <https://doi.org/10.21037/sci-2020-034>

Sonam, K. S & Guleria, S. (2017). Synergistic Antioxidant Activity of Natural Products. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*, 2(16), 1086.

Sorrentino, V., Menzies, K. J., & Auwerx, J. (2018). Repairing Mitochondrial Dysfunction in Disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 58, 353–389. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104908>

Stanley W. C. (2005). Rationale for a metabolic approach in diabetic coronary patients. *Coronary artery disease*, 16 Suppl 1, S11–S15. <https://doi.org/10.1097/00019501-200511001-00003>

Stavely, R., & Nurgali, K. (2020). The emerging antioxidant paradigm of mesenchymal stem cell

therapy. *STEM CELLS Translational Medicine*, 9(9), 985-1006. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0446>

Sternecker, J. L., Reinhardt, P., & Schöler, H. R. (2014). Investigating human disease using stem cell models. *Nature reviews. Genetics*, 15(9), 625–639. <https://doi.org/10.1038/nrg3764>

Stull, N. D., Polan, D. P., & Iacovitti, L. (2002). Antioxidant compounds protect dopamine neurons from death due to oxidative stress in vitro. *Brain research*, 931(2), 181–185. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)02269-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02269-2)

Sun, D., Li, H., Lu, X. X., Xiao, H., Ren, J., Zhang, F. R., & Liu, Z. S. (2020). Clinical features of severe pediatric patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan: a single center's observational study. *World journal of pediatrics : WJP*, 16(3), 251–259. <https://doi.org/10.1007/s12519-020-00354-4>

Suomalainen, A., & Battersby, B. J. (2018). Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(2), 77–92. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.66>

S-Yousef, A. O., A Fahad, A., Abdel Moneim, A. E., Metwally, D. M., El-Khadragy, M. F., & Kassab, R. B. (2019). The Neuroprotective Role of Coenzyme Q10 Against Lead Acetate-Induced Neurotoxicity Is Mediated by Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Activities. *International journal of environmental research and public health*, 16(16), 2895. <https://doi.org/10.3390/ijerph16162895>

Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Liew, W. P., & Sulaiman Rahman, H. (2018). Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1162. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01162>

Taniyama, Y., & Griendling, K. K. (2003). Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 42(6), 1075–1081. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F>

Tfilin, M., Sudai, E., Merenlender, A., Gispan, I., Yadid, G., & Turgeman, G. (2010). Mesenchymal stem cells increase hippocampal neurogenesis and counteract depressive-like behavior. *Molecular psychiatry*, 15(12), 1164–1175. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.110>

Timmins, N. E., Kiel, M., Günther, M., Heazlewood, C., Doran, M. R., Brooke, G., & Atkinson, K. (2012). Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. *Biotechnology and bioengineering*, 109(7), 1817–1826. <https://doi.org/10.1002/bit.24425>

Tsai, H. Y., Lin, C. P., Huang, P. H., Li, S. Y., Chen, J. S., Lin, F. Y., Chen, J. W., & Lin, S. J. (2016). Coenzyme Q10 Attenuates High Glucose-Induced Endothelial Progenitor Cell Dysfunction through AMP-Activated Protein Kinase Pathways. *Journal of diabetes research*, 2016, 6384759. <https://doi.org/10.1155/2016/6384759>

Turco, M. Y., & Moffett, A. (2019). Development of the human placenta. *Development (Cambridge, England)*, 146(22), dev163428. <https://doi.org/10.1242/dev.163428>

Uberti, F., Ruga, S., Farghali, M., Galla, R., & Molinari, C. (2021). A Combination of α -Lipoic Acid (ALA) and Palmitoylethanolamide (PEA) Blocks Endotoxin-Induced Oxidative Stress and Cytokine Storm: A Possible Intervention for COVID-19. *Journal of dietary supplements*, 1–23. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/19390211.2021.1966152>

Uccelli, A., Milanese, M., Principato, M. C., Morando, S., Bonifacino, T., Vergani, L., Giunti, D., Voci, A., Carminati, E., Giribaldi, F., Caponnetto, C., & Bonanno, G. (2012). Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 18(1), 794–804. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00498>

Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience reports*, 35(2), e00191. <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>

Urrutia, D. N., Caviedes, P., Mardones, R., Minguell, J. J., Vega-Letter, A. M., & Jofre, C. M. (2019). Comparative study of the neural differentiation capacity of mesenchymal stromal cells from different tissue sources: An approach for their use in neural regeneration therapies. *PloS one*, 14(3), e0213032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213032>

Van Harmelen, V., Röhrig, K., & Hauner, H. (2004). Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism: clinical and experimental*, 53(5), 632–637. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2003.11.012>

Van Houten, B., Woshner, V., & Santos, J. H. (2006). Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA repair*, 5(2), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.03.002>

Venkata, P., Kumari, K., Yarraguntla, S. R., Sharmila, M., & Gulibindala, E. (2021). Application of Box-Behnken Design for Formulation Parameters of Eslicarbazepine Tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.808>

Venugopal, P., Balasubramanian, S., Majumdar, A. S., & Ta, M. (2011). Isolation, characterization,

and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. *Stem cells and cloning : advances and applications*, 4, 39–50. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S17548>

Victor, V. M., Apostolova, N., Herance, R., Hernandez-Mijares, A., & Rocha, M. (2009). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in atherosclerosis: mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. *Current medicinal chemistry*, 16(35), 4654–4667. <https://doi.org/10.2174/092986709789878265>

von Bahr, L., Sundberg, B., Lönnies, L., Sander, B., Karbach, H., Hägglund, H., Ljungman, P., Gustafsson, B., Karlsson, H., Le Blanc, K., & Ringdén, O. (2012). Long-term complications, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 18(4), 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2011.07.023>

Wang, M., Yang, Y., Yang, D., Luo, F., Liang, W., Guo, S., & Xu, J. (2009). The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Immunology*, 126(2), 220–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02891.x>

Wang, S., Qu, X., & Zhao, R. C. (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of hematology & oncology*, 5, 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-5-19>

Wang, X., & Michaelis, E. K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in aging neuroscience*, 2, 12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00012>

Wang, X., Ma, S., Meng, N., Yao, N., Zhang, K., Li, Q., Zhang, Y., Xing, Q., Han, K., Song, J., Yang, B., & Guan, F. (2016). Resveratrol Exerts Dosage-Dependent Effects on the Self-Renewal and Neural Differentiation of hUC-MSCs. *Molecules and cells*, 39(5), 418–425. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2345>

Wang, X., Wu, J., Ma, S., Xie, Y., Liu, H., Yao, M., Zhang, Y., Yang, G. L., Yang, B., Guo, R., & Guan, F. (2020). Resveratrol Preincubation Enhances the Therapeutic Efficacy of hUC-MSCs by Improving Cell Migration and Modulating Neuroinflammation Mediated by MAPK Signaling in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 62. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00062>

Weiss, M. L., & Troyer, D. L. (2006). Stem cells in the umbilical cord. *Stem cell reviews*, 2(2), 155–162. <https://doi.org/10.1007/s12015-006-0022-y>

- Wilkins, A., Kemp, K., Ginty, M., Hares, K., Mallam, E., & Scolding, N. (2009). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem cell research*, 3(1), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.02.006>
- Wu, J. Q., Kosten, T. R., & Zhang, X. Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 46, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.02.015>
- Wu, X., Liang, S., Zhu, X., Wu, X., & Dong, Z. (2020). CoQ10 suppression of oxidative stress and cell senescence increases bone mass in orchietomized mice. *American journal of translational research*, 12(8), 4314–4325.
- Wu, Y., Chen, M., & Jiang, J. (2019). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and drug targets via apoptotic signaling. *Mitochondrion*, 49, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.07.003>
- Xie, T., Wang, C., Jin, Y., Meng, Q., Liu, Q., Wu, J., & Sun, H. (2020). CoenzymeQ10-Induced Activation of AMPK-YAP-OPA1 Pathway Alleviates Atherosclerosis by Improving Mitochondrial Function, Inhibiting Oxidative Stress and Promoting Energy Metabolism. *Frontiers in pharmacology*, 11, 1034. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01034>
- Yabe, S., Alexenko, A. P., Amita, M., Yang, Y., Schust, D. J., Sadovsky, Y., Ezashi, T., & Roberts, R. M. (2016). Comparison of syncytiotrophoblast generated from human embryonic stem cells and from term placentas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(19), E2598–E2607. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601630113>
- Yadav, P., Rastogi, V., & Verma, A. (2020). Application of Box-Behnken design and desirability function in the development and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery system for enhanced dissolution of ezetimibe. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(7). <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00023-3>
- Yang, H., Feng, R., Fu, Q., Xu, S., Hao, X., Qiu, Y., Feng, T., Zeng, Z., Chen, M., & Zhang, S. (2019). Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells promote healing via TNF- α -stimulated gene-6 in inflammatory bowel disease models. *Cell Death & Disease*, 10(718). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1957-7>
- Yang, T., Xu, Z., Liu, W., Xu, B., & Deng, Y. (2016). Protective effects of Alpha-lipoic acid on MeHg-induced oxidative damage and intracellular Ca(2+) dyshomeostasis in primary cultured neurons. *Free radical research*, 50(5), 542–556. <https://doi.org/10.3109/10715762.2016.1152362>

- Yaqub, F., Latief, N., Butt, H., Naseer, N., & Riazuddin, S. (2021). Alpha lipoic acid priming enhances the hepatoprotective effect of adipose derived stem cells in CCl₄ induced hepatic injury in-vitro. *European journal of pharmacology*, 906, 174201. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174201>
- Ye, Z., Wang, W., Yuan, Q., Ye, H., Sun, Y., Zhang, H., & Zeng, X. (2016). Box-Behnken design for extraction optimization, characterization and in vitro antioxidant activity of Cicer arietinum L. hull polysaccharides. *Carbohydrate polymers*, 147, 354-364. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.092>
- Yoon, D. S., Choi, Y., Choi, S. M., Park, K. H., & Lee, J. W. (2015). Different effects of resveratrol on early and late passage mesenchymal stem cells through β -catenin regulation. *Biochemical and biophysical research communications*, 467(4), 1026–1032. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.017>
- Yue, L., Ren, Y., Yue, Q., Ding, Z., Wang, K., Zheng, T., Chen, G., Chen, X., Li, M., & Fan, L. (2021). α -Lipoic Acid Targeting PDK1/NRF2 Axis Contributes to the Apoptosis Effect of Lung Cancer Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (2021), 1-16. <https://doi.org/10.1155/2021/6633419>
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
- Zhang, D., Yan, B., Yu, S., Zhang, C., Wang, B., Wang, Y., Wang, J., Yuan, Z., Zhang, L., & Pan, J. (2015). Coenzyme Q10 inhibits the aging of mesenchymal stem cells induced by D-galactose through Akt/mTOR signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015, 867293. <https://doi.org/10.1155/2015/867293>
- Zhang, F., Shi, J. S., Zhou, H., Wilson, B., Hong, J. S., & Gao, H. M. (2010). Resveratrol protects dopamine neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity through its anti-inflammatory actions. *Molecular pharmacology*, 78(3), 466–477. <https://doi.org/10.1124/mol.110.064535>
- Zhang, J., & Peng, C. A. (2019). Enhanced proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells by astaxanthin-encapsulated polymeric micelles. *PloS one*, 14(5), e0216755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216755>
- Zhao, Y., Sun, Y., Wang, G., Ge, S., & Liu, H. (2019). Dendrobium Officinale Polysaccharides Protect against MNNG-Induced PLGC in Rats via Activating the NRF2 and Antioxidant Enzymes HO-1 and NQO-1. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 9310245. <https://doi.org/10.1155/2019/9310245>

Zheng, D., Cui, C., Yu, M., Li, X., Wang, L., Chen, X., & Lin, Y. (2018). Coenzyme Q10 promotes osteoblast proliferation and differentiation and protects against ovariectomy-induced osteoporosis. *Molecular medicine reports*, 17(1), 400–407. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7907>

Zhou, T., Yan, Y., Zhao, C., Xu, Y., Wang, Q., & Xu, N. (2019). Resveratrol improves osteogenic differentiation of senescent bone mesenchymal stem cells through inhibiting endogenous reactive oxygen species production via AMPK activation. *Redox report: communications in free radical research*, 24(1), 62–69. <https://doi.org/10.1080/13510002.2019.1658376>

Zhou, Y., Tsai, T. L., & Li, W. J. (2017). Strategies to retain properties of bone marrow-derived mesenchymal stem cells ex vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1409(1), 3–17. <https://doi.org/10.1111/nyas.13451>

Zhu, H., Mitsuhashi, N., Klein, A., Barsky, L. W., Weinberg, K., Barr, M. L., Demetriou, A., & Wu, G. D. (2006). The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(4), 928–935. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0186>

Zhu, S., Hong, M., Liu, C., & Pei, Y. (2009). Application of Box-Behnken design in understanding the quality of genistein self-nanoemulsified drug delivery systems and optimizing its formulation. *Pharmaceutical development and technology*, 14(6), 642–649. <https://doi.org/10.3109/10837450902882385>