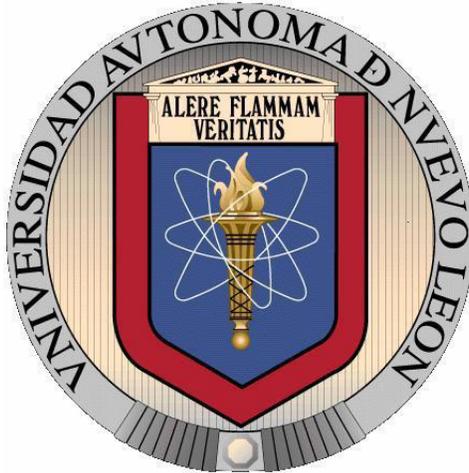


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES QUE SOBREEXPRESAN TRAIL E IFN β EN UN MODELO
MURINO DE LINFOMA**

PRESENTA

M.C. CARLOS ALBERTO GONZÁLEZ VILLARREAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

AGOSTO, 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES QUE SOBREEXPRESAN TRAIL E IFN β EN UN MODELO
MURINO DE LINFOMA**

PRESENTA

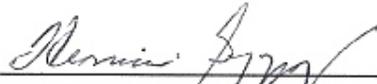
M.C. CARLOS ALBERTO GONZÁLEZ VILLARREAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

AGOSTO, 2018

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES QUE SOBREEXPRESAN TRAIL E IFN β
EN UN MODELO MURINO DE LINFOMA

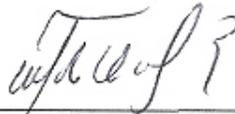
Aprobación de la tesis:



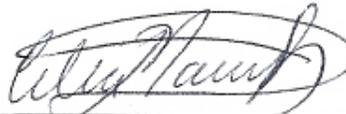
DRA. C. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Directora de tesis



DR. C. SALVADOR LUIS SAID Y FERNÁNDEZ
Codirector de la tesis



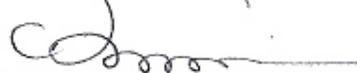
DR. C. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA
Miembro de la Comisión de Tesis



DRA. C. CELIA NOHEMÍ SÁNCHEZ DOMÍNGUEZ
Miembro de la Comisión de Tesis



DR. C. GERARDO RAYMUNDO PADILLA RIVAS
Miembro de la Comisión de Tesis



DR. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ
Subdirector de Estudios de Posgrado

**El presente trabajo se llevó a cabo en la Facultad de Medicina de la
Universidad Autónoma de Nuevo León
Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina
Molecular**

**Bajo la dirección de la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez y
la codirección del Dr. Salvador Luis Said y Fernández**

**Participaron también el Servicio de Inmunología
y el
Departamento de Histología**

con la colaboración de

**Dr. C. Adolfo Soto Domínguez
Dr. C. Humberto Cavazos Rocha
Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño
Dr. C. Mario Cesar Salinas Carmona
Dr. C. Alberto Yairh Limón Flores**

**El autor del presente estudio fue apoyado por el CONACYT con una beca
para realizar su programa de Doctorado en Ciencias
Este proyecto fue financiado parcialmente por el Programa de Apoyo a la
Investigación en Ciencia y Tecnología de la UANL (PAICYT),
Registro SA139-15**

**Autorizado por el Comité de Investigación Científica, de Bioética y
Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la UANL
Registro BI15-005**

**y aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los
Animales de Laboratorio
Registro PI15-0286**

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca que me otorgó para realizar mi programa de doctorado.

A la Dirección de la Facultad de Medicina de la UANL por la beca de alimentos.

A los departamentos de Bioquímica y Medicina Molecular, Histología y al servicio de Inmunología por permitirme entrar a sus laboratorios para realizar el presente proyecto.

A mis padres Arturo y Sonia que siempre me han motivado a seguir creciendo en las cosas que me apasionan.

A mi esposa Yessica, que sin excepción me ha acompañado a lo largo de estos años, dándome su apoyo y comprensión.

A mis asesores, Dra. Herminia Martínez Rodríguez y Dr. Salvador Said y Fernández, que me es imposible plasmar lo agradecido que estoy en papel, tienen mi admiración y mi gratitud.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna siendo un apoyo aun desde antes de iniciar el proyecto, siempre presente en todas las dudas, enriqueciendo con su experiencia y conocimientos.

A mis compañeros del laboratorio de terapia celular, Elsa, Orlando, Carlos, Florencia, Ale y Mario, quienes siempre han conservado un ambiente de trabajo agradable y productivo, con muchos ratos amenos.

A la Dra. Ana María Rivas Estilla y mis compañeros del laboratorio de infectología, ya que siempre conté con ellos, para una segunda opinión, una crítica o solo un rato para apartarse de los pendientes. Dentro de sus posibilidades, nunca me faltó su apoyo.

Al Dr. Adolfo Soto Domínguez por su valioso apoyo, confianza y colaboración durante el desarrollo de todo mi proyecto de investigación.

Al Dr. Mario César Salinas Carmona por su invaluable colaboración en este trabajo, la cual fue una pieza central para culminarlo con éxito. Muchas gracias.

Al Dr. Yairh Limón Flores y la gente del laboratorio de experimentación animal, Ángel, Mayra y Eder, que me recibieron en el laboratorio, me apoyaron y me ofrecieron su ayuda, pese a que tienen sus muy pesadas responsabilidades y pendientes y me facilitaron el trabajo con los ratones, con excelente disposición. Muchísimas gracias raza.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

A las secretarias del departamento, Juany, Cristy, Normita y Ariadna, siempre detrás de uno, para cumplir con cosas esenciales que dejamos por omisión o descuido: trámites y papelería.

A los Doctores Gerardo Padilla y Celia Nohemí Sánchez Domínguez por los conocimientos y consejos que me dieron en este proceso.

A don Lalo siendo una de las personas más dispuestas y serviciales del departamento, procurando siempre apoyarnos a mí y a mis compañeros estudiantes.

A los ratones que sirvieron para los experimentos.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi esposa Yessica

la testigo de este proceso

mi soporte

mi motivación

te amo.

INDICE

Contenido	Sección
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	V
INDICE.....	VI
Lista de Tablas	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1. Cáncer y linfoma.....	6
2.2. Importancia epidemiológica del cáncer.....	6
2.3. Mecanismos generales de inicio del cáncer.....	6
2.4. Definición de linfoma.....	7
2.5. Factores de riesgo del LNH.....	7
2.6. Diagnóstico de LNH.....	8
2.7. Patogénesis del LNH.....	9
2.8. Tratamiento.....	10
2.9. Terapia celular como alternativa para controlar el cáncer.....	11
2.10. CMM adultas.....	12
2.11. Uso de CMM adultas en terapia celular.....	12
2.12. CMM adultas en el tratamiento del cáncer.....	13
2.13. Interacción entre las CMM y los tumores.....	13
2.14. Las CMM como vehículos y medios de expresión de transgenes.....	14
2.15. Aplicación clínica de las CMM transfectadas con genes anticáncer.....	14
2.16. TRAIL.....	16
2.17. Mecanismo de muerte por TRAIL.....	17
2.18. IFN β	17

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

2.19. Ratones de laboratorio como modelos de cáncer	17
2.20. Ratones desnudos	18
2.21. Ratones singénicos	19
2.22. Células de la línea L5178Y	19
2.23. CMM-MO murinas	20
2.24. Vectores.....	20
2.24.1. Plásmidos	20
2.24.2. Virus.....	21
3. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	22
4. JUSTIFICACIÓN.....	24
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS.....	26
6.1 Objetivo general	26
6.2 Objetivos específicos y metas.....	26
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
8.1. Construcción de vectores plasmídicos.....	28
8.1.1. Diseño de secuencias de los transgenes	28
8.2. Construcción del vector de expresión pTracer-TRAIL/IFN β	29
8.3. Comprobación de la longitud de los insertos.....	30
8.4. Construcción de vectores lentivirales.....	31
8.5. Obtención y expansión de CMM-MO.....	31
8.6. Caracterización de las CMM-MO	33
8.6.1. Porcentaje de células CD90+/CD105+	33
8.6.2. Evaluación de multipotencia de las CMM-MO.....	34
8.7. Modificación genética de las CMM-MO	36
8.7.1. Transfección plasmídica de CMM-MO.....	36
Tabla 2. Condiciones y agentes de transfección	37
8.7.2. Cálculo de la intensidad de la expresión génica.....	38
8.7.3. Cálculo de la eficiencia de transfección.....	38
8.7.4. Determinación de la citotoxicidad.....	38

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

8.7.5. Índice de desempeño de las combinaciones transfectantes.....	39
8.7.6. Transducción lentiviral.....	39
8.8. Expresión de los transgenes por las CMM-MO	39
8.8.1. Verificación de la traducción de los transgenes.....	39
8.8.2. <i>Western blot</i> de los productos de transfección.....	40
8.9. Producción de linfomas	42
8.9.1. Estandarización del inóculo de células L5178Y.....	42
8.10. Evaluación de la quimiotaxis de las CMM-MO.....	43
8.11. Determinación de la reducción del tamaño de los tumores.....	45
8.12. Determinación del tiempo de sobrevida.....	46
8.13. Evolución de los tumores postimplante.....	46
8.14. Aspectos éticos	47
9. RESULTADOS	48
9.1. Obtención y caracterización de CMM-MO de ratón.....	48
9.1.1. Morfología y marcadores de superficie	48
9.1.2. Multipotencia de las CMM-MO	49
9.1.3. Quimiotaxis de las CMM-MO	50
9.2. Diseño, construcción y caracterización de los vectores plasmídicos.....	51
9.3. Estandarización de la técnica de transfección	52
9.3.1. Intensidad de la expresión génica.	53
9.3.2. Eficiencia de transfección.....	53
9.3.3. Citotoxicidad de las combinaciones de agentes transfectantes y DNA plasmídico.	54
9.3.4. Búsqueda del producto proteico del transgén TRAILS.....	58
9.4. Estandarización de la transducción.	59
9.4.1. Determinación de la concentración óptima de sulfato de protamina.	59
9.4.2. Identificación de las proteínas TRAILS, TRAILc e IFN β producidas por CMM-MO transducidas.....	61
9.5. Estandarización de la inducción de linfomas	62
9.5.1. Análisis del efecto terapéutico de CMM-MO transducidas con TRAILc, TRAILS o IFN β sobre linfomas murinos.....	62
9.5.1.1. Inducción de los linfomas	63
9.6. Identificación de los ratones que sobrevivieron con aparente eliminación de tumor. ..	70

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

9.7. Análisis de supervivencia de los grupos tratados	70
9.8. Histopatología.....	73
10. DISCUSIÓN.....	76
11. CONCLUSIONES.....	82
12. PERSPECTIVAS.....	83
12. REFERENCIAS	84
ANEXO 1. LISTA DE REACTIVOS	94
ANEXO 2. CONSUMIBLES.....	96
ANEXO 3. EQUIPO	97
ANEXO 4. SOLUCIONES.....	98
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	100
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR.....	101

Lista de Tablas

Tabla 1. Ejemplos de estudios de terapia celular realizados con CMM modificadas genéticamente	15
Tabla 2. Condiciones y agentes de transfección	37
Tabla 3. Índice de desempeño de todas las modalidades de transfección evaluadas.	57
Tabla 4. Porcentaje de supervivencia de los ratones pertenecientes a los nueve grupos de tratamiento con CMM-MO transducidas	72
Tabla 5. Significancia estadística de las diferencias de supervivencia entre los grupos tratados y el grupo sin tratamiento.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Intensidad de la expresión génica de ocho líneas celulares transducidas con lentivirus..	23
Figura 2. Estrategia experimental. Se obtuvieron y caracterizaron CMM de médula ósea de ratones BALB/c (CMM-MO).	27
Figura 3. Morfología e identificación de marcadores de superficie de las células madre mesenquimales (CMM).	48
Figura 4. Aspecto de condrocitos y osteoblastos derivados de CMM..	49
Figura 5. Análisis cualitativo de quimiotaxis de CMM-MO.....	50
Figura 6. Análisis cuantitativo de quimiotaxis de CMM-MO.	51
Figura 7. Construcción y caracterización de los vectores plasmídicos.....	52
Figura 8. Intensidad de la expresión génica en CMM-MO transfectadas usando diferentes condiciones.	55
Figura 9. Eficiencia de transfección de 12 combinaciones de agentes transfectantes y DNA plasmídico.....	56
Figura 10. Citotoxicidad de las combinaciones de agentes transfectantes y DNA plasmídico.	56
Figura 11. Western Blot de transfección..	59
Figura 12. Análisis cualitativo de eficiencia de transducción con sulfato de protamina.....	60
Figura 13. Identificación de las proteínas TRAIL soluble (s), TRAIL completo (c) e interferón β (IFN β).	61
Figura 14. Estandarización del inóculo de células de linfoma L5178Y.	63
Figura 15. Medida y peso de ratones.	64
Figura 16. Análisis cuantitativo de la implantación de los linfomas.....	65
Figura 17. Diferencias entre el volumen de los tumores entre los grupos experimentales completos..	66
Figura 18. Síntomas considerados para practicar eutanasia..	68
Figura 19. Peso de los ratones por grupo experimental.....	69
Figura 20. Análisis de supervivencia de los grupos experimentales.	71
Figura 21. HYE de tejido inoculado.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosíntrifosfato
α MEM	Alfa- Minimum Essential Medium
Bcl-2	Familia de proteínas, esenciales para la apoptosis.
Bcl-XL	Linfoma de células B – extralargo y MCL-1
BSA	Albúmina sérica bovina
$^{\circ}$ C	Centígrado (grado)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , cluster of designation o classification determinant
cDNA	DNA complementario
CMM	Célula madre mesenquimal (<i>MSC – Mesenchymal Stem cell</i>)
CMT	Células madre de tumor
CMV	Citomegalovirus
d	Días
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DE	Desviación estándar
DMEM	Deulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, por siglas en inglés – Desoxirribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF-1 α	Human elongation factor 1-alpha
EMA	Epitelial Membrane Antigen
EMT	Transición epitelial mesenquimal
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
G	Fuerza centrífuga angular, expresada en número de atmósferas
GFP	Proteína Verde Fluorescente, por sus siglas en inglés - Green Fluorescent Protein -
h	Hora(s)
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen - Antigen D related
HRP	Peroxidasa de rábano -Horse-Radish peroxidase-
HRS	Hodgkin/Reed-Sternberg
HYE	Hematoxilina y eosina

**Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan
TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma**

IL	Interleucina
INEGI	Instituto Nacional de Geografía y Estadística
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
Kb	Kilobase
M	Molar
L	Litro
LB	Luria-Bertani
LH	Linfoma Hodgkin
LNH	Linfoma No-Hodgkin
mg	miligramo(s)
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
μ m	micrómetro(s) o micra(s)
μ l	microlitro(s)
mm	milímetro(s)
N	Concentración normal de una solución
ng	Nanogramos
NOM	Norma Oficial Mexicana
nM	Nanomolar
Pb	Pares de Bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (amortiguador de fosfatos)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMC	Porcentaje de muerte celular
PVDF	Polivinilidenedifluorida (<i>Polyvinylidenedifluoride</i>)
qPCR	PCR cuantitativa o en tiempo real (<i>quantitative PCR</i>)
qRT-PCR	Retro-transcriptasa acoplada a qPCR
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundo(s)
SDS-PAGE	Gel de eletroforesis de poliacrilamida - Sodio dodecil sulfato, por siglas en inglés – <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> -
TAE	Tris-Acético-EDTA (Buffer)
TBST	Tris-buffer salino + Tween 20
TE	Tris-buffer con EDTA
TEMED	N, N, N',N', Tetramileneilendiamina
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

TNF	Factor de necrosis tumoral por sus siglas en inglés - <i>Tumor Necrosis Factor</i> -
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF, por sus siglas en inglés - <i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i> -

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

RESUMEN

Evaluación de la actividad antitumoral de células madre mesenquimales que sobreexpresan TRAIL e IFN β en un modelo murino de linfoma

Carlos Alberto González Villarreal

Introducción. El cáncer es la principal causa de muerte en países desarrollados y la segunda en países en vías de desarrollo. El linfoma es un tipo de cáncer que se origina de células linfáticas. Se caracteriza por el crecimiento de los nódulos linfáticos. Se conocen dos tipos de linfoma: el linfoma de Hodgkin (LH) y el linfoma no-Hodgkin (LNH). Todos los linfomas tienden a formar tumores sólidos. El LNH fue el motivo del presente estudio. La cirugía y la quimioterapia constituyen la primera opción para el tratamiento de la LNH. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos, ni la quimioterapia ni la radioterapia, solas o combinadas, eliminan el cáncer del organismo y tienen graves efectos iatrogénicos. Es por ello que se requieren urgentemente nuevas estrategias para atacar a los tumores en una forma más eficaz y segura. La terapia celular, basada en el uso de células madre mesenquimales (CMM) es una estrategia promisoriosa en el tratamiento del cáncer, porque poseen diversas características apropiadas para este propósito. Dos de las más notables son: 1) que las CMM migran hacia los tejidos lesionados o hacia los tumores y los colonizan (*homing*) y 2) que las CMM pueden modificarse genéticamente. Por ello, se emplean las CMM transfectadas o transducidas para que expresen genes exógenos dentro de los tumores y atacarlos *in situ*. Los genes empleados en este trabajo fueron el ligando relacionado con TNF inductor de apoptosis (TRAIL), completo (TRAILc) y soluble (TRAILS) y el interferón β (IFN β). TRAIL tiene un efecto selectivo hacia las células malignas e IFN β presenta efectos inmunomoduladores, antiproliferativos y proapoptóticos. TRAILc es insoluble y se localiza en la membrana plasmática y TRAILS es exportado por las células. Ambos tienen características deseables. **Objetivo general.** Evaluar la actividad antitumoral de CMM murinas de médula ósea modificadas genéticamente para sobreexpresar TRAILc, TRAILS e IFN β , en un modelo de linfoma sólido murino L5178Y. **Material y métodos:** Se obtuvieron y caracterizaron CMM de médula ósea de ratones BALB/c (CMM-MO). Estas células se modificaron genéticamente por transfección plasmídica con transgenes de TRAILS o IFN β , o mediante transducción lentiviral con transgenes de TRAILS, TRAILc o IFN β . Se confirmó expresión de los productos proteicos de los transgenes por las CMM-MO transducidas, mediante *Western Blot*. Se inocularon, en el gastrocnemio derecho, nueve grupos de ocho ratones hembras con células de linfoma de la línea L5178Y y se siguió su evolución, midiendo el diámetro de los tumores. Cuando el diámetro de los tumores alcanzó, en promedio 1-2 mm³, se implantaron intratumoralmente 1 \times 10⁶ CMM-MO transducidas con TRAILc, TRAILS o IFN β , o sus combinaciones. Se evaluó la eficacia terapéutica de los implantes, determinando la supervivencia de los ratones tratados con las CMM-MO transducidas, comparándola con la supervivencia de los ratones no tratados. **Resultados.** El grupo tratado con la combinación de CMM-MO transducidas con IFN β y con CMM-MO transducidas con TRAILS produjo 62.5% de supervivencia con completa eliminación de los tumores; mientras que los ratones tratados únicamente con CMM-MO transducidas con IFN β o con TRAILS produjeron una supervivencia aproximadamente 50% menor; lo cual sugiere un efecto terapéutico aditivo de ambos transgenes. **Conclusión.** El tratamiento combinado de TRAILS e IFN β es notablemente más eficaz que el resto de los tratamientos probados. **Perspectiva.** La combinación de CMM-MO transducidas con TRAILS y CMM-MO transducida con IFN β es muy prometedora para el tratamiento de linfomas humanos.



Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Directora de Tesis



Dr. C. Salvador Luis Said y Fernández
Codirector de Tesis

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

ABSTRACT

Evaluation of antitumoral activity of Mesenchymal Stem Cells over-expressing TRAIL and IFN β on a murine lymphoma model

Carlos Alberto González Villarreal

Introduction. Cancer is the first cause of death in developed- and the second in developing- countries. Lymphoma is a type of cancer, which inception comes from lymphatic cells. It is characterized by the growth of lymphatic nodes. There are two known types of lymphomas: Hodgkin (HL) and non-Hodgkin (NHL). All lymphomas show a tendency of forming solid tumors. This study was focused in NHL. Surgery and chemotherapy are the first option in NHL treatment. However, the vast majority of cases, chemotherapy or surgery, alone or combined, does not fully deplete cancer cells from their invaded organism and exert serious iatrogenic effects. Therefore, it is urgent to develop new strategies to attack tumors in a more efficacious and safe manner. Mesenchymal stem cell (MSC)-based therapy is, indeed, a promising strategy for cancer treatment, due to their diverse MSC's desirable characteristics for this purpose. Two of the most noticeable MSCs' properties are: 1) that MSCs can migrate from any place within the organism to the wounded tissue or tumor and engraft them. This MSCs' property is called homing. 2) MSC can be genetically engineered. Due to these two characteristics, MSCs are intensively employed as carriers to deliver their gene products into tumors and attack them locally. The genes employed in this study were the TNF-apoptosis related ligand apoptosis inductor (TRAIL), complete (TRAILc) and soluble (TRAILs), and interferon- β (IFN β). TRAIL exerts a selective effect upon malignant cells and IFN β drives immunomodulatory, antiproliferative and proapoptotic effects. TRAILc is insoluble and it is located in the cell plasma membrane and TRAILs is exported by cells. Both TRAILc and TRAILs have desirable characteristics. **General objective.** To evaluate the antitumor activity of murine MSC from bone marrow (BM) genetically engineered to over-express TRAILc, TRAILs or IFN β , in a solid murine lymphoma L5178Y. **Material and methods.** Bone marrow mesenchymal stem cells, from BALB/c mice, were obtained and characterized. These cells were genetically modified with TRAILs or IFN β transgenes by plasmid transfection or by lentiviral transduction of TRAILs, TRAILc or IFN β . The expression of transgene protein products by the transduced CMM-MO was confirmed by *Western Blot*. Nine groups of eight female mice were inoculated in the right gastrocnemius, with L5178Y lymphoma cells and the evolution was followed by measuring the tumor diameter. When tumors reached 1-2 mm³, in average, 1 \times 10⁶ CMM-MO transduced with TRAILc, TRAILs or IFN β , or their combinations were implanted inside tumors. The tumoricidal effect of implanted CMM-MO was evaluated by determining the survival of each group of mice, compared with survival of non-treated bearing tumor mice. **Results.** The group treated with a combination of CMM-MO transduced with IFN β and with CMM-MO transduced con TRAILs resulted in 62.5% survival and a complete elimination of tumors. On the other hand, those mice treated only with CMM-MO transduced with IFN β or with TRAILs resulting, each, in about 50% lower than the combined treatment, suggesting an additive therapeutic effect of both transgenes. **Conclusion.** The combined treatment with CMM-MO transduced with TRAILs and CMM-MO transduced with IFN β was the most efficacious to treat murine lymphoma. **Perspectives.** The treatment of solid lymphoma with a combination of CMM-MO transduced with TRAILs and CMM-MO transduced with IFN β is very promising to treat human lymphomas.

Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Thesis Director

Dr. C. Salvador Luis Said y Fernández
Thesis codirector

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Entre los diversos tipos de cáncer, se encuentran los de la sangre; siendo los principales la leucemia y los linfomas Hodgkin y no Hodgkin (LNH). La LNH fue el foco de interés del presente trabajo. Actualmente, los tratamientos convencionales para la LNH más empleados son la quimioterapia y la radioterapia. Por décadas, ambos procedimientos han mostrado cierta efectividad. Sin embargo, la especificidad y eficacia de estos tratamientos han sido insatisfactorias. Es decir, cuando se aplica en una paciente quimioterapia, radioterapia o la combinación de ambos procedimientos, no sólo se ataca a las células cancerosas, sino también a las células sanas, la LNH eventualmente desarrolla resistencia a la quimioterapia y un número importante de pacientes con linfoma muere por esta causa. Además, tanto la quimioterapia como la radioterapia tienen efectos iatrogénicos severos, que contribuyen importantemente al deterioro de la calidad de vida de los pacientes, ya de por sí comprometida por el LNH. Por ello, se requiere desarrollar nuevas terapias, más eficaces y específicas que las convencionales. Las células madre mesenquimales (CMM) son una alternativa promisorio para utilizarlas en el tratamiento de leucemias y de otros tipos de cáncer, gracias a que estas células no son inmunogénicas, ni son portadoras de infecciones exógenas, porque se toman del mismo paciente, pueden ser modificadas genéticamente, y una vez que estas células han sido reimplantadas en un organismo, éstas pueden migrar por el torrente circulatorio, localizar los tumores, colonizarlos —*homing*— expresar eficazmente los transgenes que portan y atacar, *in situ* y específicamente a las células malignas, mediante los productos de sus transgenes, secretados o mediante contacto célula-célula.

Se han realizado diversos estudios *in vitro*, utilizando líneas celulares cancerosas o *in vivo* en modelos animales, generalmente inmunodeficientes; por ejemplo, con ratones desnudos (*nude mice* [nu/nu]) o ratones no obesos/diabéticos con inmunodeficiencia severa (*non obese/diabetic severe combined immunodeficiency*

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

[NOD/SCID]) y CMMs humanas modificados genéticamente con diversos transgenes. Estos estudios se han realizado utilizando modelos heterólogos, los cuales consisten en animales de una especie implantados con xenoinjertos. Los xenoinjertos son implantes de células cancerosas o CMM de una especie diferente a la del animal receptor; p.e. CMM y células cancerosas humanas sobre ratones inmunodeficientes. Aunque los resultados obtenidos son valiosos e interesantes, estrategias experimentales como éstas, presentan limitaciones mayores: 1) los animales de laboratorio inmunodeficientes portando tumores cancerosos producto de xenoinjertos, sí desarrollan tumores por ser inmunodeficientes, pero ese tumor en un modelo de ratones inmunocompetentes que reciben un inóculo de células cancerosas de ratón (modelo singénico), generalmente no se desarrolla y queda entonces en duda la posible eficacia de la terapia con CMM modificadas genéticamente, o al menos, dicha eficacia no es cuantitativamente comparable con un modelo homólogo en animales inmunocompetentes y 2) las CMM heterólogas humanas, pueden no colonizar los tumores adecuadamente en un modelo heterólogo —ratones, por ejemplo—. de esta manera queda la duda de si una posible baja eficacia antitumoral, se debe a una causa intrínseca de las CMM modificadas genéticamente o a un microambiente desfavorable para estas células. Como una estrategia alternativa que evitase las limitaciones comentadas arriba, en este estudio nosotros utilizamos un modelo 100% singénico. Es decir, en ratones BALB/c —inmunocompetentes—inoculamos células de linfoma murino (L5178Y), con CMM-MO de ratones BALB/c modificadas con transgenes de TRAIL e IFN β murinos. Con este modelo determinamos la eficacia anti-LNH y la seguridad de un procedimiento consistente en transfectar CMM de médula ósea (MO) murinas con genes que codifican para dos proteínas conocidas por sus efectos antitumorales: el ligando relacionado con TNF inductor de apoptosis (*TNF-related apoptosis-inducing ligand* [TRAIL]) y el interferón β (IFN β). TRAIL ejerce una acción proapoptótica, selectiva para las células malignas e IFN β tiene un efecto inmunomodulador, dirigiendo la respuesta inmune contra los tumores. En el presente trabajo, evaluamos la eficacia antitumoral de CMM-MO murinas

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

modificadas genéticamente con TRAIL soluble y con su secuencia e IFN β , *in vitro*, sobre cultivos de la línea celular de leucemia L5178Y e *in vivo*, sobre masas tumorales producidas en el gastrocnemio derecho de ratones BALB/c hembras inmunocompetentes, inoculados con la misma línea L5178Y.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer y linfoma

El cáncer es el nombre dado a una colección de enfermedades relacionadas en las que una célula pierde su control en la división celular y se torna invasiva [1]. Las células cancerosas tienen defectos en los mecanismos regulatorios que gobiernan su proliferación y homeostasis. Hay más de 100 distintos tipos de cáncer y subtipos de tumores [2].

2.2. Importancia epidemiológica del cáncer

El cáncer es la principal causa de muerte en países económicamente desarrollados y la segunda en países en vías de desarrollo. La incidencia del cáncer está aumentando en países en vía de desarrollo como resultado de la elevada expectativa de vida y factores de riesgo modificables (genéticos y ambientales) y no modificables, como tabaquismo, sedentarismo y mala alimentación [3].

2.3. Mecanismos generales de inicio del cáncer

Las mutaciones y rearrreglos en el genoma de las células cancerosas son extremadamente complejos. En general, las alteraciones genéticas consisten en la reprogramación de los mecanismos de regulación homeostática. Pocos tipos de cáncer pueden curarse y en general, el pronóstico es más favorable cuando la enfermedad se detecta en etapas tempranas y los tumores se eliminan quirúrgicamente [4].

Las principales características fisiopatológicas de las células cancerosas son las siguientes: 1) autosuficiencia en señales de crecimiento; 2) insensibilidad a señales de inhibición del crecimiento; 3) evasión de la apoptosis; 4) potencial ilimitado de replicación; 5) angiogénesis; 6) invasión tisular y metástasis [5]; 7) la reprogramación del metabolismo energético y 8) la evasión de la destrucción por defensa del sistema inmune del individuo, favoreciendo el microambiente del tumor [6]

2.4. Definición de linfoma

El linfoma, es un tipo de cáncer. Se aplica el nombre de linfoma a un grupo de tumores de células sanguíneas que se origina de células linfáticas [7] y que se caracteriza por el crecimiento de los nódulos linfáticos, preferentemente periféricos. El linfoma también puede afectar al hígado, pulmón y médula ósea. Existe una clasificación de los linfomas que fue desarrollada con la finalidad de establecer un pronóstico y un tratamiento racionales.

Se conocen dos tipos de linfoma: el linfoma de Hodgkin (LH) y el linfoma no-Hodgkin (LNH). Todos los linfomas tienden a formar tumores sólidos; a diferencia de las leucemias, que se caracterizan por un aumento excesivo del número de leucocitos [8].

2.5. Factores de riesgo del LNH

En el mundo, en 2012, la Organización Mundial de la Salud y el proyecto Globocan [9] reportaron que, en hombres, hubo una incidencia de LNH—calculada a 5 años—de 217,643 casos de LNH; cifra que representó el 2.9% de todos los casos de cáncer, con una tasa de 6 casos/100,000 habitantes (h); una mortalidad de 115,404 casos, equivalente al 2.5% de las muertes ocasionadas por todos los tipos de cáncer, con una tasa de mortalidad de 3.1/100,000 h y una prevalencia de 463,368 casos (3.0% del total de casos de cáncer) y una tasa de 17.9/100,000 h. En mujeres, hubo 168,098 casos de LNH, equivalente al 2.5% del total de casos de cáncer, con una tasa de 4.1/100,000h; 84,266 muertes (2.4% del total de muertes por cáncer, con una tasa de 2.0/100.000 h y una prevalencia de 369,475 casos (2.2% del total de casos de cáncer) y una tasa de 14.2/100,000 h.

En México, en el 2012, *en hombres*, la incidencia del LNH fue de 2,325 casos, con una prevalencia—calculada a 5 años—de 4,730 casos, con una tasa de 11.7/100,000 h. [10]. En mujeres la incidencia estimada fue de 1991, la prevalencia —calculada a 5 años—de 3,979, con una tasa de 9.3/100,000 h. [11]. No existen reportes confiables sobre la mortalidad por LNH en México.

En Nuevo León, entre los años de 2008 a 2012, el promedio de la tasa de mortalidad en personas mayores de 25 años fue de 3.42 casos por 100 mil habitantes [12].

2.6. Diagnóstico de LNH

Signos y síntomas. Los pacientes con LNH usualmente presentan linfadenopatía; pero el LNH también puede aparecer en otros órganos y tejidos (extra nodal). Los linfomas comúnmente presentan linfadenopatía periférica sin dolor. Los pacientes con linfomas más agresivos presentan masas abdominales o en el mediastino. Pueden presentarse síntomas sistémicos; tales como fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso, escalofríos [13]. La esplenomegalia está presente en un 30-40% de los casos [14]. La evaluación inicial del individuo diagnosticado con LNH incluye historia clínica y examen físico, biometría hemática, panel electrolítico, pruebas de función hepática y renal, aspirado de médula ósea y biopsia; la prueba de lactato deshidrogenasa puede mostrar un incremento y actúa como indicador pronóstico. La tomografía computada de cuello, pecho, abdomen y pelvis se incluye en el análisis del estadio [13].

Histopatología e inmunohistopatología. Los linfomas se clasifican en linfomas de células B y de células T; los linfomas de células B representan aproximadamente el 90% de los linfomas; por tanto, de células T, aproximadamente el 10%. El LH se clasifica en LH nodular y LH clásico (LHC). En el LH nodular predominan los linfocitos. El LH nodular representa el 5% de los casos de LH y es más frecuente en hombres [8]. Se conocen varios subtipos del LHC. El más común es el LHC de esclerosis nodular. Los subtipos de LHC menos comunes, son los de celularidad mixta, los de predominio linfocítico, los empobrecidos en linfocitos y los inespecíficos. Todos los subtipos de LHC se tratan de la misma manera [15]. El diagnóstico diferencial de LNH se basa en un análisis histopatológico e inmunohistoquímico de los nódulos linfáticos hipertrofiados. Esto, para detectar células de Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS), CD30⁺, al CD15⁺, CD45⁻ y EMA⁻ (*Epithelial Membrane Antigen*) y en ocasiones positivas a marcadores B [16].

2.7. Patogénesis del LNH

Los linfomas de linfocitos-B se originan durante los diferentes estadios del desarrollo de estas células. El desarrollo de los linfocitos-B engloba diferentes estadios: éste se inicia en los órganos linfoides primarios y prosigue con la diferenciación en los tejidos linfoides secundarios, tales como los ganglios linfáticos, el bazo y las amígdalas. Durante esos estadios del desarrollo de los linfocitos-B ocurren modificaciones en su DNA, que son esenciales para una respuesta inmune normal. Sin embargo, las modificaciones que ocurren en el DNA de los linfocitos B pueden predisponer a estas células a sufrir anormalidades genéticas y conducir al surgimiento y evolución de un linfoma.

El desarrollo de los linfocitos-B se inicia en la médula ósea, mediante una recombinación de genes que codifican para las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos, para formar a los linfocitos-B receptores (BCR). Este proceso se conoce como recombinación V(D)J. Esta recombinación implica rupturas de doble cadena del DNA por efecto de los genes RAG1 y RAG2. Una vez que BCR expresan sus anticuerpos, los linfocitos-B abandonan la médula ósea y migran a los centros germinales de reacción en los tejidos linfoides secundarios. En estos centros germinales de reacción ocurren, cuando menos, dos modificaciones distintas en el DNA; una hipermutación somática (*SHM*) y una recombinación de cambio de clase (CSR; de IgM a IgG, IgA, o IgE). El CSR ocurre mediante la recombinación de DNA, dentro de regiones altamente repetitivas. Después del centro germinal de reacción, los linfocitos-B se desarrollan como células B de memoria o células plasmáticas. A pesar de que existe un estricto control en cada uno de los pasos descritos, pueden surgir errores. Como consecuencia de estos errores, surgen los linfomas. Las recombinaciones V(D)J, SHM y CSR representan especialmente procesos críticos que pueden predisponer al surgimiento de tumores malignos. EL CSR también implica cortes de doble cadena en el DNA y, por lo tanto, este proceso también puede resultar en translocaciones en los cromosomas. Estos cambios se detectan frecuentemente en el linfoma de Burkitt, mieloma múltiple y otras neoplasias linfoides malignas.

Los linfomas de células B surgen en diferentes estadios de diferenciación. Por lo tanto, es posible distinguir centros de linfomas pregerminales y postgerminales [17].

2.8. Tratamiento

En la actualidad, la cirugía y la quimioterapia constituyen la primera opción para el tratamiento del LNH. La aplicación de la radioterapia se restringe a tumores localizados y como un tratamiento adyuvante [18] y ambos tipos de tratamiento causan daños multiorgánicos [19]. Idealmente, la quimioterapia debería atacar específicamente células neoplásicas y reducir la carga del tumor al inducir efecto citotóxico y/o citostático, con un efecto colateral mínimo. Sin embargo la quimioterapia tiene un conjunto de factores adversos, incluyendo toxicidad sistémica, debida a sus efectos inespecíficos y generación de resistencia a los fármacos por parte de las células cancerosas [20]. Además, en la gran mayoría de los casos, ni la quimioterapia ni la radioterapia, solas o combinadas, eliminan el cáncer del organismo y, en general, la quimioterapia y la radioterapia tampoco mejoran la calidad de vida de los pacientes; sin embargo, al ser las únicas opciones viables, estos agentes anticáncer constituyen un mal necesario [19].

Todos los tipos de cáncer tienen un conjunto de características compartidas, debidas a las células neoplásicas. Por esta razón, una estrategia lógica para combatir al cáncer es inhabilitar estas características celulares [4]. Desde esta perspectiva, se han sugerido las siguientes estrategias: 1) interrumpir los mecanismos responsables de la formación, crecimiento y malignidad del tumor. 2) Inhabilitar la capacidad de evasión del sistema inmune. 3) Inhibir la angiogénesis inducida por el tumor. 4) Inhibir la capacidad de las células malignas para invadir órganos y tejidos. 5) Interrumpir las vías metabólicas que proporcionan energía a las células malignas. 6) Inhibir las señales de proliferación celular. 7) Activar los mecanismos inductores de apoptosis. 8) Suprimir el crecimiento de las células malignas [4].

2.9. Terapia celular como alternativa para controlar el cáncer

Algunos medicamentos tienen la habilidad de llegar hasta los tumores y metástasis y destruir a algunas de las células tumorales, ejerciendo alguno o algunos de los efectos señalados arriba como estrategias contra las neoplasias malignas. Sin embargo. En un enorme número de casos, sobreviven células tumorales, resistentes a los medicamentos, lo que ocasiona la regresión del cáncer. Se ha sugerido que las principales responsables de este fenómeno son las células madre de tumor (CMT) [21].

Es por ello por lo que se requieren urgentemente nuevas estrategias para atacar a los tumores. Estrategias que permitan llegar a todas las células de los tumores primarios y a las metástasis—incluyendo a las CMT—y que estos nuevos recursos anticáncer ejerzan su poder aniquilador, específicamente sobre las células tumorales—sean éstas, CMT o no—. Una rama de la medicina relativamente nueva es la Medicina Regenerativa, basada en terapia celular; la cual consiste en el uso de células madre mesenquimales humanas (hCMM), intactas o modificadas genéticamente. La razón es que estas células tienen diversas ventajas que permiten desarrollar nuevos métodos anticáncer *a la medida* [22]; algunas de las cuales comentaremos adelante. Este fue el punto central del presente trabajo.

La terapia celular, basada en el uso de CMM, se ha convertido en una estrategia promisoriosa en el tratamiento del cáncer [23]. Esto se debe a que las CMM poseen diversas características: 1) son autorenovables; 2) una sola célula puede dar lugar a nuevas colonias y 3) son multipotentes, pueden dar lugar a diversos linajes de células diferenciadas [24]. Las CMM existen en un sistema jerárquico que se rige a nivel del linaje en el que residen estas células [25]. Se reconocen tres tipos de células madre: células madre embrionarias, células madre inducidas y CMM. Los primeros dos tipos de células madre son pluripotentes, pero potencialmente tumorigénicas [26]; por ello se ha propuesto como las mejores candidatos, a las CMM adultas.

2.10. CMM adultas

Las CMM adultas son un grupo de células estromales, presentes en organismos no-fetales. Estas células representan la mejor opción en la Terapia Celular, porque su aislamiento es relativamente sencillo. Pueden obtenerse CMM de una gran variedad de tejidos como médula ósea, pulpa dental, cerebro, hígado, páncreas, piel, tejido adiposo, cordón umbilical, gelatina de Wharton y placenta [27]. Además de las CMM multipotentes, éstas tienen propiedades inmunomoduladoras, de migración y efectos parácrinos [28]. Las CMM derivadas de tejidos somáticos comparten características similares a las que previamente se conocían sólo en las CMM derivadas de médula ósea: algunas de estas características son 1) adhesión a la placa de cultivo, 2) diferenciación a células de diversos linajes y 3) poseen marcadores de superficie que las distinguen de otros tipos de células: las CMM son positivas para CD44, CD24, CD105, CD73 y CD90; pero debido a que ningún marcador es exclusivo de las células madre, las CMM se distinguen de las CM hematopoyéticas porque las CMM son negativas para CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA-DR [29].

Las CMM aportan apoyo endógeno destinado a sanar heridas y en la hematopoyesis. Cuando se trasladan a sitios lesionados, las CMM se diferencian en elementos del tejido conectivo, induciendo angiogénesis y secretando citocinas y factores de crecimiento que favorecen la cicatrización e incluso la reparación anatómica y funcional de los tejidos u órganos dañados [30].

2.11. Uso de CMM adultas en terapia celular

Las CMM han generado un interés considerable para su aplicación en biomedicina, debido a las múltiples propiedades antes mencionadas. Todas estas propiedades hacen a las CMM aptas como agentes terapéuticos. Actualmente, Las CMM representan un tipo celular para trasplante alogénico, cuyas ventajas incluyen su baja inmunogenicidad. Esto por tener una escasa expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I) y ausencia de MHC II y por lo tanto, estas células representan un muy bajo riesgo de rechazo del implante [31].

2.12. CMM adultas en el tratamiento del cáncer

La creciente evidencia de los beneficios en la medicina regenerativa sugieren las CMM para terapia en desórdenes caracterizados por pérdida de células y/o tejido, tales como infarto al miocardio [32], daño cerebral traumático [33], enfermedad de Parkinson y diabetes mellitus tipo 1 [34]. Una de las características más notables de las CMM es que éstas migran hacia los tejidos lesionados o hacia tumores y los colonizan [35]. Dicho proceso de migración se denomina *homing*.

2.13. Interacción entre las CMM y los tumores

Los tumores sólidos están compuestos de células malignas, así como por células de soporte, que conforman el tumor. Las células de soporte son fibroblastos, células endoteliales y pericitos [36] que en conjunto estructuran un microambiente complejo conocido como estroma del tumor [31].

Los mecanismos moleculares del *homing* en los tumores no están del todo elucidados, pero se sabe que se requiere la producción de moléculas quimio-atrayentes por parte de las células tumorales y expresión de los receptores específicos en la superficie de las CMM. Es ampliamente conocido que los tumores producen una gran cantidad de ligandos; los cuales son reconocidos por las citocinas producidas por las CMM y moléculas estructurales de sus membranas plasmáticas [22].

Las CMM tienen actividad inhibitoria del crecimiento de las células tumorales [37], pero también las CMM pueden promover la prevalencia y el crecimiento de los tumores [38]. Se ha propuesto que las CMM pueden transformarse en fibroblastos asociados a carcinoma [39]. Además, los tumores contienen células que poseen características similares a las CMM como autorenovación y multipotencia [38]. A estas células se les llama CMT [21].

Independientemente de que las CMM puedan favorecer o atacar a las células cancerosas, se ha propuesto a las CMM como candidatos atractivos para descargar sobre los tumores cancerosos agentes antitumorales, tomando ventaja de la habilidad de *homing* de estas células [40].

2.14. Las CMM como vehículos y medios de expresión de transgenes

Un número creciente de investigadores está explorando la conveniencia de utilizar a las CMM como agentes de entrega de elementos anticáncer, aprovechando la excepcional habilidad que tienen estas células de localizar tumores, colonizarlos y producir proteínas y miRNA *in situ* para atacar a las células malignas [22], debido a que las CMM pueden modificarse genéticamente para que puedan expresar un gen exógeno y dirigirlo al sitio del tumor [41].

En uno de los primeros estudios que se realizaron sobre terapia celular con células portadoras de transgenes, se utilizaron CMM de médula ósea transfectadas con el gen del IFN β en un modelo de xenoinjerto de melanoma en ratones desnudos. En ese estudio se demostró que las CMM de médula ósea son capaces de localizar los tumores, colonizarlos y entregar, *in situ*, el producto proteico del transgen que portan—IFN β , en este caso [42]—. Estudios pioneros como éste, demostraron la utilidad de las CMM como vehículos de transgenes, abriendo un área de oportunidad para numerosos estudios con diversos modelos de CMM portando distintos transgenes. La tabla 1 (pág. 15) muestra algunos de estos estudios).

2.15. Aplicación clínica de las CMM transfectadas con genes anticáncer

El objetivo de esta área de investigación es desarrollar un procedimiento de Terapia Celular contra el cáncer en seres humanos, utilizando a los tumores malignos como blanco y aprovechando el *homing* de CMM genéticamente modificadas o no [22]. Ello confiere a la Terapia Celular una enorme ventaja sobre la quimioterapia: una citotoxicidad específica contra los tumores, reduciendo, así, la típica y nociva toxicidad sistémica de todos los fármacos anticancerosos y los efectos iatrogénicos de la radioterapia sobre los tejidos adyacentes a los tumores irradiados. Otra ventaja de este nuevo enfoque es que permite concentrar enormemente los productos biológicos anticáncer producidos *in situ* y descargados, por las CMM transfectadas, directamente sobre las células malignas.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

El *homing* de las CMM ha mostrado un incremento en la eficacia anticáncer combinando el trasplante de células transfectadas con moléculas naturales y la radiación en modelos de xenoinjerto de glioma, mama y colon [43]. Además, la combinación de CMM transfectadas, agentes quimioterapéuticos y radioterapia han mostrado un efecto anticáncer incrementado [44].

Tabla 1. Ejemplos de estudios de terapia celular realizados con CMM modificadas genéticamente

Transgen	Efecto	Modelo	Referencia
IFNα	Inmunoestimulador, inducción de apoptosis y antiangiogénico	Metástasis (melanoma)	[45]
IFNβ	Inmunomodulador, inducción de apoptosis y antiangiogénico	Metástasis (próstata, mama y melanoma)	[42]
IFN γ	Inmunoestimulador e inducción de apoptosis	Leucemia	[46]
IL-2	Inmunomodulación	Glioma	[47]
IL-12	Activación de células NK y producción de IFN γ	Melanoma hepatoma y pulmón	[48]
CX3CL1	Activa células T citotóxicas y NK	Melanoma	[49]
GCV/HSV-tk	Conversión de profármaco	Glioma	[50]
5-FC/CD	Conversión de profármaco	Colon	[51]
NK4	Inhibe angiogénesis e inducción de apoptosis	Colon	[52]
Virus oncolíticos	Destruye tumores por replicación viral	Mama, pulmón y ovario	[53]
TRAIL	Induce apoptosis	Mama y glioma	[54]

Pese a que la terapia celular con CMM es prometedora, aún se requiere realizar más investigaciones para analizar la eficacia y seguridad de los diferentes modelos experimentales que utilizan CMM genéticamente modificadas o no en

ensayos preclínicos y clínicos. La tabla 1 (Pág. 15) presenta un compendio de estudios que se han realizado con CMM modificadas genéticamente así como los genes utilizados [22]. Estos estudios se hicieron *in vitro*. Sin embargo, ya se están desarrollando ensayos clínicos en fases 1 y 2 (la mayoría dirigidos a medicina regenerativa); sin que se hayan reportado efectos adversos agudos o a largo plazo [44].

2.16. TRAIL

En 1995, el TRAIL se identificó por primera vez por su secuencia de alta homología con otros miembros de la superfamilia del TNF [55]. El TRAIL también es conocido como Apo-2L [56]. El TRAIL completo (TRAILc) es una proteína transmembranal de tipo II que muestra una alta homología con CD95L y tiene un 28% de identidad aminoacídica en el motivo de unión extracelular [55]. TRAIL muestra características únicas: puede inducir apoptosis selectivamente en células tumorogénicas o transformadas; pero no en células normales. Esta propiedad convierte al TRAIL en un excelente candidato para usarlo en la terapia contra el cáncer. Además, mientras la mayoría de los miembros de la superfamilia TNF tiene una expresión estrictamente regulada y usualmente sólo muestran una expresión transitoria en células activadas, el RNAm del TRAILc se expresa constitutivamente en una amplia cantidad de tejidos [55]. TRAILc es una proteína de 281 aminoácidos (40 KDa) conformado de una fracción transmembranal (aminoácidos 1-113) y una fracción externa soluble (aminoácidos 114-281), la cual puede escindirse proteolíticamente (TRAILs) [57]. De manera similar a otros elementos de la familia del TNF, TRAIL debe formar homotrímeros que se unan a tres receptores moleculares [58]. Un átomo de Zn, unido por cisteínas en el ligando trimérico es esencial para la estabilidad de éste y una actividad biológica óptima. (Fig. 4b) [59]. El efecto selectivo de TRAIL hacia las células malignas depende de los receptores celulares; de los cuales se han descrito dos receptores para la superfamilia TNF (TNFR) que se unen a TRAIL dirigido al mecanismo de inducción de apoptosis: DR4 [60] (Death receptor 4 o TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2) [61], ambos con un motivo conservado en el dominio de muerte (DD, *Death*

Domain). TRAIL soluble tiende a migrar al ser escindido y llegar a DR4 y DR5, sin embargo, experimentos recientes sugieren actividad tumoricida superior en modelos de cáncer con CMM modificadas que expresan la proteína completa, ampliando el panorama del potencial uso terapéutico de TRAIL [62].

2.17. Mecanismo de muerte por TRAIL

La apoptosis, o la muerte celular programada, es un mecanismo clave que permite a los organismos multicelulares ejercer una estricta regulación celular, previniendo así, procesos patológicos, tales como el cáncer, inmunodeficiencia o auto-reactividad.

2.18. IFN β

Los interferones (IFN) son citocinas ampliamente expresadas con efectos pleiotrópicos que tienen una potente actividad antiviral y efectos inhibidores de crecimiento [63]. La familia de IFN se subdivide en dos clases principales: tipo I y tipo II. Hay diversas subclases de IFN tipo I y todas conservan cierto grado de homología entre sí. Entre las subclases de IFNI se incluye el IFN α (y sus 13 subtipos), IFN β , IFN δ , IFN ϵ , IFN κ , IFN τ , e IFN ω [64]. El IFN es conocido por actuar en múltiples vías con efectos distintos y con frecuencia orientados hacia una función (inhibitoria/antiproliferativa y/o apoptosis).

2.19. Ratones de laboratorio como modelos de cáncer

Los modelos en mamíferos son críticos para el estudio de la biología del cáncer; generalmente se utilizan mamíferos grandes en estudios preclínicos [65]; sin embargo, los roedores se emplean para estudios más básicos [66, 67].

El ratón de laboratorio (*Mus musculus*) es uno de los mejores sistemas de modelos para investigación de cáncer. Esto se debe a varias características ventajosas de los ratones de laboratorio: su pequeño tamaño, la facilidad de criarlos en cautiverio, tienen un promedio de vida de 3 años y muchas similitudes fisiológicas y moleculares con el ser humano, además de que ya se cuenta con la secuencia completa del genoma del ratón [68]. Ratones que han desarrollado espontáneamente diversos tipos de cáncer, como sucede en los humanos se

utilizan con frecuencia como modelos. También se cuenta actualmente con modelos de cáncer en ratón en los que se inducen tumores cancerosos. Para ello se emplean algunas sustancias químicas, virus carcinógenos, variaciones de ratones genéticamente modificados (GEM. *Genetically engineered mice*), xenoinjertos con células humanas [69] y aloinjertos con células tumorales.

2.20. Ratones desnudos

Actualmente, los ratones desnudos son el prototipo experimental para desarrollo de cáncer con injertos de células tumorales humanas, conocido como xenoinjerto (*xenograft*). Los ratones desnudos no tienen pelo y se caracterizan por mostrar aplasia tímica congénita y por consiguiente, una deficiencia inmune relacionada a linfocitos T [70]. Algunos de los estudios que se suelen conducir en ratones desnudos son la evaluación de mecanismos y características del desarrollo de los tumores, crecimiento de los tumores, metástasis y tratamiento del cáncer [70].

El complicado mantenimiento de los ratones desnudos es una de las principales limitaciones del uso de este modelo. Estos animales tienen una gran susceptibilidad a enfermedades infecciosas, lo cual demanda el trabajo de personas bien calificadas para el cuidado de los ratones e instalaciones, mantenimiento y alimento especiales. Pese a estas dificultades, los modelos *in vitro* (con células cancerosas en cultivo) resultan insuficientes para estudiar un comportamiento maligno celular. Por tal motivo, los ensayos *in vivo* se consideran como el estándar de oro para realizar estudios sobre cáncer [71]. Sin embargo, existen diferencias cruciales, comparando xenoinjertos con especímenes de pacientes, con especímenes autóctonos murinos (aloinjerto). Por ejemplo, en los xenoinjertos, se alteran las siguientes características de los tumores y su microambiente: 1) la arquitectura normal de los tumores, 2) aparece una heterogeneidad genética—que en tumores autóctonos sería muy reducida—; 3) ausencia de un sistema inmune competente, 4) vasculatura alterada, 5) circulación linfática alterada y arquitectura de los tejidos vecinos [72]. Todo esto tiene sentido debido a las discrepancias evolutivas que existen entre ratón y los seres humanos,

particularmente en la inmunidad innata y adaptativa [73]. Tales diferencias en las células y el microambiente podrían ser relevantes en la evaluación terapéutica y podrían explicar por qué ciertos antineoplásicos que muestran actividad en el xenoinjerto, resultan poco efectivos en el estadio clínico [74].

2.21. Ratones singénicos

Considerando las limitaciones de los modelos murinos de xenoinjerto, en muchas ocasiones los investigadores han optado por utilizar el modelo murino de tumores singénicos. Es decir, *tumores de ratón creciendo en ratones*. Se reconocen numerosas ventajas con el modelo de tumores singénicos: 1) Los animales no requieren instalaciones especiales ni cuidados especiales; 2) estos ratones son de bajo costo, comparado con los ratones desnudos; 3) los resultados son reproducibles; 4) los tumores se desarrollan en organismos inmunocompetentes, y 5) se dispone de una gran variedad de tipos de tumores. Por otro lado, una de las limitaciones del modelo murino de tumores singénicos, es que no es posible hacer extrapolaciones directas de dichos resultados a lo que ocurre en el hombre. Sin embargo, los resultados proporcionan conclusiones razonablemente aproximadas sobre este asunto [75].

2.22. Células de la línea L5178Y

En 1952 en los laboratorios del NIH, Law et al desarrollaron la línea celular de linfoma murino trasplantable L5178Y. Esta línea celular se derivó de un tumor inducido en el timo de un ratón DBA/2 tratado con metilcolantreno y se adaptó a una forma ascítica. En 1958, Fisher desarrolló un medio de crecimiento *in vitro* para mantener a las células en suspensión [76]. L5178Y se ha empleado por décadas, para detectar mutaciones en el locus de la timidina cinasa (tk-1) de la clona 3.7.2c (tk+/-), mediante el ensayo de linfoma de ratón (MLA, *Mouse Lymphoma Assay*). Dicho ensayo plantea emplear potenciales mutagénicos químicos o físicos para abolir la actividad de la timidina cinasa [77]. Por otro lado, se sabe que L5178Y es muy efectiva para producir tumores sólidos, implantada intramuscularmente en ratones singénicos. L5178Y es ligeramente inmunogénica, por lo que bajos inóculos (1×10^4 células o menos) podrían no inducir tumores o ser

reabsorbidos. [78, 79]. Entonces, este modelo es muy adecuado para estudiar linfomas murinos y por ello está incluido en nuestra estrategia de trabajo.

2.23. CMM-MO murinas

Como se mencionó anteriormente, hay muchas fuentes posibles de CMM, pero son tres las fuentes que se consideran como principales: médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical, que comparten marcadores celulares y la mayoría de las características fenotípicas [80]. La gran mayoría de la información disponible relacionada con CMM derivadas de médula ósea (CMM-MO) es producto de estudios *ex vivo* en cultivo. El aislamiento e identificación preliminar de las CMM-MO es relativamente sencillo, aprovechando la habilidad de estas células para adherirse al sustrato, en forma relativamente selectiva, crecen con facilidad y abundancia en un medio y bajo condiciones de cultivo adecuadas y se conoce bien su inmuno-fenotipo y su notable habilidad de *homing*. Para ensayos *in vitro* o *in vivo* se obtienen cantidades adecuadas de CMM-MO del fémur y tibia de ratones BALB/c [81, 82].

2.24. Vectores

Para que las CMM actúen como sistemas de expresión deben de ser genéticamente modificadas mediante un vector de expresión. La naturaleza del vector dependerá del tipo celular a modificar (y sus características estructurales y fisiológicas), el gen a internalizar y la finalidad del sistema de expresión resultante [83]. En nuestro proyecto probamos dos vectores de expresión, transfección con plásmidos y transducción lentiviral, los cuales explicaremos a continuación.

2.24.1. Plásmidos

El DNA desnudo se internaliza mediante un proceso llamado transfección, existen diversos métodos para llevar a cabo la transfección; los más comunes son los químicos [84]. Reactivos químicos cargados positivamente que forman complejos con ácidos nucleicos de carga negativa y que posteriormente son atraídos a la membrana celular de carga negativa en un proceso mecánico de internalización no claramente descrito. La eficiencia de transfección es dependiente al menos de

tres elementos a considerar el proceso: la línea celular, el o los transgen(es) a internalizar, y el método de transfección empleado. Por tanto, la eficiencia de transfección tiende a variar con frecuencia. Por lo general, la transfección plasmídica ofrece menor eficiencia de transfección que los vectores virales [85].

2.24.2. Virus.

Los virus representan el método de transfección mediada por agentes biológicos más común y más eficiente. Este método se conoce preferentemente como transducción [86]. La transfección mediada por virus es frecuentemente sencilla con alta y sostenida expresión de los transgenes gracias a la capacidad de los virus de integrar el genoma viral en el huésped (en caso de los retrovirus). Los lentivirus se usan frecuentemente, considerando su tropismo hacia numerosas líneas celulares [87]. La tercera generación de lentivirus es incapaz de replicarse en células; lo cual incrementa notablemente la seguridad de la transducción [88, 89].

Pese a lo anterior, los virus no son un sistema perfecto y presentan algunas limitaciones; p.e. la producción de las partículas virales es técnicamente demandante, los virus por sí mismos pueden desencadenar respuestas inmunes con efectos inflamatorios o citotóxicos. Además, la integración del genoma viral al genoma de las células huéspedes al azar, y existe una alta probabilidad de que el genoma viral se inserte en regiones promotoras de genes, lo cual puede inactivar genes supresores de tumor o genes esenciales. Otra limitación de la transducción es que la capacidad de empaquetamiento de los virus para un gen exógeno es limitada [90]. Este hecho podría dificultar la introducción de genes de interés o limitar la infectividad de los virus [85].

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro laboratorio el M.C. Jesús Borrego Terrazas realizó un ensayo de transfección en CMM humanas derivadas de tejido adiposo, transfectadas con vectores plasmídicos que expresan IFN β y TRAIL y los evaluó *in vitro*. Sus resultados confirmaron el *homing* de las CMM y la expresión de IFN β y TRAIL. Sin embargo, se obtuvo una baja producción de las proteínas recombinantes [91]. Debido a lo anterior, consideramos que, como siguiente paso, era necesario incrementar la producción de proteínas *in vitro* por las células modificadas genéticamente y confirmar la eficacia antitumoral *in vivo*, en un modelo singénico de ratón. Respecto al uso de plásmidos, nosotros pensamos que el papel del promotor en dicho ensayo (de citomegalovirus [CMV]) era el causante de la baja producción de proteínas. En apoyo de esta hipótesis, Jane Yuxia Qin et al. (2010) reportaron que el promotor de CMV era uno de los menos adecuados para la expresión de transgenes en CMM. La figura 1 (Pág. 24) muestra los resultados obtenidos por Jane Yuxia Qin trabajando con ocho promotores diferentes. En cambio, puede observarse en esa misma figura que los promotores EF1 α o CAGG mostraron una expresión considerablemente mayor que el promotor de CMV.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

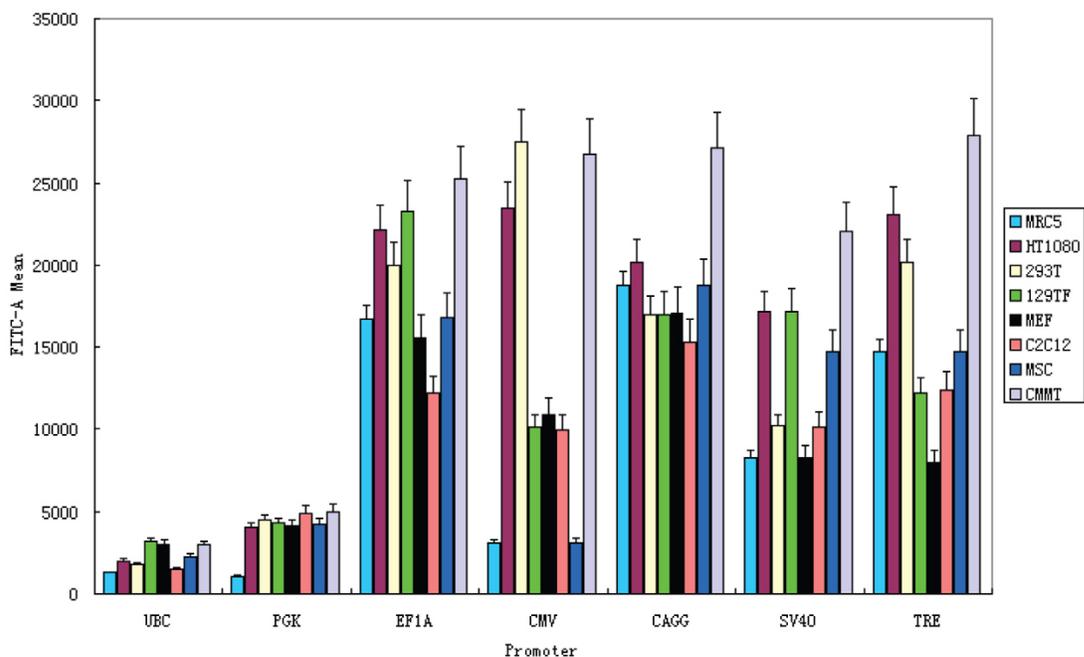


Figura 1. Intensidad de la expresión génica de ocho líneas celulares transducidas con lentivirus. Traducido de la fuente original. Usualmente el de citomegalovirus (CMV) es un promotor fuerte y la opción preferente en muchos estudios; sin embargo, en el caso de las CMM (barra azul) la expresión de la GFP fue muy pobre; hecho que nos obligó a descartar al promotor de CMV como una opción para transducir CMM-MO murinas. En cambio, los promotores EF1A o CAGG mostraron una expresión de la GFP notoriamente mayor comparado al promotor de CMV. (Imagen obtenida de Qin et al. 2010).

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte en países industrializados y la segunda en países en vías del desarrollo. En general, la eficacia de los esquemas convencionales para tratar este padecimiento es insatisfactoria, y produce severos efectos iatrogénicos. Por ello, es necesario y urgente desarrollar nuevos tratamientos, que sean menos tóxicos y más eficaces contra los diversos tipos de cáncer. Las CMM transfectadas con genes que expresen reconocidos productos anticáncer, como el TRAIL y el IFN β , son candidatos muy promisorios para tales fines, ya que adicionalmente a su fácil obtención y cultivo, cuentan con su excepcional habilidad de *homing*, para descargar los productos antitumorales directamente sobre las células malignas que están formando tumores primarios o metástasis. Cabe mencionar que en este trabajo se inocularon los tratamientos localmente (intratumoralmente) con la finalidad de evaluar más clara y directamente las propiedades terapéuticas de los tratamientos.

Por otro lado, en general, los modelos de animales inmunodeficientes portando xenoinjertos de tumores e implantados con CMM heterólogas aportan información valiosa, pero difícilmente extrapolable a lo que podría ocurrir en seres humanos portando tumores endógenos e implantados con CMM propias portando transgenes humanos.

Considerando la información proporcionada por Borrego-Terrazas (2014), el siguiente paso consistió en escalar a un modelo *in vivo*, inmunocompetente y singénico en donde el linfoma murino resultó ser una opción muy adecuada. Para tener información más actualizada probamos las 2 modalidades de TRAIL, tanto proteína completa (TRAILc) como fracción soluble (TRAILs) junto con IFN β .

5. HIPÓTESIS

Las CMM de médula ósea de ratón, modificadas genéticamente para que sobreexpresen TRAILs, TRAILc o IFN β , e implantadas intratumoralmente, son capaces de reducir la masa de linfomas (L5178Y) e incrementar la sobrevida de ratones singénicos e inmunocompetentes.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Construir un sistema de CMM-MO modificadas genéticamente para que sobreexpresen TRAILc, TRAILs o IFN β y evaluar la eficacia de estas células y sus combinaciones para reducir el tamaño de tumores sólidos y cuantificar la sobrevida en un modelo de linfoma murino L5178Y singénico e inmunocompetente.

6.2. Objetivos específicos y metas.

1. Construir y validar un sistema de expresión de CMM que expresen TRAIL e IFN β .
 - a. Obtener, expandir y caracterizar CMM de médula ósea (MO).
 - b. Diseñar transgenes y producir los sistemas de expresión.
 - c. Validar los sistemas de expresión.
2. Determinar el grado de reducción del tamaño de los tumores sólidos de ratones BALB/c, causados por L5178Y y tratadas con CMM modificadas.
 - a. Determinar el inóculo de la línea tumoral.
3. Determinar el tiempo de vida postinoculación de células L5178Y en ratones BALB/c tratados con CMM modificadas.
 - a. Identificar ratones con aparente eliminación del tumor.
 - b. Análisis citopatológico.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

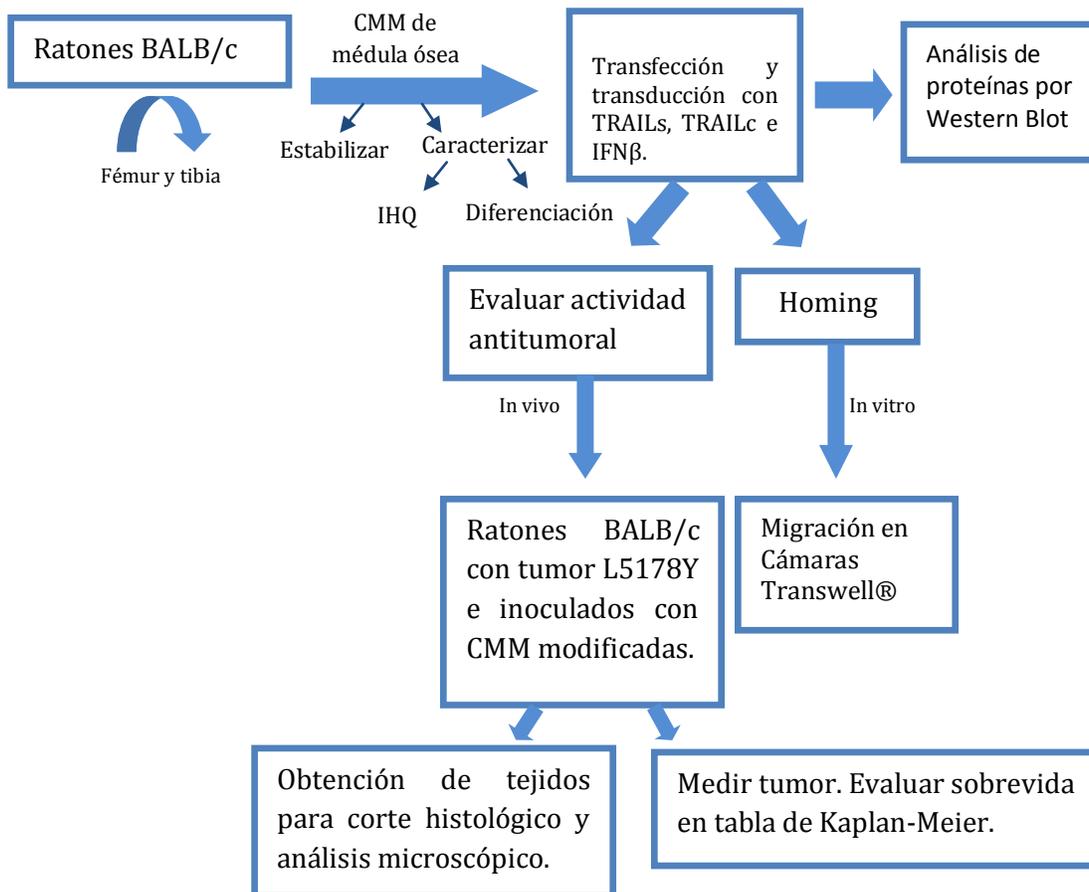


Figura 2. Estrategia experimental. Se obtuvieron y caracterizaron CMM de médula ósea de ratones BALB/c (CMM-MO). Estas células se modificaron genéticamente por transfección plasmídica con transgenes de TRAILS o IFN β , o mediante transducción lentiviral con transgenes de TRAILS, TRAILc o IFN β . Se confirmó expresión de los productos proteicos de los transgenes por las CMM-MO transducidas mediante *Western Blot*. Se inocularon, en el gastrocnemio derecho, nueve grupos de ocho ratones hembras con células de linfoma de la línea L5178Y y se siguió su evolución, midiendo el diámetro de los tumores. Cuando el diámetro de los tumores alcanzó, en promedio 1-2 mm³, se implantaron intratumoralmente 1 \times 10⁶ CMM-MO transducidas con TRAILc, TRAILS o IFN β , o sus combinaciones. Se evaluó la eficacia terapéutica de los implantes, determinando la sobrevida de los ratones tratados, comparándola con la sobrevida de los ratones no tratados.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Construcción de vectores plasmídicos

8.1.1. Diseño de secuencias de los transgenes

Diseño in silico del constructo para TRAIL. La secuencia nucleotídica de la fracción soluble de TRAIL de ratón se obtuvo del Genbank, con el número de registro U37522 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/U37522>). En el extremo 5' del gen murino de TRAIL se colocó una secuencia de zipper de isoleucinas, que de acuerdo con Yan et al y Seol [92, 93], favorece la trimerización de TRAIL, río arriba del zipper de isoleucinas se insertó un sitio de corte de furina; el cual permitió escindir la secuencia accesoria de la proteína, antes de ser secretada [94]. La secuencia del constructo se continuó con la secuencia del péptido señal de la luciferasa del copépodo marino *Gaussia princeps* [95] —un crustáceo luminiscente— para favorecer la secreción de la proteína, seguido de la secuencia de Kozak. Dicha secuencia se flanqueó con los sitios de restricción para EcoRI y NotI para que permitiera su posterior subclonación.

Diseño in silico del constructo para IFN β . La secuencia del IFN β de ratón (con el número de registro NM_010510) se obtuvo del Genbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_010510). Al extremo 5' de esta secuencia se le agregó la secuencia de Kozak junto al codón de inicio y los sitios de restricción de *EcoRI* y *NotI*, idénticos al constructo de TRAIL.

Plásmidos. Los constructos sintéticos, arriba descritos, se obtuvieron de la casa comercial IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA) integrados al plásmido pIDTsmart-amp. El vector de expresión eucariótico a subclonar fue el plásmido pTracerTM-EF/V5-His A (lot. 1636534, Invitrogen, Van Allen Way Carlsbad CA. USA). Este plásmido cuenta con el promotor EF1 α , un gen de resistencia a zeocina para su selección y expresa la GFP como gen reportero; la cual se usó para determinar la eficiencia de transfección y para rastrear a las células transfectadas en órganos y tejidos de los ratones implantados. Se transformaron bacterias calcio competentes de *Escherichia coli* DH5 α con los

plásmidos pIDTsmart-amp-TRAIL/IFN β , pTracer-EF/V5 o pTracer-CMV2 para propagar, por separado, cada uno de los plásmidos mencionados, siguiendo el protocolo de Li et al [96] modificado de Sambrook y Russell [97]. Una vez transformadas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO. USA) adicionado con 50 μ g de ampicilina/mL (Sigma-Aldrich Co.). El protocolo realizado se describe a continuación: Se preparó solución de CaCl₂ "mejorada" (Glicerina 15% y CaCl₂ 75 mmol/L en agua grado Milli-Q) y se conservó frío. Se preparó cultivo de *E. coli* DH5 α en agar LB por 12-18 h, tomó y cultivó una colonia en caldo LB por 12-14 h a 37°C a 200 rpm de agitación, posteriormente, del cultivo resultante se agregó en proporción 1:100 a medio LB fresco (50 mL) y medir DO600 hasta aprox. 0.4 (1.5-2 h). Se transfirió el cultivo a un tubo cónico de 50 mL frío y centrifugar a 1,000 $\times g$, a 4°C por 5 min. Se decantó el medio, cuidando no perder el pellet y se resuspendieron las bacterias en 20 mL de "CaCl₂ mejorada". Se dejó reposar 5 min en hielo. Se resuspendieron las bacterias y se sedimentaron como la vez anterior. Se decantó el sobrenadante. Se agregaron 4 mL de "CaCl₂ mejorada" y se dividió la suspensión de bacterias en alícuotas de 100 μ L. Cada alícuota se colocó en microtubos de 1.5 mL y se almacenaron a –80°C. Se extrajeron los plásmidos utilizando el kit Isolate II plasmid mini kit (Bioline USA Inc. Tauton, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.2. Construcción del vector de expresión pTracer-TRAIL/IFN β

Para obtener las secuencias de los transgenes de los plásmidos pIDTsmart-amp se realizaron los siguientes procedimientos, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se emplearon las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA). Para ello se usaron 500 ng de DNA plasmídico y 25 μ L de la mezcla de reacción (agregando 2.5 μ L de buffer de digestión 10x incluido con la enzima de restricción y agua MilliQ). El proceso de digestión fue idéntico para los vectores pTracer. Se realizó este procedimiento con el objetivo de abrir y linearizar el plásmido. Se purificó la banda de interés (702 pb para TRAIL y 564 pb para IFN β , productos de la digestión) con el kit Isolate PCR

and gel kit (Bioline USA Inc). Se realizó la ligación Quick-stick ligase (Bioline USA inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.3. Comprobación de la longitud de los insertos

Se transformó un cultivo de la cepa DH5 α de *E. coli* con cada uno de los plásmidos arriba descritos -por separado- mediante le técnica de choque térmico. El procedimiento fue el siguiente: Se descongeló una alícuota de bacterias *E. coli* calcio-competentes, colocando el criovial en hielo y agitándolo suave e intermitentemente. Se agregaron 1-5 ng de plásmido a internalizar en las bacterias suspendidas y se dejó reposar la preparación por 30 min en hielo. Se colocó el tubo con las bacterias conteniendo los plásmidos en un baño maría precalentado a 42°C por 90 seg. Inmediatamente después, se colocó en hielo el tubo con las bacterias por 3 min. Agregar 500 μ L de medio LB fresco (Sigma Aldrich) sin antibiótico y agitar en Thermomixer (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA) ajustado a 200 rpm y 37°C por 30 min. Se dejó la tapa del microtubo con bacterias semiabierta y sostenida con cinta adhesiva, para permitir el intercambio de gases. Para transformar con los constructos, se agregó la totalidad de la suspensión bacteriana en una placa de petri con agar LB (Sigma Aldrich) suplementado con 50 μ g de ampicilina/mL (Sigma Aldrich). Cuando se hizo la transformación con DNA plasmídico puro se agregaron 50-100 μ L de la solución de bacterias transformadas en una placa de Petri y se incubó a 37°C toda la noche (Shel-Lab, Cornelius, OR, USA). Las bacterias se hicieron crecer en placas de Petri con ~20 mL de agar LB adicionado con 50 μ g de ampicilina/mL. Después de 12-18 h se levantaron 10 colonias de bacterias transformadas con un asa bacteriológica de platino y se cultivaron en 2 mL de caldo LB por 18 h, y se extrajo el DNA plasmídico con el kit Isolate II (Bioline) y éste se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* (New England Biolab) como se mencionó anteriormente para verificar la presencia de los insertos de interés y con *NotI* y *PsiI* (New England Biolab) para verificar la orientación de los mismos. Una vez verificadas las construcciones se produjo el plásmido a una mayor escala al cultivar un inóculo de la bacteria transformada seleccionada en el procedimiento anterior en

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

100 mL de medio LB con 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina en un matraz Erlenmeyer, y posteriormente se extrajo el DNA plasmídico con el Plasmid Midi kit (Qiagen, Germantown, USA) y se almacenó en microtubos de 1.5 mL (Eppendorf) a -20°C para su uso ulterior.

8.4. Construcción de vectores lentivirales

Diseño in silico de lentivirus. Los transgenes usados como moldes para diseñar los vectores lentivirales eran idénticos a los vectores plasmídicos, incluyendo la GFP; eliminando los sitios de restricción y agregando la selección con geneticina (en lugar de zeocina), y se diseñaron empleando la plataforma Vector Builder de Cyagen (Santa Clara, California 95050, USA). El empaquetamiento y titulación de estos fue hecho por la casa comercial Cyagen. Además de la fracción soluble de TRAIL e IFN β se incluyó una construcción con el gen completo de TRAIL.

8.5. Obtención y expansión de CMM-MO

Se obtuvieron las CMM-MO de ocho ratones BALB/c, machos, de 6-8 semanas de edad, producidos en el laboratorio de experimentación animal del Servicio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la UANL. Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individual (Lab&bio), con un flujo de aire filtrado. Esta barrera evitó que ingresaran a las jaulas agentes nocivos externos. Además, durante la estancia de los ratones en dichas jaulas, un sistema automático de homeostasis ambiental registró y mantuvo en condiciones idóneas, la presión de aire, la concentración de oxígeno y de CO $_2$, la humedad, la temperatura, y la presencia/concentración de amoníaco. Las jaulas se asearon cada 3 días. Los ratones se sacrificaron en una cámara de CO $_2$ y se diseccionaron los fémures, tibias y húmeros. Los huesos se descontaminaron, sumergiéndolos 1 min en etanol al 70%. De estos huesos se obtuvo la médula ósea después de haber cortado las epífisis con unas pinzas de corte. La médula ósea se extrajo introduciendo una aguja con jeringa calibre 26 en el canal medular de cada hueso e instilando 2-4 mL de medio de cultivo con DMEM-F12-glutamax (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY 14072, USA) suplementado con 15% de suero fetal bovino estéril (Gibco), 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamicina (Gibco), 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

anfotericina B (Gibco) y 2 nM glutamina (Gibco). De cada ratón se colectó un volumen total de 5 mL de la médula ósea (proveniente de todos los huesos e incluyendo el volumen de medio suplementado) en una botella de 25 cm² con tapón de rosca, permeable a los gases (Corning, NY 14831, USA). La botella con la médula ósea se incubó en atmósfera de CO₂ al 5%, a 37°C por 24 h. El sobrenadante se transvasó a una botella de cultivo nueva. A la botella original se le agregaron 5.0 mL de DMEM suplementado fresco. Esos pasos se repitieron tres veces, para tener al final cuatro botellas con células adherentes. Al finalizar 72 h de cultivo se reemplazó el medio de cultivo con 5 mL de DMEM suplementado fresco y las células se incubaron nuevamente en atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C hasta que los cultivos alcanzaron una confluencia de 80%. El medio usado se desechó y las células se desprendieron del sustrato incubando las monocapas celulares en sus botellas de cultivo con 2 mL de una solución de 0.25% tripsina-EDTA (Gibco) por 10 min a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Las suspensiones celulares se mezclaron en un tubo cónico de 15 mL (Corning). Las células se sedimentaron por centrifugación a temperatura ambiente por 5 min a 300 $\times g$ y se resuspendieron en 1 mL de medio suplementado. Se determinó el porcentaje de la viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul tripano. Brevemente: se mezclaron 4 μ L de una suspensión de células de MO de los ratones con 16 μ L de azul tripano (Gibco). De esta mezcla, se depositaron 10 μ L de la solución en una cámara de Neubauer, se contaron sólo las células translúcidas (viables). Se calculó el número de células viables por mL, aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ células viables/mL} = [\text{número total de células}][\text{factor de dilución}][10,000]$$

La concentración de la suspensión de células de MO se ajustó a 1×10^6 /mL con DMEM-F12-Glutamax (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino estéril, 50 μ g de gentamicina/mL y 0.25 μ g de anfotericina B /mL (Gibco). En adelante nos referiremos a este medio suplementado como DMEM-S. De esta suspensión celular se inoculó 1 mL en botellas de cultivo, de 25 cm² con tapón de rosca, permeable a los gases (Corning), conteniendo 5 mL de DMEM-S. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ por 2-3 días hasta alcanzar 80% de

confluencia. Estas células se resebraron tres veces, se cosecharon, se lavaron y resuspendieron en DMEM-S fresco, se contaron y se colocaron en crioviales de 1 mL (Corning) donde se les adicionó dimetilsulfóxido (DMSO) (ATCC, Manassas, Virginia 20110, USA.) a concentración final 10%. La suspensión celular se dividió en alícuotas de 1 mL con 1×10^6 células y se crio-preservaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

8.6. Caracterización de las CMM-MO

8.6.1. Porcentaje de células CD90+/CD105+

Mediante análisis de inmunocitoquímica, se determinó el porcentaje de células que expresaban los marcadores de superficie típicos de CMM (CD105 y CD90). Para ello, se utilizaron anticuerpos monoclonales primarios anti-CD105 y anti-CD90 (USbiologicals, Salem, Massachusetts, USA) diluidos con PBS 1:25 y 1:200, respectivamente. Como secundarios se utilizaron anticuerpos biotinilados de cabra, incluidos en el estuche Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) detection IHC Kit (Abcam, Burlingame, California, USA). Las células murinas de MO se lavaron, sumergiéndolas en TBST por 5 min. Se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% incluido en el kit y se incubó la preparación por 10 min a temperatura ambiente. Se lavó la preparación con TBST por 3-5 min. Se bloquearon las proteínas, con la solución llamada *protein block*, incluida en el kit (por 30 min a 37°C, en cámara húmeda). Se lavó la preparación con TBST por 3-5 min; se embebió con el anticuerpo primario y se cubrió con plástico sellador durante toda la noche, a 4°C en cámara húmeda. Se lavó como antes, se cubrió con el anticuerpo secundario: Se incubó por 30 min a 37°C en cámara húmeda, se lavó con TBST 3-5 min; se agregó la solución de estreptavidina-HRP incluida en el kit y se incubó por 15 min a 37°C en cámara húmeda. Se lavó la preparación con TBST 3-5 min y se reveló la presencia de los marcadores de interés agregando una solución de sustrato-cromógeno (10:1 gotas; incluido en el kit) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. En la misma laminilla, se hizo una contratinción con hematoxilina de Harris, se hicieron tres lavados con agua destilada (por 2 min en cada ocasión). Se agregó hematoxilina de Harris, cubriendo uniformemente las

células por 2 min. Se lavó la preparación con agua corriente y después con agua destilada, en cada ocasión por 3 min. Posteriormente se deshidrató la preparación, sumergiéndola sucesivamente en etanol al 70%, al 96%, al 100% y en xilol. Se eliminó el exceso de xilol con un paño, se montó un cubreobjetos encima de la preparación, se selló con resina entellan (Merck) y se conservó en oscuridad hasta su uso. Las laminillas se observaron con un microscopio óptico de campo claro (Leica, DM IL LED, Wetzlar, Alemania) a 10X, se tomó una fotografía con la cámara integrada al microscopio (Leica, DFC295) con el software LAS V4.3 y se contaron células positivas con ayuda del software ImageJ de manera manual (www.imagej.nih.gov). El software ImageJ es una plataforma gratuita que permite el análisis y/o manipulación de imágenes de manera digital (<https://imagej.nih.gov/ij/>)

8.6.2. Evaluación de multipotencia de las CMM-MO

Se evaluó la condición de pluripotencia de las CMM-MO modificadas y no modificadas genéticamente con la intención de demostrar la conservación de la capacidad de diferenciación después de la integración de los transgenes al genoma. Para ello se evaluó la habilidad de las CMM-MO para diferenciarse a osteoblastos o condrocitos. En los dos casos se empleó el *Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit* (R&D Systems, Inc. Minneapolis, Minnesota 55413, USA).

Diferenciación de las CMM-MO a osteoblastos. Para validar esta habilidad de las CMM-MO para diferenciarse a osteoblastos, se inocularon 3×10^4 células en una microcámara de 4 pozos Lab-Tek® (Nunc®, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) permitiendo el crecimiento de las células hasta alcanzar una confluencia del 50-70% con medio StemXVivo® osteogenic/adipogenic base media (R&D Systems, Inc. Minneapolis, Minnesota 55413, USA). Una vez observada dicha confluencia, se reemplazó el medio con medio osteogénico suplementado: α MEM basal media (10% de concentración de SFB, 50 μ g/mL de gentamicina, 2.5 μ g/mL de anfotericina B) y la proporción correcta del reactivo

Mouse/Rat osteogenic supplement (ascorbato-fosfato, β -glicerolfosfato y BMP-2 recombinante humana) 20X, incluido en el *Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit*. El medio suplementado se reemplazó cada 3-4 días hasta completar un total de 21 días [98]. La presencia de osteoblastos se demostró tiñendo las preparaciones con Von-Kossa. Brevemente: Se fijaron las laminillas con formalina. Se trató la preparación con solución saturada de carbonato de litio por 20 min, para eliminar los uratos que podrían estar presentes. Se lavaron las preparaciones con agua corriente, sumergiéndolas 5 veces, y 1 vez con agua destilada. Se agregó a las laminillas una solución de nitrato de plata al 5% y se expusieron a luz natural por 60 min. Se incubaron las preparaciones en una solución de tiosulfato de sodio al 5% por 5 min y se lavaron, sumergiéndolas tres veces con agua corriente. Las preparaciones se contratiñeron con rojo neutro al 1% por 1 min y se lavaron con agua destilada. Se deshidrataron las preparaciones mediante inmersiones sucesivas en etanol grado ATC (Sigma Aldrich) al 70, 96 y 100% (3 min) y después con xilol puro (JT Baker) sobre las preparaciones se montó un cubreobjetos. Nota: Las microcámaras están construidas sobre portaobjetos.

Diferenciación de CMM-MO a condrocitos. Utilizando un procedimiento similar al que seguimos para diferenciar las CMM-MO a osteoblastos, CMM-MO se expandieron hasta 90% de confluencia y se reemplazó el medio de cultivo por suplemento condrogénico: DMEM F-12 conteniendo 50 μ g/mL de gentamicina, 2.5 μ g/mL de anfotericina B y 1x ITS supplement (No. de catálogo 390418, R&D systems), y la proporción correcta del suplemento condrogénico (Dexametasona, ascorbato-fosfato, prolina, piruvato y TGF- β 3 recombinante humana) 100X, suministrado con el *Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit*. El medio de diferenciación fue reemplazado cada 2-3 días, hasta completar un total de 21 días. Se confirmó la diferenciación de las CMM-MO a condroblastos tiñendo las células con azul alciano. Brevemente: Las preparaciones se adicionaron con solución de azul alciano por 10 min. Se enjuagaron con agua destilada. Se contratiñeron con rojo neutro por 2 min. Se diferenciaron con agua destilada y se

deshidrataron, sumergiéndolas en etanol al 96% sucesivamente por 10 inmersiones hasta etanol al 100%. Se aclararon las preparaciones con xilol, como se hizo con los osteoblastos y se montaron los cubreobjetos con entellan (Merck).

Los cultivos de células diferenciadas a osteoblastos o condrocitos se observaron con un microscopio de campo claro (Leica, DM IL LED), equipado con un objetivo 10X y una cámara Leica (DFC295) con la que se tomaron fotografías de 4 campos elegidos al azar: identificando los depósitos de calcio en los osteocitos con el colorante de Von Kossa y los proteoglucanos de la matriz condrogénica en los cultivos de condrocitos con azul alciano [98, 99].

8.7. Modificación genética de las CMM-MO

En el presente trabajo se exploró la eficiencia de incorporación de los transgenes de interés a las CMM-MO de dos métodos diferentes: Transfección, mediante el uso de plásmidos recombinantes y transducción, mediante lentivirus.

8.7.1. Transfección plasmídica de CMM-MO

Se procedió a realizar la transfección de cultivos de CMM-MO de ratón en su pase 4 y con un 80% de confluencia, previamente expandidas en DMEM-F12-S, bajo las condiciones de cultivo descritas en el párrafo 8.5 (pág. 31). Se emplearon los siguientes reactivos: Turbofect, Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y Xfect transfection reagent (Clontech, Takara, Mountain View, California, USA). Para identificar el reactivo y protocolo con los mejores resultados se probaron las condiciones mostradas en la Tabla 2.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

Tabla 2. Condiciones y agentes de transfección

Condición	Lipofectamine 3000	Turbofect	Xfect ²	
			Original	Modificado
A ³	0.75/1.0	2.0/1.0	0.3/1.0	0.3/1.0
B	0.75/2.0	2.0/2.0	0.6/1.0	0.6/1.0
C	1.5/1.0	4.0/1.0	0.3/2.0	0.3/2.0
D	1.5/2.0	4.0/2.0	0.6 /2.0	0.6 /2.0

¹Manufacturador: Xfect, Clonetech; Lipofectamine, Invitrogen and Turbofect, ThermoFisher.

²Xfect se probó siguiendo las instrucciones del fabricante principalmente consistiendo en tratar las CMM-MO con una mezcla de Xfect y plásmido, incubar 4 h a 37°C en humedad con CO₂, cambiar el medio y remplazar el pozo con las células con medio fresco por 44 h. El protocolo modificado consistió en no cambiar el medio con la mezcla de plásmidos y Xfect, a su vez, incubar las células por 48 h en presencia de los componentes descritos en esta tabla.

³La condición del ensayo A corresponde a la recomendada por el fabricante. Condición B a D fueron variaciones experimentales del volumen de reactivo y DNA plasmídico.

Se empleó el plásmido pTracer-EF vacío para realizar los ensayos de transfección de las CMM-MO. Para determinar la eficiencia de transfección se realizaron los ensayos en placas de 24 pozos (Corning). Se cultivaron las CMM-MO sobre un cubreobjetos redondo (Fisherbrand, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA), para lo cual se hicieron crecer sobre los cubreobjetos colocados en cada pozo de la placa de cultivo, hasta formar una monocapa. Cuarenta y ocho h después de la transfección, las células se fijaron con metanol:acetona 1:1 (v/v) frío a 4°C por 20 min. Las preparaciones se lavaron dos veces con amortiguador de fosfatos, pH 7.0 (PBS). Se levantó el cubreobjetos con unas pinzas de cirujano. El cubreobjetos con las células adheridas se montó, invertido, sobre un portaobjetos que contenía 7 μ L de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Vecta shield, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, California, USA). Se eliminó el exceso de líquido, acercando suavemente un paño seco. DAPI es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de DNA y

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

funcionó como tinción de contraste. De las preparaciones obtenidas con cada una de las condiciones de transfección descritas en la tabla 2 se observaron 4 campos elegidos al azar con microscopio de epifluorescencia (Nokia, Eclipse 50i) y se tomaron fotografías digitales de cada campo con una cámara Sight DS-2MV acoplada al microscopio de epifluorescencia. En dichas fotografías y con la ayuda del *software* ImageJ se contaron manualmente las células transfectadas que presentaron fluorescencia en verde, debido a la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), cuyo gen está presente en los plásmidos, como reportero. Todos los ensayos se realizaron tres veces, por duplicado, y se contaron cuatro campos de cada condición para obtener la media y DE.

8.7.2. Cálculo de la intensidad de la expresión génica.

La intensidad de señal se interpretó de acuerdo con la producción de GFP en un modelo de cruces, donde (+) corresponde a la menor señal y (+++++) a la mayor señal.

8.7.3. Cálculo de la eficiencia de transfección.

Se calculó la eficiencia de transfección aplicando la siguiente ecuación:

$$E1. \% \text{ de transfección} = \frac{CMM-MO/GFP}{CMM-MO \text{ totales}} \times 100$$

Donde, CMM-MO/GFP son las células madre mesenquimales de médula ósea murinas que mostraron una señal verde-fluorescente bajo el microscopio de epifluorescencia; CMM-MO totales es el número total de CMM-MO

8.7.4. Determinación de la citotoxicidad.

Para determinar si las condiciones experimentales podrían resultar en toxicidad para las células se analizó la sobrevivencia con el estuche Cell Viability and Cytotoxicity Kit (Cell Biolabs, San Diego, Cal, EUA) comparando cada condición mencionada en la Tabla 2. El ensayo se hizo 3 veces por triplicado y se consideró

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

como 100% de viabilidad las células plaqueadas al mismo tiempo, pero sin agentes transfectantes o plásmidos.

8.7.5. Índice de desempeño de las combinaciones transfectantes.

Para considerar todos los criterios anteriormente mencionados y analizados, se interpretaron los resultados con la siguiente ecuación:

$$ID = \frac{IS+ET+VC+R}{4}$$

Donde ID, Índice de desempeño; IS, intensidad de señal; ET, eficiencia de transfección; VC, viabilidad celular y R, ET/VC (Tabla 3).

8.7.6. Transducción lentiviral.

En placas de 24 pozos, se inocularon 4×10^4 CMM-MO/pozo y se incubaron por 16 h en atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. Dieciséis h después de haber realizado el subcultivo se adicionaron a cada pozo con 0, 5, 10 y 50 μ g de sulfato de protamina/mL (Sigma-Aldrich) para determinar la concentración óptima de dicho compuesto para transducir a las CMM-MO. Todos los cultivos se infectaron con lentivirus a una multiplicidad de infección (MOI) de 2 partículas virales/célula, de acuerdo a lo reportado por Yuan et al [62]. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% por 48h. Se contaron las células totales y las células verde-fluorescentes, contando 4 campos de las preparaciones correspondientes a cada condición de transducción ensayada. Se calculó la eficiencia del procedimiento como porcentaje de transducción, aplicando la ecuación E1 (página 37). Después haber hecho un pase de los cultivos transducidos, a cada uno de éstos se le agregaron 200 μ g de geneticina (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) /mL para seleccionar las células transducidas.

8.8. Expresión de los transgenes por las CMM-MO

8.8.1. Verificación de la traducción de los transgenes

Para comprobar expresión de los transgenes a nivel de traducción, después de incubar 48 h en DMEM-S se obtuvieron 9 ± 1 mL del medio de cultivo usado de

monocapas confluentes de CMM-MO modificadas con TRAILs e IFN β . El medio de cultivo se concentró 40 ± 5 veces, por ultrafiltración con centrifugación a $4,000 \times g$ por 40 min a temperatura ambiente en una columna Amicon, con un punto de corte de 10 kDa (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Para ello se utilizó una centrífuga Eppendorf 5403 (Hauppauge, NY, USA). El concentrado se pasó a un microtubo de 1.5 mL, estéril (Corning, NY 14831, USA) y se almacenó a -20°C hasta su uso. Por otro lado, debido que el TRAILc es intramembranal, fue necesario extraerlo antes de su análisis. Para ello, una monocapa confluyente de CMM-MO-TRAILc, crecidas en botellas de cultivo 25 cm^2 de superficie, se levantaron con una solución de tripsina 0.25% y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (Gibco) y se sedimentaron mediante centrifugación a $300 \times g$ por 5 min a temperatura ambiente. Las CMM-MO-TRAILc se resuspendieron en 1 mL de medio DMEM-S, y se ajustó su concentración a 1×10^6 células/mL, como se describió en la sección 8.5 (Págs. 31 y 32). Se extrajeron las proteínas intracelulares como se describe a continuación: los tubos, conteniendo 1×10^6 CMM-MO-TRAILc se centrifugaron a temperatura ambiente a $16,000 \times g$ por 10 s. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 50 μL de buffer de lisis 5X (Tritón 100X [50 mL], Tris HCl 1 M pH 7.5 [5 mL], KCl 2M [12.5 mL] y MgCl_2 1M [1mL], DTT [1 μL], Invitrogen), e inhibidor de proteasas [5 μL] (Sigma-Aldrich): La preparación se aforó a 0.5 mL con agua destilada estéril, se incubó en hielo por 20 min, se centrifugó en microcentrífuga refrigerada (Labnet, Edison, NJ, USA) a $16,000 \times g$ a 4°C por 5 min. Se reservó el sobrenadante en un microtubo de 1.5 mL (Corning).

8.8.2. *Western blot* de los productos de transfección.

Las muestras para analizar por Western Blot corresponden a los sobrenadantes de las células transfectadas con los vectores de expresión. Para ello, se cultivaron CMM-MO en botellas de 25 cm^2 hasta una confluencia del 70% para efectuar la transfección por el método seleccionado y descrito en la sección 8.7.1. Las células se dejaron reposar por 48 h a 37°C con 5% de CO_2 en humedad.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

Se colectó el sobrenadante y se tomaron 500 μ L de este en un microtubo de 1.5 mL para proceder a una precipitación de proteínas por el método de metanol-cloroformo. Brevemente: Se adicionaron 600 μ L de metanol al 100% (Sigma Aldrich) y 450 μ L de cloroformo puro (Sigma Aldrich) a los 500 μ L de medio en el mismo tubo y se mezcló por inversión por 1 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 RPM a 4°C por 2 min. Después se retiró la fase acuosa (la fase superior) cuidando no tocar la interfase y se agregaron 600 μ L de metanol; se mezcla por inversión 1 min. Posteriormente se centrifuga a 12,000 RPM a 4°C por 7 min y se retira el sobrenadante. Finalmente se dejó secar a 50°C y se resuspendió en agua MilliQ (volumen final 100 μ L).

Con las preparaciones conteniendo TRAILS e IFN β se corrieron electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS (*SDS/PAGE*, por sus siglas en inglés [*sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis*]) al 12% (Sigma-Aldrich). Los geles se cargaron con 50 μ L del concentrado proteico por carril y se corrieron a 80 V por 2.5 h. Las proteínas se electro-transfirieron de los geles de poliacrilamida-SDS a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF)(Bio Rad, Hercules, California, USA) y se bloqueó incubando las membranas con las proteínas toda la noche con leche semidescremada comercial (Svelty, Nestlé, Ciudad de México) a 4°C en agitación (20 RPM). Las preparaciones de proteínas se incubaron 2 h a 4°C, con anticuerpos primarios anti-TRAIL (1:200) y anti-IFN β (1:500) de ratón, obtenidos de conejo (Abcam) y un anticuerpo secundario policlonal anti-conejo conjugado con HRP (*Horse-radish peroxidase* –Peroxidasa de rábano—) (1:10,000)(Promega, Madison, Wisconsin, USA.). Se reveló utilizando el estuche de luminol Clarity ECL Kit (Bio Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante y se analizaron las membranas de *Western blot* en un fotodocumentador Molecular Imager® Chemidoc XRS+ Imaging System (Bio Rad) y con el *software* ImageLab, que incluye el equipo y que nos permitió tomar imágenes de las membranas.

8.9. Producción de linfomas

Se produjeron linfomas en ratones BALB/c derivados de una la línea celular de linfoma murino L5178Y; el cual se ha empleado por su alta eficacia para producir tumores en ratones singénicos e inmunocompetentes [78].

Expansión in vitro de L5178Y. La línea celular tumoral L5178Y TK+/- clone (3.7.2C) [TK+/- (clone 3.7.2C)] (ATCC® CRL-9518™) se cultivó en botellas para cultivo de 25 cm² (Corning) conteniendo 5 mL de DMEM de alta glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino estéril, 50 μ g/mL gentamicina (Gibco), 0.25 μ g/mL de anfotericina B (Gibco) y se agregó el volumen apropiado de *pluronic* F68 al 10% (Gibco) para obtener concentración final de 0.1% en el medio suplementado. Este medio lo llamaremos DMEM-AGs. Las células se conservaron en cultivo en DMEM-AGs siguiendo las condiciones de la ATCC (conservar cultivos de 2×10^5 a 1×10^6 células/mL de medio y cambio de medio cada 3 d) para mantener las células en fase logarítmica al momento del inóculo. Bajo esas condiciones, se incubaron 2×10^5 células tumorales a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 3 d. Las células se resuspendieron en 1 mL de DMEM-AGs y se utilizaron inmediatamente o se preservaron en nitrógeno líquido. Este último procedimiento se realizó contando las células viables y ajustando su concentración 1×10^6 células, suspendidas en DMEM-AG adicionado con DMSO al 5% (concentración final). La suspensión celular se dividió en alícuotas de 1 mL; cada alícuota se colocó en un criotubo (Corning) y éstos se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

8.9.1. Estandarización del inóculo de células L5178Y.

Se realizaron experimentos para estandarizar el inóculo en los ratones BALB/c, para conocer el número idóneo de células que debería inocularse en cada ratón y el tiempo necesario para obtener tumores sólidos estables (no reabsorbidos por los ratones inmunocompetentes) y una sobrevida de al menos 15 d; suficiente para que los ratones desarrollaran un tumor moderadamente agresivo para ser tratado con nuestros tratamientos experimentales sin producir la muerte antes de

40d. Las células L5178Y se lavaron tres veces con solución salina, se resuspendieron con 1 mL de solución salina inyectable (Laboratorios Pisa, México) y se determinó el porcentaje de viabilidad con el método de exclusión de azul tripano. La suspensión celular se ajustó a 1×10^5 , 5×10^5 y 1×10^6 células en 100 μ L con solución salina inyectable. Cada una de estas suspensiones celulares de 100 μ L se inoculó en el gastrocnemio derecho de tres ratones, empleando una jeringa de insulina, armada con una aguja hipodérmica calibre 27. Este procedimiento no fue demasiado doloroso para los animales y no requirieron anestesia. Los ratones se alojaron en jaulas apropiadas, con temperatura y horas de luz reguladas, alimento balanceado y agua purificada estéril *ad libitum*. Los animales se observaron diariamente, midiendo con un vernier el diámetro de los tumores. Además, los ratones se observaron periódicamente para conocer su capacidad de realizar acciones básicas (alimentarse o beber agua) hasta que fallecieran espontáneamente o hasta los 20 días postinoculación. Se registraron los datos de tiempo que tardaron los tumores en que todos los grupos alcanzaran el diámetro de 0.5 cm. Se calculó el promedio y las desviaciones estándar, se comparó el porcentaje de ratones sobrevivientes a los 20 días postinoculación entre los grupos, mediante una prueba de *t* de Student (significancia: $p=0.05$) y se seleccionó el inóculo que cumplió con los requisitos para evaluar el efecto antitumoral de las CMM-MO.

8.10. Evaluación de la quimiotaxis de las CMM-MO

La quimiotaxis de las CMM-MO es un ensayo *in vitro* que emula el *homing*, que ocurre *in vivo*. Se cultivaron células L5178Y en botellas de cultivo de 25 cm², conteniendo 3 mL de medio DMEM-AG (Gibco) suplementado siguiendo las instrucciones por el productor (ATCC) se lavaron con PBS dos veces y se contaron con cámara de Neubauer, como antes se explicó. Las células se resuspendieron y su concentración se ajustó a 2×10^5 células/mL con medio fresco adicionado con 3% de SFB. Las células se incubaron en botellas de cultivo 25 cm² a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 48 h. El medio usado por dichos cultivos se consideró como medio condicionado y se reservó para colocar en el

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

compartimiento inferior de cada pozo de una placa *Transwell*[®] de 8 μm de poro (Corning[®] NY. 14831. USA). Estas placas constan de 24 pozos y 12 insertos de 6.5 mm, estos insertos poseen membranas semipermeables con poros de 3.0 μm que permiten pasar moléculas relativamente grandes, pero no células. En el fondo de cada pozo se colocaron 650 μL del medio condicionado por las células L5178Y; cuya capacidad para atraer a las CMM-MO se puso a prueba. El medio condicionado se produjo de la siguiente manera: Se cultivaron 2×10^5 células L5178Y por mL en medio suplementado con SFB reducido (3%) por 48h; posteriormente se centrifugaron las células, el sobrenadante consiste en el medio condicionado el cual se colectó y conservó en un tubo limpio hasta su uso. En el inserto se inocularon 2×10^4 CMM-MO. Se incluyó un duplicado por ensayo de control positivo de quimiotaxis, el cual consistió en medio fresco DMEM al 30% de suero fetal bovino. Se incubó la preparación a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 5 h. Se descartó el medio del inserto y las células se lavaron dos veces con PBS. Se fijó la preparación con formaldehído al 4% (J.T. Baker, Center Valley, Pennsylvania, USA) a 4°C por 20 min y se teñió con una solución de cristal violeta al 0.5% (Merck, Darmstadt, Alemania). Se sumergió en metanol al 100% por 20 min a temperatura ambiente, procurando que la membrana del inserto estuviese en contacto con la solución de cristal violeta por ambos lados. El inserto se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min y se lavó con agua corriente hasta que el filtro se vio translúcido. Entonces, éste se dejó secar a temperatura ambiente. Las células fijadas y teñidas se observaron con un microscopio óptico de campo claro (Leica DM IL LED, Wetzlar, Alemania) con un objetivo de 40X. Se tomaron fotografías de cuatro campos seleccionados al azar con una cámara acoplada al microscopio (Leica, DFC295) y las células atrapadas en los poros del filtro se contaron manualmente con la ayuda del software ImageJ. El procedimiento anterior se repitió tres veces. Se calcularon los promedios y desviaciones estándar y se compararon los resultados obtenidos mediante una prueba de *t* de Student (significancia: $p=0.05$).

8.11. Determinación de la reducción del tamaño de los tumores

Se formaron 9 grupos, cada uno con 8 ratones BALB/c hembras de 12-13 semanas, a los cuales se le indujo un linfoma sólido, inoculando 1×10^6 células L5178Y, suspendidas en 100 μ L de solución salina fisiológica en el gastrocnemio derecho, como se explicó en la sección 8.9 (página 43). En este ensayo se emplearon CMM-MO transducidas con lentivirus, portando los transgenes codificantes para TRAILs, TRAILc o IFN β o CMM-MO no transducidas (naïve). Desde el día de la inoculación de las células L5178Y hasta el día 38 se midieron las piernas de los ratones con un vernier, tres veces por semana. Considerando la forma ovoide de los tumores, se empleó la siguiente ecuación para determinar su volumen:

$$\text{Vol} = \pi/6 (L \times A \times h)$$

Donde π es 3.1416, L es el largo que consiste medir del tobillo a la rodilla, A es ancho de la pierna y h es la altura midiendo un punto anterior al mismo punto posterior de la pierna inoculada.

Los implantes de las CMM-MO transducidas se realizaron cuando se observó un incremento del diámetro de la pierna en todos los ratones de al menos 1-2 mm^3 . Se probaron varias combinaciones de CMM-MO transducidas con los tres transgenes de interés o sin ninguno de ellos, como se explica a continuación, donde cada tratamiento corresponde a CMM-MO transducidas con el transgen o la combinación de transgenes especificados. Cada tratamiento consistió en un implante de un total 1×10^6 CMM-MO suspendidas en 100 μ L de solución salina fisiológica inyectable directamente en el tumor, independientemente de que el implante haya consistido en CMM-MO portando un sólo transgen, dos o tres o no portando ninguno. En la lista siguiente omitimos las siglas de CMM-MO dado que usamos éstas en todos los casos.

Grupo 1.-(CMM-MO) TRAILs

Grupo 2.-TRAILc + IFN β

Grupo 3.-IFN β

Grupo 4.-TRAILc

Grupo 5.- TRAILs + IFN β

Grupo 6.- CMM sin modificar (naïve) + TRAILc + IFN β

Grupo 7.- CMM naïve

Grupo 8.- Vehículo (solución salina 100 μ L)

Grupo 9.- Sin tratamiento

Se dio seguimiento a los tumores durante todo el estudio hasta cuando todos los ratones sin tratamiento murieran o se sometieran a eutanasia. Los ratones que fue necesario someter a eutanasia debieron presentar, en conjunto, los siguientes signos de acuerdo con lo descrito por Langford et al: Orejas bajas, ojos tiesos, pelo erizado, inactividad y baja reacción a estímulos [100]; adicionalmente, si un ratón mostraba decremento hasta de un 20% del peso inicial registrado también se sometió a eutanasia, independientemente de los signos antes mencionados. La graficación y administración de los datos se realizó con el software Prism GraphPad versión 7.00 para Windows (Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

8.12. Determinación del tiempo de sobrevida

A la par de la medición de los tumores, se documentó la sobrevida de los ratones con la prueba de sobrevivencia de Kaplan-Meier. Los resultados se interpretaron con el software SPSS v.22 con la intervención de *Log Rank de Mantel-Cox* (significancia: $p=0.05$).

8.13. Evolución de los tumores postimplante.

Los ratones se analizaron individualmente a lo largo del estudio registrando decesos, colectando biopsias de los tumores y pesos de los ratones. Se consideró al grupo sin tratamiento como grupo de corte, es decir, 1 día después que el grupo completo falleció, se sacrificaron los ratones supervivientes tomando biopsia del tejido en el sitio exacto de inoculación de las células L5178Y. Las biopsias se colocaron en una cubetilla y se incluyeron en Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek, Nagano, Japón) para ser almacenadas a -80°C .

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

Los cortes de las biopsias se realizaron con un microtomo criostato (Roundfin, Shenyang, China) y se montaron en portaobjetos, posteriormente se tiñeron con la tinción de HyE. Brevemente: Se sumergió la preparación 60-70 seg en Hematoxilina de Meyer, después se lavó en agua corriente por 10 seg, después se sumergió en eosina por 10-12 seg, posteriormente se lavó en agua corriente por 3-7 seg, posteriormente se deshidrató pasando a etanol al 70% por 15 inmersiones, después a etanol al 95% por 15 inmersiones y finalmente 2 minutos en etanol al 100%; se aclaró la muestra con xilol puro por 3 minutos y se montó con resina (Vecta Mount, Vector laboratories).

Las preparaciones se observaron en microscopio óptico analizando los tejidos de ambos, ratones tratados y no tratados.

8.14. Aspectos éticos

En este trabajo se utilizaron células en cultivo y el menor número de animales de laboratorio que permitió llegar a conclusiones válidas y reproducibles, respetando en todo momento la NOM-062-ZOO-1999, para manejo de animales de experimentación.

9. RESULTADOS

9.1. Obtención y caracterización de CMM-MO de ratón

9.1.1. Morfología y marcadores de superficie

La Figura 3A muestra el aspecto de las CMM-MO de uno de nuestros cultivos, estando en baja confluencia. Todas las células tenían la forma típica de fibroblastos con prolongaciones citoplasmáticas. Las Figuras 3B y 3C muestran un cultivo de CMM-MO creciendo en forma exponencial. En la Figura 1B se observa que prácticamente todas las células expresaron el marcador de superficie CD90 y en la Figura 1C puede observarse a la totalidad de las células expresando el marcador de superficie CD105 (células teñidas de color marrón). Ambos marcadores son característicos de las CMM.

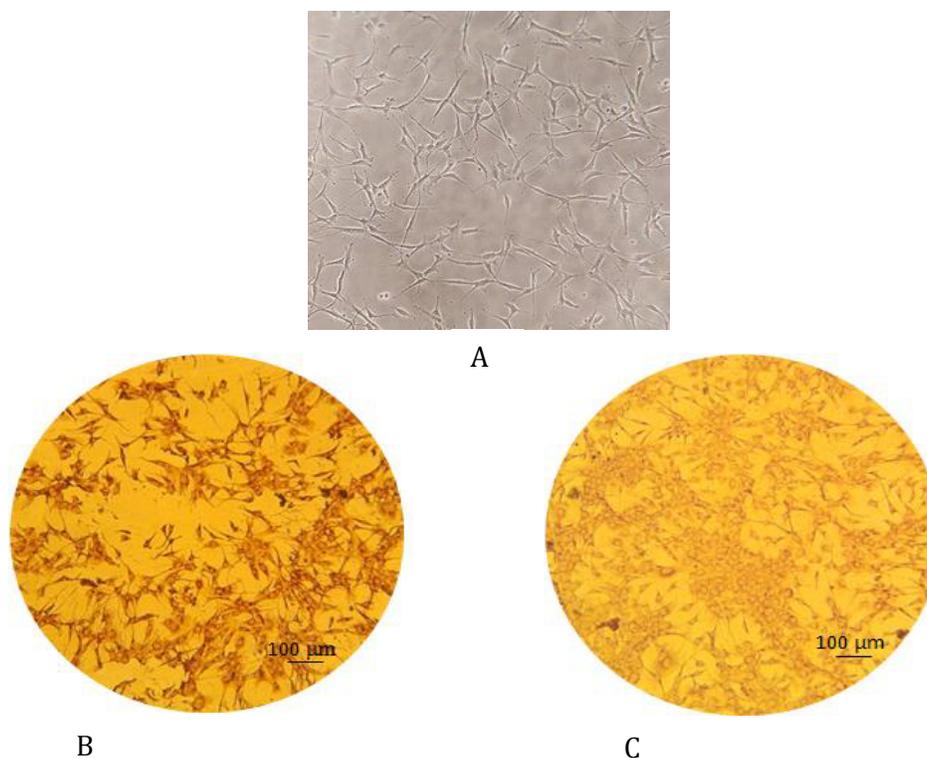


Figura 3. Morfología e identificación de marcadores de superficie de las células madre mesenquimales (CMM). Estas células se obtuvieron de la médula ósea de ratones macho. Estas células fueron adherentes, mostraron una morfología típica de fibroblastos (A) y prácticamente todas las células expresaron los marcadores de superficie CD90 (B) y CD105 [C] visualizados mediante inmunocitoquímica (color marrón). Estas características demuestran su linaje de CMM.

9.1.2. Multipotencia de las CMM-MO

La figura 4 muestra dos ejemplos de la multipotencia de las CMM-MO que nosotros obtuvimos y expandimos. En la Figura 4A se observa un cultivo, prácticamente puro de condrocitos derivados de CMM-MO, los cuales, a partir del cuarto día iniciaron la producción de glucosaminoglicanos (color verde-azul), típicos de la matriz extracelular de los cartílagos. La figura 4B muestra un cultivo de osteoblastos, los cuales han acumulado depósitos de calcio (color marrón, teñidos con la técnica de Von-Kossa). Fue posible observar la diferenciación de las CMM-MO a osteoblastos en los cultivos sin teñir, en los que se apreciaba cierto grado de calcificación, tanto en los cultivos como en las células fijadas.

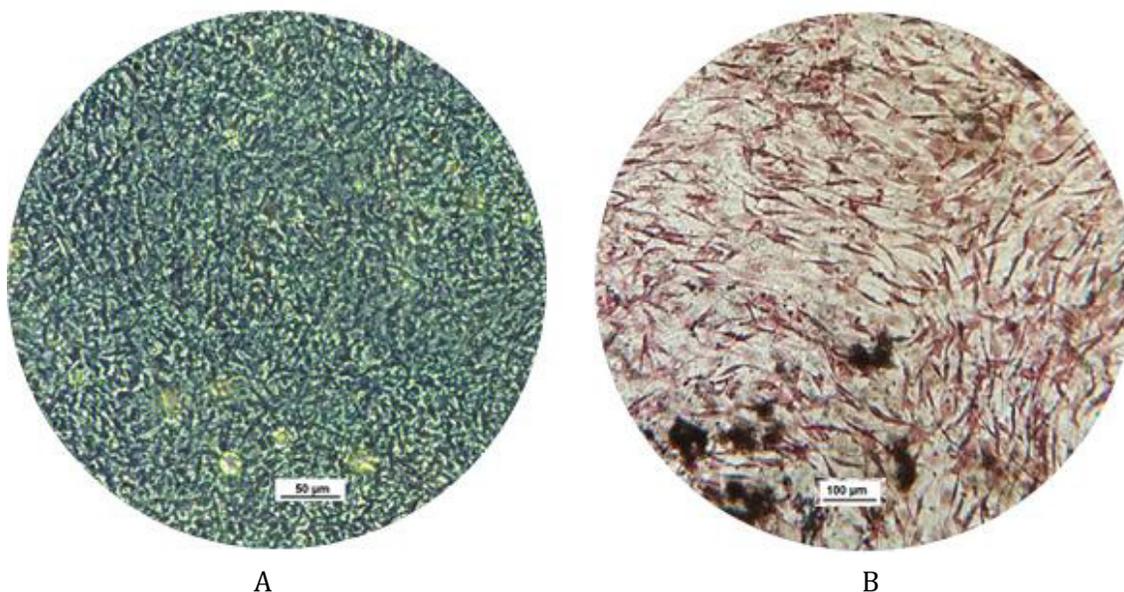


Figura 4. Aspecto de condrocitos y osteoblastos derivados de CMM. Se indujo la diferenciación de las CMM-MO utilizando el *Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit*. En la imagen **(A)** se observa la totalidad de las células diferenciadas a condrocitos, mostrando la coloración verde-azul típica de los glucosaminoglicanos teñidos con azul alciano. La imagen **(B)** muestra a todas las células diferenciadas a osteoblastos; rodeados de depósitos de calcio (marrones; tinción de Von-Kossa).

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

9.1.3. Quimiotaxis de las CMM-MO

La figura 5 muestra los resultados cualitativos de quimiotaxis obtenidos con las CMM-MO, usando como quimioattractante experimental el medio condicionado por células L5178Y sin diluir y diluido 1:2 con medio fresco sin suero y como control positivo 30% de SFB. En todos los casos las CMM-MO mostraron una fuerte quimiotaxis, hacia el medio condicionado o hacia el SFB. La figura 6 corresponde a un análisis cuantitativo de estos mismos experimentos. Esta figura muestra que el medio condicionado sin diluir indujo quimiotaxis en 321 ± 17 CMM-MO, y el medio condicionado diluido 1:2 indujo quimiotaxis en 225 ± 8 CMM-MO. Es decir, en el medio condicionado diluido indujo 30% menos que el medio sin diluir. Por otro lado, El SFB indujo quimiotaxis en 283 ± 8 CMM-MO, 11.8 % menos que el medio condicionado sin diluir.

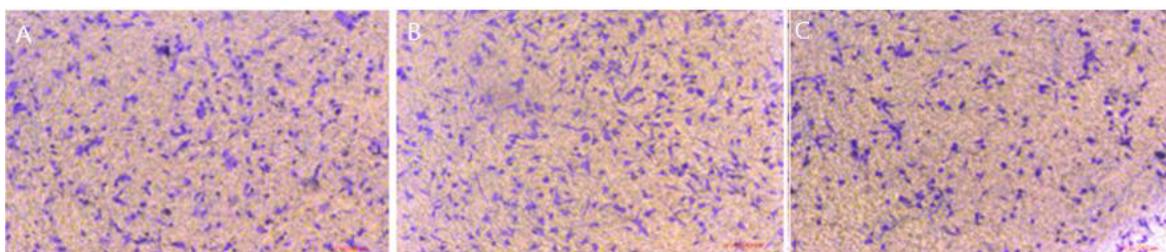


Figura 5. Análisis cualitativo de quimiotaxis de CMM-MO. Células madre mesenquimales de médula ósea de ratón (CMM-MO) se sometieron a un ensayo de quimiotaxis, como parte de la caracterización de estas células. Los ensayos se hicieron en dispositivos llamados Transwells^R que constan de un pozo y un inserto con un filtro que permite pasar moléculas, pero no células; las cuales, al migrar, quedan atrapadas en el filtro. Éstas se tiñeron con cristal violeta (puntos púrpuras). Puede observarse que el suero fetal bovino (SFB) al 30% (**A**), el medio condicionado por las células L5178Y, sin diluir (**B**) o diluido 1:2 (**C**) indujeron una fuerte quimiotaxis en las CMM-MO, sin embargo, este último notoriamente menor.

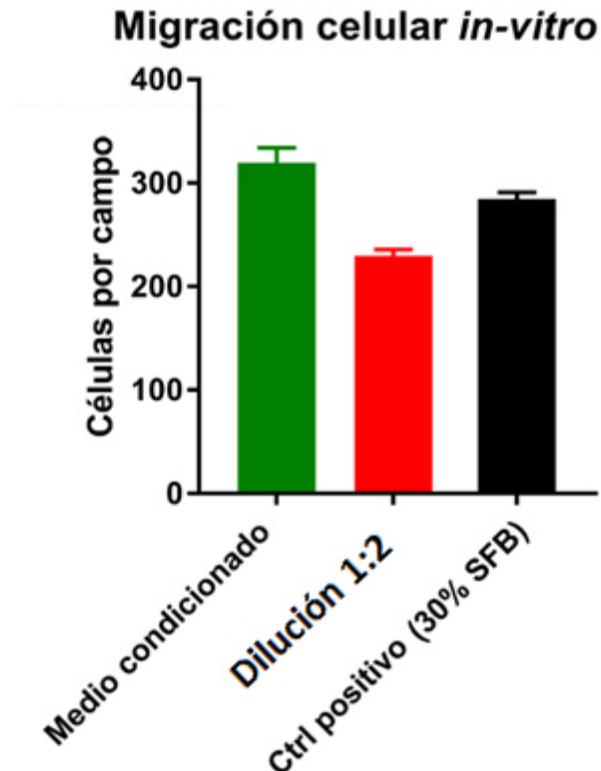


Figura 6. Análisis cuantitativo de quimiotaxis de CMM-MO. Los ensayos de quimiotaxis fueron los mismos descritos en la Fig. 5. Se tomaron 4 fotografías digitales de 2 ensayos independientes se contaron las células atrapadas en los filtros, en cuatro campos por fotografía, con la ayuda del Software ImageJ. Las barras representan el promedio \pm DE.

9.2. Diseño, construcción y caracterización de los vectores plasmídicos

La figura 7A muestra el modelo *in silico* que preparamos para diseñar los plásmidos que emula los geles de agarosa con los productos de digestión enzimática; aquí se incluyen ambos vectores de expresión y se muestran los patrones de bandas esperados (software: NEBcutter <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). Para verificar la correcta construcción de los plásmidos se realizó una digestión enzimática con *EcoRI* y *NotI* (que liberaría el inserto) y *EcoRI* y *PsiI* (que nos confirmaría orientación correcta). La figura 7B muestra el patrón de bandas obtenidas.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

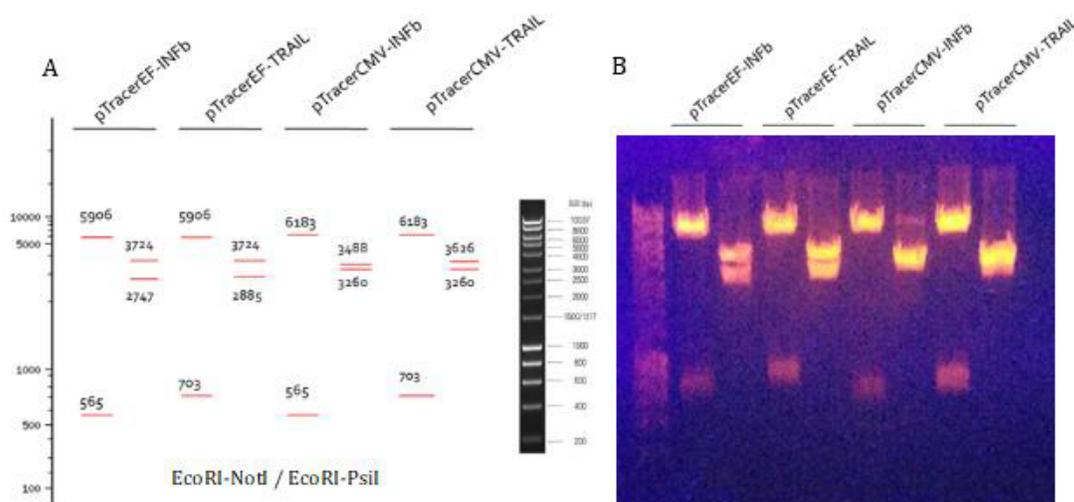


Figura 7. Construcción y caracterización de los vectores plasmídicos. **A)** Modelo *in silico*. Predicción del patrón de bandas de ambos plásmidos empleados. Cada carril por plásmido corresponde a una digestión con las enzimas especificadas. Primer carril corresponde a liberación el inserto del vector de expresión confirmando ligación y el segundo carril a un patrón de bandas esperado que confirma orientación correcta, Software: NebCutter. **B)** Gel de electroforesis al 1% de agarosa resultante de la digestión de los constructos. Patrón de bandas corresponde idénticamente al modelo *in silico*. Marcador de peso molecular: Hyperladder 1000pb Bioline.

El patrón de bandas obtenidas con la digestión con *EcoRI* y *NotI* es de 5906/565 para IFN β y 5906/703 para TRAILs en pTracer-EF1, mientras que en pTracer-CMV se obtuvo 6183/595 para IFN β y 6183/703 para TRAILs; dicha digestión libera el inserto del vector de expresión y muestra el tamaño predicho tanto *in silico* (Fig. 1A) como en el gel de electroforesis (Fig 1B). Adicionalmente, se digirió con *EcoRI* y *PsiI* para verificar la orientación correcta y se obtuvo bandas de 3724/2747 en caso de IFN β y 3724/2885 en caso de TRAILs en el vector pTracer-EF1, a su vez, se obtuvo 3488/3160 para IFN β y 3626/3260 para TRAILs en el vector pTracer-CMV; en esta digestión, las bandas se observan pegadas (Fig. 1B) debido a la cercanía en los tamaños resultantes, sin embargo, es el patrón esperado y confirmamos la correcta construcción de los vectores.

9.3. Estandarización de la técnica de transfección

Con estos experimentos optimizamos tres de las variables más importantes que deben tomarse en cuenta en un procedimiento de transfección, utilizando agentes químicos transfectantes y DNA plasmídico. Estas variables son: intensidad de la

expresión génica, eficiencia de transfección y viabilidad de las células transducidas. A continuación, describimos los resultados obtenidos con nuestros ensayos.

9.3.1. Intensidad de la expresión génica.

La figura 8 muestra los resultados que obtuvimos con las concentraciones de tres agentes químicos transfectantes y diferente masa de DNA plasmídico mostrados en la Tabla 2. En el grupo de imágenes de la figura 8 (pág. 55) puede observarse la aparente variabilidad en la densidad de las CMM-MO transfectadas y la intensidad de la fluorescencia, como un efecto medible de la expresión de la GFP, la cual dependió del agente transfectante utilizado, su volumen y la combinación del volumen del agente transfectante y la masa de DNA plasmídico. La mayor intensidad de fluorescencia (++++) se observa en el recuadro 2D; la cual corresponde al protocolo modificado por nosotros, usando una combinación de 0.6 μ L Xfect/2.0 μ g pTracer-EF-His-A. Esta combinación de Xfect/plásmido produjo un nivel arriba de la intensidad de fluorescencia que la observada con el mismo agente transfectante (Xfect) y la combinación de volumen de Xfect/masa de DNA recomendado por el fabricante (recuadro 1D). Xfect también produjo una alta intensidad de fluorescencia de la GFP transfectada (++++) como sigue: 1) usando el protocolo modificado con las siguientes proporciones de volumen de Xfect/masa de DNA plasmídico: 0.3 μ L/1.0 μ g (2A), 0.6 μ L/1 μ g (2B), y 0.3 μ L/2 μ g (2C) y 2) siguiendo el protocolo original y usando las siguientes combinaciones de Xfect (μ L)/masa de DNA plasmídico (μ g): 0.6 μ L/1.0 μ g (1B) 0.3 μ L/2 μ g (1C) y 0.6 μ L/2 μ g); o usando Turbofect 2 μ l/DNA plasmídico 2 μ g (4B) o Turbofect 4 μ L /DNA plasmidico 2 μ g (4C). La señal con fluorescencia más baja observada por nosotros (+) correspondió a Lipofectamina 3000, 0.75 μ L/DNA plasmídico 1 μ g.

9.3.2. Eficiencia de transfección.

La figura 9 (pág. 56) muestra la eficiencia de transfección determinada con las combinaciones de volumen (μ L) de tres agentes transfectantes y la masa (μ g) de DNA plasmídico, especificados en la Tabla 2. Se observó un notable incremento

en la eficiencia de transfección en los ensayos realizados con el doble del volumen de Turbofect o de Xfect y con el doble de la masa de DNA plasmídico. En el caso de Xfect, evitamos cambiar el medio de cultivo a las 48 h posteriores al inicio de la transfección con Xfect (protocolo modificado). El haber duplicado el volumen de Xfect y la masa de DNA plasmídico y el haber implementado los cambios al protocolo recomendado por el fabricante incrementó significativamente la eficiencia de transfección, comparando ésta con la eficiencia lograda con el protocolo original.

9.3.3. Citotoxicidad de las combinaciones de agentes transfectantes y DNA plasmídico.

La figura 10 (pág. 56) y la tabla 3 (pág. 57) muestran los resultados cuantitativos de citotoxicidad de todas las combinaciones probadas. Xfect fue considerablemente tóxico para las CMM-MO transfectadas, sin embargo, no hubo diferencias significativas de mortalidad celular entre el protocolo modificado por nosotros — arriba comentado — y el método recomendado por el fabricante. Por lo tanto, la modificación que nosotros le hicimos al método para transfectar con Xfect no representa un aumento en toxicidad. Por otro lado, lipofectamina 3000 mostró poca o nula toxicidad con la combinación del agente transfectante y la masa de DNA plasmídico sugerida por el fabricante, pero tuvo una ligera toxicidad al aumentar el volumen de Lipofectamina 3000 (Condición B, C y D). Turbofect mostró una nula toxicidad en la condición original (2A) pero cabe enfatizar que este mostró una creciente toxicidad (desde 103.3 hasta 9.65% de sobrevida) al duplicar el volumen del reactivo y/o la masa del DNA plasmídico, hasta producir una muerte celular prácticamente total con la condición 2D.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

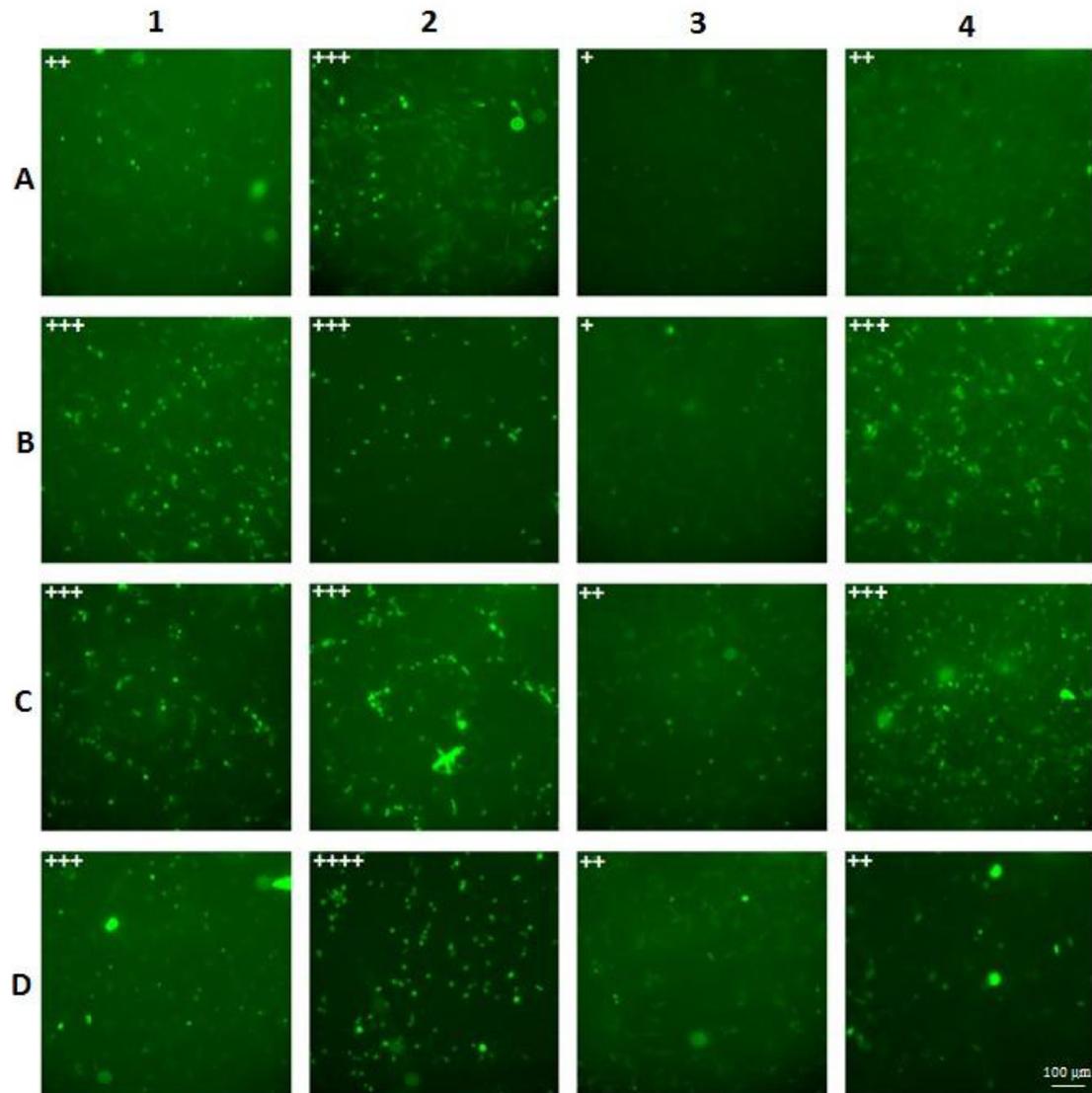


Figura 8. Intensidad de la expresión génica en CMM-MO transfectadas usando diferentes condiciones. Iniciamos todos los cultivos de CMM-MO con el mismo inóculo del mismo cultivo de células. Cada imagen es representativa de la apariencia de las células y de la intensidad de fluorescencia de la GFP. Se muestran los resultados obtenidos como sigue: Con Xfect, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (columna 1). Xfect, con un protocolo modificado por nosotros (columna 2). Protocolos originales con Lipofectamina (columna 3) y Turbofect (columna 4). La línea A muestra la apariencia de las CMM-MO transfectadas con el volumen de Xfect y la masa de DNA plasmídico recomendados por el fabricante. Las líneas B a D muestran la apariencia de las preparaciones obtenidas con diferentes combinaciones del agente transfectante (μL) y masa del plásmido pTracer-EF-His-A (μg) descritos en la Tabla 2. Las cruces en la esquina superior derecha de los recuadros indican la intensidad relativa de la fluorescencia de la GFP observada en cada preparación. Los contornos celulares pueden apreciarse claramente sobre el fondo de todas las imágenes. Además, puede observarse que la densidad celular fue diferente, dependiendo de la condición de transfección empleada.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

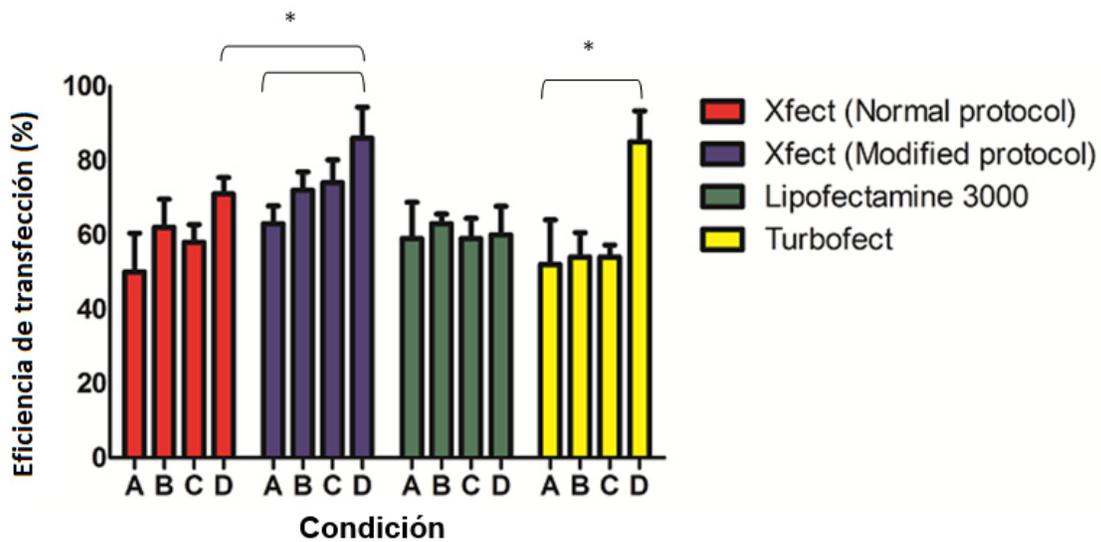


Figura 9. Eficiencia de transfección de 12 combinaciones de agentes transfectantes y DNA plasmídico. Esta gráfica corresponde a los experimentos cuyos resultados cualitativos se muestran en la Figura 8. Las combinaciones de volumen (μ L) de cada uno de los agentes transfectantes los agentes y la masa (μ g) del DNA del plásmido pTracer-EF-His-A se especifican en la Tabla 2. Xfect mostró la mayor eficiencia de transfección en contraste a Lipofectamina 3000 y Turbofect, además, el protocolo modificado mostró una eficiencia significativamente mayor ($p < 0.05$) que el protocolo normal. Cada barra representa el promedio y la D.E. de 3 ensayos por duplicado. Los análisis se realizaron con la ayuda del software Prism Graphpad V7.00 y SPSS V22, aplicando la prueba de U de Mann Whitney y H de Kruskal Wallis.

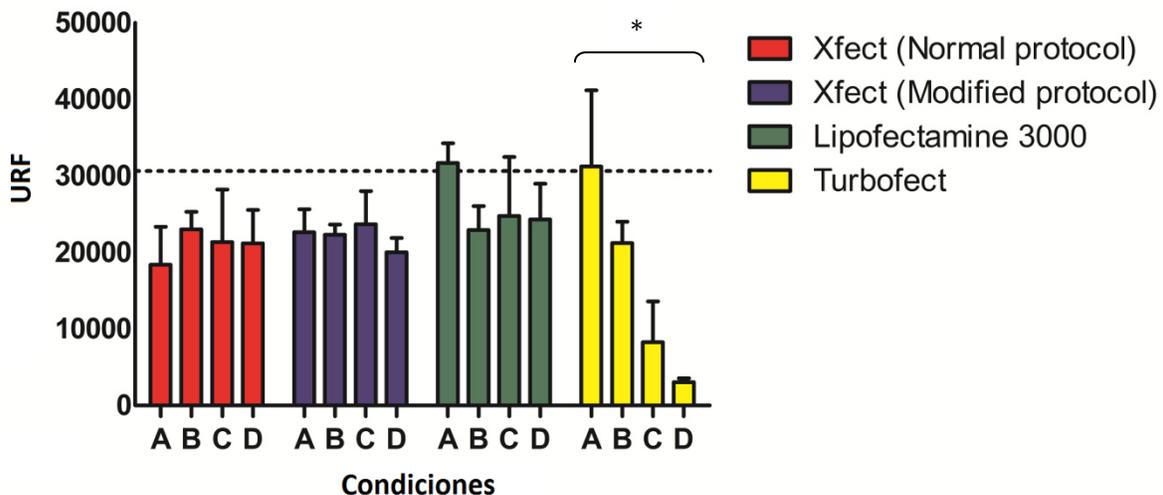


Figura 10. Citotoxicidad de las combinaciones de agentes transfectantes y DNA plasmídico. Se terminó la viabilidad celular después de haber realizado la transfección con las combinaciones de agentes transfectantes y DNA plasmídico, especificadas en la Tabla 2 e interpretadas en Unidades relativas de fluorescencia. Xfect mostró cierto grado de toxicidad en todas las condiciones (incluido el recomendado por el fabricante). Lipofectamina 3000 muestra ligera toxicidad al modificar las condiciones. Turbofect mostró toxicidad creciente al modificar el protocolo. La línea puntuada corresponde a 100% de viabilidad. Cada barra representa el promedio \pm DE de 3 determinaciones por triplicado y obteniendo la mediana. El software utilizado para realizar las pruebas estadísticas fue Prism Graphpad V7.00 y SPSS V22. Las pruebas estadísticas realizadas fueron la U de Mann Whitney y la H de Kruskal Wallis $*P < 0.05$.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

9.3.4. Índice de desempeño de las modalidades de transfección.

En la Tabla 3 se muestran los tres parámetros determinados con cada condición de los ensayos de transfección, los cuales se utilizaron para calcular el índice de desempeño (ID) de cada una de las condiciones de transfección ensayadas en este estudio. La Tabla 3 también incluye el cociente de la eficiencia de transfección/viabilidad celular.

Tabla 3. Índice de desempeño de todas las modalidades de transfección evaluadas.

Condición ¹	Reactivo	Intensidad de señal	Eficiencia de transfección (Prom \pm DE) ²	Viabilidad celular (Prom \pm DE)	ET/VC ³	ID ⁴
Protocolo recomendado por el fabricante						
1A	Lipofectamina	10	57.5 \pm 8.8	104.0 \pm 8.6	0.55	57.2
1B		10	68.8 \pm 8.8	74.7 \pm 10.3	0.92	51.2
1C		20	73.8 \pm 6.3	80.8 \pm 25.7	0.91	53.3
1D		20	58.5 \pm 7.5	79.4 \pm 15.1	0.73	52.6
2A	Turbofect	20	51.3 \pm 11.3	103.3 \pm 32.2	0.49	58.2
2B		20	55.6 \pm 7.5	68.7 \pm 9.7	0.81	48.1
2C		20	53.8 \pm 2.5	25.7 \pm 17.2	2.9	33.2
2D		20	86.1 \pm 7.6	9.65 \pm 2.1	8.9	38.6
3A	Xfect	20	50.6 \pm 10.1	60.1 \pm 15	0.84	43.6
3B		20	67.5 \pm 7.5	77.1 \pm 8.6	0.88	54.9
3C		30	51.9 \pm 3.8	68.5 \pm 21.5	0.76	50.1
3D		30	70.0 \pm 3.8	68.7 \pm 15	1.00	56.2
Protocolo modificado						
4A	Xfect*	30	62.5 \pm 3.1	72.9 \pm 10.7	0.86	55.1
4B		30	71.3 \pm 8.1	72.9 \pm 4.5	0.97	58.1
4C		30	73.5 \pm 7.5	75.0 \pm 12.9	0.98	59.5
4D		40	86.1 \pm 8.9.	65.2 \pm 6.4	1.31	64.1

¹Condición de ensayo se refiere al volumen (μ L) de cada uno de los tres agentes transfectantes y la masa de DNA plasmídico utilizados en este estudio. Estos datos se encuentran en la Tabla 2.

²Prom \pm DE, promedio de la eficiencia de transfección, expresada en porcentaje \pm DE

³ET/VC, eficiencia de transfección/viabilidad celular.

⁴ID, índice de desempeño.

En la tabla 3 puede observarse que Xfect mostró el mejor ID con 64.1 en la condición 4D del protocolo modificado. Sin embargo, con esa condición observamos una toxicidad ligeramente mayor (65.2%) que con las otras

condiciones ensayadas (A, B y C) pero esa diferencia no fue estadísticamente significativa. En cuanto al protocolo normal, también fue muy efectivo, con un ID=56.2 en la condición 3D. Por lo tanto, Xfect mejoró su ID al duplicar la concentración de Xfect y la masa de DNA plasmídico. Turbofect tuvo el peor ID (33.2 en condición 2C) en gran parte debido a la alta toxicidad celular. Sin embargo, cabe mencionar que Turbofect mostró una buena ID (58.2) con el protocolo original (2A). Lipofectamina 3000 mostro resultados similares con todas las condiciones ensayadas. Sin embargo, la condición original (1A) mostró el mejor ID (57.2). En conclusión, Xfect demostró ser el más efectivo en términos de eficiencia de transfección e intensidad de la expresión génica, sin haber incrementado significativamente su citotoxicidad, con respecto a la toxicidad observada con el protocolo recomendado por el fabricante. Además, el protocolo modificado, que consistió en no cambiar el medio de cultivo a las 4 h, resultó en presentar una eficiencia de transfección significativamente mayor que el protocolo recomendado por el fabricante.

9.3.4. Búsqueda del producto proteico del transgén TRAILS

Se probaron diversas condiciones para visualizar mediante *Western blot*, las proteínas de TRAILS o IFN β , transfectando las CMM-MO con pTracer-EF-HIS o pTracer-CMV2; los cuales portaban los transgenes de interés. Sin embargo, mediante esta estrategia y pese a la optimización de la transfección que describimos previamente, no observamos las bandas correspondientes a TRAILS o a IFN β , pero sí la banda correspondiente a TRAIL comercial (Figura 11; Pag 59). Lo que nos indicó que los plásmidos que diseñamos no fueron eficaces para dirigir la síntesis de TRAILS o IFN β en suficiente cantidad como para visualizar sus bandas por *Western blot*. Decidimos, entonces, continuar nuestro proyecto de investigación utilizando transducción lentiviral.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

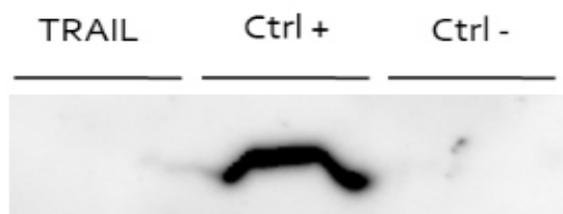


Figura 11. Western Blot de transfección. Ausencia de una banda, visible mediante *Western Blot*, en CMM-MO transfectadas con pTracer-EF-TRAIL. El Western blot se realizó con el sobrenadante de CMM transfectadas con las condiciones óptimas de transfección, previamente identificadas (Tabla 3), utilizando como vehículo molecular pTracer-EF-TRAILS y proteínas precipitadas por el método de metanol-cloroformo. La imagen corresponde a un *Western blot* representativo de diversos experimentos donde se intentó optimizar el método de concentración de proteínas para visualizar la banda de interés. El control positivo es claramente visible, el control negativo corresponde a sobrenadante de CMM sin transfectar procesado idénticamente a la muestra problema.

9.4. Estandarización de la transducción.

9.4.1. Determinación de la concentración óptima de sulfato de protamina.

En la figura 12 (Pág. 60) se presentan las imágenes de transfecciones realizadas en CMM-MO, utilizando los lentivirus que nosotros diseñamos y caracterizamos previamente y una serie ascendente de concentraciones de sulfato de protamina, expresadas como $\mu\text{g/mL}$: 1, 5, 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$ y un control negativo, sin virus. El sulfato de protamina se utiliza en procedimientos de transducción porque neutraliza las cargas eléctricas de las células y de los virus, facilitando la entrada de los virus a las células; y así, mejorando la eficiencia de transducción. En la figura 12A (sin virus) no se observó fluorescencia. Con 1 μg de sulfato de protamina (12B) aparecieron manchas con fluorescencia débil y difusa, con 5 μg de sulfato de protamina (12C) se observaron múltiples contornos de las CMM-MO transducidas. Con 10 $\mu\text{g/mL}$ (12D), la fluorescencia se intensificó considerablemente, pero se observaron múltiples células lisadas. 50 $\mu\text{g/mL}$ disminuyó dramáticamente la densidad celular y la intensidad de la fluorescencia.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

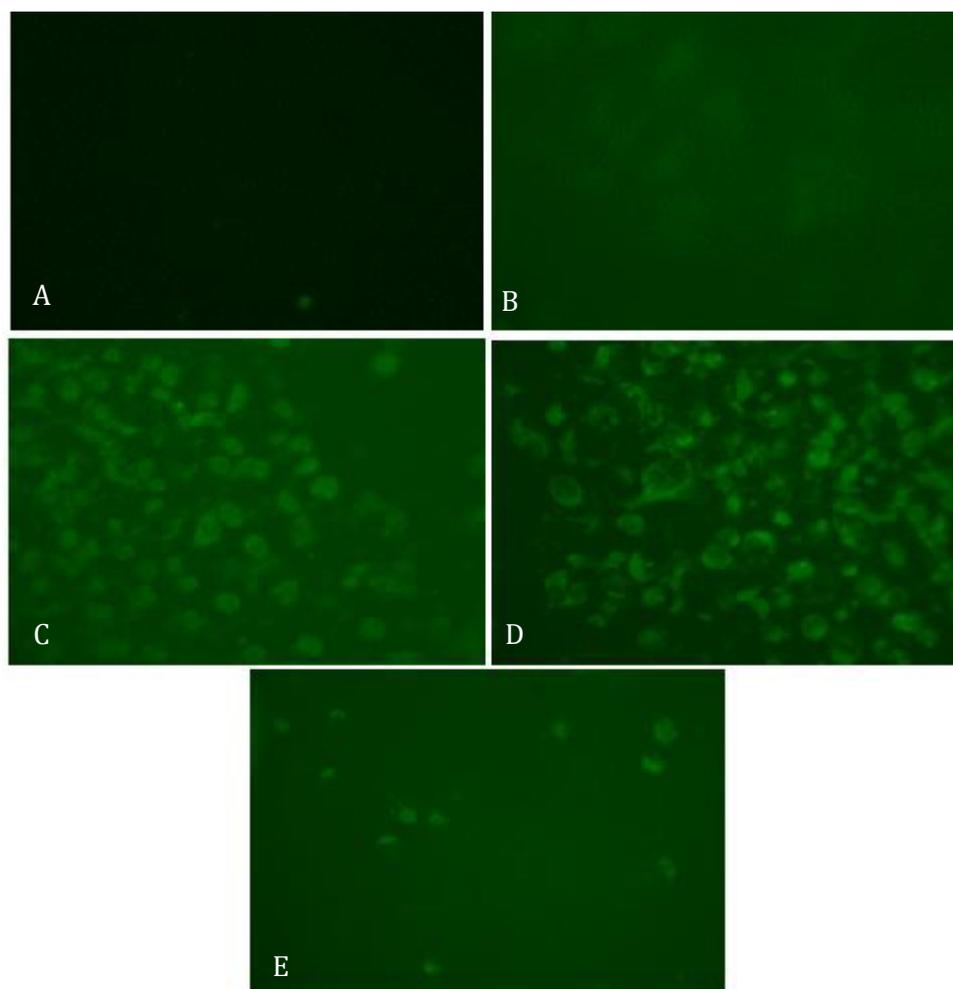


Figura 12. Análisis cualitativo de eficiencia de transducción con sulfato de protamina. Para estos ensayos se utilizaron vectores lentivirales que contenían las secuencias exactas de los transgenes codificantes para TRAIL completo, TRAIL soluble, Interferón β y la proteína verde fluorescente (GFP), cuya señal se registró en las fotografías de esta figura. El recuadro **A** corresponde a un control negativo, sin virus. En los recuadros **B** a **E** se realizaron los procedimientos de transfección con los lentivirus — previamente diseñados por nosotros — y las siguientes concentraciones de sulfato de protamina: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (recuadro B), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (recuadro C), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (recuadro D) y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (recuadro E).

Concluimos que una MOI de 2 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de protamina eran las condiciones óptimas para realizar la transducción de las CMM-MO; lo cual nos permitió expandir las CMM-MO transducidas con los transgenes de interés, en cantidades suficientes para realizar el experimento que puso a prueba nuestra hipótesis.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

9.4.2. Identificación de las proteínas TRAILS, TRAILc e IFN β producidas por CMM-MO transducidas.

La figura 13 muestra las bandas obtenidas mediante Western blot de las proteínas TRAILS, TRAILc e IFN β producidas —por separado— por cultivos de CMM-MO transducidas con los transgenes correspondientes. En el primer carril, correspondiente a IFN β se observan dos bandas, una con un peso molecular igual al del IFN β comercial, utilizado como estándar y una banda con un peso molecular ligeramente mayor. En el siguiente carril corresponde a TRAILS, en el cual se observó una sola banda, con un peso molecular similar al del TRAIL comercial. En el tercer carril se observan varias bandas en la muestra experimental, una de ellas coincide con el peso molecular del estándar. Bandas adicionales se atribuyen a modificaciones postraduccionales.

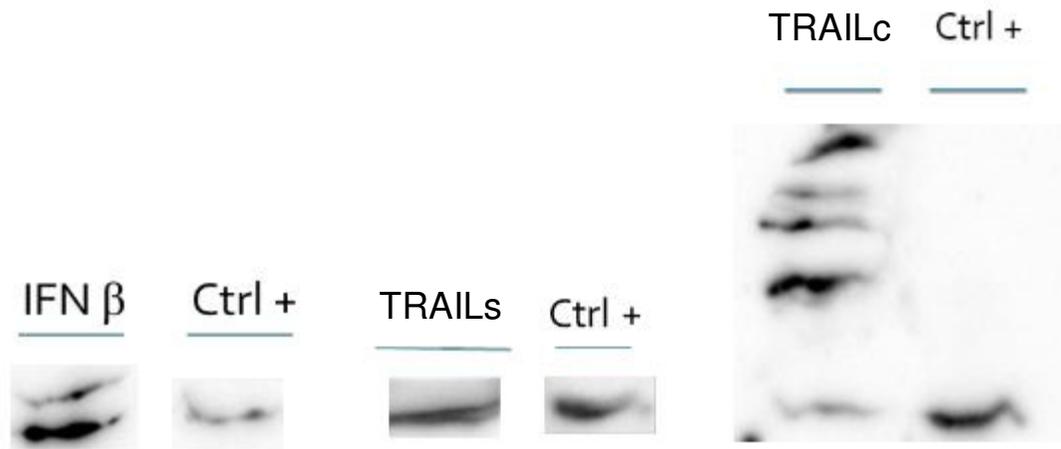


Figura 13. Identificación de las proteínas TRAIL soluble (s) TRAIL completo (c) e interferón β (IFN β). Este análisis se realizó mediante *Western blot* de sobrenadante de cultivo de CMM transducidas con lentivirus que portaban los transgenes de interés (por separado) —previamente diseñados y caracterizados— y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de protamina —concentración previamente identificada como óptima para la transducción de las CMM-MO de 40 veces con ultrafiltros para centrifuga de 10 KDa (Amicon, Merck). Las bandas se revelaron mediante quimioluminiscencia por luminol (Bio-rad). Como control negativo, se usó medio concentrado de CMM sin transducir y como control positivo se emplearon las proteínas recombinantes comerciales de TRAIL (Peprotech) e IFN β (Merck) murinos cargando 200 ng y 4 KU respectivamente.

En conclusión, las CMM-MO transducidas produjeron todas las proteínas esperadas con una eficiencia satisfactoria. Con estos resultados validamos a las CMM-MO genéticamente modificadas con lentivirus eran aptas para ser empleadas en los ensayos *in vivo*.

9.5. Estandarización de la inducción de linfomas

La línea tumoral de linfoma murino L5178Y se empleó por su capacidad para producir tumores en ratones inmunocompetentes. La figura 14 (pag. 63) muestra los resultados que obtuvimos con una serie ascendente del número de células de linfoma inoculados.

El inóculo de 1×10^6 células de linfoma desarrollaron el tumor muy rápidamente y pesó 3.65 g, matando a los ratones a los 12 días post inoculación. Considerando el tiempo de sobrevivencia, existía el riesgo de que los tumores fueran demasiado agresivos y no permitieran que las células transducidas con los factores antitumorales ejercieran sus efectos terapéuticos. En contraste, el inóculo con 5×10^5 células L5178Y produjo tumores de crecimiento más lento que el inóculo con 1×10^6 células y produjo tumores con un peso adecuado para nuestros propósitos (2.73 g), adicionalmente, estos tumores no se reabsorbieron. Los ratones murieron a los 17 dpi, con un lapso de 9-10 d antes de que se hiciera visible una tumoración, de 1-2 mm³.

En conclusión, el inóculo con 5×10^5 células L5178Y fue el más apropiado para continuar con nuestro estudio: con estas condiciones, los ratones no reabsorbieron el tumor y sobrevivieron al menos 15 d.

9.5.1. Análisis del efecto terapéutico de CMM-MO transducidas con TRAILc, TRAILs o IFN β sobre linfomas murinos

El período de estudio para analizar la sobrevida y la capacidad de reducir tumores en ratones BALB/c de CMM-MO transducidas con transgenes con actividad antitumoral constó de 42 días y consistió en cuatro fases: inducción de los linfomas, tratamiento de los ratones con combinaciones de CMM-MO transducidas con TRAILs, TRAILc, IFN β o sin transducir (naïve), determinación de la sobrevida

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

de los ratones que revivieron los diferentes tratamientos y análisis histológico de los tumores o tejidos donde estuvieron los tumores antes de haber sido eliminados por las CMM-MO transducidas.

Inóculo (células L5178y)	tumor	Peso (g)
1×10^5		0.28
5×10^5		2.73
1×10^6		3.65

Figura 14. Estandarización del inóculo de células de linfoma L5178Y. Inoculamos en el gastrocnemio derecho, a un grupo de nueve ratones machos de 6 semanas de edad y los observamos hasta que ocurrió su muerte. Los números a la izquierda de la figura indican el número de células tumorales inoculadas. Las imágenes en el centro de la figura son fotografías de los tumores disectados de la pierna derecha de los ratones, una vez que éstos se sacrificaron o murieron. La regla, al pie de cada fotografía señala las dimensiones de cada tumor, en mm. Los números a la derecha de las fotografías corresponden al peso (expresado en g), que alcanzaron los tumores a los 13 días pi. Los tumores inoculados con 1×10^5 células fue pequeño y poco agresivo. Los tumores inducidos con 1×10^6 células crecieron muy rápido y los ratones murieron a los 13 d postinóculo. Los tumores inducidos con 5×10^5 células crecieron más lentamente y mataron a los ratones a los 17 días postinóculo.

9.5.1.1. Inducción de los linfomas

La figura 15 muestra la forma en que se manejaron y pesaron los ratones y cómo se le dio seguimiento al desarrollo de los tumores —midiendo los tumores con un vernier—, hasta que alcanzaron el tamaño adecuado para implantar las CMM-MO

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

transducidas con los genes de interés. En el día 7 postinóculo (PI) se apreció un ligero aumento en el tamaño del tumor. En el día 9 pi, la totalidad de los ratones implantados mostró una pequeña tumoración en la pierna inoculada. En la figura 16 se muestran los resultados cuantitativos de este procedimiento.



Figura 15. Medida y peso de ratones. El grupo completo de ratones (n=72) se inoculó en el gastrocnemio derecho con 1×10^5 células suspendidas en 100 μ L de solución salina fisiológica estéril. Los ratones se observaron diariamente y se midió el sitio del inóculo con un vernier 3 veces por semana y todos los ratones se pesaron en una balanza semianalítica. Al noveno día postinóculo todos los ratones mostraron un pequeño tumor en el sitio de la inoculación.

Consideramos que los linfomas se habían establecido cuando el incremento del volumen de la pierna (derecha) donde se realizó el inóculo era 1 desviación estándar superior al promedio del volumen de la pierna derecha del grupo no inoculado.

9.5.1.2. Implantación de las CMM-MO transducidas y evolución de los ratones tratados

Una vez que se confirmó el desarrollo de los tumores, en el día 9 se implantaron las CMM-MO transducidas, los ratones se dividieron en 9 grupos de 8 ratones (hembras de 12-13 semanas) cada uno y se inocularon con las combinaciones de CMM-MO transducidas (por separado) con TRAILs, TRAILc, IFN β o naïve, de acuerdo con los grupos especificados en la sección 8.11 (pág. 45).

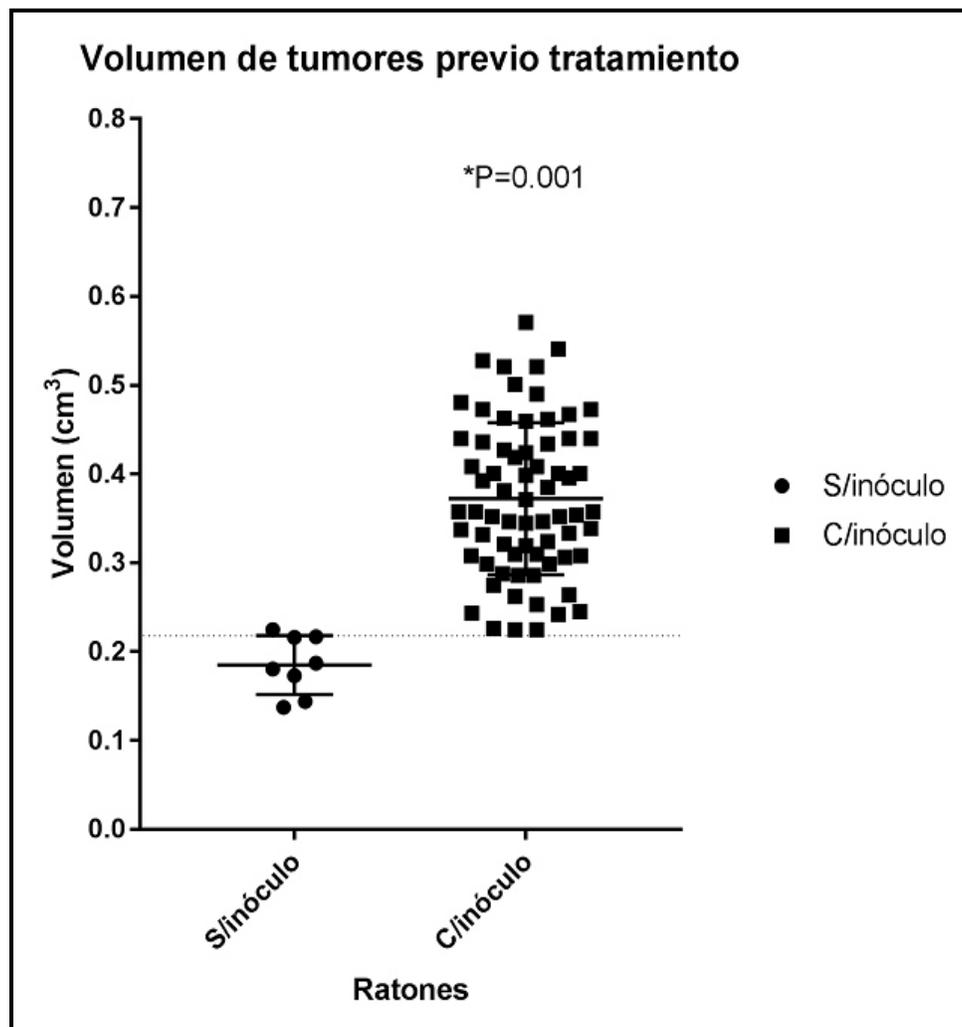


Figura 16. Análisis cuantitativo de la implantación de los linfomas. Al día 9 postinóculo se calculó el volumen de la pierna derecha de los 72 ratones inoculados con las células de linfoma y el de un grupo control de ocho ratones, que no se inocularon. Todos los ratones desarrollaron una tumoración, comparados con los controles y la gran mayoría mostraba un tumor con un volumen superior a los ratones no inoculados.

Durante la implantación de las CMM-MO observamos que algunos ratones sangraron moderadamente, principalmente en aquellos con tumores más grandes, lo que sugiere una alta vascularización tumoral. Sin embargo, la mayoría de los ratones no mostraron signos de dolor intenso o incapacidad PI. En el día 26 PI se detectó los primeros ratones muertos. Tras este suceso, analizamos la última medición del volumen de las piernas con los tumores en todos los grupos. Lo anterior con la intención de determinar las diferencias del volumen entre los

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

ratones tratados y no tratados. La figura 17 muestra las diferencias de volumen de los tumores entre los ratones no implantados con CMM-MO transducidas o implantados con estas células, en diferentes combinaciones.

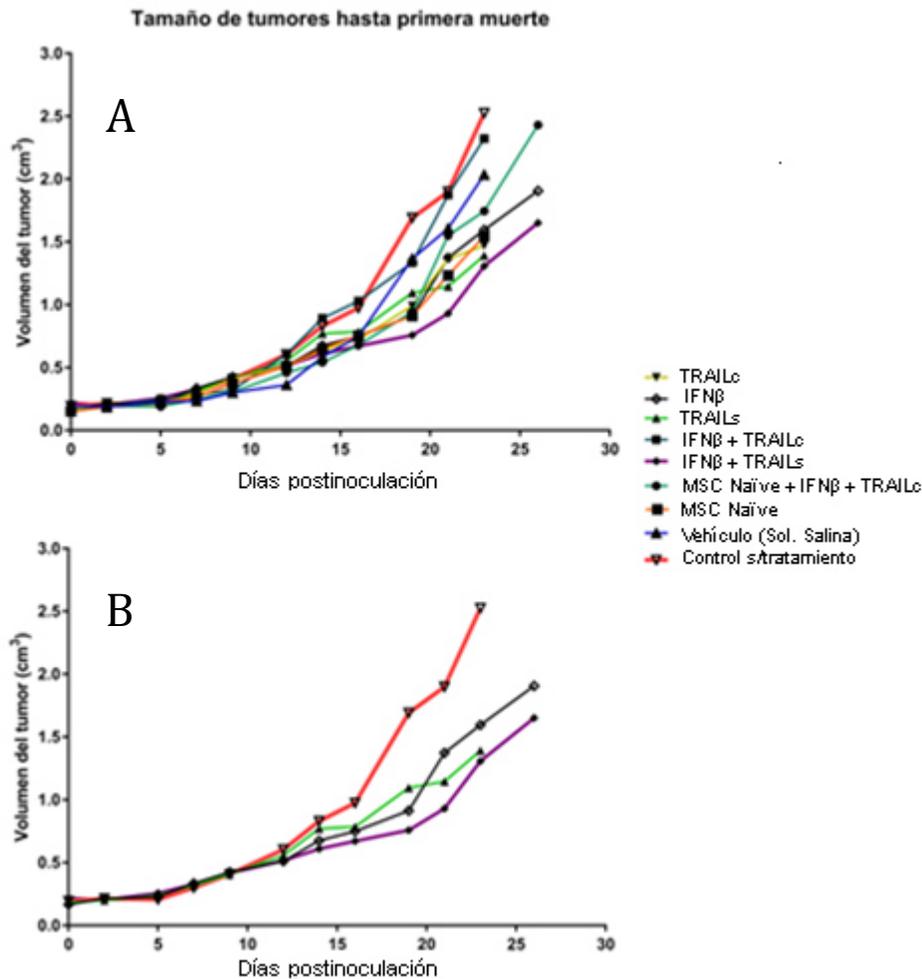


Figura 17. Diferencias entre el volumen de los tumores entre los grupos experimentales completos. Los ratones se implantaron con un total de 1×10^6 CMM-MO transducidas con TRAILc, TRAILs, IFN β o las combinaciones indicadas en esta figura directamente en el tumor. La gráfica (A) muestra que a partir del día 5 el volumen de los tumores empezó a diferenciarse entre los diferentes tratamientos (definiéndose más claramente el día 9). En el día 23 el volumen de los tumores de los ratones no tratados era significativamente mayor que los grupos implantados. La gráfica (B) muestra más claramente que en el día 23 postratamiento, el volumen de los tumores en el grupo no tratado fue significativamente mayor que el de los grupos tratados con CMM-MO portando TRAILs e IFN β (solos y combinado).

La Figura 17A muestra que el volumen de los tumores se diferenció entre grupos a partir del día 9 PI. En el día 23 dichas diferencias eran evidentes, entre grupos y con respecto al grupo de ratones no tratados. La primera muerte ocurrió en el grupo sin tratamiento a los 26 d PI (Siendo el día 23 la última medición con todos

los individuos vivos de este grupo). En ese momento, el volumen promedio del grupo sin tratamiento mostró el mayor volumen de los tumores (promedio 2.5 cm³) seguido por el grupo que recibió un implante combinado de CMM-MO transducidas con TRAILc y CMM-MO transducidas con IFN β (Fig 17A). El promedio del volumen de los tumores fue de 2.3 cm³. Por otro lado, el grupo con tratamiento combinado de TRAILS e IFN β al mismo tiempo (23 días PI) presentó el menor volumen de los tumores (1.0 cm³) con un promedio de los tumores de 1.6 cm³ al día del primer deceso, el cual, en este grupo ocurrió el primer deceso en el día 28 PI.

En la figura 17B se analizan los mejores resultados que obtuvimos enfatizando los datos de los tratamientos independientes de TRAILS e IFN β . Al día 23 postratamiento el promedio del volumen de los tumores en los ratones implantados con CMM-MO transducidas con TRAILS fue de 1.3 cm³ (comparado a 2.5 cm³ del grupo sin tratamiento al mismo día PI). En los ratones implantados únicamente con CMM-MO-IFN β el volumen de los tumores fue de 1.5 cm³ al día 23 (sin decesos) y al día 25 (primer deceso) midiendo 1.8 cm³ y en los ratones implantados con una combinación de CMM-MO-TRAILS (5×10^5 células) y CMM-MO-IFN β (5×10^5 células) el volumen de los tumores fue 1.25 cm³ al día 23 (sin decesos) y 1.6 al día 25 (primer deceso). El primer deceso en el grupo que recibió un implante combinado de CMM-MO-TRAILS y CMM-MO-IFN β sucedió el día 28 adicionalmente al menor volumen de tumores. Por lo tanto, los resultados sugieren un efecto aditivo al combinar los tratamientos de TRAILS e IFN β .

Desde el día 26 hasta el día 41 PI se dio seguimiento diario a los ratones, registrando los decesos y obteniendo biopsias de los tumores. Los ratones que mostraron los signos mencionados en la sección 8.11 (Pág. 45), denotando intenso sufrimiento y dolor, fueron sometidos a eutanasia. La figura 18 muestra, como ejemplo, dos ratones con síntomas de enfermedad terminal, que se sometieron a eutanasia para evitarles un mayor sufrimiento: pelo erizado, ojos tiesos, orejas bajas y un volumen enorme del linfoma. Se consideró el día de la

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

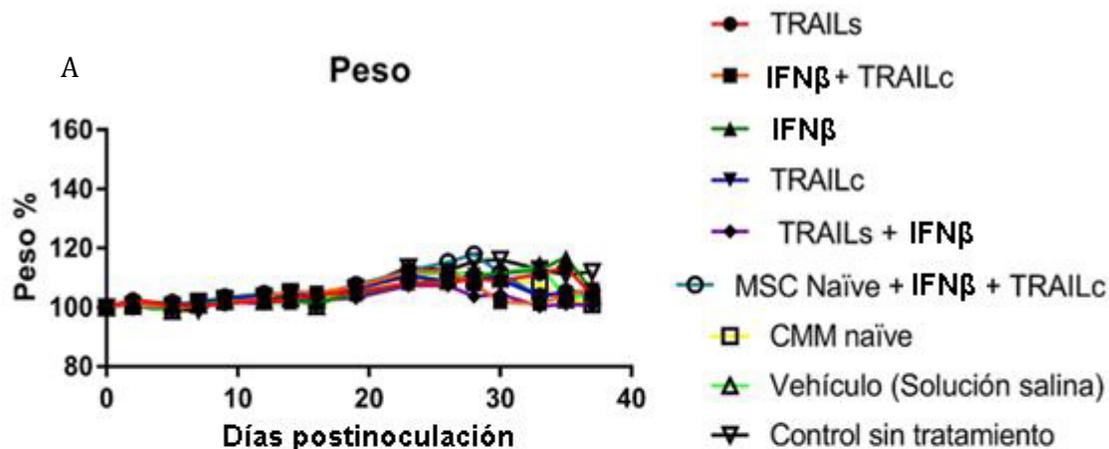
eutanasia para para calcular el tiempo de sobrevivencia, correspondiente a cada tratamiento.



Figura 18. Síntomas considerados para practicar eutanasia. En la fotografía **(A)** se muestra un ratón que tenía el pelo erizado, mostraba muy poca movilidad, de lo que se podía inferir que estos animales estaban experimentando un intenso dolor. Considerando los lineamientos reportados por Langford et al., estos animales se sometieron a eutanasia por dislocación cervical. La fotografía del recuadro **(B)** muestra un ratón con un enorme tumor, inmediatamente antes de haber sido sometido a eutanasia.

Además de la inspección de los ratones, se mantuvo un registro minucioso de su peso, para detectar oportunamente una posible caquexia (pérdida de peso por inflamación crónica) o incapacidad física para comer. Sin embargo, ningún ratón mostró dicha incapacidad y por lo tanto no se observó decremento en el peso. La figura 19 muestra las gráficas de los promedios de peso, registrados durante todo el experimento o hasta que murieron los ratones. Puede observarse que hasta el día 18 PI todos los grupos mantuvieron un peso homogéneo a partir de entonces, todos los ratones mostraron un claro incremento de peso, debido al crecimiento de los tumores.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma



B



Figura 19. Peso de los ratones por grupo experimental. La gráfica **(A)** muestra que los ratones no sólo no perdieron peso a lo largo del estudio o hasta que fallecieron, sino que la mayoría de los grupos aumentaron de peso después del día 22, acorde al aumento de la masa tumoral. La fotografía del recuadro **(B)** muestra, como ejemplo, a un ratón alimentándose. Esto ocurrió en todos los grupos, a lo largo del experimento, aun cuando los ratones ya habían desarrollado masas tumorales grandes.

Concluimos que todos los tratamientos mostraron un menor volumen de los tumores con relación a los grupos no implantados. El grupo de tratamiento combinado de TRAILc e IFN β mostró una eficacia terapéutica pobre, siendo sus resultados similares al grupo sin tratamiento. Por otro lado, el grupo con TRAILs e IFN β combinados presentó la mayor reducción tumoral, el cual, comparado con los tratamientos independientes de TRAILs o IFN β , presentó un efecto aditivo. Finalmente, ningún ratón tuvo que ser sometido a eutanasia por pérdida de peso,

este criterio es importante para identificar y discernir posible deceso por causas ajenas al tumor, en ese caso, por falta de alimento.

9.6. Identificación de los ratones que sobrevivieron con aparente eliminación de tumor.

El día 41 PI murió el último ratón sin tratamiento, por lo tanto, el día 42 se estableció como último día a evaluar los días de supervivencia PI de todos los grupos incluidos en el estudio. Por lo tanto, en el día 42 PI se sacrificaron todos los ratones sobrevivientes, se inspeccionó y se palpó la pierna inoculada para detectar la presencia de tumores y se tomó una biopsia del sitio donde se inocularon las células de linfoma L5178Y. Ninguno de los ratones que sobrevivieron presentó un tumor detectable a la vista o al tacto.

9.7. Análisis de supervivencia de los grupos tratados

El análisis de supervivencia de los grupos tratados se llevó a cabo en el día 41, cuando murió el último ratón no tratado. El análisis consistió en la determinación del porcentaje de ratones sobrevivientes, llevando registro durante todo el experimento de los decesos y los ratones sobrevivientes. La figura 20 (pág. 71) es una gráfica de Kaplan-Meier. La supervivencia de todos los grupos implantados con CMM-MO transducidas fue mayor que las de los ratones no tratados. A los 41 días PI, el único grupo en el que se observó 100% de mortalidad fue el no implantado. El grupo que recibió el tratamiento combinado con TRAILs y IFN β presentó la mayor supervivencia (62.5%). Es decir, dicho tratamiento fue el más eficaz. Además, el tratamiento combinado con TRAILs y IFN β comparado con los tratamientos independientes de TRAILs o IFN β resultaron en 50% y 25% de supervivencia respectivamente.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

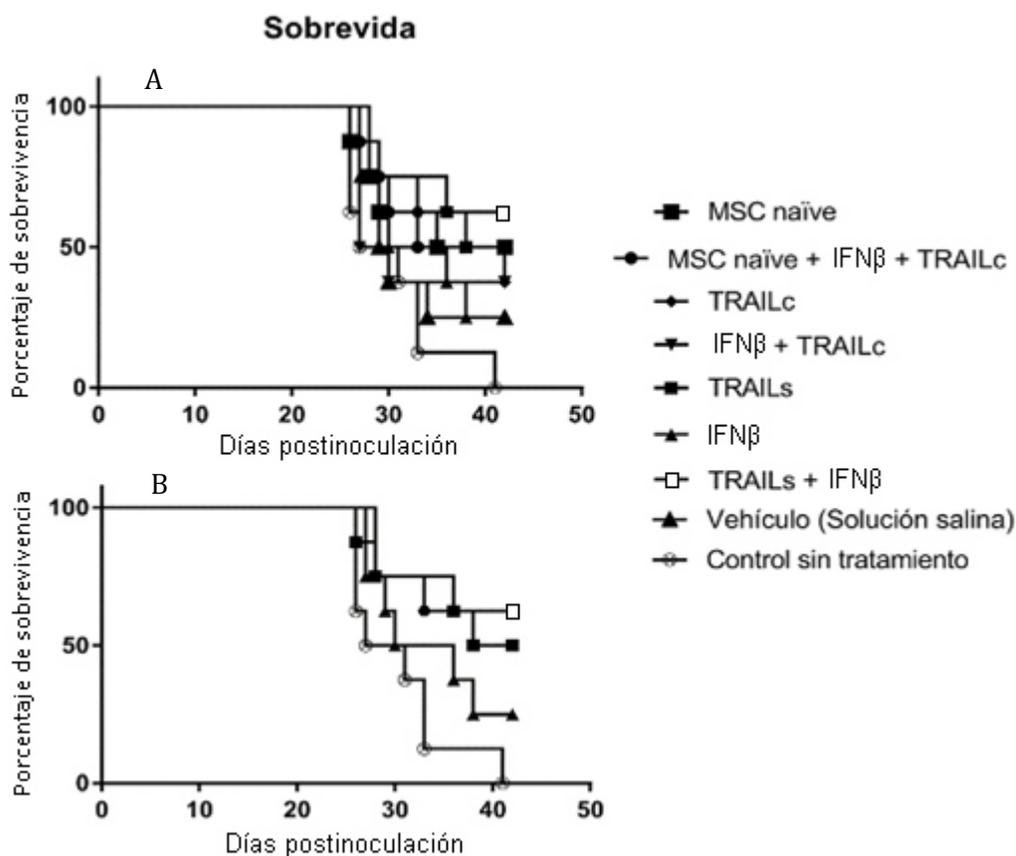


Figura 20. Análisis de sobrevivencia de los grupos experimentales. En la gráfica de Kaplan-Meier (A) se muestra el porcentaje de sobrevivencia de los 9 grupos incluidos en el presente estudio. Los ratones de todos los grupos sobrevivieron hasta el día 28. Todos los ratones del grupo sin tratamiento murieron al día 41 postinoculación. Todos los tratamientos tuvieron efectos antitumorales y algunos los grupos tuvieron resultados finales idénticos. En la gráfica (B) se observa que el grupo con mayor sobrevivencia fue el tratado con la combinación de CMM-MO-IFN β y CMM-MO-TRAILs (62.5%). Los grupos que recibieron tratamientos independientes, con CMM-MO-TRAILs o con CMM-MO-IFN β tuvieron menor sobrevivencia: con TRAILs (50%) y con IFN β (25%) representando entonces, un efecto aditivo.

Estos resultados y el menor volumen de los tumores (Fig. 17; pág. 66) observados en los ratones que recibieron el tratamiento combinado de TRAILs e IFN β muestran un efecto antitumoral aditivo. Todos los tratamientos y el porcentaje de sobrevivencia se enlistan en la Tabla 4. La menor sobrevivencia (25%) se observó en el grupo inoculado únicamente con el vehículo (solución salina fisiológica), y CMM-MO-IFN β . El tratamiento de CMM-MO-TRAILc y el combinado con CMM-MO-TRAILc y con CMM-MO-IFN β permitió 37.5% de sobrevivencia. El grupo

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

implantado con CMM naïve presentó 50% de sobrevivencia a la igual que la combinación de CMM-MO naïve, CMM-MO-TRAILc y CMM-MO-IFN β .

Tabla 4. Porcentaje de sobrevivencia de los ratones perteneciente a los nueve grupos de tratamiento con CMM-MO transducidas

Grupo¹	Tratamiento²	% de sobrevivencia³
A	TRAILs	50
B	IFN β + TRAILc	37.5
C	IFN β	25
D	TRAILc	37.5
E	IFN β + TRAILs	62.5
F	CMM Naïve + IFN β + TRAILc	50
G	CMM naïve	50
H	Vehículo (Sol. salina fisiológica)	25
I	Control sin tratamiento	0

¹Nomenclatura dada a cada grupo por nosotros.

²El tratamiento consistió en inocular intratumoralmente 1×10^6 CMM-MO transducidas con uno de los transgenes indicados en la columna. En todos los casos las células estaban suspendidas en 100 μ L de solución salina fisiológica estéril. Los grupos que recibieron más de un transgen se inocularon con un número proporcional de CMM-MO. Es decir, cuando el tratamiento consistió en dos transgenes, se inocularon 5×10^5 CMM-MO transducidas con un transgen y 5×10^5 CMM-MO transducidas con el otro transgen.

³El cálculo del porcentaje de sobrevivencia se realizó a los 42 días postinóculo, 1 día después que todos los ratones que no recibieron tratamiento habían muerto.

La tabla 5 (pág. 73) muestra los resultados del análisis estadístico que se realizó para conocer la significancia de las diferencias entre cada tratamiento y el grupo de ratones no tratados. El tratamiento con TRAILs, CMM Naïve/IFN β /TRAILc y CMM naïve permitió una sobrevivencia significativamente mayor que el grupo no tratado y el tratamiento combinado con IFN β /TRAILs resultó altamente significativo. El resto de los tratamientos (IFN β /TRAILc, IFN β , TRAILc y sólo el vehículo) no influyeron significativamente en la sobrevivencia de los ratones.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

Tabla 5. Significancia estadística de las diferencias de sobrevida entre los grupos tratados y el grupo sin tratamiento

Tratamiento ¹	Significancia ²
TRAILs	0.017 (*)
IFN β + TRAILc	0.068
IFN β	0.170
TRAILc	0.072
IFN β + TRAILs	0.008 (**)
CMM Naïve + IFN β + TRAILc	0.042 (*)
CMM naïve	0.038 (*)
Vehículo (sol. Salina)	0.309

¹El tratamiento consistió en inocular intratumoralmente 1×10^6 CMM-MO transducidas con uno de los transgenes indicados en la columna. En todos los casos las células estaban suspendidas en 100 μ L de solución salina fisiológica estéril. Los inóculos se hicieron intratumoralmente, distribuyendo el total del volumen en varios sitios de los tumores. Los grupos que recibieron más de un transgen se inocularon con un número proporcional de CMM-MO. Es decir, cuando el tratamiento consistió en dos transgenes, se inocularon 5×10^5 CMM-MO transducidas con un transgen y 5×10^5 CMM-MO transducidas con el otro transgen.

²La significancia estadística de las diferencias entre el porcentaje de sobrevivencia de los ratones tratados con los transgenes de interés o sus combinaciones con respecto a los ratones no tratados se realizó con la prueba de Log-Rank de Mantel-Cox y la ayuda del Software SPSS V22.

9.8. Histopatología

Para concluir, se analizaron biopsias de los grupos tratados y del grupo sin tratamiento con la finalidad de identificar microscópicamente la presencia o ausencia de los tumores.

Las biopsias de obtuvieron inmediatamente después del sacrificio y se incluyeron en O.T.C. (un medio de montaje para criopreservación); las biopsias se cortaron con criostato (Roundfin) y se tiñeron con HYE (hematoxilina y eosina) (Fig. 21).

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

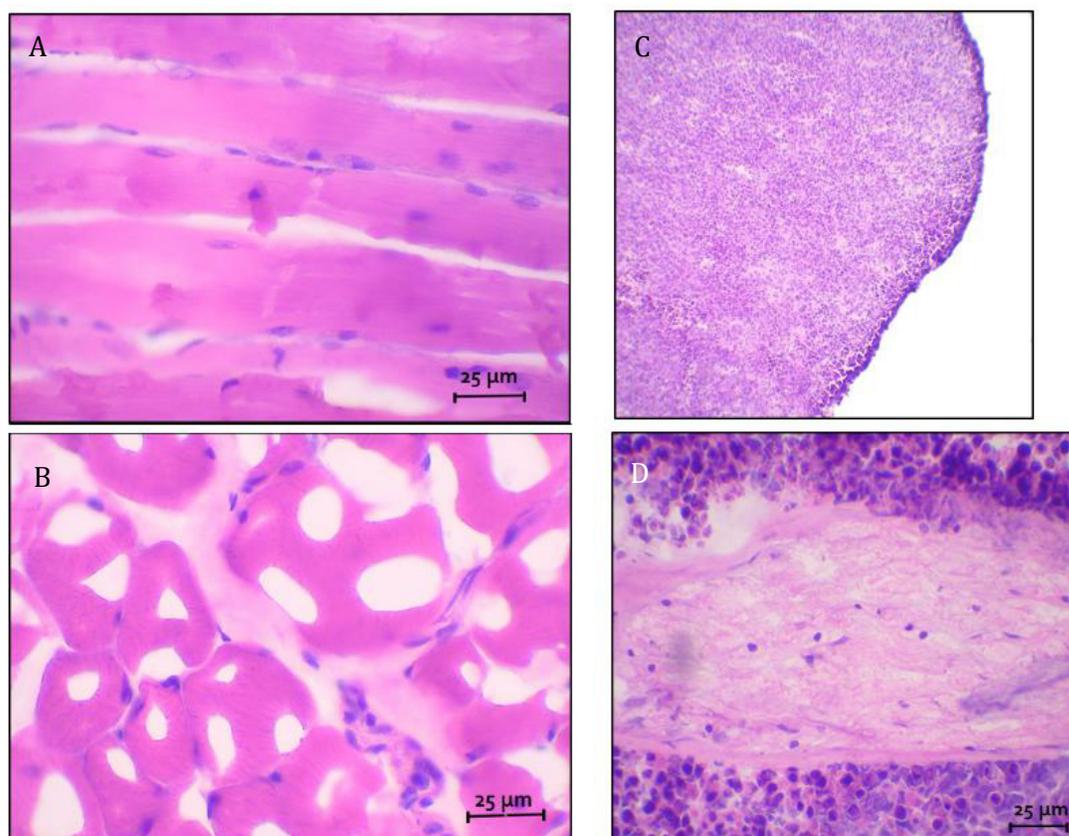


Figura 21. HYE de tejido inoculado. **A-B)** Biopsia de grupo tratado con TRAILs + IFN β . Se muestra tejido muscular íntegro, sin masa muscular visible. Presencia de infiltrado de células linfoides y polimorfonucleares. **C-D)** Biopsia de grupo sin tratamiento. El tejido se compone de células linfoides aglomeradas, con poca o nula presencia de tejido muscular.

Todos los ratones sobrevivientes no mostraban tumoración a la vista, al tacto, a la disección y solamente un ligero infiltrado de células linfoides y polimorfonucleares en el análisis microscópico (Fig. 21A-B) sugiriendo respuesta inmune activa. Por otro lado, el tejido tumoral del grupo sin tratamiento (Fig. 21C-D) muestra tejido el cual desplazó totalmente el tejido muscular y consistiendo casi completamente de células linfoides con tonalidades intensamente basófilas.

En conclusión, el tratamiento de CMM transducidas fue efectivo en el modelo de linfoma L5178Y. Todos los ratones del estudio desarrollaron tumor y ninguno fue necesario sacrificar por causas ajenas al tumor. Los tratamientos independientes y combinados mostraron efectos antitumorales alentadores, enfatizando el grupo de

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

combinación de TRAILs e IFN β , el cual mostró 62.5% de supervivencia y comparado a los tratamientos independientes de TRAILs e IFN β separados, con 50 y 25% de supervivencia respectivamente, nos demuestra un efecto aditivo al suministrarse en combinación.

Los ratones sobrevivientes no mostraron signos visibles del tumor y el análisis histopatológico demuestra un ligero infiltrado de células linfoides y polimorfonucleares, sin embargo, no es apreciable tejido tumoral. El tejido del grupo sin tratamiento se vio inmerso en células linfoides, presuntamente células de linfoma, el cual desplazó el tejido muscular en su totalidad, existiendo un contraste evidente entre las micrografías de ambas biopsias.

10. DISCUSIÓN

En este estudio demostramos que las CMM-MO y las proteínas TRAIL e IFN β son en conjunto una poderosa herramienta terapéutica para atacar linfomas. Para ello utilizamos un modelo experimental, cuyos elementos los hacen más parecido a lo que ocurre en los seres humanos con cáncer, por haber sido completamente singénico, el primero en el mundo que se implementa de esta manera.

Dichos elementos fueron los siguientes: 1) Utilizamos ratones (BALB/c) los cuales son inmunocompetentes, a diferencia de muchos otros estudios donde se utilizan animales inmunosuprimidos [49, 52, 101], 2) Utilizamos células de linfoma murino para inducir los tumores. Obtuvimos CMM-MO de ratones BALB/c, producidos en el mismo laboratorio que los ratones experimentales. 3) las CMM-MO fueron transducidas con transgenes murinos y empleamos anticuerpos monoclonales contra proteínas murinas para realizar las caracterizaciones de las CMM-MO y para identificar los productos proteicos de las CMM-MO transducidas con TRAILs, TRAILc o IFN β . Los hallazgos que reportamos en este estudio se fundamentan en los siguientes hechos:

Obtuvimos y expandimos CMM-MO, cuya extirpe fue confirmada por los siguientes criterios: 1) Estas células fueron CD90+ y CD105+ — marcadores de superficie que son característicos de las CMM, 2) Fueron capaces de diferenciarse a condrocitos o a osteoblastos, lo cual demuestra su condición de multipotencia [102]. Estos lineamientos son parte de los criterios internacionales para identificar las CMM [102, 103]. La obtención, expansión y caracterización de las CMM-MO nos permitió trabajar extensamente con ellas a lo largo de este proyecto.

Fue posible modificar las CMM genéticamente con plásmidos y con lentivirus portadores de transgenes [35] así como detectar sus productos (TRAILs, TRAILc e IFN β) mediante *Western blot*, además, Mostraron una eficiente quimiotaxis, atraídas por el medio condicionado de células L5178Y. A juzgar por nuestros

resultados de los experimentos antilinfoma *in vivo*, estas células fueron capaces de colonizar los linfomas [104].

La obtención de CMM-MO, capaces de expresar transgenes eficientemente fue crucial para el éxito de nuestro proyecto. Así que, como parte de nuestro proyecto, se analizaron las ventajas y limitaciones de los dos métodos de modificación genética más comunes: la transfección con plásmidos y la transducción viral.

La transfección es técnicamente más sencilla que la transducción. Sin embargo, las CMM por lo general son complicadas de transfectar [105]. Previamente nuestro grupo logró que CMM-MO transfectadas con IFN β y TRAIL mostraran quimiotaxis y fueran citotóxicas. Sin embargo, la intensidad de la expresión génica en estas células no fue suficiente para visualizar mediante *Western blot*, los productos proteicos de interés. Por ese motivo, en la primera fase de nuestro proyecto realizamos una serie de ajustes al método de transfección para incrementar la intensidad de la expresión génica, utilizando vectores de expresión con un promotor más fuertes (EF1- α) que el que se utilizó originalmente (de CMV). Con este propósito, se comparó la eficiencia de transfección, la citotoxicidad y la intensidad de la expresión génica de tres agentes transfectantes (Xfect transfection reagent, Lipofectamine 3000 y Turbofect), combinando diferentes volúmenes de estos agentes y cantidades de DNA de los plásmidos que nosotros diseñamos. Además, modificamos el método de transfección recomendado por el fabricante de Xfect. Así se logró identificar al agente transfectante y las condiciones de ensayo que maximizaron los tres parámetros arriba mencionados. Conjuntamos esos tres parámetros en un índice de desempeño (ID).

Con todos estos ajustes y utilizando Xfect, se obtuvo una eficiencia de transfección superior al 70% y un ID superior a esos parámetros en todas las combinaciones ensayadas [22]. Este resultado contrasta con lo reportado por Gheisari et al, quien reportó transfección de CMM con otros agentes transfectantes comerciales siendo 19.6% la eficiencia de transfección más alta (con lipofectamina 2000). Sin embargo, con todos estos ajustes no logramos

visualizar los productos proteicos de los transgenes de interés. Por este motivo decidimos continuar el desarrollo de nuestro proyecto utilizando lentivirus, para transducir a las CMM-MO. Sin embargo, la transfección sigue siendo una herramienta útil para ensayos *in-vitro*.

La transducción (como técnica) es sencilla, sin embargo, la producción de los virus requiere de un mayor entrenamiento técnico y es más laborioso, puesto que hay más elementos a considerar que los que se requieren para construir un vector plasmídico. Estos vectores fueron diseñados por nosotros y solicitamos a una casa comercial (Cyagen) la producción, el empaquetamiento y título de los vectores lentivirales. Para utilizar esos lentivirus en el desarrollo de nuestro proyecto, primero se estandarizó el método de transducción.

Encontramos que las mejores condiciones fueron infectar a las CMM-MO con una multiplicidad de infección (MOI) de dos partículas virales por célula [62] y 5 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de protamina como agente neutralizante. Con estas condiciones se obtuvo 100% de eficiencia de transducción. Dichas condiciones permitieron visualizar todas las proteínas de interés mediante *Western blot*. Por lo tanto, se optó por continuar el proyecto transduciendo a las CMM-MO con lentivirus.

Otro elemento indispensable de nuestro modelo fue la línea de linfoma murino L5178Y, la cual tiene la cualidad de inducir tumores sólidos en ratones inmunocompetentes [78, 79]. En este trabajo estandarizamos el inóculo en ratones BALB/c de 6 semanas de edad y determinamos que un inóculo de 5×10^5 células, inoculadas en el gastrocnemio, eran capaces de inducir un tumor sólido que no se reabsorbía y que permitía la supervivencia de los ratones por un tiempo suficiente para evaluar los efectos terapéuticos de las CMM-MO transducidas. En el ensayo *in vivo*, con nuestros tratamientos, los ratones sobrevivieron hasta el día 41. Mediante las condiciones arriba referidas se logró implantar los linfomas en todos los ratones que utilizamos en el experimento *in vivo*.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

Para tratar a los ratones, implantamos las CMM-MO transducidas directamente en los tumores. Este procedimiento contrasta con muchos estudios, en los que los investigadores optaron por utilizar la vía parenteral para realizar los implantes [37, 42, 106, 107]. Para evaluar el *homing* de las CMM. Sin embargo, al implantar las CMM-MO transducidas directamente en los tumores, evitamos muchas de las variables no controlables que suceden dentro de un organismo vivo. Por ejemplo, la posibilidad de que no todas las células llegaran a los tumores.

De los grupos de experimentación, el grupo sin tratamiento resultó en 100% de mortalidad, pero siendo un modelo de cáncer en ratones inmunocompetentes no habría sido sorprendente que 1 o 2 ratones sobrevivieran en dicho grupo; lo cual ocurrió en el grupo que recibió únicamente solución salina fisiológica. El inóculo constó de 100 μ L intramuscularmente; aunque no se consideró la necesidad de anestesia, si resulta muy doloroso para los ratones al momento de la inoculación por desgarre muscular, ruptura de vasos sanguíneos, etc. Estas alteraciones pudieron actuar como adyuvante causando inflamación, infiltrado de células y cicatrización que, a su vez, pudo traducirse como el 25% de sobrevivencia que observamos.

El tratamiento más efectivo se observó con el implante de CMM-MO-IFN β y CMM-MO-TRAILS (62.5% de sobrevivencia y significativamente diferente a la sobrevivencia del grupo de ratones no tratados). Aunque éste es un buen resultado, no es del todo el esperado, puesto la terapia con TRAILc (no TRAILS) Yuan et al reportó una mayor eficacia terapéutica como tratamiento independiente [62]. Este resultado podría atribuirse a la naturaleza de la proteína y la vía de administración que utilizamos en este trabajo. TRAILc es una proteína más grande que está mayormente anclada en la membrana celular (contrario a TRAILS que se encuentra en espacio extracelular) y está presente en la cara externa de la membrana plasmática. Esta propiedad requiere de contacto célula-célula para ejercer la acción apoptótica; hay reportes que indican que el contacto célula-célula es muy factible al administrarse vía parenteral, lo que permitiría una dispersión

uniforme en toda la masa tumoral, sin embargo, en nuestro trabajo inoculamos directamente al tumor, delimitando su función antitumoral a una sección local y relativamente pequeña. TRAILs e IFN β son secretables y pueden ejercer función paracrina.

El TRAIL como terapia en CMM fue abordado inicialmente por Loebinger et al [108] y evaluado en diversos modelos de cáncer (pulmón, mama y células escamosas) y Studeny et al [42] abordó IFN β en un modelo de melanoma. Ambos reportes son pioneros con buenos resultados, sin embargo, este estudio es el primero en combinar ambas proteínas en un solo tratamiento con resultados alentadores. Quan Chen et al identificó una interacción entre TRAIL e IFN β desde el 2001, sin embargo este trabajo se limitó a ensayos *in vitro* en un modelo de melanoma [109].

Hasta el día 38 del estudio *in vivo* se midieron y pesaron los ratones. El peso de los ratones en un ensayo de inducción de tumor puede resultar en un decremento importante en pocos días, este decremento debe seguirse y evitar que sobrepase 20% del peso del ratón debido a que, por razones éticas, el ratón se debe someter a eutanasia. El decremento del peso puede ser debido a un estado de caquexia por sobreproducción de TNF α que es típico en cuadros inflamatorios crónicos, o bien, los tumores causan mucho malestar y dolor en los ratones, en ocasiones, por el tamaño del tumor, están físicamente impedidos de alcanzar su alimento o agua. Es importante puntuar que ningún ratón perdió peso a lo largo del estudio, por lo tanto, no fue necesario excluir a ningún ratón de nuestro estudio.

Los ratones que presentaran signos intensos de malestar y dolor los cuales se enlistan como pelo erizado, ojos tiesos, orejas bajas, inactividad y baja reacción de estímulos, deben ser sometidos a eutanasia, según los criterios de Langford [100]. Aquellos ratones que presentaron todos estos síntomas se sacrificaron, para evitarle mayores sufrimientos. Cabe enfatizar que estos criterios se aplicaron estrictamente, puesto que el estudio dependía precisamente de analizar la sobrevivencia.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

Todos los ratones que sobrevivieron hasta el día 41 (día de su sacrificio) redujeron el tamaño de sus tumores hasta ser éstos imperceptibles. Los cortes teñidos con hematoxilina y eosina mostraron en las biopsias de tumores, casi únicamente células no musculares, sin estructura. En los ratones sobrevivientes, en cambio se observaron claramente fibras musculares bien organizadas con núcleos bien definidos y algunas células linfoides y células polimorfonucleares, lo cual indica la presencia de un proceso inflamatorio moderado. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de algunas células linfoides en el tejido muscular, porque no se distinguen entre las células sanas y las tumorales. Entonces, existe la posibilidad de que el linfoma se reactive, aunque sería muy conveniente analizar la presencia de células de linfoma con técnicas específicas de inmunocitoquímica.

11. CONCLUSIONES

1. Se confirmó el linaje de las CMM que extrajimos de médula ósea mediante la identificación de marcadores de superficie y su capacidad de diferenciación.
2. Las CMM mostraron un tropismo positivo (quimiotaxis) hacia medio condicionado, 11% superior que el control positivo (medio con 30% de SFB) y es dependiente de la concentración (30% menos migración al diluir 1:2 el medio condicionado).
3. Los vectores plasmídicos de expresión se construyeron correctamente y esto se confirmó mediante el análisis del patrón de bandas en electroforesis de agarosa.
4. Las CMM se transfectaron con dichos vectores obteniendo hasta 86.1% de eficiencia de transfección con el método modificado en nuestro laboratorio empleando Xfect transfection reagent (Clontech) sin un aumento significativo en la toxicidad.
5. Los vectores plasmídicos resultaron insatisfactorios para identificar las proteínas de interés mediante Western Blot.
6. Los vectores lentivirales lograron 100% de eficiencia de transducción con una MOI de 2 con 5 μ g/mL de sulfato de protamina.
7. Los transgenes transducidos fueron TRAIL soluble, TRAIL completo e IFN β ; todos fueron identificables mediante Western Blot.
8. El inóculo para inducir un tumor estable con la línea tumoral de linfoma murino L5178Y fue de 5×10^5 células inoculadas intramuscularmente.
9. El 100% de los ratones en el estudio desarrollaron un tumor con dichas condiciones.
10. Ningún ratón fue sacrificado por motivo de pérdida de peso, pero se sometieron a eutanasia si se detectaban con intenso sufrimiento.
11. El 100% de los ratones inoculados con células L5178Y y que no fueron tratados murieron a los 41 días postinoculación

12. El tratamiento combinado de TRAIL soluble con IFN β resultó en 62.5% de supervivencia al día 42, representando un efecto aditivo comparado al tratamiento independiente de TRAIL soluble (50%) y de IFN β (25%).
13. Nuestros resultados apoyan nuestra hipótesis.

12. PERSPECTIVAS

- 1.- Realizar un experimento sobre la actividad antitumoral de las CMM-MO-IFN β y CMM-MO-TRAILs, similar al que presentamos aquí, con un mayor tamaño de muestra y con un tiempo de espera suficiente para conocer el tiempo de supervivencia de los ratones tratados con las células modificadas genéticamente.
- 2.- Realizar un ensayo inoculando las CMM-MO-IFN β y CMM-MO-TRAILs en la vena caudal en animales con metástasis. El *homing* es una cualidad de las CMM y es importante conocer la eficacia terapéutica de la combinación de CMM-MO-IFN β y CMM-MO-TRAILs, inoculadas vía endovenosa, sobre todo para conocer la eficacia de este tratamiento contra metástasis.
- 3.- Además de TRAILc, TRAILs e IFN β , investigar la eficacia terapéutica de otros transgenes que codifiquen para factores proteicos con actividad antitumoral. Una de nuestras mejores conclusiones es que es posible lograr un efecto aditivo con estas células y vale la pena comprobar nuevas combinaciones.
- 4.- Realizar tratamientos con exosomas en vez de CMM completas. Este abordaje representa un paso adelante en la terapia con células madre debido a que dichos exosomas contienen muchos elementos que se le atribuyen las funciones inherentes a las CMM, adicionalmente, estos exosomas contienen las proteínas secretadas por modificación genética.

12. REFERENCIAS

1. **About cancer** [<https://www.cancer.gov/about-cancer>]
2. Cooper GMHRE: **El cáncer**. In *La célula*. 6ta edició. Marbán; 2010:631–632.
3. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A: **Cancer Statistics , 2014**. 2014, **64**:9–29.
4. Hanahan D: **Rethinking the war on cancer**. *Lancet* 2014, **383**:558–563.
5. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer**. *Cell* 2000, **100**:57–70.
6. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation**. *Cell* 2011, **144**:646–74.
7. Kumar Vinay, Abbas Abul, Faustro Nelson AJ: *Patología Estructural y Funcional de Robbins y Cotran*. 8th edition. Elsevier; 2010.
8. Ottensmeier C: **The classification of lymphomas and leukemias**. *Chem Biol Interact* 2001, **135–136**:653–664.
9. **Estimated cancer incidence, mortality and prevalence in 2012**
10. **Estimated incidence and prevalence, adult population: Male, México**
11. **Estimated incidence and prevalence, adult population: female, México**
12. **Estadísticas de gestión en Nuevo León. 2009-2015**
[http://www.saludnl.gob.mx/drupal/sites/default/files/Estadísticas de Gestión_WEB.pdf]
13. Rogers BB: **Overview of Non-Hodgkin's Lymphoma**. *Semin Oncol Nurs* 2006, **22**:67–72.
14. Kasamon YL, Swinnen LJ: **Treatment advances in adult Burkitt lymphoma and leukemia**. *Curr Opin Oncol* 2004, **16**:429–435.
15. Yung L, Linch D: **Hodgkin's lymphoma**. *Lancet (London, England)* 2003, **361**:943–51.
16. Lara-Torres C, Ortiz-hidalgo C: **Diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico del linfoma de Hodgkin y su diagnóstico diferencial**. 2009, **47**:35–45.
17. Nogai H, Dörken B, Lenz G: **Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma**. *J Clin Oncol* 2011, **29**:1803–1811.
18. **About radiotherapy** [http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/radiotherapy/about?_ga=2.87469532.596638489.1509986228-

374525719.1509986228]

19. Hendijani F: **Human mesenchymal stromal cell therapy for prevention and recovery of chemo/radiotherapy adverse reactions.** *Cytotherapy* 2015, **17**:509–525.
20. Johnstone RW, Ruefli A a., Lowe SW: **Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy.** *Cell* 2002, **108**:153–164.
21. Garza-Treviño EN, Said-Fernández SL, Martínez-Rodríguez HG: **Understanding the colon cancer stem cells and perspectives on treatment.** *Cancer Cell Int* 2015, **15**:2.
22. Carlos-González-Villarreal, Herminia Guadalupe Martínez-Rodríguez SS-F: **How desirable and undesirable features of naïve or genetically reengineered mesenchymal stem cells are being considered in preclinical or clinical assays.** *Jbuon* 2017, **22**:812–830.
23. Kang S-G, Jeun SS, Lim JY, Kim SM, Yang YS, Oh W II, Huh P-W, Park CK: **Cytotoxicity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against human malignant glioma cells.** *Childs Nerv Syst* 2008, **24**:293–302.
24. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P: **Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.** *Cell* 2003, **114**:763–776.
25. Kovacic JC, Muller DWM, Harvey R, Graham RM: **Update on the use of stem cells for cardiac disease.** *Intern Med J* 2005, **35**:348–356.
26. Ben-David U, Benvenisty N: **The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells.** *Nat Rev Cancer* 2011, **11**:268–277.
27. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB: **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.** *J Cell Sci* 2006, **119**(Pt 11):2204–2213.
28. Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazlewood C, Jones B, Kambouris M, Kollar K, McTaggart S, Pelekanos R, Rice A, Rossetti T, Atkinson K: **Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells.** *Semin Cell Dev Biol* 2007, **18**:846–858.
29. Karp JM, Leng Teo GS: **Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:206–216.
30. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F: **Concise review: Dissecting a**

discrepancy in the literature: Do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* 2011, **29**:11–19.

31. Dai L-J, Moniri MR, Zeng Z-R, Zhou JX, Rayat J, Warnock GL: **Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy.** *Cancer Lett* 2011, **305**:8–20.

32. Chen S, Fang W, Ye F, Liu Y-H, Qian J, Shan S, Zhang J, Chunhua RZ, Liao L, Lin S, Sun J: **Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial IFNarction.** *Am J Cardiol* 2004, **94**:92–95.

33. Qu C, Mahmood A, Lu D, Goussev A, Xiong Y, Chopp M: **Treatment of traumatic brain injury in mice with marrow stromal cells.** *Brain Res* 2008, **1208**:234–9.

34. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, Selig M, Godwin J, Law K, Placidi C, Smith RN, Capella C, Rodig S, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH, Abdi R: **Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes.** *J Immunol* 2009, **183**:993–1004.

35. Hamada H, Kobune M, Nakamura K, Kawano Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y: **Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy.** *Cancer Sci* 2005, **96**:149–156.

36. Zischek C, Niess H, Ischenko I, Conrad C, Huss R, Jauch K-W, Nelson PJ, Bruns C: **Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma.** *Ann Surg* 2009, **250**:747–753.

37. Ahn J, Coh Y, Lee H, Shin I, Kang S, Youn H: **Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit Melanoma Growth In Vitro and In Vivo.** 2015, **168**:159–168.

38. Mathonnet M, Perraud A, Christou N, Akil H, Melin C, Battu S: **Hallmarks in colorectal cancer: Angiogenesis and cancer stem-like cells.** *World J Gastroenterol* 2014, **20**:4189–4196.

39. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, Battula VL, Weil M, Andreeff M, Marini FC: **Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging.** *Stem Cells* 2009, **27**:2614–2623.

40. Hong I-S, Lee H-Y, Kang K-S: **Mesenchymal stem cells and cancer: Friends or enemies?** *Mutat Res* 2014, **768**:1–9.
41. Corsten MF, Shah K: **Therapeutic stem-cells for cancer treatment: hopes and hurdles in tactical warfare.** *Lancet Oncol* 2008, **9**:376–384.
42. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M: **Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors.** *Cancer Res* 2002, **62**:3603–3608.
43. Klopp AH, Spaeth EL, Dembinski JL, Woodward W a., Munshi A, Meyn RE: **Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment.** *Cancer Res* 2007, **67**:11687–11695.
44. Loebinger MR, Janes SM: **Stem cells as vectors for antitumour therapy.** *Thorax* 2010, **65**:362–369.
45. Ren C, Kumar S, Chanda D, Chen J, Mountz JD, Ponnazhagan S: **Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon-alpha in a mouse melanoma lung metastasis model.** *Stem Cells* 2008, **26**:2332–2338.
46. Xiao S, Li D, Zhu H-Q, Song M-G, Pan X-R, Jia P-M, Peng L-L, Dou A-X: **RIG-G as a key mediator of the antiproliferative activity of interferon-related pathways through enhancing p21 and p27 proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:16448–16453.
47. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H: **Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model.** *Gene Ther* 2004, **11**:1155–1164.
48. Chen X, Lin X, Zhao J, Shi W, Zhang H, Wang Y, Kan B, Du L, Wang B, Wei Y, Liu Y, Zhao X: **A tumor-selective biotherapy with prolonged impact on established metastases based on cytokine gene-engineered MSCs.** *Mol Ther* 2008, **16**:749–756.
49. Xin H, Kanehira M, Mizuguchi H, Hayakawa T, Kikuchi T, Nukiwa T, Saijo Y: **Targeted delivery of CX3CL1 to multiple lung tumors by mesenchymal stem cells.** *Stem Cells* 2007, **25**:1618–1626.
50. Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: **Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy.** *J Gene Med* 2008, **10**:610–618.

51. Kucerova L, Matuskova M, Pastorakova A, Tyciakova S, Jakubikova J, Bohovic R, Altanerova V, Altaner C: **Cytosine deaminase expressing human mesenchymal stem cells mediated tumour regression in melanoma bearing mice.** *J Gene Med* 2008, **10**:610–618.
52. Kanehira M, Xin H, Hoshino K, Maemondo M, Mizuguchi H, Hayakawa T: **Targeted delivery of NK4 to multiple lung tumors by bone marrow-derived mesenchymal stem cells.** *Cancer Gene Ther* 2007, **14**:894–903.
53. Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili M a, Curiel DT, Pereboeva L: **Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses.** *Mol Cancer Ther* 2006, **5**:755–766.
54. Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, Janes SM: **Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer.** *Cancer Res* 2009, **69**:4134–4142.
55. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK: **Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.** *Immunity* 1995, **3**:673–682.
56. Pitti RM, Marsters S a., Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A: **Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family.** *J Biol Chem* 1996, **271**:12687–12690.
57. Wang S, El-Deiry WS: **TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors.** *Oncogene* 2003, **22**:8628–8633.
58. Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley RF, Ashkenazi A, de Vos AM: **Triggering Cell Death.** *Mol Cell* 1999, **4**:563–571.
59. Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P: **TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:241–243.
60. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan a M, Gentz R, Ebner R, Ni J: **The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL.** *Science* 1997, **276**(April):111–113.
61. Sheridan JP, Marsters S a, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D: **Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors.** *Science* 1997, **277**:818–821.
62. Yuan Z, Kolluri KK, Sage EK, Gowers KHC, Janes SAMM: **Mesenchymal stromal**

cell delivery of full-length tumor necrosis factor e related apoptosis-inducing ligand is superior to soluble type for cancer therapy. *J Cytotherapy* 2015, **17**:885–896.

63. Plataniias LC: **Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling.** *Nat Rev Immunol* 2005, **5**:375–386.

64. Pestka S, Langer JA: **Interferons and their Actions.** *Annu Rev Biochem* 1987, **56**:727–777.

65. Mack GS: **Cancer researchers usher in dog days of medicine.** *Nat Med* 2005, **11**:1018.

66. Rosol TJ, Tannehill-Gregg SH, LeRoy BE, Mandl S, Contag CH: **Animal models of bone metastasis.** *Cancer* 2003, **97**:748–757.

67. Griffith TS, Stokes B, Kucaba T a, Earel JK, VanOosten RL, Brincks EL, Norian L a: **TRAIL gene therapy: from preclinical development to clinical application.** *Curr Gene Ther* 2009, **9**:9–19.

68. Frese KK, Tuveson DA: **Maximizing mouse cancer models.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**:654–658.

69. Kendall SD, Adam SJ, Counter CM: **Genetically Engineered Human Cancer Models Utilizing Mammalian Review ND ES SC INTRODUCTION.** *Cell Cycle* 2006, **5**:1074–1079.

70. Sharkey FE, Fogh J: **Considerations in the use of nude mice for cancer research.** *Cancer Metastasis Rev* 1984, **3**:341–360.

71. Welch DR: **Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo.** *Int J Cancer* 1997, **72**:1–22.

72. Sikder H, Huso DL, Zhang H, Wang B, Ryu B, Hwang ST, Powell JD, Alani RM: **Disruption of Id1 reveals major differences in angiogenesis between transplanted and autochthonous tumors.** *Cancer Cell* 2003, **4**:291–299.

73. Mestas J, Hughes CCW: **Of mice and not men: differences between mouse and human immunology.** *J Immunol* 2004, **172**:2731–2738.

74. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein L V, Venditti JM, Schepartz S, Kalyandrug S, Christian M, Arbuck S, Hollingshead M, Sausville E a: **Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical**

- trials. *Br J Cancer* 2001, **84**:1424–1431.
75. Teicher B a: **Tumor models for efficacy determination.** *Mol Cancer Ther* 2006, **5**:2435–2443.
76. Beer JZ, Budzicka E, Niepokojczycka E, Rosiek O, Szumiel I, Walicka M: **Loss of tumorigenicity with simultaneous changes in radiosensitivity and photosensitivity during in vitro growth of L5178Y murine lymphoma cells.** *Cancer Res* 1983, **43**(October):4736–4742.
77. Liechty MC, Rauchfuss HS, Lugo MH, Hozier JC: **Sequence analysis of tka(-)-1 and tkb(+)-1 alleles in L5178Y tk+/- mouse-lymphoma cells and spontaneous tk-/- mutants.** *Mutat Res* 1993, **286**:299–307.
78. Stephens T, Smith M, Waterman S, McCloskey M, Jackman A, Boyle F: **Use of murine L5178Y lymphoma thymidine kinase mutants for in vitro and in vivo antitumour efficacy evaluation of novel thymidylate synthase inhibitors.** 1993:589–592.
79. Orozco-barocio A, Paniagua-domínguez BL, Alberto P, Flores-torales E, Velázquez-magaña S, Nava JA: **Cytotoxic effect of the ethanolic extract of Lophocereus Schottii: A mexican medicinal plant.** 2013, **10**:397–404.
80. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K: **Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.** *Stem Cells* 2006, **24**:1294–1301.
81. Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F: **Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow.** *Exp Cell Res* 2004, **295**:395–406.
82. Nadri S, Soleimani M, Hosseni RH, Massumi M, Atashi A, Izadpanah R: **An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells.** *Int J Dev Biol* 2007, **51**:723–9.
83. Recillas-Targa F: **Multiple Strategies for Gene Transfer, Expression, Knockdown, and Chromatin Influence in Mammalian Cell Lines and Transgenic Animals.** *Mol Biotechnol* 2006, **34**:337–354.
84. Schenborn, Goiffon: **DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells.**

Methods Mol Biol (Clifton, NJ) 2000, **130**:147–153.

85. Kim TK, Eberwine JH: **Mammalian cell transfection: The present and the future.** *Anal Bioanal Chem* 2010, **397**:3173–3178.

86. Pfeifer A, Verma IM: **GENE THERAPY: Promises and Problems.** *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001, **2**:177–211.

87. Cronin J, Zhang X-Y, Reiser J: **Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping.** *Curr Gene Ther* 2005, **5**:387–398.

88. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L: **A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system.** *J Virol* 1998, **72**:8463–71.

89. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D: **Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery.** *J Virol* 1998, **72**:9873–80.

90. Woods NB, Muessig A, Schmidt M, Flygare J, Olsson K, Salmon P, Trono D, Von Kalle C, Karlsson S: **Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: Risk of insertional mutagenesis.** *Blood* 2003, **101**:1284–1289.

91. JA Borrego Terrazas: *Células Madre Humanas Modificadas Genéticamente Para Expresar TRAIL e Interferon Beta Con Efecto Antitumoral in Vitro.* 2014.

92. Yan C, Li S, Li Z, Peng H, Yuan X, Jiang L, Zhang Y, Fan D, Hu X, Yang M, Xiong D: **Human umbilical cord mesenchymal stem cells as vehicles of CD20-specific TRAIL fusion protein delivery: A double-target therapy against non-Hodgkin's lymphoma.** *Mol Pharm* 2013, **10**:142–151.

93. Kim MH, Billiar TR, Seol DW: **The secretable form of trimeric TRAIL, a potent inducer of apoptosis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **321**:930–935.

94. Kim C-Y, Jeong M, Mushiake H, Kim B-M, Kim W-B, Ko JP, Kim M-H, Kim M, Kim T-H, Robbins PD, Billiar TR, Seol D-W: **Cancer gene therapy using a novel secretable trimeric TRAIL.** *Gene Ther* 2006, **13**:330–338.

95. Tannous B a., Kim DE, Fernandez JL, Weissleder R, Breakefield XO: **Codon-optimized gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and**

in vivo. *Mol Ther* 2005, **11**:435–443.

96. Li X, Sui X, Zhang Y, Sun Y, Zhao Y, Zhai Y, Wang Q: **An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells.** *African J Biotechnol* 2010, **9**:8549–8554.

97. Russell, R.W.Sambrook J: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition. N.Y.: Cold spring harbor laboratory press; 2001.

98. Pittenger MF: **Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells.** *Science (80-)* 1999, **284**:143–147.

99. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ: **Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells.** *Proc Natl Acad Sci* 2001, **98**:7841–7845.

100. Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, LaCroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS: **Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse.** *Nat Methods* 2010, **7**:447–449.

101. Gao P, Ding Q, Wu Z, Jiang H, Fang Z: **Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma.** *Cancer Lett* 2010, **290**:157–166.

102. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM: **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy* 2006, **8**:315–317.

103. Farbod Rastegar T-CH: **Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications.** *World J Stem Cells* 2010, **2**:67.

104. Karp JM, Leng Teo GS, Teo GSL: **Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details.** *Stem Cell* 2009, **4**:206–216.

105. Gheisari Y, Soleimani M, Azadmanesh K, Zeinali S: **Multipotent mesenchymal stromal cells: optimization and comparison of five cationic polymer-based gene delivery methods.** *Cytotherapy* 2008, **10**:815–823.

106. Prantl L, Muehlberg F, Navone NM, Song Y-H, Vykoukal J, Logothetis CJ, Alt EU: **Adipose tissue-derived stem cells promote prostate tumor growth.** *Prostate* 2010, **70**(May):1709–1715.
107. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J: **Human Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Gliomas.** *Cancer Res* 2005, **65**:3307–3318.
108. Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, Janes SM: **Mesenchymal Stem Cell Delivery of TRAIL Can Eliminate Metastatic Cancer.** *Cancer Res* 2009, **69**:4134–4142.
109. Chen Q, Gong B, Mahmoud-Ahmed AS, Zhou A, Hsi ED, Hussein M, Almasan A: **Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma.** *Blood* 2001, **98**:2183–2192.
110. Qin JY, Zhang L, Clift KL, Hular I, Xiang AP, Ren BZ, Lahn BT: **Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter.** *PLoS One* 2010, **5**:3–6.

ANEXO 1. LISTA DE REACTIVOS

- **Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY 14072, USA.**
 - DMEM-F12-glutamax®
 - Gentamicina (10 mg/mL)
 - Anfotericina B (250 mg/mL)
 - Glutamina (200 nM)
 - Tripsina-EDTA 0.25% (1x)
 - Geneticina 50 mg/mL
 - Pluronic® F-68 10%
 - Optimem
 - Azul tripano
- **J.T. Baker, Center Valley, Pennsylvania, USA**
 - Acetona ACS
 - Formaldehido 38%
- **Corning, NY 14831, USA**
 - DMEM Alta glucosa
 - Suero Fetal Bovino
- **New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA**
 - EcoRI - HF (10,000 U)
 - NotI- HF (500 U)
 - PstI (200 U)
- **ATCC, Manassas, Virginia 20110, USA**
 - Dimetil Sulfóxido grado cultivo celular
- **Vector Laboratories, Inc. Burlingame, California, USA**
 - DAPI mounting medium
- **Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA**
 - Turbofect®
- **Invitrogen, Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA**
 - Zeocina 100 mg/mL
 - Lipofectamine 3000®
 - TEMED (N,N,N',N' Tetrametiletilendiamino)
 - Agarosa Ultrapura
- **Sigma-Aldrich Co.**
 - Agar Luria-Bertani (LB) polvo
 - Caldo Luria-Bertani (LB) polvo
 - Sodio Dodecil Sulfato (SDS)
 - Ampicilina anhidra en polvo
 - Sulfato de protamina- sal de salmón
 - Acrilamida
 - Tris Base
 - Tween 20x
 - Tween 100x

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan
TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

- Etanol grado molecular
- Metanol grado ACS
- Colorante cristal violeta en polvo
- Coctel de Inhibidor de proteasas
- **Peptech, Rocky Hill, NJ, USA**
 - TRAIL soluble de ratón recombinante
- **Merck, Darmstadt, Alemania**
 - IFN β de ratón recombinante
- **Clontech, Takara, Mountain View, California, USA**
 - Xfect® transfection reagent
- **Bio Rad, Hercules, California, USA**
 - Protein Dual Color standard
 - Clarity Western ECL substrate (Luminol)
- **Bioline USA Inc, Constitution Drive Tauton, MA**
 - Hyperladder 1000 pb (Marcador de peso molecular para DNA)
 - Quick-stick ligase
- **Jalmek, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México**
 - Etanol grado ACS
 - Ácido acético glacial
 - Glicerina
 - Azul de bromofenol (polvo)
- **Abcam, Burlingame, California, USA**
 - Anticuerpo anti-TRAIL de ratón (obtenido de conejo)
 - Anticuerpo anti-IFN β de ratón (obtenido de conejo)
- **Promega, Madison, Wisconsin, USA**
 - Anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP.

ANEXO 2. CONSUMIBLES

- **Corning, NY, USA**
 - Microtubos para microcentrífuga de polipropileno de 0.2, 0.6 y 1.5 mL
 - Tubos de polipropileno cónicos de 15 y 50 mL
 - Botellas de cultivo de tapa ventilada de rosca tratadas para adhesión celular de 25 y 75 cm²
 - Puntas para pipeta automática de 20, 200 y 1000 μ L
 - Placas de cultivo de 60 mm x 15 mm
 - Placa de cultivo de 6 pozos
 - Placa de cultivo de 24 pozos
 - Placa de cultivo de 96 pozos
 - Placa de superficie negra (para fluorescencia) de 96 pozos
 - Placas Transwell® de 24 pozos (12 filtros) de 0.8 μ m de poro
 - Placas Transwell® de 24 pozos (12 filtros) de 0.3 μ m de poro
- **Fisherbrand, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA**
 - Cubreobjetos redondos
- **Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA**
 - Cámaras de cultivo sobre laminilla Lab-tek® Nunc
 - Pipetas de transferencia de plástico
 - Cubreobjetos redondos de borosilicato de 12 mm
 - Portaobjetos Superfrost® Plus
- **Pall, Port Washington, New York, USA**
 - Filtro de jeringa Acrodisc® de 0.2 μ m de poro
- **Bio Rad, Hercules, California, USA**
 - Membrana de PVDF para Western Blot
- **Becton-Dickinson and company, Franklin Lakes, NJ, USA**
 - Placas de Petri 100 mm
 - Jeringa de insulina calibre 26g
 - Jeringa de plástico sin aguja de 5, 10 y 20 mL

ANEXO 3. EQUIPO

1. **Microscopio de epifluorescencia**, Marca Nikon, Modelo Eclipse 50i, montado con cámara digital Sight DS-2MV. Software ENIS-Elements B12 Modelo 2.30.
2. **Microscopio invertido**, Marca Velab, Modelo VE-403.
3. **Microscopio de campo claro**, Marca Leica, Modelo DM IL LED, con cámara DFC295. Wetzlar, Alemania.
4. **Lector de placas**, Marca Biotek, Modelo Cytation 3M. Winooski, Vermont, USA.
5. **Centrífuga refrigerada**, Marca Eppendorf, Modelo 5403. Hauppauge, NY, USA.
6. **Microcentrífuga refrigerada**, Marca Labnet, Modelo Prismr. Edison, NJ, USA.
7. **Centrífuga clínica**, Marca Dynac. Modelo 420101. Sparks, MD, USA.
8. **Microcentrífuga**, Marca Eppendorf. Modelo 5415c. Hauppauge, NY, USA.
9. **Vortex Mixer**, Marca American Scientific Products. Modelo 58223-1.
10. **Incubadora para cultivo celular**, inyección de CO₂, water jacketed, Marca Panasonic, Sanyo, Modelo MCO-20IAC. Gunma, Japón.
11. **Campaña de flujo laminar clase II**. Marca Labconco, Modelo 36212-04, Kansas, Missouri, USA.
12. **Balanza semianalítica**, Marca Ohaus, Modelo Adventurer-Pro. Parsippany, NJ, USA.
13. **Potenciómetro**, Marca Thermo Scientific, Modelo Orion 310. Waltham, Massachusetts, USA
14. **Placa de calentamiento y agitación**, Marca Cimarec. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.
15. **Baño de agua**, Marca Precision, Modelo Waterbath 182.
16. **Agitador oscilatorio**, Marca Benchmark, Modelo Blotboy. Edison, NJ, USA.
17. **Ultracongelador**, Marca Panasonic, Panasonic-Healthcare Modelo MDF-U33V-PA. Wood Dale, Illinois, USA.
18. **Fuente de poder para electroforesis**, Marca BioRad, Modelo Power-Pac 200. Hercules, California, USA.
19. **Cámara de electroforesis vertical**. Marca BioRad Hercules, California, USA.
20. **Cámara de electroforesis horizontal**. Marca Thermo Scientific.
21. **Foto documentador**, Marca Biorad, Modelo ChemiDoc XRS+. Hercules, California, USA.

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

22. **Rack y jaulas para ratones.** Lab&Bio, Corea.
 23. **Criostato,** Marca Roundfin, Modelo 2230, Shenyang, China.

ANEXO 4. SOLUCIONES

Solución	Componentes
PBS (10x)	25.6 g Na ₂ HPO ₄ - 7H ₂ O 80 g NaCl 2 g KCl 2 g KH ₂ PO ₄ Aforar a 1 L de H ₂ O
Buffer de carga (SDS PAGE)	4.7 mL H ₂ O 0.5 Tris-HCl 1M pH 6.8 (6.5 mM) 0.8 mL Glicerol 2% SDS 5% β -Mercaptoetanol 0.001% azul de bromofenol Alicuotar y guardar a -20°C sin exponer a la luz.
Buffer Concentrador (SDS PAGE)	7.57 g Tris Base 0.5 g SDS 225 mL H ₂ O Ajustar pH a 6.8 con HCl y aforar a 250 mL.
Buffer Separador (SDS PAGE)	22.7 g Tris Base 0.5 g SDS 200 mL H ₂ O Ajustar pH a 8.8 con HCl y aforar a 250 mL.
TBST (1x)	2.4 g Tris Base 8 g NaCl 950 mL de H ₂ O Ajustar pH a 7.6 y aforar a 1000 mL
Buffer de Corrida (10x)	30 g Tris Base 144 g Glicina 10 g SDS Aforar a 1000 mL
Buffer de Transferencia (5x)	14.5 g Glicina 29 g Tris Base Aforar a 800 mL y conservar a 4°C Agregar Metanol (concentración final 20%) antes de uso.
Cristal Violeta para tinción de migración	Cristal Violeta al 0.5% H ₂ O:Metanol (80:20)
Cloruro de calcio (Calcio competentes)	CaCl 75 mM 15% glicerol Preparar en H ₂ O
Medio DMEM-F12-Glutamax Suplementado	10% SFB (15% en cultivo primario) (2 nM de glutamina en cultivo primario) 100 μ g/mL gentamicina 2.5 μ g/mL anfotericina B
Sulfato de protamina (1000x)	5 mg/mL en H ₂ O
Ampicilina (1000x)	50 mg/mL en H ₂ O
Medio DMEM Alta glucosa suplementado	10% SFB

Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma

	<p>100 μg/mL gentamicina 2.5 μg/mL anfotericina B 0.1% Pluronic® F68</p>
Solución de Carnoy	<p>Etanol:Cloroformo:Ácido acético glacial 6:3:1</p>
TAE (10x)	<p>48.4 g Tris Base 11.4 mL ácido acético glacial 3.7 g EDTA sal disodio Aforar a 1000 mL</p>
Solución de azul alciano	<p>Azul alciano acuoso al 1% en H₂O_d Ácido acético al 1% em H₂O_d Filtrar y agregar timol (conservador)</p>
Solución saturada de carbonato de litio	<p>Agregar compuesto sólido en H₂O hasta observar sedimento sin disolverse</p>
Solución de Nitrato de plata 5%	<p>5 g de Nitrato de plata Aforar a 100 mL de H₂O bd</p>
Solución de tiosulfato de sodio al 5%	<p>5g Tiosulfato o hiposulfito de sodio Aforar a 100 mL de H₂O_{bd}</p>
Solución de rojo neutro 1%	<p>1 g rojo neutro Aforar a 100 mL en H₂O_d</p>
Hematoxilina de Gill	<p>730 mL H₂O 250 mL Etilenglicol 2.0 g Hematoxilina anhidra (polvo) (2.6 g si es en cristales) 0.2 g Yodato de sodio 17.6 g Sulfato de aluminio 2.0 mL ácido acético glacial</p>
Solución de rojo oleoso	<p>Preparar Isopropanol al 99% en H₂O_d Agregar polvo del colorante lentamente hasta apreciar un sedimento no miscible. (Esta solución se prepara al momento de usar y se mezcla la mezcla con 2 partes de H₂O_d y se filtra)</p>
Gelatina glicerinada (medio de montaje acuoso) para rojo oleoso	<p>7 g Gelatina pura en polvo 42 mL H₂O_d 50 mL Glicerina 1 g fenol. Proceso en caliente con baño maría, fenol se agrega al final lentamente en calor para filtrar.</p>

RESUMEN BIOGRÁFICO

M.C. Carlos Alberto González Villarreal

Candidato para el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Biología molecular e Ingeniería Genética.

Tesis: Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFN β en un Modelo Murino de Linfoma.

Campo de Estudio: Biología Molecular.

Datos personales: Nacido en Monclova, Coahuila, México el 1ro de septiembre de 1986.

Hijo de José Arturo González Elizondo y Sonia Marybell Villarreal Elizondo.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina en el año 2010 con el grado de Químico Clínico Biólogo y en el año 2013 de la Facultad de Medicina con el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Experiencia Profesional.

2013-2014.- Asesor comercial y técnico. Productos y Equipos biotecnológicos S.A de C.V.

2011.- Químico Analista. Hospital Universitario "José Eleuterio González".

2006.- Técnico laboratorista. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento y Servicio de Microbiología, Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas.

2009-2010.- Servicio social. Departamento y servicio de Inmunología, Facultad de Medicina.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR

1.- C.A. González-Villarreal, S.L. Said-Fernández, H.G. Martínez-Rodríguez. **How desirable and undesirable features of naïve or genetically reengineered mesenchymal stem cells are being considered in preclinical or clinical assays.** JBUON 2017, 22(4): 812-830. Primer autor. Publicado.

2.- C.A. González-Villarreal, S.L. Said-Fernández, H.G. Martínez-Rodríguez et al. **Bone marrow mesenchymal stem cells: Improving transgene expression level, transfection efficiency and viability.** JBUON 2018, Primer autor. Publicado.

3.- Presentación de cartel. **"Un método eficiente de transfección de Células Madre Mesenquimales derivadas de médula ósea: comparación de dos reactivos"**. Congreso Nacional de Investigación Biomédica 2017. UANL. Cintermex, Monterrey, NL. México. Octubre 2017.

4. Presentación oral. **"Expresión y detección de las proteínas TRAIL e Interferón β en células madre mesenquimales de ratón transducidas con lentivirus recombinantes"**. Congreso Nacional de Investigación Biomédica 2017. UANL. Cintermex, Monterrey, NL. México. Octubre 2017.

En proceso de escritura.

1. C.A. González-Villarreal, Martínez-Rodríguez Herminia, Said-Fernández Salvador. et al. **A combined treatment of TRAIL and IFN β carried by Mesenchymal stem cells has an additive tumor reducing effect: A murine lymphoma model.**