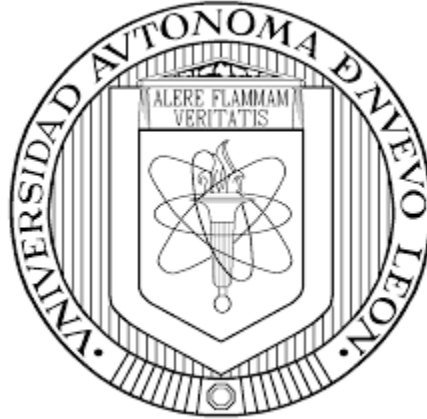


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE CÉLULAS
MADRE MESENQUIMALES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE CON
TRAIL SOLUBLE, IL-12 E IFN β EN UN MODELO MURINO
SINGÉNICO DE LINFOMA.**

por

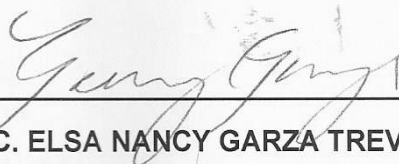
Q.B.C Adriana Guadalupe Quiroz Reyes

**Como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias con
Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

Julio 2020

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE CON TRAIL SOLUBLE,
IL-12 E IFN β EN UN MODELO MURINO SINGÉNICO DE LINFOMA.**

Aprobación de la tesis:



DRA. C. ELSA NANCY GARZA TREVIÑO

Directora de Tesis



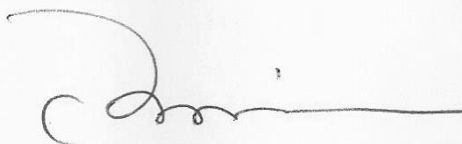
DRA. C. ANA MARIA G. RIVAS ESTILLA

Co-Director de Tesis



DR. ALBERTO YAIRH LIMÓN FLORES

Miembro de la Comisión



DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

Esta investigación se llevó a cabo en la **Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González”, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.**

Con la colaboración de las siguientes dependencias:

Departamento de Inmunología

Departamento de Histología

Colaboradores

Dr. Adolfo Soto Domínguez
Departamento de Histología

Dr. Humberto Rodríguez Rocha
Departamento de Histología

Dr. Mario Cesar Salinas Carmona
Departamento de Inmunología

Dra. Med. Paulina Delgado González
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Dr. Gerardo Padilla Rivas
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Este trabajo de investigación fue autorizado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UANL con el número de registro B19-00003 y financiado por el Programa de apoyo a la investigación Científica y Tecnológica de la UANL (PAICYT-UANL) Registro SA770-19.

DEDICATORIA

A mis padres que siempre me impulsaron para soñar en grande y lograr todo lo que me propusiera en la vida, inculcándome el amor al estudio, perseverancia, responsabilidad y dedicación. Gracias por no dejarme rendir y apoyarme en todo.

A mi hermana por estar siempre para mí y ser mi apoyo emocional más importante.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible el desarrollo de esta tesis de maestría:

Mis compañeros del laboratorio de terapia celular Carlos, Juan Francisco, Bryan, Jorge, Kevin, Irlanda, Antonio y Luis.

También a los laboratorios de Biología estructural y Citogenómica y Microarreglos, Elda, Ana y Alex, por facilitarme equipos y orientarme siempre que lo necesitaba.

A mis compañeros de posgrado por los buenos momentos y las enseñanzas compartidas. A Elda y María Fernanda, que más que compañeras son excelentes amigas.

Al departamento de Bioquímica y Medicina molecular, a mis maestros del posgrado por darme bases sólidas para ser investigadora. A todo el personal administrativo, Ariadna, Juany, por estar al pendiente y siempre dispuestas a ayudar.

Gracias en especial a la Dra. Herminia y el Dr. Said por abrirme las puertas del laboratorio de terapia celular, y a la Dra. Elsa por ser mi guía, compartirme sus conocimientos, creatividad, siempre estar al pendiente de mi desempeño e impulsarme cuando lo necesitaba.

Agradezco a los departamentos de Inmunología y de Histología por la asesoría brindada y la apertura para enseñarme nuevas técnicas de investigación.

Gracias a todas las personas que me acompañaron en el camino y fueron parte de mi crecimiento profesional para culminar este proyecto.

ÍNDICE

| | Página |
|---|---------------|
| Índice de figuras | IV |
| Índice de tablas | VI |
| Abreviaturas | VII |
| Resumen | VIII |
| Abstract | IX |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Generalidades del cáncer | 1 |
| 1.2 Mecanismos generales de inicio del cáncer | 1 |
| 1.3 Generalidades del linfoma | 2 |
| 1.3 Epidemiología de linfoma | 2 |
| 1.4 Diagnóstico del linfoma | 3 |
| 1.5 Patogénesis del linfoma | 4 |
| 1.6 Tratamiento del linfoma | 5 |
| 1.7 Nuevas terapias antitumorales | 6 |
| 1.8 CMM | 8 |
| 1.9 CMM adultas en el tratamiento del cáncer | 9 |
| 1.1 Aplicación clínica de las CMM en la terapia génica basada en células madre | 10 |
| 1.12 Tipos de modificación genética | 11 |
| 1.13 Vectores virales | 11 |
| 1.13.1 Lentivirus | 13 |
| 1.14 Proteínas con actividad antitumoral en terapia génica basada en CMM | 15 |
| 1.14.1 TRAIL | 15 |
| 1.14.2 Interferón Beta (IFN β) | 18 |
| 1.14.3 Interleucina 12 (IL-12) | 19 |
| 1.15 Modelos animales de cáncer | 21 |
| 1.16 Línea celular L5178Y | 22 |
| 2. ANTECEDENTES DIRECTOS | 24 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 26 |
| 4. HIPÓTESIS | 27 |

| | |
|---|----|
| 5. OBJETIVOS | 28 |
| 5.1 Objetivo general | 28 |
| 5.2 Objetivos específicos | 28 |
| 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 29 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| 7.1 Diseño de secuencias de los transgenes | 30 |
| 7.2 Obtención y expansión de CMM-MO | 30 |
| 7.3 Caracterización de las CMM-MO mediante los marcadores CD90 ⁺ /CD105 ⁺ /CD34 ⁻ | 32 |
| 7.4 Evaluación de multipotencia de las CMM-MO | 33 |
| 7.5 Modificación genética de las CMM-MO | 35 |
| 7.5.1 Transducción lentiviral | 35 |
| 7.5.2 Cálculo de la eficiencia de transducción | 36 |
| 7.6 Validación de la expresión de los transgenes por las CMM- MO | 36 |
| 7.7 Producción de linfomas | 38 |
| 7.7.1 Modificación genética de las células L5178Y | 38 |
| 7.8 Determinación de la reducción del tamaño de los tumores | 39 |
| 7.9 Determinación del tiempo de supervivencia | 43 |
| 7.10 Evolución de los tumores post-implante y análisis de metástasis | 43 |
| 7.11 Aspectos éticos | 45 |
| 8. RESULTADOS | 45 |
| 8.1 Transducir CMM-MO de ratón con los transgenes TRAILs, IFN β e IL12 y la línea L5178Y con un gen reportero fluorescente | 46 |
| 8.1.1 Obtención de CMM-MO ratón | 46 |
| 8.1.2. Caracterización de CMM-MO por marcadores CD105, CD90, CD34 | 47 |
| 8.1.3. Evaluación de multipotencia de las CMM-MO | 48 |
| 8.1.4. Validación de la expresión de TRAILs, IL-12 e IFN β | 49 |
| 8.1.5. Validación de la modificación genética de línea de linfoma para la expresión de marcador reportero fluorescente. | 52 |
| 8.2 Evaluar la actividad antitumoral de CMM-MO que expresan IL-12, las combinaciones TRAILs con IL-12, TRAILs con IFN β y | |

| | | |
|---|-------|----|
| el tiempo de sobrevida en un modelo murino singénico de linfoma | | 52 |
| 8.2.1 Comparación del desarrollo del tumor y detección de metástasis | | 52 |
| 8.2.2 Detección del receptor de muerte de TRAIL | | 53 |
| 8.2.3 Aplicación de tratamientos contra tumor sólido | | 57 |
| 8.3 Analizar la capacidad de migración de las CMM-MO transducidas con TRAILs, IFN β e IL-12 y su potencial anti-metastásico en un modelo murino mediante fluorescencia e histología | | 59 |
| 8.3.1 Obtención y preservación del tejido tumoral | | 67 |
| 8.3.2 Análisis de migración celular a los tejidos | | 67 |
| 8.3.3 Análisis de alteración histológica | | 71 |
| 9. DISCUSIÓN | | 75 |
| 10. CONCLUSIÓN | | 82 |
| 11. PERSPECTIVAS | | 83 |
| 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | | 84 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 1. Principales características de las células tumorales | 2 |
| Figura 2. Mecanismo inducción de apoptosis por TRAIL | 17 |
| Figura 3. Mecanismo de acción del IFN β | 19 |
| Figura 4. Mecanismo de acción de IL-12. | 21 |
| Figura 5. Estrategia experimental | 29 |
| Figura 6. Células adherentes de médula ósea de ratón del tercer pase al 80 % de confluencia en campo claro a 10X | 46 |
| Figura 7. Caracterización de CMM-MO ratón | 47 |
| Figura 8. Diferenciación Adipogénica y Osteogénica de CMM-MO | 49 |
| Figura 9. Imágenes de fluorescencia de CMM transducidas una semana después de procedimiento de transducción | 50 |
| Figura 10. Imágenes de fluorescencia de células L5178Y transducidas una semana después del procedimiento | 51 |
| Figura 11. <i>Western Blot</i> de sobrenadantes de CMM transducidas | 52 |
| Figura 12. Volumen del tumor al día 9 | 54 |
| Figura 13. Detección por fluorescencia de células L5178Y transducidas en tumor | 55 |
| Figura 14. Análisis de metástasis a órganos por fluorescencia | 56 |
| Figura 15. Análisis de metástasis a órganos por tinción Hematoxilina-Eosina | 57 |
| Figura 16. Estandarización de detección del receptor de TRAIL. | 58 |
| Figura 17. Receptor de TRAIL murino (DR5) en muestras de tumor al día 22 post-inoculación | 59 |
| Figura 18. Desarrollo del tumor y aplicación de tratamientos | 61 |
| Figura 19. Pesos de ratones en el transcurso del experimento | 62 |
| Figura 20. Porcentaje de sobrevivencia de ratones tratados | 63 |
| Figura 21. Análisis macroscópico de extremidad inferior derecha | 65 |
| Figura 22. Diferencias en peso de tumores en grupos tratados | 66 |

| | | |
|--|-------|----|
| Figura 23. Fotografías de fluorescencia de tejidos de grupos experimentales | | 68 |
| Figura 24. Señal fluorescente de <i>mCherry</i> | | 71 |
| Figura 25. Histología de tumor/gastrocnemio derecho e hígado de grupos experimentales | | 73 |
| Figura 26. Escala de alteración histológica | | 74 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|--|---------------|
| Tabla 1. Significancia estadística de las diferencias de sobrevida entre los grupos tratados y el grupo sin tratamiento. | |
| | 64 |
| Tabla 2. Significancia estadística de las diferencias de sobrevida entre los grupos tratados con CMM-MO transducidas y CMM-MO sin transducir. | |
| | 64 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| LH | Linfoma de Hodgkin |
| LNH | Linfoma No Hodgkin |
| CMM | Células Madre Mesenquimales |
| MO | Médula ósea |
| TRAILc | Forma completa unida a membrana celular del ligando inductor de la apoptosis relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral |
| TRAILS | Forma soluble del ligando inductor de la apoptosis relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral |
| IFN β | Interferón beta |
| IFN γ | Interferón gamma |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| DR5 | Receptor de muerte 5 (<i>Death receptor 5</i>) |
| MOI | Multiplicidad de infección |
| Kg | Kilogramo |
| g | Gramo |
| μ g | Microgramo |
| mL | Mililitro |
| μ L | Microlitro |
| nM | Nanomolar |
| mm | Milimetro |
| μ m | Micrómetro |
| nm | Nanómetro |
| h | Hora |
| min | Minuto |
| seg | Segundo |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| kDa | Kilodalton |
| cm ² | Centímetros cuadrados |
| cm ³ | Centímetros cúbicos |
| HRP | Peroxidasa de rábano picante (<i>Horse-radish peroxidase</i>) |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| SFB | Suero fetal bovino |
| °C | Grado centígrado |

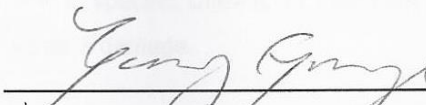
RESUMEN

Q.B.C. Adriana Guadalupe Quiroz Reyes

Título del estudio: “Evaluación de la actividad antitumoral de células madre mesenquimales modificadas genéticamente con TRAIL soluble, IL-12 e IFN β en un modelo murino singénico de linfoma”.

Introducción: El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. El linfoma es un tipo de cáncer en donde las células del sistema inmune forman tumores sólidos. El tratamiento actual incluye al trasplante autólogo de células hematopoyéticas, quimioterapia y cirugías, sin embargo, estos presentan efectos secundarios. Por esta razón se está en búsqueda de tratamientos más eficientes. Uno de ellos es la inmunoterapia por medio de la terapia génica de células madre mesenquimales (CMM), las cuales tienen propiedades inmunoregulatorias, migran hacia los sitios de tumor y pueden modificarse genéticamente para la expresión de productos antitumorales. Tres de estos son TRAIL soluble (TRAILS), interferón beta (IFN β) e interleucina 12 (IL-12), los cuales son proapoptóticos y capaces de activar la respuesta inmune antitumoral.

Objetivo: Evaluar la eficacia antitumoral de CMM-MO modificadas genéticamente para sobreexpresar TRAILS, IFN β o IL-12 en un modelo de linfoma murino singénico e inmunocompetente. **Materiales y métodos:** Las CMM de médula ósea se obtuvieron a partir de ratones BALB/c. Se realizó transducción lentiviral para la expresión de TRAILS, IFN β e IL-12 así como el reportero *GFP*. Se validó la transducción por fluorescencia y *Western Blot*. Se empleó la línea de linfoma murino L5178Y transducida mediante lentivirus para la expresión de los reporteros *mCherry* y *GFP*, para la generación de tumores sólidos en ratones BALB/c. Mediante un primer experimento se detectó metástasis hepática y la expresión del receptor de TRAIL (DR5). En un segundo experimento se aplicaron los tratamientos, se evaluó la actividad antitumoral y la sobrevida. Se analizaron cortes de tejido por medio de fluorescencia y Hematoxilina-Eosina. **Resultados:** Los tratamientos evaluados de CMM-MO que sobreexpresaban TRAILS con IL-12, TRAILS con IFN β , así como IL-12 aumentaron la sobrevida del modelo experimental ($p < 0.05$), y mostraron una disminución del volumen del tumor ($p < 0.05$) al comparar con los controles. A nivel histológico observamos menor intensidad de fluorescencia en el gastrocnemio derecho del grupo tratado con CMM IL-12 la cual fue significativa comparado con el control sin tratamiento ($p < 0.05$). A nivel histológico, el tratamiento de CMM IL-12 redujo la infiltración de células tumorales y además presentó menor grado de displasia de forma significativa ($p < 0.05$). Mientras tanto, los hígados en ambos análisis mostraron persistencia de células tumorales y displasia moderada, por lo que la metástasis no pudo ser inhibida. **Conclusión:** Las CMM-MO de ratón que sobreexpresan TRAILS en combinación con IL-12 o IFN β y sólo IL-12, son capaces de reducir el tamaño del tumor e incrementar significativamente la sobrevida del modelo murino, sin embargo, no logran inhibir el desarrollo y progresión de metástasis hepática. En específico el tratamiento de CMM IL-12 fue el que redujo la infiltración de células malignas y presentó menor daño tisular de forma significativa.



Dra. Elsa Nancy Garza Treviño

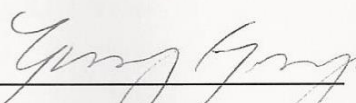
Directora de Tesis

ABSTRACT

Q.B.C. Adriana Guadalupe Quiroz Reyes

Title: "Evaluation of antitumoral activity of genetically modified mesenchymal stem cells with soluble TRAIL, IL-12, and IFN β in a syngeneic lymphoma murine model".

Introduction: Cancer es one of the main causes of morbidity and mortality around the world. Lymphoma is a cancer type that affects immune system cells, producing solid tumors. Current treatment includes autologous transplantation of hematopoietic cells, chemotherapy, and surgery, however, there are secondary effects due to these therapeutics. For this reason, more efficient treatments are need. One of them is immunotherapy, through mesenchymal stem cells (MSC) gene therapy, which have immunoregulatory properties, tumor sites migration, and can be genetically modified for antitumoral product overexpression. Three of them are soluble TRAIL (sTRAIL), beta interferon (IFN β), and interleukin 12 (IL-12), which are proapoptotic and capable of induce antitumoral immunity. **Objective:** Assess antitumoral effectiveness of genetic modified MSC overexpressing sTRAIL, IFN β or IL-12 in syngeneic and immunocompetent lymphoma murine model. **Materials and Methods:** MSC were obtained from BALB/c bone marrow. Lentiviral transduction of MSC with *GFP* and transgenes was confirmed by fluorescence microscopy and Western Blot. Lymphoma L5178Y cells were transduced for expression of reporter gene (*mCherry / GFP*) in an attempt for its tissue identification and migration analysis. In a first experiment, hepatic metastasis was detected and, it was confirmed that lymphoma cells expressed TRAIL receptor (DR5). Ins a second experiment different treatments were applied, and antitumoral activity and survivor were evaluated. **Results:** *In vivo* model showed that combined treatment of MSC sTRAIL+IFN β , MSC sTRAIL+IL-12 or MSC IL-12 alone significantly reduce tumor volume and increase survivor in BALB/c ($p < 0.05$) mice with only one application. At histologic level, MSC IL-12 significantly reduce tumor cells infiltration in right gastrocnemius compared with negative control ($p < 0.05$), and also it presented less tissue dysplasia, confirmed by fluorescence and Hematoxylin-Eosin dye; however, any treatment inhibited hepatic metastasis. **Conclusion:** MSC expressing sTRAIL, INF β and IL-12, in combination or individual, can be used as an antitumor strategy and increase survivor time. Nevertheless, localized application did not inhibit metastasis development. In specific, CMM IL-12 treatment was the one that reduce tumor cells infiltration and present less tissue damage.



Dra. Elsa Nancy Garza Treviño

Thesis Director

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del Cáncer.

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo [1]; esta enfermedad tiene auge en países económicamente desarrollados como resultado del incremento de la vida media de la población, así como la adopción de un estilo de vida con hábitos como tabaquismo, inactividad física y dietas occidentales [2]. En México es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y diabetes [1]. Se define como un conjunto de enfermedades que presentan en común la pérdida del control del ciclo celular y la ganancia de la capacidad de invadir otros tejidos [3]. La Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), estima que uno de cada cinco hombres y una de cada seis mujeres en el mundo desarrollarán cáncer en el curso de su vida, y que uno de cada ocho hombres y una de cada 11 mujeres morirá por esta enfermedad [4].

1.2. Mecanismos generales de inicio del cáncer.

Todos los agentes que están relacionados con inicio del cáncer tienen en común la capacidad de alterar el genoma de las células involucradas. Entre estos agentes se encuentran sustancias químicas, radiación ionizante, radiación ultravioleta y diversos virus. Generalmente, las sustancias carcinógenas, el asbesto o el humo de los cigarrillos, inducen mutaciones directa o indirectamente al convertirse en compuestos mutágenos, en algunos casos induciendo la activación y acción de enzimas celulares [3]. Las alteraciones genéticas en las células cancerosas generalmente resultan en una reprogramación de los mecanismos de regulación homeostática [5]. Las principales características de las células tumorales se ilustran en la figura 1 [6], [7].



Figura 1. Principales características de las células tumorales.

1.3. Generalidades del linfoma.

Según la Sociedad Americana del Cáncer, el linfoma es un tipo de cáncer que se origina en las células del sistema inmune [8]. Incluye a un grupo de tumores sólidos de extirpe linfoide y se caracteriza por el crecimiento de los nódulos linfáticos, preferentemente periféricos, teniendo la capacidad de invadir otros órganos como hígado, pulmón y médula ósea. Los linfomas se clasifican en linfoma de Hodgkin (LH) y linfoma no-Hodgkin (LNH), con el fin de lograr un pronóstico y un tratamiento adecuado. Todos los linfomas forman tumores sólidos; a diferencia de las leucemias, que se caracterizan por un aumento excesivo del número de leucocitos en sangre periférica [9], [10].

1.4. Epidemiología de linfoma.

A nivel mundial en el 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el proyecto GLOBOCAN reportaron que en ambos sexos hubo una incidencia de 509,590 y 79,990 casos en el año 2018 por LNH y LH, respectivamente. El LNH ocupó el lugar

número 11 de todos los casos de cáncer, mientras que el LH ocupó el lugar 26 [4]. En México, en el 2018, la incidencia en ambos sexos fue de 5,174 nuevos casos y 2,741 muertes asociadas a LNH, y 2,388 nuevos casos y 543 muertes en LH [11]. En Nuevo León, entre los años de 2008 a 2012, el promedio de la tasa de mortalidad por Linfomas en personas mayores de 25 años fue de 4 casos por 100 mil habitantes [12], y en el 2016 el total de egresos en hospitales públicos por enfermedades de la sangre, de los órganos hematopoyéticos y trastornos que afectan el sistema inmune fue de 1,573; de esos 679 fue en hombres y 894 en mujeres [13].

1.5. Diagnóstico de linfomas.

El linfoma presenta frecuentemente linfadenopatía periférica sin dolor que también puede ser extranodal, es decir, en otros órganos y tejidos, mientras que los pacientes con linfomas de tipo más agresivo presentan masas abdominales o en el mediastino. Los síntomas pueden ser sistémicos, tales como fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso y escalofríos [14]. Hay esplenomegalia en el 30-40% de los casos [15]. El diagnóstico incluye la historia clínica, examen físico, biometría hemática, electrolitos, pruebas de función hepática y renal, aspirado de médula ósea, biopsia y tomografía de cuello, pecho, abdomen y pelvis. En el LH es característica la presencia de células de Reed-Sternberg [14]. En LNH la prueba de lactato deshidrogenasa puede estar incrementada y actúa como indicador pronóstico. También se incluye para el análisis la tomografía computarizada de cuello, pecho, abdomen y pelvis [14], [16].

Los linfomas se clasifican en linfomas de células B y de células T; mientras que los linfomas de células B representan aproximadamente el 90% de los linfomas, los linfomas de células T constituyen aproximadamente el 10% del total de los casos. El diagnóstico debe realizarse en tejido ganglionar o extraganglionar obtenido de una biopsia. El diagnóstico diferencial de linfoma se basa en un análisis histopatológico e inmunohistoquímico de los nódulos linfáticos hipertrofiados, para detectar células de Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS), CD30⁺, CD15⁺, CD45⁻ y EMA⁻ (*Epithelial Membrane Antigen*) y en ocasiones positivas a marcadores B [17].

1.6. Patogénesis del linfoma.

Los linfomas de linfocitos B tienen su origen durante las etapas del desarrollo normal de estas células. Los linfocitos B inician su desarrollo en la médula ósea, un órgano linfoide primario, y continúan con la diferenciación en los tejidos linfoides secundarios, como los ganglios linfáticos y el bazo [18]. Durante los estadios del desarrollo de los linfocitos B ocurren modificaciones en su material genético 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 cambios genéticos anormales y conducir al surgimiento y evolución de un linfoma [19].

En la médula ósea se da la recombinación de los genes que codifican para las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos que forman parte del receptor del linfocito B (BCR). Este proceso se conoce como recombinación V(D)J. Esta recombinación implica la ruptura de la doble cadena del DNA por efecto de los genes RAG1 y RAG2. Una vez que se expresa el BCR, los linfocitos B abandonan la médula ósea y migran a los centros germinales en los tejidos linfoides secundarios. En estos centros germinales ocurren, al menos dos modificaciones distintas en el DNA; la hipermutación somática (SHM, por sus siglas en inglés) donde se modifican las regiones variables de las inmunoglobulinas (Ig) para producir anticuerpos de alta afinidad por sus antígenos, y la recombinación de cambio de clase (CSR; de IgM a IgG, IgA, o IgE). Después del centro germinal, 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, y 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 [19].

Los linfomas de células T son un grupo heterogéneo que representa una pequeña cantidad de los LNH, que comprende al linfoma cutáneo de células T y el linfoma periférico de células T [20]. Este grupo de linfomas suele presentar un peor pronóstico que el de células B, ya que suelen ser más agresivos [21]; también están asociados con menor sensibilidad a la quimioterapia y mayor recaída o reincidencia [22]. En cuanto al origen molecular de los linfomas de células T, el 90 por ciento de los pacientes con linfoma periférico de células T presentan rearrreglos clonales de los genes del receptor de linfocitos T (TCR). El locus gamma es el que presenta los más frecuentes. También, son comunes las mutaciones citogenéticas. Por otro lado, no se observan anormalidades cromosómicas específicas en los pacientes con linfoma cutáneo de células T, pero el TCR sí presenta rearrreglos [23].

1.7. Tratamiento del linfoma.

Todos los tipos de cáncer tienen un conjunto de características compartidas por las células neoplásicas. Por esta razón, una estrategia fundamental para combatir al cáncer es inhabilitar estas propiedades. A partir de esto 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 y 8) suprimir el crecimiento de las células malignas [6].

El tratamiento actual para el linfoma incluye el trasplante autólogo de células hematopoyéticas (TCPH) que es la terapia estándar para pacientes con LH agresivo o avanzado y LNH. Este tratamiento puede permitir remisiones duraderas a largo plazo. Aunque la TCPH se asocia con tasas bajas de morbilidad y mortalidad tempranas relacionadas con el trasplante, las altas dosis de quimioterapia e irradiación corporal total utilizadas como parte de los regímenes de acondicionamiento pueden aumentar potencialmente el riesgo de complicaciones

tardías de la terapia que reducen el efecto terapéutico de la misma. La quimioterapia y cirugías para remover tumores son una de las primeras opciones de tratamiento. La radioterapia se restringe a tumores localizados [24]. Idealmente, la quimioterapia debería atacar específicamente células neoplásicas y reducir el tamaño del tumor al inducir efecto citotóxico y/o citostático. Sin embargo, la quimioterapia presenta diversos efectos secundarios como toxicidad y daño multiorgánico [20], [25], [26], debido a sus efectos inespecíficos y generación de resistencia a los fármacos por parte de las células cancerosas [27]. Además, en la gran mayoría de los casos, ni la quimioterapia y/o la radioterapia, logran eliminar totalmente las células tumorales del organismo ni mejoran la calidad de vida de los pacientes [22]. Por lo tanto, es necesario implementar nuevas estrategias para atacar a los tumores, que permitan llegar a todas las células malignas y a las metástasis.

1.8. Nuevas terapias antitumorales.

Algunos tratamientos del cáncer son capaces de llegar hasta los tumores y destruir a las células tumorales, implementando alguna de las estrategias contra las neoplasias malignas anteriormente mencionadas. Sin embargo, en la mayoría de los casos se generan mutaciones que seleccionan a las células resistentes a los medicamentos, lo que ocasiona la reaparición del cáncer. Se ha sugerido que las principales responsables de este fenómeno son las células madre de tumor (CMT), que son las que dan origen a las células del cáncer [28]. Por lo tanto, es necesario implementar nuevas estrategias para atacar a los tumores, y que estos nuevos tratamientos sean activos específicamente contra las células tumorales [29].

Entre las nuevas terapias contra el cáncer se incluye a la inmunoterapia. La inmunoterapia ha ampliado el panorama del tratamiento del cáncer, ya que promueve la eliminación de células tumorales con menos efectos secundarios que la quimioterapia u otros agentes que destruyen de manera directa a los tumores. En la inmunoterapia se emplean agentes para estimular o suprimir el sistema inmune, eliminando las células cancerígenas por medio de mecanismos naturales, muchos de los cuales suelen ser evadidos durante la progresión de la enfermedad [30], [31].

Las estrategias de inmunoterapia en cáncer se dividen en dos grupos. El primero denominado inmunoterapia “pasiva”, se emplean moléculas o células efectoras del sistema inmune para atacar directamente a las células tumorales. En esta categoría se incluye terapia basada en anticuerpos y sus derivados, así como terapia de células T de receptor quimérico (*CAR-T cells*, por sus siglas en inglés). La segunda estrategia denominada inmunoterapia “activa”, se basa en activar el sistema inmune a través de la modulación de mecanismos celulares; se puede incrementar la captación, procesamiento y presentación de antígenos por los linfocitos T a las células presentadoras de antígeno (CPA) por medio de vacunas adyuvantes y de células dendríticas. Además, puede incluirse a citocinas que promueven la actividad de CPA como interferones (IFN), agonistas de receptores tipo Toll y estimulantes de agonistas de genes del interferón; así mismo, se puede aumentar la activación y expansión de los linfocitos T vírgenes, e intensificar la fase efectora de la respuesta inmune con terapia celular *ex vivo* de linfocitos T [32].

Dentro de ésta última estrategia se puede incluir la inmunoterapia basada en terapia celular y terapia génica. La terapia celular se fundamenta en el uso de células madre (CM) [33]. Se reconocen tres tipos de CM: CM embrionarias, CM inducidas y células madre mesenquimales (CMM) adultas. Las CM son totipotentes, sin embargo, son potencialmente tumorales [34]. Por esta razón, se acepta de forma general como mejores candidatas a las CMM adultas, preferentemente autólogas, para utilizarse en terapia celular. La terapia génica se define por la FDA (Food and Drug Administration) como una técnica que modifica los genes de un organismo para tratar o curar una enfermedad. Generalmente los materiales genéticos que se utilizan son ADN, ARNm, siARN, miARN y oligonucleótidos anti-sentido [35]. La terapia génica puede funcionar a través de diversos mecanismos: 1) el reemplazo de un gen causante de una enfermedad por una copia del gen normal; 2) inactivación del gen causante de una enfermedad que no está funcionando adecuadamente; 3) introducción de un gen nuevo o modificado dentro del organismo para tratamiento de una enfermedad [36].

Según el tipo de células o tejidos blanco para la entrega de genes y tratamiento, la terapia génica se divide en terapia de línea germinal y de células somáticas. La terapia de línea germinal involucra la manipulación genética de células reproductivas para hacer cambios heredables, sin embargo, por razones bioéticas no se emplea en humanos. Por otro lado, la terapia génica de células somáticas se considera más segura, ya que los cambios genéticos se mantienen en el paciente y no son transmitidos a la descendencia [35].

Los procedimientos de terapia génica de células somáticas se clasifican en *in situ*, *in vivo* y *ex vivo*. En la entrega *in situ*, se administra el material genético directamente dentro de la célula o el tejido blanco y el sistema *in vivo* emplea vectores para entregar el material genético hasta la célula dañada en el organismo. Los procedimientos *ex vivo*, o “fuera del cuerpo vivo”, requieren el aislamiento de las células del paciente, su modificación con el gen terapéutico y su posterior reintroducción al paciente, donde ejercen su efecto biológico [35].

Actualmente se ha reportado la aplicación potencial de las CMM en la terapia génica basada en células madre después de su modificación genética *ex vivo* como tratamiento de enfermedades [37]–[40], debido a diversas propiedades que las vuelven atractivas para su aplicación como terapia contra el cáncer.

1.9. CMM.

Las CMM poseen diversas características deseables en la terapia celular: 1) son autorregenerativas, 2) una sola célula puede dar lugar a nuevas colonias y 3) son multipotentes, es decir, pueden dar lugar a diversos linajes de células diferenciadas [41]. Las CMM son una población de células de linaje mesodérmico que pueden obtenerse de una gran variedad de tejidos como médula ósea, pulpa dental, cerebro, hígado, páncreas, piel, tejido adiposo, cordón umbilical, gelatina de Wharton, placenta, y son fáciles de aislar [42]. Además, tienen propiedades inmunomoduladoras, de migración y efectos parácrinos [43]. La Sociedad Internacional de Terapia Celular ó ISCT (Internacional Society of Cellular Therapy)

en el 2006 propuso tres criterios para definir a las CMM: 1) son adherentes en placas de cultivo; 2) tienen la capacidad de expresar los antígenos CD44, CD24, CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA-DR, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; 3) las CMM deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo [44], [45].

En el organismo, las CMM participan en los procesos de reparación de heridas y en el mantenimiento de la hematopoyesis en la médula ósea. 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 y la reparación de los tejidos u órganos dañados [46]. La creciente evidencia de los beneficios de las CMM en la medicina regenerativa las vuelve importantes como terapia en padecimientos caracterizados por pérdida de células y/o tejido, como infarto al miocardio [47], daño cerebral traumático [48], enfermedad de Parkinson, diabetes mellitus tipo 1 [49] y cáncer. Las propiedades antes mencionadas hacen aptas a las CMM como agentes terapéuticos, generando gran interés para su aplicación en biomedicina. Actualmente, las CMM representan un tipo celular para trasplante alogénico debido a su baja inmunogenicidad al tener una escasa expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I) y ausencia de MHC II, representando bajo riesgo de rechazo del implante [50].

1.10. CMM adultas en el tratamiento del cáncer.

Una de las características más destacables de las CMM es que éstas migran hacia los tejidos lesionados o hacia tumores y los colonizan [51], un proceso de migración denominado *homing*. Los mecanismos moleculares del *homing* en los tumores no están del todo establecidos, pero se sabe que es necesaria la liberación de quimiocinas por parte de las células tumorales y la expresión de los receptores específicos a ellas en la superficie de las CMM. Así mismo, los tumores producen una gran cantidad de ligandos para las citocinas producidas por las CMM y

moléculas estructurales de sus membranas plasmáticas [29]. Al llegar a las células tumorales las CMM tienen la propiedad de inhibir su crecimiento [29], por medio de colonización y producción de proteínas y miARN *in situ* [51]. Además, pueden modificarse genéticamente para expresar un gen exógeno y dirigirse al sitio del tumor, donde lo expresan [52].

1.11. Aplicación clínica de las CMM en la terapia génica basada en células madre.

Se ha encontrado que la actividad de las CMM depende en gran medida del microambiente y las fuentes de obtención de las células [53]. Las CMM naïve o sin modificar pueden promover el desarrollo del cáncer, ya que producen factores de crecimiento y angiogénesis, y pueden tanto aumentar como inhibir la inflamación [53], [54]. Sin embargo, la modificación genética *ex vivo* asegura el efecto citotóxico dirigido hacia las células malignas y se aprovechan sus propiedades [55]. Algunas ventajas de esta estrategia terapéutica son: citotoxicidad específica contra los tumores, reduciendo así la toxicidad sistémica de todos los fármacos anticancerosos, los efectos secundarios y focalizar los productos biológicos antineoplásicos producidos *in situ* por las CMM modificadas, directamente sobre las células malignas [56]. Además, la combinación de CMM transfectadas o transducidas con transgenes, agentes quimioterapéuticos y radioterapia han mostrado un efecto antitumoral incrementado [57] en modelos de xenoinjerto de glioma, cáncer de mama y colon [46].

Actualmente están en curso ensayos clínicos en fases 1 y 2 de CMM modificadas genéticamente para que expresen productos antitumorales (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02079324, NCT03298763). Todo ello muestra que la terapia génica basada en CMM es prometedora, aunque aún se requiere realizar más investigaciones para analizar la eficacia y seguridad de los diferentes modelos experimentales que utilizan CMM genéticamente modificadas [29].

1.12. Tipos de modificación genética.

El material genético puede ser transferido por medio de un vector, el cual se define como un vehículo utilizado para entregar un gen de interés. El vector ideal puede transferir una cantidad específica de material genético dentro de la célula blanco, permitiendo la expresión de un producto génico sin ser tóxico. En las células blanco, donde se quiere la expresión de cierta proteína, el material genético exógeno se puede entregar por medio de dos tipos de vectores: vectores no virales y virales [58].

Los vectores no virales consisten de ADN y ARN [plásmidos, ARN de interferencia siARN, entre otros], entregados a la célula blanco por medio de métodos físico-químicos como liposomas, fosfato de calcio, polímeros catiónicos, electroporación, nucleofección, sonotransfección, nanopartículas, complejos proteicos, entre otros; este procedimiento se denomina transfección [38], [58]. Estos métodos son fáciles de realizar, sin embargo muestran la desventaja de ser poco eficientes, pueden afectar la membrana y la expresión de los genes es transitoria debido a que no se integran al genoma [59], por lo que se va perdiendo conforme la célula se divide [38].

Por otro lado, la transferencia de genes por medio de vectores virales se denomina transducción [58]. Existe una gran variedad de vectores virales, y su uso depende de la naturaleza de la célula blanco a la cual se desea infectar. El uso de virus está asociado con mayor demanda técnica y un mayor riesgo de toxicidad. Sin embargo, los vectores virales han ido evolucionando para ser más seguros, modificando su producción para que sean incompetentes para replicarse [35].

1.13. Vectores virales.

Encontrar un vector adecuado para entregar material genético se ha convertido en un reto para que la terapia génica se vuelva un mejor tratamiento que los métodos convencionales [35]. Los vectores virales son un sistema más prometedor para la entrega de genes ya que presentan dos ventajas sobre los

métodos físico-químicos: 1) la transferencia de genes es más eficiente y específica; 2) no se requieren múltiples dosis, ya que en la mayoría de los casos una sola es suficiente [58]. Entre los distintos tipos de vectores virales que se utilizan en la terapia génica se encuentran los adenovirus, los virus adeno-asociados, alfavirus, flavivirus, virus de herpes simplex (VHS), virus del sarampión, rabdovirus, retrovirus, lentivirus, virus del Newcastle, poxvirus y picornavirus [60]. Algunos virus tienen la habilidad de insertarse en las células que infectan, y producir la expresión génica estable dentro del genoma del huésped. Permiten la manipulación de su genoma y la eliminación de genes virulentos sin perder la habilidad de infectar las células del huésped [35].

Los vectores virales más utilizados en la terapia génica son los adenovirus. Los adenovirus son virus desnudos de ADN de cadena sencilla que tienen la capacidad de empaquetar 7.5 kb de ADN externo, no se insertan al genoma, por lo que quedan como episomas que permiten la expresión a corto plazo del gen de interés en una gran variedad de células huésped, además pueden alcanzar altos títulos virales [58]. Estos vectores tienen la desventaja de producir elevada respuesta inmune en el huésped al activar a los linfocitos T CD4+ y CD8+ [38], [60].

Los virus adeno-asociados (AAV por sus siglas en inglés) fueron aislados por primera vez como contaminantes de preparaciones de adenovirus. Son virus de ADN desnudo de 4.7 kb, y tienen capacidad de inserción de hasta 5 kb. Generalmente se considera que los AAV causan menor patogenicidad y toxicidad, además que proveen expresión de transgenes a largo plazo por medio de la integración al genoma de la célula huésped, aunque en su mayoría son conservados como episomas [58]. Algunas limitantes de su uso son que requieren de proteínas derivadas de otros virus, agentes genotóxicos, radiación UV o hidroxiurea para infectar las células y replicarse [35]. Además, tras administración repetida pueden activar la respuesta inmune del huésped [60].

El VHS tiene potencial para utilizarse en terapia génica debido a su habilidad para evadir la respuesta inmune y los fármacos circulantes, puede entregar múltiples genes, infectar un amplio espectro de células, tiene pocos efectos

adversos y la permite expresión génica a largo plazo. Es un virus envuelto de ADN de doble hebra que puede entregar transgenes de hasta 50 kb, sin embargo no se insertan en el genoma y son principalmente usados como virus oncolíticos [35]. Algunas otras limitantes incluyen baja eficiencia de infección, dificultad de manipular debido al tamaño del genoma y limitado rango de células para infección [58].

Los retrovirus son virus envueltos de ARN de cadena sencilla pertenecientes a la familia *Retroviridae*, capaces de producir ADN de doble hebra a partir de ARN por medio de la enzima transcriptasa reversa que traen con ellos, y luego insertarlo en el genoma del huésped [58]. Los retrovirus pueden transportar de 9 a 12kb de ARN, pueden infectar una gran variedad de células y alcanzar títulos elevados, aunque se integran de forma aleatoria dentro del genoma del huésped causando mutagénesis insercional, lo cual es una problemática descrita en otras terapias. Una desventaja de los retrovirus es su incapacidad de infectar células sin dividirse, lo que ha aumentado el interés de la aplicación de vectores lentivirales para terapia génica. Aunque los lentivirus pertenecen a la familia de los retrovirus, tienen la capacidad de infectar a células con y sin división, produciendo baja citotoxicidad. Al poseer la misma capacidad de empaquetamiento y la integración cromosómica de los retrovirus convencionales, los lentivirus se han vuelto atractivos para aplicaciones terapéuticas que requieren expresión de una proteína específica por largos periodos de tiempo [60]. Además, tienden a integrarse dentro del cuerpo de los genes, produciendo menor riesgo de genotoxicidad [61]. Actualmente existen vectores lentivirales autoinactivables, que son transcripcionalmente inactivos [35].

1.13.1. Lentivirus.

Los lentivirus pertenecen a la familia *Retroviridae* de virus de ARN de una hebra. Son virus esféricos con envoltura, que contienen dos copias de ARN de cadena positiva, cargan enzima transcriptasa reversa, integrasa y proteasa [62]. Una vez que se transcribe ADN a partir de ARN, éste se inserta en el genoma del huésped para aprovechar la maquinaria de la célula para producir todos los

componentes virales. Además, debido a su inserción en el ADN, esta información es transmitida a la descendencia de la célula que infectaron [58].

Los genes básicos que debe contener un lentivirus para transducir una célula son los genes *gag*, *pol* y *env*. *Gag* codifica las proteínas estructurales, *pol* codifica la enzima transcriptasa reversa y enzimas requeridas para la integración al genoma de la célula huésped, y *env* codifica las glicoproteínas de la envoltura viral [61].

Los lentivirus, por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) tienen la habilidad de infectar células en división y sin dividirse o en estado quiescente [38]. Para aumentar el espectro de infección de células blanco, es posible reemplazar los genes de glicoproteínas de superficie por genes de otro virus que sí pueda infectar otras células. Los sistemas lentivirales aseguran expresión a largo plazo y transferencia eficiente sin respuesta inflamatoria [58].

La primera generación de vectores lentivirales contenía una porción significativa del genoma del VIH, incluyendo los genes *gag* y *pol*, así como muchas otras proteínas virales. La proteína de envoltura de otro virus, comúnmente el virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), fue incluida en su diseño, el cual reconoce al receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL), que permite transducir un amplio rango de células. Los vectores de segunda generación son más seguros, ya que no tienen los factores de virulencia accesorios, aunque ello no inhibe su capacidad para transferir material genético a la célula huésped. Los lentivirus de tercera generación son aún más seguros al estar dividido el genoma viral, reduciendo la capacidad de producción de virus. En estos vectores, los genes *gag* y *pol* o *env* están en tres plásmidos separados que contienen la secuencia viral necesaria para el empaquetamiento [61]. La introducción de deleciones en el extremo 3' de la terminación larga terminal (LTR por sus siglas en inglés *Long Terminal Repeat*) del genoma viral crea vectores autoinactivables, en donde está interrumpida la actividad del promotor/potenciador del LTR, minimizando el riesgo de replicación de virus competentes, disminuyendo interferencias por el promotor y reduciendo el riesgo de mutagénesis insercional [62].

Se han empleado lentivirus para tratar el síndrome de inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X, cáncer [38], [63], [64] y enfermedades monogénicas como la anemia de células falciformes, sin que se hayan presentado hasta el momento efectos adversos por su uso [35]. También se han utilizado para tratamiento del VIH, con vectores tipo pT, los cuales llevan consigo miARNs que suprimen la expresión del receptor CCR5 e inhiben la infección viral [65]. Este tipo de virus se ha utilizado principalmente para terapia *ex vivo*, en donde se toman células del paciente, se cultivan junto con el virus para modificar las células con un gen de interés y posteriormente son reintroducidas dentro del paciente para permitir su actividad específica [35].

1.14. Proteínas con actividad antitumoral en terapia génica basada en CMM.

Se han realizado diversos estudios con CMM modificadas genéticamente para que expresen proteínas antitumorales como IFN α , IFN γ [66], IL-12 [67], IL-18, TRAIL [39] entre otras. El presente trabajo se centrará en 3 de ellas: TRAIL soluble, IFN β e IL-12.

1.14.1. TRAIL.

El ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral o TRAIL es conocido como Apo-2L [68], se puede presentar como completo y soluble. TRAIL completo (TRAILc) es una proteína transmembranal que puede inducir apoptosis por la vía extrínseca o dependiente de receptor selectivamente en células tumorales o transformadas, pero no en células normales. Además, el ARNm del TRAILc se expresa constitutivamente en una amplia cantidad de tejidos, principalmente hígado, pulmón y próstata [69]. 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 como TRAIL soluble (TRAILs) [68]. De manera similar a otros elementos de la familia del TNF, TRAIL debe formar homotrímeros que se

unan a tres receptores moleculares. Un átomo de Zn, unido por cisteínas en el ligando trimérico es esencial para la estabilidad de éste y una actividad biológica óptima [70]. El efecto selectivo de TRAIL de producir apoptosis de las células malignas depende de la unión a los receptores celulares de la superfamilia TNF (TNFR): DR4 [71] (Death receptor 4 o TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2) [72], ambos con un motivo conservado en el dominio de muerte (DD, *Death Domain*)[73].

El mecanismo de acción de TRAIL es la inducción de la apoptosis, también llamada muerte celular programada; este mecanismo clave permite a los organismos multicelulares ejercer una estricta regulación celular, previniendo así, procesos patológicos, tales como el cáncer, inmunodeficiencia y autoinmunidad. TRAIL puede desencadenar la apoptosis mediante la vía extrínseca, también llamada vía de apoptosis dependiente de receptor, por medio de la unión trimérica de TRAIL a los receptores de muerte celular (TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5) antes mencionados [72]. Después de la formación del homotrímero, se recluta una molécula adaptadora, el dominio de muerte asociado a Fas (FADD), el cual es ensamblado en el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). DISC interacciona con las caspasas 8 y 10 y las activa. La caspasa-8/10 de forma activa, convierte a la proteína que contiene el dominio BH3 inhibidor de Bcl-2 (Bid) en Bid truncado (tBid). El efecto sinérgico de Bcl-2 asociado a X (BAX) y el antagonista homólogo de Bcl-2 (BAK) resulta en la traslocación intramitocondrial de tBid y la liberación al citoplasma del citocromo c, ensamblando así la procaspasa-9 y el factor de activación de la proteasa apoptótica-1 (APAF-1), para formar el complejo apoptosoma y eventualmente activar las caspasas ejecutoras 3/6/7. En vías dependientes del receptor, la caspasa-8 activa, actúa directamente sobre las caspasas ejecutoras para activarlas e inducir la apoptosis. La activación de las caspasas ejecutoras culmina con los eventos de la apoptosis como la fragmentación del ADN, la disociación del citoesqueleto y las proteínas nucleares [74]. El mecanismo de apoptosis por TRAIL se muestra en la figura 2.

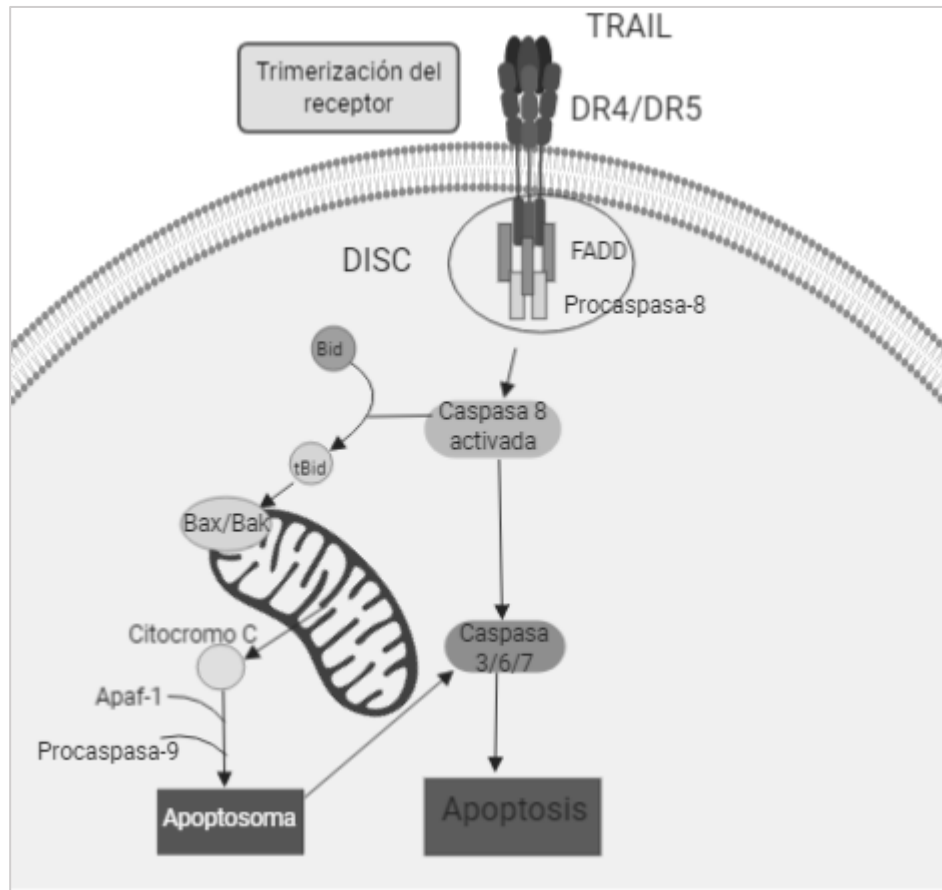


Figura 2. Mecanismo inducción de apoptosis por TRAIL.

Aunque TRAIL-R1 y TRAIL-R2 son similares estructuralmente y ambos son capaces de conducir a la apoptosis por la unión cruzada con TRAIL, se han reportado diferencias funcionales entre ellos. Primero, TRAIL-R2 tiene mayor afinidad por TRAIL que TRAIL-R1. Sin embargo, mayor afinidad no necesariamente resulta en mayor activación de DISC, y aunque TRAIL-R2 puede ser activada por el ligando soluble, esta interacción sólo desencadena una formación de DISC débil. Esto indica que TRAIL-R2 puede requerir mayor entrecruzamiento de TRAILs, mientras la estimulación de TRAIL-R1 por TRAILs parece ser capaz de desencadenar la apoptosis independientemente de la reticulación adicional [75]. Se ha descrito que TRAILc es más eficiente que TRAILs para producir apoptosis en las células diana [76]. Sin embargo, en otros estudios se observó que TRAILs también puede desempeñar esta función de manera exitosa [39], [76]–[80]. La producción

de TRAILs se puede determinar *in vivo* por medio de ELISA (análisis inmunoenzimático ligado a enzimas) del homogenizado de los tejidos tumorales en donde se aplicaron las CMM-TRAILs. En cultivos de CMM-TRAILs se puede recuperar TRAILs del sobrenadante y visualizar la presencia de la proteína mediante Western-Blot [80].

1.14.2. Interferón Beta (IFN β).

Los interferones (IFN) son una familia de citocinas autócrinas y parácrinas secretadas por las células del organismo en respuesta a microorganismos patógenos y virus - especialmente virus - [81]. Estas citocinas muestran efectos pleiotrópicos, que resultan en una potente actividad antiviral e inhibición de crecimiento de la infección [82].

Los IFN tipo I tienen diferentes niveles de expresión en los tejidos, aunque se unen al mismo receptor (IFNAR1/IFNAR2) y tienen mecanismos de señalización similares. IFN β tiene hasta 50 veces más afinidad de unión al receptor IFNAR1 que el IFN α , resultando en una actividad antiproliferativa más potente y distinta acción inmunoreguladora [81]. Los receptores IFNAR1/IFNAR2 son proteínas transmembranales que se asocian a la familia de tirosina quinasas Janus (JAK1 y TYK2), las cuales pueden fosforilar residuos de tirosina específicos, transducir la señal y activar las proteínas de transcripción STAT. Una vez que se fosforila el heterodímero STAT1/STAT2, se une a IRF9 (factor regulador de interferón 9), formando el complejo del factor de transcripción 3 del gen estimulado por IFN (ISGF3). El ISGF3 se transloca al núcleo y se une al elemento de respuesta estimulado por IFN (ISREs). De esta manera se activa la transcripción de muchas citocinas inmunoreguladoras, factores de muerte celular y proteínas relacionadas con la respuesta antiviral, así como más IFN β , que incide sobre las células vecinas (figura 3). Además, los efectos antitumorales del IFN pueden ser consecuencia de su actividad anti-angiogénica, reduciendo la formación de vasos sanguíneos del tumor y conduciendo a la muerte por la ausencia de oxígeno y nutrientes. También, esto afecta directamente las células endoteliales, inhibiendo su proliferación y

remodelación de la matriz extracelular [83]. Ya se ha reportado *in vitro* la actividad antitumoral del IFN, sin embargo, se requiere de altas concentraciones que *in vivo* podrían generar toxicidad sistémica. Por ello se han diseñado estrategias de entrega localizada como lo es mediante modificación de CMM para la reducción del crecimiento de tumores en modelos murinos [84]–[86].

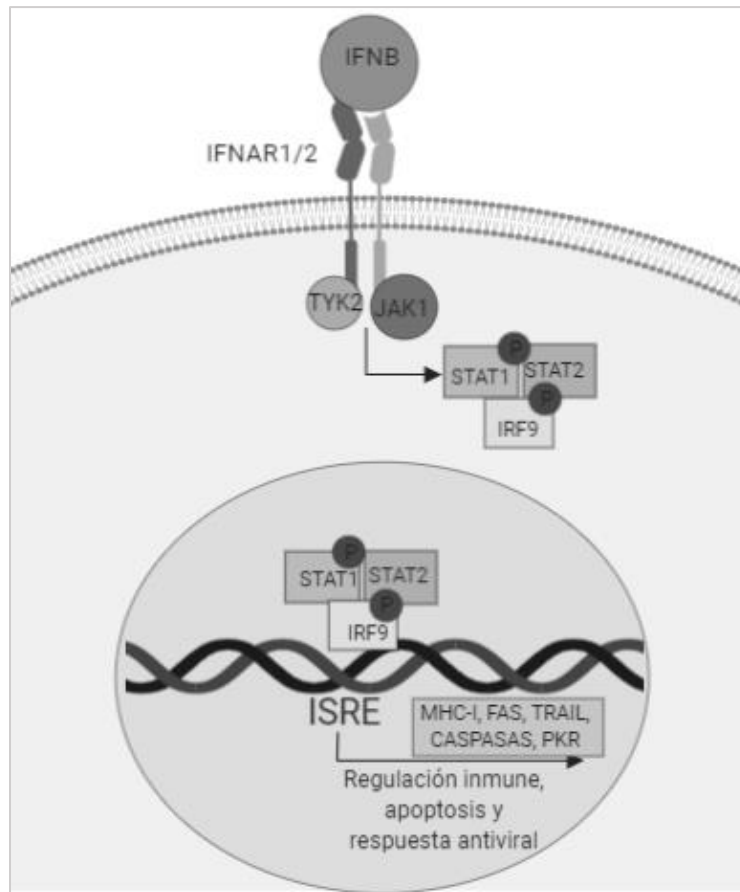


Figura 3. Mecanismo de acción del IFNβ.

1.14.3. Interleucina 12 (IL-12).

La IL-12 es una proteína proinflamatoria que tiene una importante participación en el desarrollo de la respuesta inmune [87]. La familia de IL-12 está conformada por 4 miembros, IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35. Ellos proveen el puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa [88]. La IL-12 es producida

principalmente por las células presentadoras de antígeno (CPAs), como las células dendríticas y los macrófagos, en respuesta a la presencia de microorganismos o sus componentes, como lipopolisacárido, ADN y ARN de doble cadena.

Una vez producida, la IL-12 se une a su receptor de alta afinidad (IL-12R β 1/IL-12R β 2), expresado en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados, células NK y células dendríticas, activa las vías Tyk2, Jak2 y STAT para la producción de IFN- γ , un mediador biológico crítico en los efectos microbicidas y antitumorales de la IL-12 [88]. El receptor de la IL-12 beta 1 (IL12R β 1) se une a Tyk2, mientras que el receptor IL-12R β 2 se asocia con Jak2. Jak2 fosforila los residuos de tirosina de STAT3 y STAT4. Así, ellos se translocan al núcleo y se unen al sitio promotor de IFN- γ . STAT4 también recluta al oncogén Jun (c-Jun) en el promotor de IFN- γ [89]. Esto induce la proliferación de los linfocitos y facilita el desarrollo de una respuesta T helper de tipo 1 (Th1) al producir IFN- γ [87], [90], lo cual a su vez favorece la expresión de TRAIL por los linfocitos NK. La IL-12 afecta el crecimiento del tumor y la metástasis por medio de la inducción de la infiltración de linfocitos T CD8⁺ y su diferenciación hacia linfocitos T citotóxicos (figura 4) [90].

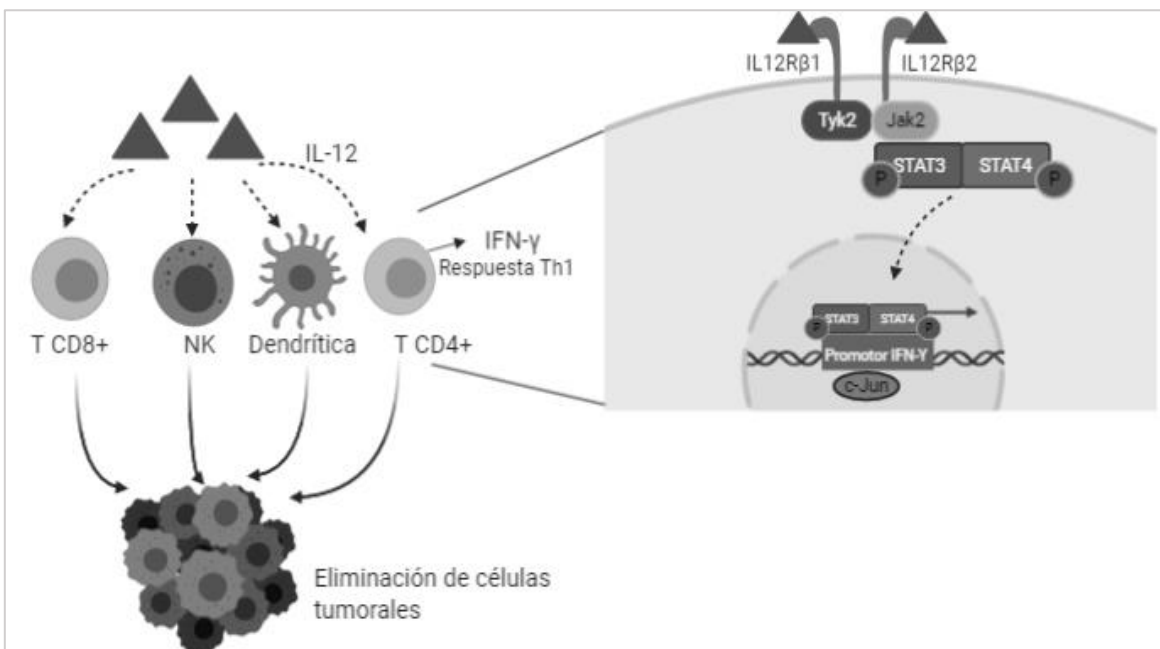


Figura 4. Mecanismo de acción de IL-12.

Se han reportado estudios donde empleando CMM transducidas con virus para que sobreexpresen IL-12 o haciendo transferencia génica de las secuencias de sus subunidades, se ha demostrado tener eficacia en la erradicación de tumores [90]–[92]. Esto indica que en combinación con otras estrategias contra el cáncer puede ayudar a disminuir la recaída tras la aplicación de tratamientos convencionales como la quimioterapia, radioterapia y cirugía [87].

1.15. Modelos animales de cáncer

Los modelos con animales son críticos para el estudio de la biología del cáncer. Los mamíferos grandes se suelen designar para estudios preclínicos [93]; sin embargo, los roedores se emplean para estudios más básicos [94], [95]. El ratón de laboratorio (*Mus musculus*) es uno de los mejores sistemas de modelos para investigación de cáncer; estos pueden desarrollar espontáneamente diversos tipos de tumor, como sucede en los humanos. También se han desarrollado modelos en ratón en los que se induce el crecimiento de tumores cancerosos con algunas sustancias químicas, virus carcinógenos, variaciones de ratones genéticamente modificados (GEM. *Genetically Engineered Mice*), xenoinjertos con células humanas y aloinjertos con células tumorales [96].

En la actualidad, los ratones desnudos son el prototipo experimental para desarrollo de cáncer con injertos de células tumorales humanas, conocido como xenoinjerto (*xenograft*), debido a que la inmunodeficiencia de linfocitos T compromete considerablemente al ratón y permite el injerto, crecimiento y la metástasis de las células tumorales [97]. No obstante, el complicado mantenimiento de los ratones desnudos limita el empleo de este modelo. Estos animales son muy susceptibles a presentar enfermedades infecciosas, lo cual requiere la atención de personal calificado para su cuidado, instalaciones, mantenimiento y alimento especial [98].

En adición, existen diferencias entre xenoinjertos con muestras de pacientes y especímenes autóctonos murinos (aloinjerto). En los xenoinjertos se ve alterada

la arquitectura normal de los tumores, se observa heterogeneidad genética—que en tumores autóctonos sería muy reducida—, ausencia de un sistema inmune competente, vasculatura alterada, circulación linfática alterada y arquitectura de los tejidos vecinos [99]. Todo lo anterior se explica por las diferencias evolutivas que hay entre ratones y seres humanos, particularmente en la inmunidad innata y adaptativa [100].

Tomando en cuenta las limitaciones de los modelos murinos de xenoinjerto antes mencionadas, en algunos casos 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 este modelo: 1) los animales no requieren instalaciones ni cuidados especiales; 2) bajo costo de mantenimiento, comparado con los ratones desnudos; 3) resultados 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 ser humano. Sin embargo, los resultados proporcionan conclusiones razonablemente aproximadas sobre este asunto [100].

1.16. Línea celular L5178Y

La línea celular L5178Y de linfoma de células T derivada de un tumor inducido en el timo de ratón DBA/2 tratado con metilcolantreno, fue adaptada a una forma ascítica [101]. Se sabe por otros trabajos 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 [102], [103]. En el presente trabajo se utiliza la variante L5178Y TK+/- clone(3.7.2C), de la cual actualmente no hay reportes de metástasis, sin embargo, la diseminación extranodal en el linfoma ocurre frecuentemente, principalmente a sistema nervioso central, tórax, sistema gastrointestinal y genitourinario [104]. Es por ello que se utiliza esta línea celular

para el desarrollo de tumores en ratones y analizar si puede desarrollar metástasis en el presente estudio.

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro laboratorio de Terapia Celular previamente ya se ha estado trabajando con nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer empleando CMM genéticamente modificadas. En el 2014 Borrego-Terrazas obtuvo CMM a partir de tejido adiposo humano y las modificó genéticamente por transfección empleando plásmidos portadores de los ADNc de TRAIL e IFN β , los cuales también tenían el marcador reportero fluorescente *GFP*. La transfección se verificó por medio del porcentaje de células verde fluorescentes; así mismo, se colectaron los medios condicionados de las CMM transfectadas y se validó la expresión de las proteínas por medio de ELISA. Una vez demostrado que las células sobreexpresaban estos transgenes, se realizó un ensayo de migración para evaluar la capacidad de “*homing*” de las CMM humanas transfectadas. Después de ello, se realizaron cocultivos de CMM transfectadas en conjunto con la línea COLO320 de cáncer colorrectal empleando *transwells*, en presencia y ausencia de s-adenosilmetionina (SAM) un reactivo protector de apoptosis, para la evaluación de citotoxicidad y apoptosis. Entre los resultados se obtuvo que las CMM transfectadas produjeron un rendimiento máximo de IFN β de 228 pg/mL a las 24 h, no obstante, no fue posible detectar la proteína TRAIL. Las CMM co-transfectadas con ambos genes mostraron una reducción significativa de la capacidad de migración con respecto a las CMM no transfectadas, así como también mostraron actividad citotóxica contra la línea de cáncer de colon en ausencia de SAM, conduciendo a apoptosis celular [105], sin embargo el efecto no se mantuvo por mucho tiempo.

Posteriormente en el 2018 González-Villareal evaluó 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. Para la generación de los tumores empleó la línea celular de linfoma murino L5178Y. Se obtuvieron y caracterizaron CMM de médula ósea de ratones BALB/c, las cuales fueron modificadas genéticamente por medio de transducción lentiviral con transgenes de TRAILs, TRAILc o IFN β que también contenían el reportero fluorescente *GFP*. De nuevo se validó la eficiencia de transducción por medio de porcentaje de células

fluorescentes, y la expresión de los productos proteicos de las CMM transducidas se confirmó por medio de *Western Blot*, empleando los medios condicionados. Se indujo el desarrollo de un tumor sólido en el gastrocnemio derecho de nueve grupos de ratones hembra BALB/c con la línea L5178Y y luego de alcanzar un volumen promedio de 1-2 cm³, se implantaron intratumoralmente los tratamientos de CMM transducidas con TRAILc, TRAILs o IFN β , o sus combinaciones. El grupo tratado con la combinación de CMM IFN β y TRAILs permitió la sobrevivencia de 62.5% del grupo, con una completa eliminación de los tumores de manera macroscópica. Sin embargo, los ratones tratados de forma individual con CMM IFN β , TRAILc o con TRAILs produjeron una sobrevida del 50%, lo que indicó que los transgenes presentaban un efecto sinérgico al combinarse. Por lo tanto, el tratamiento combinado de TRAILs e IFN β fue el más eficaz de los tratamientos para la eliminación de tumores [80].

En este estudio se continuarán los análisis de eficiencia y seguridad de las CMM de ratón transducidas con TRAILs para obtener los importantes conocimientos que aún faltan por completar con los anteriormente aportados en nuestra línea de investigación. Se empleó nuevamente la línea de linfoma murino L5178Y pero ahora se realizó su modificación genética para la expresión de un gen reportero fluorescente (mCherry/*GFP*) para realizar el seguimiento de las células metastásicas, además de que se probó una nueva proteína, la interleucina 12 (IL-12), la cual ya ha demostrado poseer propiedades antitumorales, y el tratamiento combinado de CMM que expresan TRAILs e IL-12; esto se realizó para evaluar si existe un efecto sinérgico aún mayor que el de TRAILs e IFN β , y con ello desarrollar nuevos tratamientos que puedan ser empleados para el tratamiento de tumores sólidos.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Los tratamientos convencionales como quimioterapia y radiaciones, en la mayoría de los casos son poco efectivos, y tienen efectos secundarios graves. Por eso, es importante el desarrollar nuevas terapias, que sean específicas y eficaces contra el linfoma y otros tipos de cáncer.

Las CMM transducidas con genes que expresen productos antitumorales tienen aplicaciones promisorias para tales fines, ya que además de su relativamente fácil obtención y cultivo, tienen la habilidad para realizar *homing*, y con ello, liberar los productos antitumorales directamente sobre las células malignas de los tumores. TRAILs ha demostrado una elevada capacidad para producir apoptosis de las células malignas. IFN β o IL-12 son citocinas que activan la respuesta inmune anti-tumoral, pero debido a su corta vida media se requiere un mecanismo que facilite su administración continua sin generar toxicidad. Por ello, proponemos evaluar la eficacia antitumoral al implantar CMM-MO-transducidas con los transgenes TRAILs, IFN β o IL-12 en un modelo singénico de linfoma con ratones BALB/c. Los resultados de este trabajo ofrecen un tratamiento innovador, específico y eficaz que pudiera tener actividad en contra de cualquier tumor sólido.

4. HIPÓTESIS

Las CMM-MO de ratón modificadas genéticamente para que sobreexpresen TRAILs, IFN β o IL-12, al ser implantadas intratumoralmente en un modelo de linfoma murino singénico e inmunocompetente, son capaces de reducir el tamaño del tumor, evitar el desarrollo de metástasis e incrementar significativamente la supervivencia de los ratones, en comparación con ratones con linfoma, implantados con CMM-MO no transducidas o no implantados con CMM-MO.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia antitumoral de CMM-MO modificadas genéticamente para sobreexpresar TRAILs, IFN β o IL-12 en un modelo de linfoma murino singénico e inmunocompetente.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Transducir CMM-MO de ratón con los transgenes TRAILs, IFN β e IL-12, la línea celular de linfoma murino L5178Y con un gen reportero fluorescente y validar su expresión génica.
- 2) Evaluar la actividad antitumoral de CMM-MO que expresan IL-12, las combinaciones TRAILs con IL-12, TRAILs con IFN β y el tiempo de supervivencia en un modelo murino singénico de linfoma.
- 3) Analizar la capacidad de migración de las CMM-MO transducidas con TRAILs, IFN β e IL-12 y su potencial anti-metastásico en un modelo murino mediante fluorescencia e histología.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

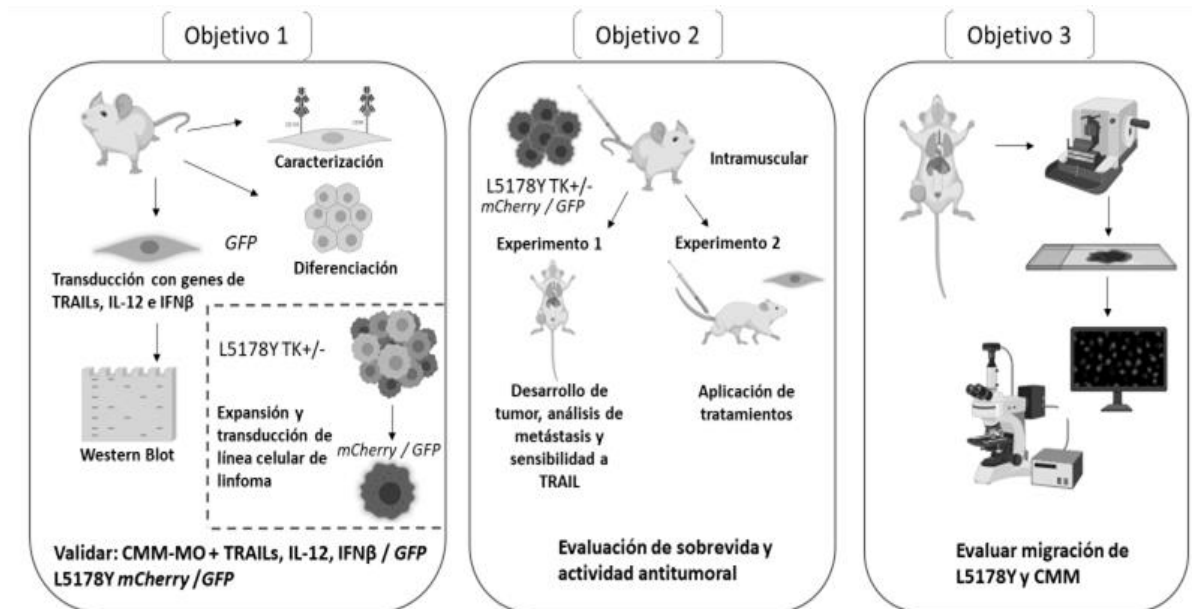


Figura 5. Estrategia experimental. Las CMM se obtuvieron de médula ósea de ratones (BALB/c) (CMM), las cuales se caracterizaron y se diferenciaron. Se realizó transducción lentiviral para la expresión de TRAILS, IFN β e IL-12, y se validó la expresión génica por *Western Blot*. Simultáneamente se realizó la transducción de las células de linfoma murino L5178Y TK +/- para que expresen el reportero fluorescente *mCherry* / *GFP*. Posteriormente, se inocularon las células de linfoma transducidas en el gastrocnemio derecho de ratones BALB/c para la realización de 2 experimentos. En el primero se evaluó el desarrollo del tumor, análisis de metástasis y sensibilidad de apoptosis por TRAIL por análisis histológico e inmunohistoquímica. En un segundo experimento se aplicaron los tratamientos para seguimiento de los tumores y sobrevida. Por último, después realizar el sacrificio de los grupos de experimentación, se aislaron biopsias de los tumores, así como de los órganos donde se encontró metástasis, y se analizaron por medio de microscopía de fluorescencia y tinción Hematoxilina-Eosina para el análisis de la capacidad anti metastásica de los tratamientos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Diseño de secuencias de los transgenes.

Los vectores que se utilizaron en este trabajo fueron diseñados empleando la plataforma Vector Builder de Cyagen (Santa Clara, California 95050, USA). Los constructos de los vectores fueron diseñados por González-Villareal [80], para la expresión de TRAILs, IFN β e IL-12, y que además expresan la proteína verde fluorescente (*GFP*) como marcador reportero: pLV[Exp]-EGFP/Neo-EF1A>{sMurTRAIL}, pLV[Exp]-EGFP/Neo-EF1A>mlfnb1[NM_010510.1], pLV[Exp]-EGFP/Neo-EF1A>{MurIL12-70p}. El vector lentiviral pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>mCherry fue comprado directamente de la casa comercial Vector Builder, y le brinda a las células fluorescencia color verde de *GFP* y rojo por *mCherry*.

7.2. Obtención y expansión de CMM-MO.

Las CMM-MO fueron obtenidas a partir de fémures de 3 ratones BALB/c, 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. Se requirió esta cantidad de ratones para reunir la cantidad necesaria de células para ser aplicadas en los tratamientos experimentales. Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individual (Lab&bio), con un flujo de aire filtrado para que no ingresen agentes nocivos del ambiente. Además, se cuenta con un sistema automático de homeostasis ambiental que registra y mantiene en condiciones idóneas, la presión de aire, la concentración de oxígeno y de CO₂, la humedad, la temperatura, y la concentración de amoníaco. Las jaulas se limpiaron cada tres días. Los ratones empleados para el aislamiento de las CMM-MO se sacrificaron en una cámara de CO₂ y se confirmó su muerte por medio de dislocación cervical con posterior revisión de los signos vitales. A continuación, se describe brevemente el protocolo de aislamiento. Los huesos obtenidos se descontaminaron con etanol al 70% por 1 min. (minutos). Posteriormente, para obtener las CMM-MO cortamos las epífisis del

hueso con un bisturí. La médula ósea se extrajo introduciendo una jeringa con aguja calibre 30 en el canal medular de cada hueso que contenía 2-4 mL de medio de cultivo con DMEM-F12-glutamax (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY 14072, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino estéril (SFB) (Gibco), 100 µg/mL gentamicina (Gibco), 2.5 µg/mL de anfotericina B (Gibco) y 2 nM glutamina (Gibco). El medio inyectado en el canal medular fue colectado y depositado en una botella de 25 cm² con tapón de rosca, permeable a los gases (Corning, NY 14831, USA). La botella con la médula ósea fue incubada en atmósfera de CO₂ al 5%, a 37°C por 24 h. Las células que no se adhirieron en la botella de cultivo fueron colocadas nuevamente en una botella de cultivo de 25 cm². A la botella original se le agregaron 5 mL de DMEM-F12 suplementado fresco. Esos pasos se repitieron tres veces, para tener al final cuatro botellas con células adherentes. Al finalizar las 72 horas (h) de cultivo se reemplazó el medio de cultivo con 5 mL de DMEM-F12 suplementado fresco y las células fueron cultivadas 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 1 mL de una solución de 0.25% tripsina-EDTA (Gibco) por 5 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 xg y se resuspendieron en 1 mL de medio DMEM-F12 suplementado. El porcentaje de viabilidad celular se determinó mediante el método de exclusión con azul tripano. Brevemente: se mezclan 4 µL de una suspensión de células de MO de los ratones con 16 µL de azul tripano al 2% (Gibco). De esta mezcla, se depositan 10 µL de la solución en una cámara de Neubauer, y se cuentan sólo las células translúcidas (viables). Se calcula 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 x10⁶ / mL con DMEM-F12 suplementado. 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 medio de cultivo. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ hasta alcanzar 80% de confluencia. Estas células se resembraron tres veces en DMEM-F12 suplementado fresco, y cuando alcanzaron el 80% de confluencia se contaron y se colocaron en crioviales (Corning) a una concentración de 1x10⁶ células/mL con dimetilsulfóxido (DMSO) (ATCC, Manassas, Virginia 20110, USA.) al 10%. Se realizó un proceso de congelación lenta donde primero se almacenan los crioviales a -20 °C por una hora, y posteriormente toda la noche a -80°C. Al transcurrir 24 horas, los crioviales se guardan en nitrógeno líquido y ahí se mantienen hasta su uso.

7.3. Caracterización de las CMM-MO mediante los marcadores CD90⁺/CD105⁺/CD34⁻.

El proceso de caracterización se realizó siguiendo los criterios de la ISCT, donde las CMM-MO expresan marcadores CD44, CD24, CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA-DR, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B [44], [45]. El análisis se realizó por medio de inmunohistoquímica empleando anticuerpos monoclonales primarios anti-CD105, anti-CD90 y anti-CD34 (USbiologicals, Salem, Massachusetts, USA) diluidos con PBS 1:25, 1:200 y 1:100, respectivamente. Como sistema de detección utilizamos el *Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) detection IHC Kit* (Abcam, Burlingame, California, USA). Las CMM-MO previamente aisladas se llevaron hasta el tercer pase y fueron sembradas en microcámaras de 4 pozos Lab-Tek® (Nunc®, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) por 12 h para permitir su adherencia. Después de ese lapso las células fueron fijadas con metanol-acetona (4:1) por 10 min a 4°C. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS al 10%. Las CMM-MO se lavaron en TBST por 5 min. Se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ y se incubó la preparación 10 min a temperatura ambiente. Se realizó otro lavado con TBST por 3-5 min, y se bloquearon las proteínas con la solución *protein block*, incluida en el kit (por 30 min a 37°C, en cámara húmeda). Se realizó otro lavado con TBST por 3-5 min, para

continuar con la adición del anticuerpo primario. La laminilla con el anticuerpo primario se cubrió con plástico sellador durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después de transcurrido ese tiempo, se lavó como antes y se cubrió con el anticuerpo secundario, incubando por 30 min a 37°C en cámara húmeda. Se lavó con TBST 3-5 min y se agregó la solución de estreptavidina-HRP incluida en el kit, incubando por 15 min a 37°C en cámara húmeda. La preparación se lavó 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 pañuelo, se montó un cubreobjetos encima de la preparación y, se selló con resina Entellan (Merck). La laminilla se conservó en oscuridad hasta su uso. Se analizaron 5 campos por laminilla con un microscopio 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), reportando como porcentaje de células positivas. El software ImageJ es una plataforma gratuita que permite el análisis y/o manipulación de imágenes de manera digital (<https://imagej.nih.gov/ij/>)

7.4. Evaluación de multipotencia de las CMM-MO.

Se evaluó la capacidad de multipotencia de las CMM-MO para diferenciarse a osteoblastos y adipocitos utilizando el *Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit* (R&D Systems, Inc. Minneapolis, Minnesota 55413, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para demostrar la propiedad de diferenciarse a osteoblastos de las CMM-MO, 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. Los osteoblastos fueron identificados con colorante Von Kossa, donde se tiñeron los depósitos de matriz ósea de color marrón oscuro o negro; brevemente las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se transfieren a solución saturada de carbonato de litio por 20 minutos. Se realizaron lavados con agua corriente y se colocan en una solución de nitrato de plata al 5%, bajo iluminación brillante (exposición a luz natural) en un tiempo de 30 a 60 min. Después de este tiempo se observa un cambio de color. Finalizada esta parte, se sumergen las células en una solución de tiosulfato de sodio al 5% por 5 min. Se hicieron lavados con agua corriente y una contratinción con rojo neutro. Por último, se lavó el exceso de colorante, se deshidrató la laminilla sumergiéndola sucesivamente en etanol al 70%, al 96%, al 100% y en xilol. Se eliminó el exceso de xilol con un pañuelo, se montó un cubreobjetos encima de la preparación, se selló con resina Entellan (Merck). La laminilla se conservó en oscuridad hasta su uso.

Las CMM-MO se diferenciaron a adipocitos con el siguiente procedimiento. 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 100% con medio *StemXVivo® osteogenic/adipogenic base media* (R&D Systems, Inc. Minneapolis, Minnesota 55413, USA). Se reemplazó el medio de cultivo con medio adipogénico suplementado: α MEM basal media (10% SFB, 50 μ g/mL de gentamicina, 2.5 μ g/mL de anfotericina B) y la proporción correcta del suplemento adipogénico

(hidrocortisona, isobutilmetilxantina e indometacina) 100X, incluida en el *Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit*. El medio suplementado se reemplazó cada 3-4 días hasta completar un total de 14 días. Las células diferenciadas a adipocitos se identificaron por la presencia de gotas lipídicas mediante la tinción de Rojo oleoso O; brevemente, las células son fijadas en paraformaldehído al 4% por 20 min a temperatura ambiente. Se descarta el fijador y se hacen 2 lavados con agua. Se añade isopropanol al 60% por 5 min. Una vez transcurrido el tiempo se descarta el isopropanol y se cubren las células con la solución de trabajo de rojo oleoso (3 mL del stock en 2 mL de agua destilada) por 10-20 min. Se retira el rojo oleoso y las células se lavan 2-5 veces con agua hasta eliminar el exceso de colorante. Se utiliza contratinción de hematoxilina por 1 min sumergiendo la laminilla sucesivamente en etanol al 70%, al 96%, al 100% y en xilol. Se eliminó el exceso de xilol con un pañuelo, se montó un cubreobjetos encima de la preparación, se selló con resina Entellan (Merck). La laminilla se conservó en oscuridad hasta su uso.

Los cultivos de células diferenciadas a osteoblastos o adipocitos se observaron con un microscopio de campo claro (Leica, DM IL LED Wetzlar, Alemania), equipado con un objetivo 10X y una cámara Leica (DFC295).

7.5. Modificación genética de las CMM-MO

7.5.1. Transducción lentiviral.

En botellas de cultivo de 25 cm² se inocularon 5 ×10⁵ CMM-MO y se incubaron por 16 h en atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. Después de ese tiempo se adicionaron 5 µg de sulfato de protamina/mL (Sigma-Aldrich) para transducir a las células. Todos los cultivos se infectaron con el lentivirus correspondiente a una multiplicidad de infección (MOI) de 2 partículas virales/célula, de acuerdo a lo reportado por Yuan *et al* [106]. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% por 48 h. Después de haber hecho un pase de los cultivos transducidos, a cada uno de éstos se le agregaron 200 µg de geneticina (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) /mL para seleccionar las células

transducidas. Después de una semana de selección, se tomó una alícuota de las CMM-MO modificadas y fueron cultivadas en microcámaras de 4 pozos Lab-Tek® (Nunc®, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA); se mantuvieron por 12 h con medio DMEM-F12 suplementado para permitir la adherencia a la laminilla. Después de ese tiempo se eliminó el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS al 10% y se fijaron las células con metanol-acetona (4:1) por 10 min a 4°C; seguido de eso se realizó otro lavado con PBS al 10%, se retiró el exceso de humedad y se añadió una gota (7 µL) medio de montaje *Vectashield* con DAPI (Vecta Mount, Vector laboratories), y se colocó un cubreobjetos sobre la laminilla. Se realizó el conteo de las células totales y las células verde-fluorescentes en cuatro campos por medio de microscopio de epifluorescencia (Nokia, Eclipse 50i) 40X; se tomaron fotografías digitales de cada campo con una cámara Sight DS-2MV acoplada al microscopio de epifluorescencia. Se calculó la eficiencia del procedimiento como porcentaje de transducción.

7.5.2. Cálculo de la eficiencia de transducción.

Se calculó la eficiencia de transducción aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ eficiencia de transducción} = \frac{\text{CMM-MO-GFP}}{\text{CMM-MO totales}} \times 100$$

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

7.6. Validación de la expresión de los transgenes por las CMM-MO.

Para confirmar la expresión de los transgenes a nivel de traducción se realizó la técnica de *Western Blot*. Después de incubar 48 h en medio DMEM-F12 suplementado, se obtuvieron 9 ± 1 mL del medio de cultivo usado de monocapas confluentes de CMM-MO modificadas con TRAILs, IFNβ e IL-12. El medio de cultivo se concentró por ultrafiltración con centrifugación a 5,000 rpm por 40 min a temperatura ambiente en una columna Amicon (Amicon® Ultra-15 10K Centrifugal

Filter Devices). Se colectó el medio concentrado y se tomaron 500 μ L de éste en un microtubo de 1.5 mL para proceder con la 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 concentrado en el mismo tubo, y se mezcló por inversión durante 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 mezcló por inversión 1 min. Enseguida se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 7 min y se retiró el sobrenadante. Finalmente se dejó secar a 50°C y se resuspendió en agua MilliQ (volumen final 100 μ L). Para estandarizar la técnica se lisaron CMM-MO sin transducir empleando el buffer de lisis PKR para la detección de actina. Brevemente: se inocularon 500,000 células en una placa Petri y se incubaron por 12 h. Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS 10%. Se añadió el buffer de lisis PKR 1X, y se incubó por 20 min a -20°C. Transcurrido este tiempo, se hizo un raspado de las células y se transfirieron a un microtubo de 1 mL. Las células se mezclaron en un vórtex por 10 seg, para lisar por completo. El lisado se centrifugó 12,000 rpm a 4°C por 2 min y se recuperó el sobrenadante. Se cuantificaron las proteínas totales por medio de Bradford (Bradford Quick Start Bio Rad); brevemente, se usó una placa de 96 pozos la cual manejamos con hielo para mantener más estables las proteínas. Se colocó 1 μ L por pozo de muestra y se añadieron 100 μ L del reactivo de Bradford. Se incubó por 5 min sobre hielo y se leyó absorbancia a 600 nm. Con las preparaciones obtenidas se realizó un *Western Blot*; primero, se corrió electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS (*SDS/PAGE*, por sus siglas en inglés [*sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis*]) al 12% con 1.5 mm de grosor (Sigma-Aldrich). Los geles se cargaron con 40 μ L del concentrado proteico por carril (100 μ g/mL aprox. de proteína total) y se corrieron a 85 V por 15 min y luego 100 V por 1 h. Las proteínas se electro-transfirieron a una membrana de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF) (Bio Rad, Hercules, California, USA) por medio de una cámara de transferencia semi-seca (BioRad, Hercules, California, USA), siguiendo una rampa de voltaje (15 min, 10 V; 10 min, 15 V; 5 min, 20 V), y se bloquearon

incubando las membranas con las proteínas toda la noche con leche semidescremada comercial (Svelty, Nestlé, Ciudad de México) 5% en TBS a 4°C en agitación (20 RPM). Se realizó un lavado con TBS y posteriormente las preparaciones de proteínas se incubaron 4 h a 4°C, con anticuerpos primarios anti-TRAIL (1:200), anti-IFN β (1:800), anti-IL-12 (1:1000) y anti-Actina (1:1000) de ratón, obtenidos de conejo (Abcam). Se realizaron 4 lavados con TBST por 5 min y luego se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario policlonal anti-conejo conjugado con HRP (*Horse-radish peroxidase* –Peroxidasa de rábano picante—) (1:10,000). Después de incubar se realizaron 4 lavados con TBST por 5 min y un último lavado por 5 min con TBS. Se reveló utilizando el estuche de luminol Clarity ECL Kit (Bio Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante y se analizaron las membranas en un fotodocumentador Molecular Imager® Chemidoc XRS+ Imaging System (Bio Rad) y con el software ImageLab incluido en el equipo se tomaron imágenes de las membranas.

7.7. Producción de linfomas.

Se produjeron linfomas en ratones BALB/c mediante la línea celular de linfoma murino L5178Y anteriormente descrita.

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 SFB estéril, 50 μ g/mL gentamicina (Gibco), 2.5 μ g/mL de anfotericina B (Gibco) y 0.1% de *pluronic* F68 al 10% (Gibco) en el medio suplementado.

7.7.1 Modificación genética de las células L5178Y.

La transducción lentiviral se realizó con base al protocolo empleado para la transducción de las CMM-MO de ratón. En botellas de cultivo de 25 cm² se inocularon 5 \times 10⁵ células de L5178Y y se incubaron por 16 h en atmósfera de CO₂

al 5% a 37°C. Después de transcurrido ese tiempo se adicionaron 5 µg de polibreno /mL (Vector Builder) para transducir a las células T [107]. Todos los cultivos se infectaron con lentivirus a una multiplicidad de infección (MOI) de 2 partículas virales/célula. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% por 48 h, y las células transducidas fueron seleccionadas con geneticina (200 µg/mL) (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Después de una semana de selección, las células de linfoma L5178Y modificadas fueron centrifugadas a 300 xg para eliminar el medio de cultivo. Se realizó un lavado con PBS al 10% y se fijaron las células con metanol-acetona (4:1) por 10 min a 4°C; seguido de eso se realizó un lavado con PBS al 10%. Se realizó un extendido de las células fijadas sobre una laminilla, se retiró el exceso de humedad, se añadió una gota (7 µL) medio de montaje *Vectashield* con DAPI (Vecta Mount, Vector laboratories), y se colocó un cubreobjetos sobre la laminilla. Se realizó el conteo de las células totales y las células verde/rojo-fluorescentes en cuatro campos por medio de microscopio de epifluorescencia (Nokia, Eclipse 50i) 40X, y se tomaron fotografías digitales de cada campo con una cámara Sight DS-2MV acoplada al microscopio de epifluorescencia. Se calculó la eficiencia del procedimiento como porcentaje de transducción. Las células seleccionadas se almacenaron en nitrógeno líquido en fase vapor hasta su uso.

7.8. Determinación de la reducción del tamaño de los tumores.

Cálculo del número de muestra: Para determinar el número de muestra se usó la fórmula descrita por Charan (2013) [108], donde $E = \text{Total de animales} - \text{Número de grupos}$. Si E es menor de 20 el número de animales es el adecuado. Esta fue utilizada para el grupo de estandarización ($E = 10 - 5 = 5$) y para los grupos experimentales ($E = 25 - 5 = 20$).

Estandarización del tumor sólido: Se utilizaron dos grupos de 5 animales para realizar la estandarización y reproducir las condiciones experimentales establecidas por González-Villareal [80]. A un grupo se le inocularon 5×10^5 células de L5178Y

transducidas con *mCherry/GFP* en 100 μ L de solución salina y al otro grupo se le inocularon las células L5178Y sin transducir, ambas en el gastrocnemio derecho. Antes de la inoculación se aplicó anestésico intraperitoneal (Ketamina 100 mg/Kg, Xilazina 10 mg/Kg) [109]. Los ratones se mantuvieron vivos hasta un máximo de 26 días o si el tumor sobrepasaba el 10% del peso corporal normal del ratón [110] y se sacrificaron en una cámara de CO₂ con posterior dislocación cervical y verificación de signos vitales. También fueron sacrificados si presentaban signos de intenso dolor de acuerdo con el manual de Manejo de Roedores de Laboratorio aceptado por la Asociación Americana de Acreditación de Laboratorios de Cuidado Animal (AAALAC) [111]: disminución de la ingesta de agua y alimento, pérdida de peso (>20%), pelaje erizado, piel seca, laceraciones, postura y caminar anormal, inclinación de la cabeza, letargia, hinchazón, diarrea, convulsiones, descarga de los orificios corporales y disnea. Al sacrificarse los ratones se les realizó biopsia del tumor y se extrajeron los órganos siguientes: hígado, pulmón, riñón y cerebro. Los órganos extraídos del modelo experimental 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. Se realizaron cortes de 6 μ m con un criostato (Roundfin, Shenyang, China) se colocaron en un portaobjetos con una gota (7 μ L) de medio de montaje *Vectashield* con DAPI (Vecta Mount, Vector laboratories) seguido del montaje de un cubreobjetos, y se observaron mediante un microscopio de epifluorescencia (Nokia, Eclipse 50i) 40X, para analizar la distribución de las células en el tumor y presencia de metástasis en los diversos tejidos aislados. También se realizaron tinciones histológicas con Hematoxilina-Eosina. Tinción Hematoxilina-Eosina: Se sumerge la preparación 60-70 segundos (seg). en Hematoxilina de Meyer, después se lava en agua corriente por 10 seg, enseguida se sumerge en eosina por 10-12 seg, posteriormente se lava en agua corriente por 3-7 seg, se continúa con la deshidratación 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 aclara la muestra con xilol puro por 3 minutos y se monta con resina (Vecta Mount, Vector laboratories), colocando al final un cubreobjetos encima.

Además, se realizó una inmunohistoquímica para el receptor de TRAIL (TRAIL R2/DR5) (anti-DR5, Abcam) en cortes de 6µm de tumores de ambos grupos sin recibir tratamiento, con el fin de evaluar la sensibilidad de TRAILS para producir apoptosis. Nuevamente se empleó como sistema de detección el *Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) detection IHC Kit* (Abcam, Burlingame, California, USA). Los cortes de tumor de ambos grupos se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de *Tissue-Tek O.C.T. compound* (Sakura Finetek, Nagano, Japón) y se fijaron con metanol-acetona (4:1) por 10 min a 4°C, seguido de un lavado con PBS al 10%. Las laminillas se lavaron en TBST por 5 min. Se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ y se incubó la preparación 10 min a temperatura ambiente. Se realizó otro lavado con TBST por 3-5 min, y se bloquearon las proteínas con la solución *protein block*, incluida en el kit (por 30 min a 37°C, en cámara húmeda). Se realizó otro lavado con TBST por 3-5 min, para continuar con la adición del anticuerpo primario. La laminilla con el anticuerpo primario se cubrió con plástico sellador durante toda la noche, a 4°C en cámara húmeda. Después de transcurrido ese tiempo, se lavó como antes y se cubrió con el anticuerpo secundario, incubando por 30 min a 37°C en cámara húmeda. Se lavó con TBST 3-5 min y se agregó la solución de estreptavidina-HRP incluida en el kit, incubando 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 pañuelo, se montó un cubreobjetos encima de la preparación y se selló con resina Entellan (Merck). La laminilla se conservó en oscuridad hasta su uso. Se analizaron 5 campos por laminilla con un microscopio 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).

Una vez comprobada la eficacia para generar un tumor sólido por las células transducidas, la sensibilidad de TRAIL para generar apoptosis y el análisis de presencia de metástasis, continuamos con el establecimiento del tumor sólido en los grupos experimentales.

Establecimiento del tumor sólido. Se formaron 5 grupos, cada uno con 5 ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas (n=25), a los cuales se le indujo el desarrollo de un linfoma sólido, inoculando 5×10^5 células L5178Y transducidas, suspendidas en 100 μ L de solución salina fisiológica en el gastrocnemio derecho, como describió González-Villareal en 2018 [80]. Antes de la inoculación se aplicó anestésico vía intraperitoneal (Ketamina 100 mg/Kg, Xilazina 10 mg/Kg) [109]. Al día 9 post inoculación, los tumores del gastrocnemio derecho alcanzaron un volumen de 1-2 cm^3 , cumpliendo con lo previamente reportado por nuestro grupo de investigación [80].

Tratamientos experimentales: Los tratamientos elegidos fueron seleccionados tomando en cuenta los resultados obtenidos en los trabajos previos de nuestro laboratorio donde la combinación de TRAILs e IFN β fue la que mostró mayor efecto citotóxico, redujo el volumen de los tumores y alargó la sobrevivencia de los ratones [105],[80]. Además, en este trabajo se añadió la IL-12 y la combinación con TRAILs, para observar si presentaba mayor efecto que los tratamientos previamente analizados. Se probaron varias combinaciones de CMM-MO transducidas con los tres transgenes de interés (TRAIL, IFN β e IL-12) o sin ninguno de ellos. 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 no portando ninguno. Antes de la inoculación se aplicó anestésico vía intraperitoneal (Ketamina 100 mg/Kg, Xilazina 10 mg/Kg) [109]. En la lista siguiente se muestran los grupos experimentales:

- Grupo 1: Sin tratamiento (Control)
- Grupo 2: CMM-MO sin transducir (naïve) 1×10^6 CMM-MO
- Grupo 3: 5×10^5 CMM-MO transducidas con TRAILs y 5×10^5 CMM-MO transducidas con IFN β
- Grupo 4: 5×10^5 CMM-MO transducidas con TRAILs y 5×10^5 CMM-MO transducidas con IL-12
- Grupo 5: 1×10^6 CMM-MO transducidas con IL-12

Medición del tejido tumoral: Desde el día de la inoculación de las células L5178Y hasta máximo el día 90 postratamiento o cuando los tumores alcanzaron el 10% del peso normal del ratón [110], se midieron las extremidades inoculadas 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:

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

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 datos obtenidos fueron graficados con el software Prism GraphPad versión 8.00 para Windows (Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

7.9. Determinación del tiempo de sobrevida.

Se dio seguimiento a los tumores durante todo el estudio hasta máximo el día 50 post-inoculación, cuando todos los ratones murieron o se sometieron a eutanasia con el procedimiento anteriormente mencionado. Si antes de los 50 días los ratones presentaban dolor moderado (estrechamiento orbital con parpados parcialmente cerrados, abultamiento nasal y de mejillas, orejas poco levantadas y hacia atrás, bigotes agrupados) se aplicó analgésico (Buprenorfina 0.05-205 mg / Kg vía intraperitoneal cada 6-12 h) [112], con el fin de mantener por el mayor tiempo el desarrollo de la enfermedad y analizar la eficacia del tratamiento, así como la visualización del desarrollo de metástasis. A la par de la medición de los tumores, se analizó la sobrevida de los ratones con la prueba de sobrevivencia de Kaplan-Meier. Los resultados se interpretaron con el software SPSS v.24 con la intervención

de *Log Rank de Mantel-Cox* (significancia: $p=0.05$), y con el software Prism GraphPad versión 8.0.

7.10. Evolución de los tumores post-inoculación y análisis de metástasis.

Los ratones se analizaron individualmente a lo largo del estudio registrando decesos, colectando biopsias de los tumores, órganos y pesos de los ratones. Los órganos extraídos del modelo experimental se colocaron en una cubetilla y se incluyeron en *Tissue-Tek O.C.T. compound* (Sakura Finetek, Nagano, Japón) para ser almacenados a -80°C . Los tumores fueron sometidos a un proceso de pre-fijación en acetona fría por 10 minutos, para posteriormente ser incluidos en *Tissue-Tek O.C.T compound*.

A partir de las biopsias obtenidas de los tejidos tumorales, se realizaron 2 cortes de $6\ \mu\text{m}$ con un microtomo criostato (Roundfin, Shenyang, China) y se montaron en portaobjetos. Se eliminó el exceso de *Tissue-Tek O.C.T. compound* con agua corriente y posteriormente, se les realizó tinción con Hematoxilina-Eosina. Tinción Hematoxilina-Eosina: Se sumerge la preparación 60-70 seg en Hematoxilina de Meyer, después se lava en agua corriente por 10 seg, enseguida se sumerge en eosina por 10-12 seg, posteriormente se lava en agua corriente por 3-7 seg, se continúa con la deshidratación 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 aclara la muestra con xilol puro por 3 minutos y se monta con resina (Vecta Mount, Vector Laboratories). Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de campo claro analizando los tejidos de ambos, ratones tratados y no tratados.

Tomando en cuenta los resultados del experimento uno para el establecimiento del tumor, se seleccionaron los órganos en donde se hubo detectado presencia de metástasis, se realizaron dos cortes de $6\ \mu\text{m}$ por cada tejido y se realizó tinción con Hematoxilina-Eosina para confirmar los cambios histopatológicos producidos y la realización de una escala semicuantitativa de alteración histológica. Así mismo, con el fin de conocer si las CMM-MO transducidas

migraron a estos órganos se evaluó por microscopía de epifluorescencia su presencia en el tumor en conjunto con las células de linfoma L5178Y, ambas expresando fluorescencia. Se realizaron dos cortes de 6 µm por cada tejido, se retiró el exceso de *Tissue-TEK O.C.T compound* con agua corriente y con un pañuelo se retiró el exceso de líquido sin dejar secar por completo. Se añadió una gota (7 µL) de medio de montaje *Vectashield* con DAPI, y se colocó un cubreobjetos sobre la laminilla. Se realizó el conteo de las células totales y las células verde/rojo-fluorescentes en cuatro campos por medio de microscopio de epifluorescencia (Nokia, Eclipse 50i) 40X; se tomaron fotografías digitales de cada campo con una cámara Sight DS-2MV acoplada al microscopio de epifluorescencia. Las imágenes se procesaron empleando el software Image J, y se reportó como intensidad de fluorescencia.

7.11. Aspectos éticos.

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

8. RESULTADOS

Los resultados obtenidos se irán describiendo según el orden de los objetivos específicos.

8.1. Transducir CMM-MO de ratón con los transgenes TRAILs, IFN β e IL12 y la línea L5178Y con un gen reportero fluorescente.

8.1.1. Obtención de CMM-MO ratón.

Dos semanas después de cultivar las células adherentes de la médula ósea de 3 ratones de la cepa BALB/c, se obtuvo un cultivo de células adherentes al plástico de la caja de cultivo, las cuales presentaban morfología alargada en forma de huso, similar a fibroblastos. Al alcanzar el 80% de confluencia se realizó el subcultivo hasta el pase 3. En la figura 6 se incluye una imagen representativa del cultivo de células adherentes de médula ósea en el pase 3 (figura 6).



Figura 6. Células adherentes de médula ósea de ratón del tercer pase al 80 % de confluencia en campo claro a 10X.

8.1.2. Caracterización de CMM-MO por marcadores CD105, CD90, CD34.

La identificación de los marcadores de extirpe mesenquimal establecidos por la ISCT [45] se realizó por medio de inmunohistoquímica contra CD105, CD90 y CD34 en células adherentes de médula ósea del pase 3. Las células positivas se identificaron por la coloración café-rojiza y las negativas se observaron de color azul-violeta por la contratinción con Hematoxilina de Harris. Por medio de microscopía de campo claro, se realizó un conteo de células positivas en 5 campos y el resultado se reportó como porcentaje de positividad. Las células adherentes obtenidas de médula ósea mostraron el fenotipo CD105⁺ (98.39 ± 0.945 %), CD90⁺ (98.95 ± 0.964 %) y CD34⁻ (0.754 ± 0.541 %) (figura 7).

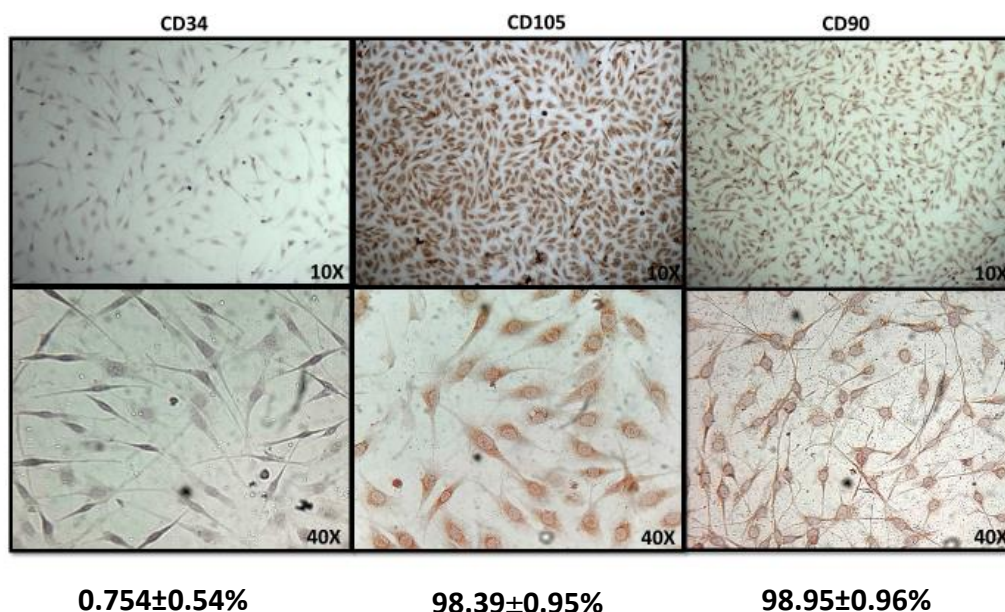


Figura 7. Caracterización de CMM-MO ratón. CMM de pase 3. Anticuerpos: anti-CD90 (1:200), anti-CD105 (1:25), anti-CD34 (1:100). Porcentaje de células positivas en 5 campos. Positivo coloración café-rojiza; negativo color morado por contratinción con hematoxilina.

8.1.3. Evaluación de multipotencia de las CMM-MO.

Las CMM-MO tienen la propiedad de diferenciarse a diferentes linajes celulares, por ello en este trabajo se realizó la diferenciación hacia linaje adipogénico y osteogénico. En el proceso de diferenciación a linaje adipogénico las CMM-MO se cultivaron con el medio de diferenciación suplementado para adipocitos durante 14 días. Después de ese periodo de tiempo las células se fijaron y se tiñeron con rojo oleoso O. Las CMM-MO diferenciadas a adipocitos cambiaron su morfología de fibroblasto hacia células redondeadas, las cuales presentaron gotas lipídicas intracelulares las cuales se tiñeron levemente de color rojo. Como control negativo se emplearon CMM-MO cultivadas con medio sin factores de diferenciación y como control positivo se empleó tejido adiposo de rata. Para la diferenciación a osteoblastos, las CMM se cultivaron con el medio suplementado con factores osteogénicos por 21 días. Después de transcurrido ese tiempo las células diferenciadas se fijaron y se tiñeron con Von Kossa. Las CMM-MO diferenciadas a osteoblastos presentaron una morfología cuboidea, característica de esta extirpe celular, y además mostraron depósitos de matriz ósea de color marrón oscuro alrededor de las células. Como control negativo se emplearon CMM-MO cultivadas con medio sin factores de diferenciación y como control positivo se utilizó hueso macerado de rata. Las imágenes representativas se incluyen en la figura 8.

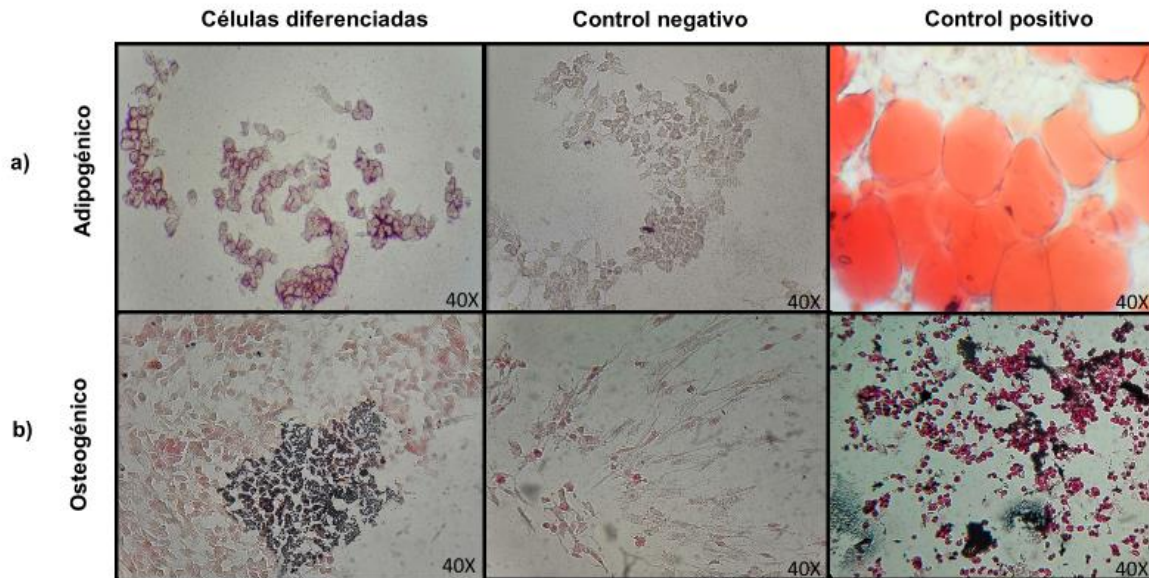


Figura 8. Diferenciación Adipogénica y Osteogénica de CMM-MO. a) Diferenciación a linaje adipogénico: tinción Rojo oleoso; positivo color rojizo de gotas de grasa intracelulares, 14 días post-diferenciación. Control negativo: CMM sin medio de diferenciación; control positivo: tejido adiposo de rata. b) Diferenciación a linaje osteogénico; positivo precipitado color negro de matriz ósea, 21 días post-diferenciación. Control negativo: CMM sin medio de diferenciación; control positivo: hueso de rata. Campo claro a 40X.

8.1.4. Validación de la expresión de TRAILs, IL-12 e IFN β por CMM-MO.

Para evaluar la expresión de los transgenes de TRAILs, IL-12 e IFN β se realizó la modificación genética de las CMM-MO empleando vectores lentivirales. Estos vectores fueron diseñados por González-Villareal [80], y fueron fabricados por la casa comercial Vector Builder de Cyagen. Las CMM-MO durante el proceso de transducción conservaron sus características morfológicas y la capacidad de autorreplicación. Finalizado el periodo de selección con geneticina, se determinó la eficiencia de transducción por medio de microscopía de epifluorescencia de las células que expresaban el gen reportero fluorescente *GFP*. Analizando cuatro campos al azar a 40X; se obtuvo un porcentaje de células positivas del 88% en CMM TRAILs, 95% CMM IFN β y 77% para las CMM IL-12 (figura 9).

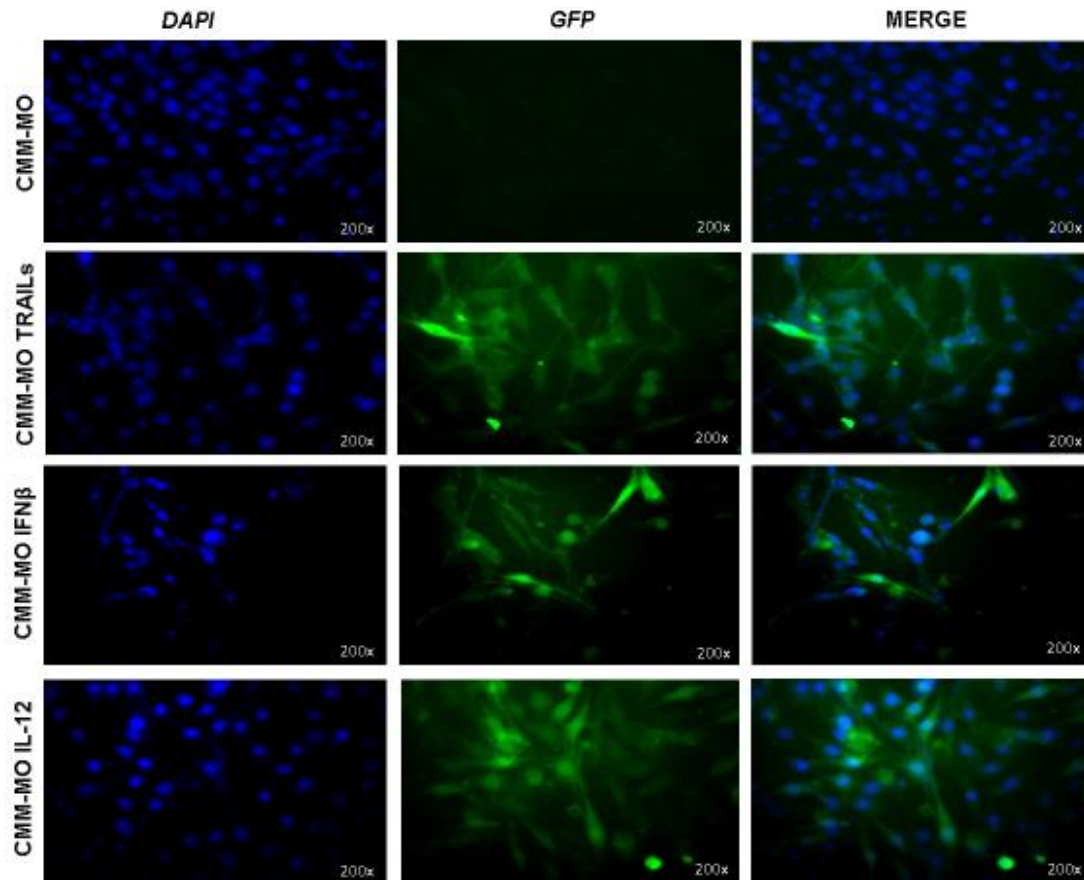


Figura 9. Imágenes de fluorescencia de CMM-MO transducidas una semana después de procedimiento de transducción. CMM transducidas marcadas con gen reportero *GFP* en color verde, núcleo celular teñido con *DAPI* en color azul. Eficiencia de transducción: CMM TRAILS 88%, CMM IFN β 95% y CMM IL-12 77%. CMM, células madre mesenquimales; TRAILS, fracción soluble del ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral; IFN β , interferón beta; IL-12, interleucina 12.

La validación de la expresión de los transgenes a nivel de proteína por parte de las células transducidas con lentivirus se llevó a cabo por medio de *Western Blot*, siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado. Para estandarizar la técnica se empleó un anticuerpo contra la proteína citoplasmática actina y se utilizaron lisados celulares de CMM-MO, obteniéndose una banda de aproximadamente 42 kDa.

Posterior a estandarizar las condiciones continuamos con la detección de las proteínas del sobrenadante en los cultivos de células transducidas. Una vez colectados los sobrenadantes se concentraron y precipitaron para obtener la pastilla de proteínas totales. Las proteínas resuspendidas en agua MiliQ fueron cuantificadas por medio de Bradford. Las muestras fueron cargadas en un rango de 80 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínas totales en un volumen de 40 μL en el gel de poliacrilamida de 1.5 mm de grosor para la separación de proteínas por medio de electroforesis *SDS-PAGE*; se utilizó un buffer de carga 5X. Seguido de eso, se realizó la electro-transferencia en cámara semi-seca hacia una membrana de PVDF, se continuó con el bloqueo, lavados y adición de anticuerpos primario y secundario. En los tres tipos de concentrado de sobrenadante analizados se detectó la presencia independiente de las bandas correspondientes a TRAILs, IL-12 e IFN β , cuyos tamaños correspondían a los pesos moleculares de 22, 22 y 25 kDa, respectivamente (figura 10), las cuales se observaron de color oscuro. Sin embargo, la resolución de las bandas no fue la adecuada, debido a que el buffer de carga empleado generó manchas y ruido de fondo en la membrana de PVDF, por lo que se mantiene como una perspectiva mejorar la calidad de estas.

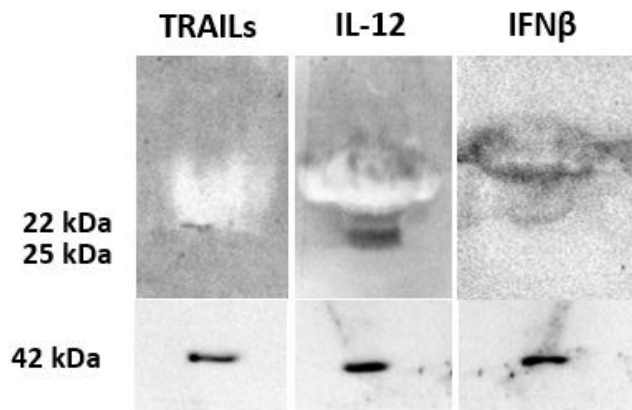


Figura 10. *Western Blot* de sobrenadantes de CMM-MO transducidas. Volumen de carga 40 μL , concentración de 80 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína total. Control de actina. Anticuerpos empleados: anti-TRAIL (1:200), anti-IL-12 (1:1000), anti-IFN β (1:800), anticuerpo primario anti-actina (1:1000), y anticuerpo secundario de conejo conjugado con HRP (1:10 000).

Bandas correspondientes a las proteínas se observan de color negro. Peso molecular de TRAILs, 22 kDa; de IL-12, 25 kDa; y de IFN β , 22 kDa. Actina, 42 kDa.

8.1.5. Validación de la modificación genética de línea de linfoma para la expresión de marcador reportero fluorescente.

La transducción lentiviral de la línea de linfoma se realizó de forma similar a la de las CMM-MO. Esta modificación genética permitió el marcaje de las células de tumor para poder ser identificadas rápidamente en cortes de tejidos, por medio de los reporteros fluorescentes *mCherry*/*GFP*. El proceso de transducción no modificó las características morfológicas normales de las células tumorales, observándose intacta su membrana. Después de la selección por geneticina, se analizó por microscopía de fluorescencia su eficiencia de transducción. Se revisaron 4 campos a 40X y se tomaron fotografías con la cámara adjunta al microscopio de epifluorescencia. Se contaron las células totales de color azul (núcleos con *DAPI*) y las células que presentaban fluorescencia rojo y verde (genes reporteros). La eficiencia de transducción de las células de linfoma L5178Y fue del 94% (figura 11). Debido a que la línea de linfoma es en suspensión, se presentaron problemas de formación de agregados celulares, lo cual dificultó el análisis de la eficiencia de transducción.

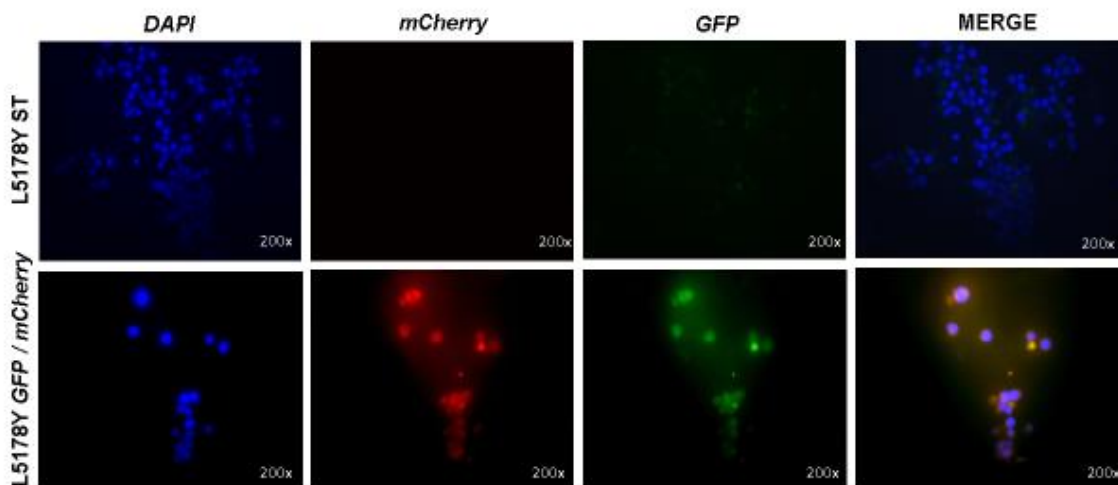


Figura 11. Imágenes de fluorescencia de células L5178Y transducidas una semana después del procedimiento. Células de linfoma L5178Y transducidas marcadas con gen reportero fluorescente *mCherry* y *GFP* en color rojo y verde. Núcleo celular teñido con *DAPI* en color azul. Eficiencia de transducción: 94%.

8.2. Evaluar la actividad antitumoral de CMM-MO que expresan IL-12, las combinaciones TRAILs con IL-12, TRAILs con IFN β y el tiempo de supervivencia en un modelo murino singénico de linfoma.

8.2.1. Comparación del desarrollo del tumor y detección de metástasis.

Con el fin de comprobar si la línea L5178Y transducida mantiene la capacidad para generar un tumor sólido, se realizó un ensayo piloto con dos grupos de 5 ratones BALB/c de 6 a 8 semanas. Al primer grupo se le inocularon 5×10^5 células sin transducir por ratón en el gastrocnemio derecho, según lo estandarizado previamente por nuestro grupo de investigación [80]. Al segundo grupo se le inoculó la misma cantidad de células, pero estas se encontraban modificadas genéticamente para la expresión de los reporteros fluorescentes *mCherry/GFP*. En ambos grupos se permitió el desarrollo del tumor, se realizaron mediciones de los volúmenes de las piernas cada tercer día y fueron sacrificados siguiendo los criterios anteriormente establecidos. Las mediciones de los tumores al día 9 se ilustran en la figura 12. Después del análisis estadístico no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos ($p > 0.05$, prueba de T), indicando que el procedimiento de transducción no altera la capacidad de la línea celular para formar un tumor sólido.

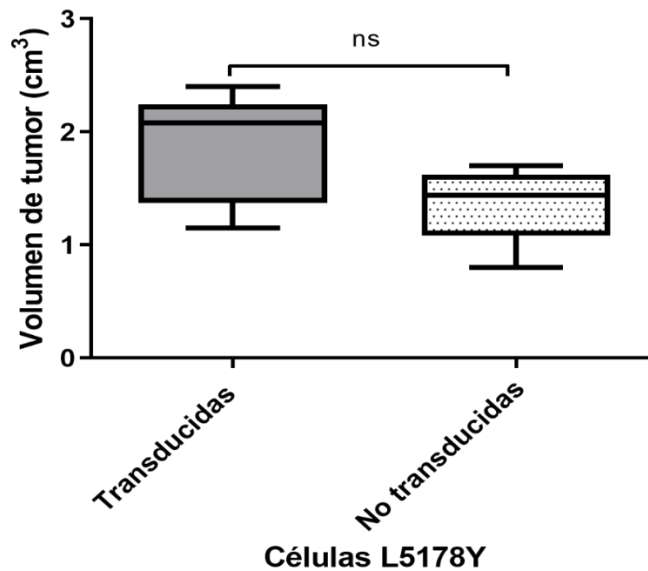


Figura 12. Volumen del tumor al día 9. Los valores graficados representan la media \pm el error estándar. ns: no diferencia significativa, $p < 0.05$.

Los ratones de este ensayo se mantuvieron con vida hasta el día 22 y luego fueron sacrificados debido a que presentaban signos de dolor intenso, además que los tumores sobrepasaban el 10% del peso del ratón. Una vez sacrificados, se extrajeron los tumores y los siguientes órganos de ambos grupos: hígado, riñones, pulmones y cerebro. Estos se procesaron con fijador de Carnoy para inclusión en parafina y con Tissue-Tek, O.C.T compound, para realizar corte con un criostato. Se realizaron cortes de $6\mu\text{m}$, dos por tejido, se les lavó el exceso del medio de montaje con agua corriente, se eliminó el exceso de humedad con un pañuelo y se les colocó el medio de montaje (Vectashield with DAPI), para examinar en microscopio de epifluorescencia. En los cortes de tumor se pudo confirmar la presencia de señal fluorescente procedente de las células transducidas con los genes reporteros fluorescentes *mCherry* y *GFP*, de color rojo y verde (figura 13). Mientras tanto, los tumores generados por células de linfoma no transducidas no presentaban señal procedente de estos marcadores. Posteriormente se analizaron los órganos extraídos. En todos los ratones del grupo inoculado con la línea de

linfoma transducida, se detectó señal fluorescente del reportero *mCherry* y *GFP*, de color rojo y verde respectivamente, en los cortes de hígado (figura 14), señal que nos indicaba una posible metástasis a hígado. El daño hepático producido por la metástasis se confirmó por medio de la tinción Hematoxilina-Eosina, donde se observó la presencia de infiltrado de células tumorales linfoides en los sinusoides que rodean a los hepatocitos, formación de nuevos vasos sanguíneos y displasia del parénquima hepático. Como control positivo se empleó un corte de tumor, en donde se visualizó la presencia de las células tumorales linfoides de núcleo grande y citoplasma escaso, ausencia de células musculares esqueléticas y formación de nuevos vasos capilares (figura 15). En los otros tejidos aislados (riñones, pulmones y cerebro) no se detectó señal fluorescente procedente de estos marcadores ni tampoco se observaron cambios morfológicos correspondientes con metástasis.

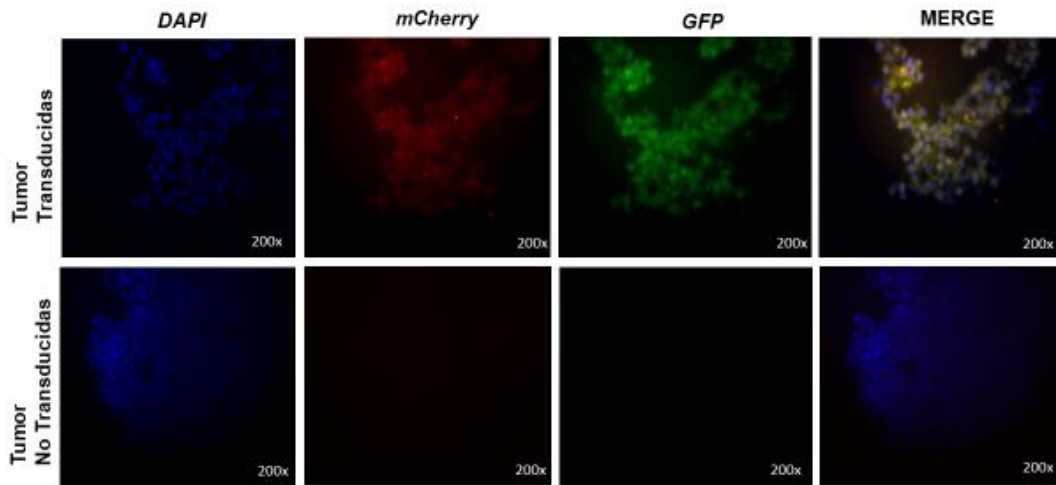


Figura 13. Detección por fluorescencia de células L5178Y transducidas en tumor. Comparación de línea de linfoma L51778Y no transducida y transducida. Células transducidas marcadas con el gen reportero *mCherry* y *GFP* en color rojo y verde. Núcleos celulares teñidos con *DAPI* en color azul.

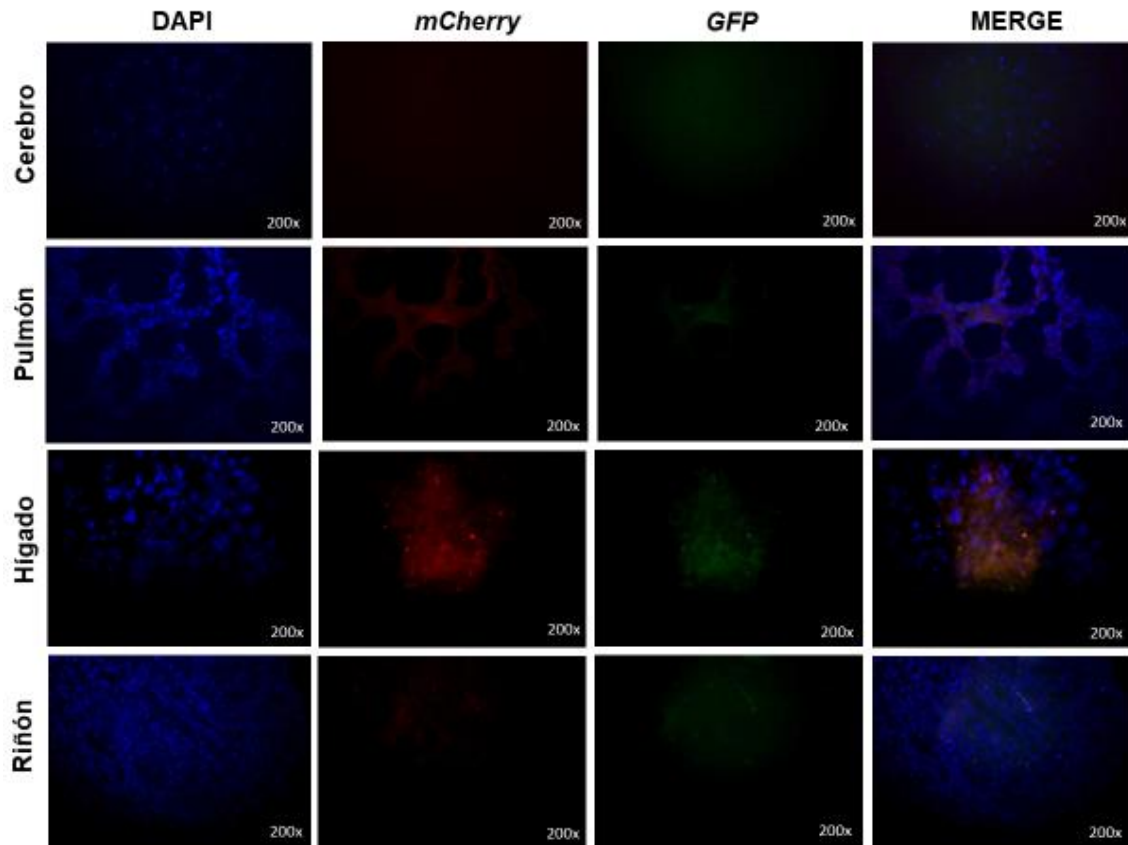


Figura 14. Análisis de metástasis a órganos por fluorescencia. Imágenes de fluorescencia de cortes de cerebro, pulmón, hígado y riñón. Tejidos positivos a células L5178Y transducidas presentan señal del gen reportero *mCherry* en color rojo, y del gen reportero *GFP* en color verde. Núcleos celulares teñidos con *DAPI* en color azul.

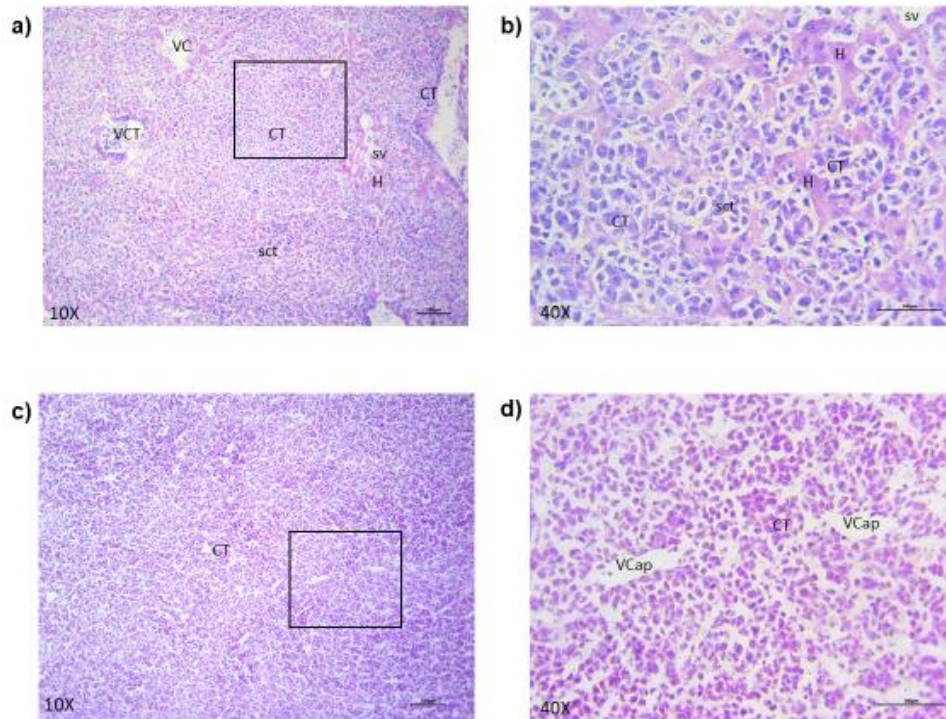


Figura 15. Análisis de metástasis a órganos por tinción Hematoxilina-Eosina. a) Corte de hígado del grupo inoculado con células L5178Y transducidas, campo claro 10X. Se observa evidencia de metástasis por la presencia de células tumorales de color morado en vena central, en sinusoides y en parénquima hepático, así como displasia del tejido. Hepatocitos en color rosa. b) Ampliación a 40X de hígado metastásico. Se observa más claramente la inclusión de células tumorales en sinusoides. VCT: Vena central con células tumorales. VC: Vena central con células sanguíneas. CT: C. tumorales. H: Hepatocitos. Sv: Sinusoides limpios. Sct: Sinusoides con células tumorales. c) Corte de tumor del grupo inoculado con células L5178Y transducidas, el cual se empleó como control positivo de células tumorales, campo claro 10X. Ausencia de células musculares características del músculo esquelético. d) Ampliación a 40X de tumor, se observan vasos capilares tumorales. CT: Células tumorales. Vcap: Vasos capilares en el tumor.

8.2.2. Detección del receptor de muerte de TRAIL

La detección del receptor murino de muerte de TRAIL (TRAIL-DR5) se realizó con el fin de comprobar la sensibilidad de la línea L5178Y para producir apoptosis por medio de esa vía de señalización, ya que la ausencia de este podría representar

un mecanismo de resistencia a la eliminación por esta vía. La estandarización se realizó en cortes de 6 μm de riñón de ratón, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Se emplearon 2 diluciones, 1:200 y 1:400, la primera era la indicada en el kit comercial; como control negativo se empleó la misma muestra, pero sin añadir el anticuerpo primario (figura 16). La señal positiva está indicada por la coloración café-rojiza, mientras la coloración azul-violeta es por la contratinción con Hematoxilina de Harris. Se eligió la dilución 1:200 para continuar con el procesamiento de las muestras debido a que era donde la señal positiva café-rojiza se observó más intensa y uniforme.

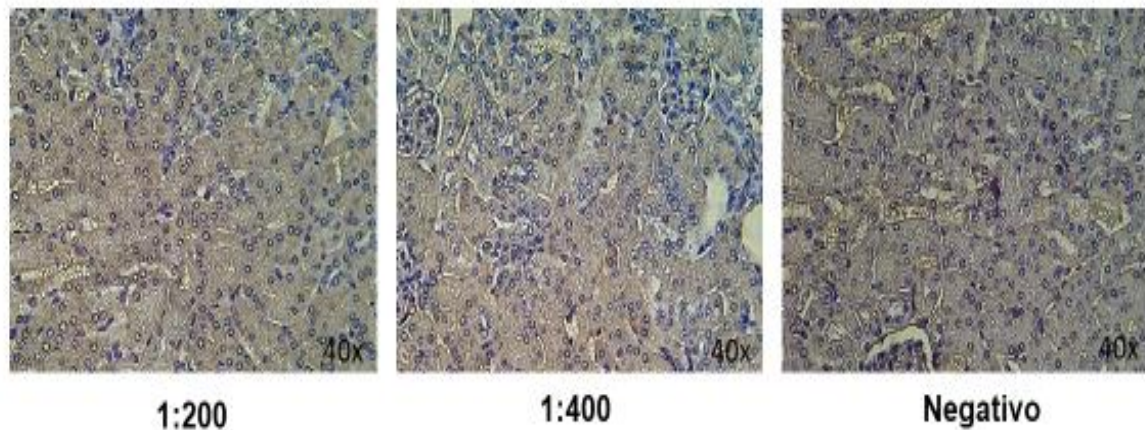


Figura 16. Estandarización de detección del receptor de TRAIL. Corte histológico de 6 μm de riñón de ratón. La positividad se indica por el color café-rojizo; núcleos de color morado por contratinción con hematoxilina. Campo claro a 40x.

Se analizó la presencia del receptor en cortes de 6 μm de tumor, tanto del grupo ratones inoculados con las células L5178Y transducidas como no transducidas sacrificados al día 22, $n=3$. En ambos casos se demostró que las células eran positivas para la presencia del receptor DR5 (No transducidas = 60%, Transducidas = 60%). En dichas células se observaba coloración citoplasmática positiva de color café-rojizo, lo cual es indicativo de que las células son sensibles a apoptosis por el ligando TRAIL. No obstante, la señal de DR5 no era continua, sino

que se presentaba por áreas en la laminilla, lo cual se asocia con diversidad celular en el tumor debido a las células que forman el microambiente. Para el análisis se observaron 10 campos por triplicado, y se reportó como porcentaje de campos positivos. Como control positivo se empleó riñón de ratón y como control negativo se utilizó un corte de tumor procesado sin la adición del anticuerpo primario. En la figura 17 se incluyen imágenes representativas.

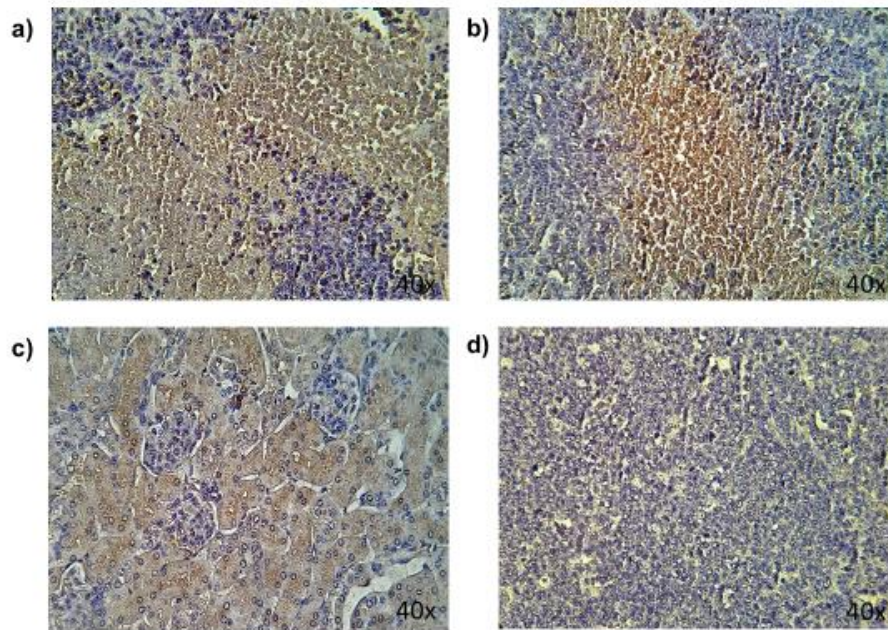


Figura 17. Receptor de TRAIL murino (DR5) en muestras de tumor al día 22 post-inoculación. a) Grupo inoculado con células L5178Y no transducidas, 60% positivo; b) grupo inoculado con células L5178Y transducidas, 60% positivo; c) control positivo (riñón de ratón) y d) control negativo (corte de tumor sin anticuerpo primario). Positividad indicada por coloración café-rojiza; núcleos color morado por contratinción con hematoxilina. Análisis de 10 campos al azar, n=3. Cortes de 6 μ m, campo claro a 40x.

8.2.3. Aplicación de tratamientos contra tumor sólido.

Una vez demostrada la capacidad de las células L5178Y transducidas para generar un tumor sólido, así como la confirmación del receptor de TRAIL, se indujo nuevamente el desarrollo de un tumor sólido en el gastrocnemio derecho de ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas en 5 grupos con una n=5 por grupo, utilizando la línea de linfoma murino L5178Y transducida para la expresión de los genes reporteros *mCherry/GFP*. Se realizó la medición de los gastrocnemios derechos cada 3 días con un Vernier, así como las mediciones de los pesos de los ratones. Al día 9 post-inoculación los tumores de los ratones alcanzaron un volumen entre 1-2 cm³, y al día 10 se aplicaron los diversos tratamientos consistentes de CMM-MO transducidas o sin transducir suspendidas en 100 µL de solución salina. En la figura 18 se observa el desarrollo del tumor conforme al tiempo y el efecto de la aplicación de los tratamientos con CMM-MO. Los tratamientos de CMM-MO que expresaban TRAILs + IFN β , TRAILs + IL-12 e IL-12 lograron reducir de manera significativa el crecimiento del tumor, comparado con el control negativo y con el tratamiento de CMM-MO sin transducir ($p < 0.05$, ANOVA de una vía, comparación múltiple de Tukey). Sin embargo, no hubo diferencias entre estos tratamientos ($p < 0.05$). De manera contrastante, el tratamiento de CMM-MO sin transducir redujo al principio el tamaño de los tumores, sin embargo, cerca del día 20 los tumores volvieron a crecer de manera acelerada.

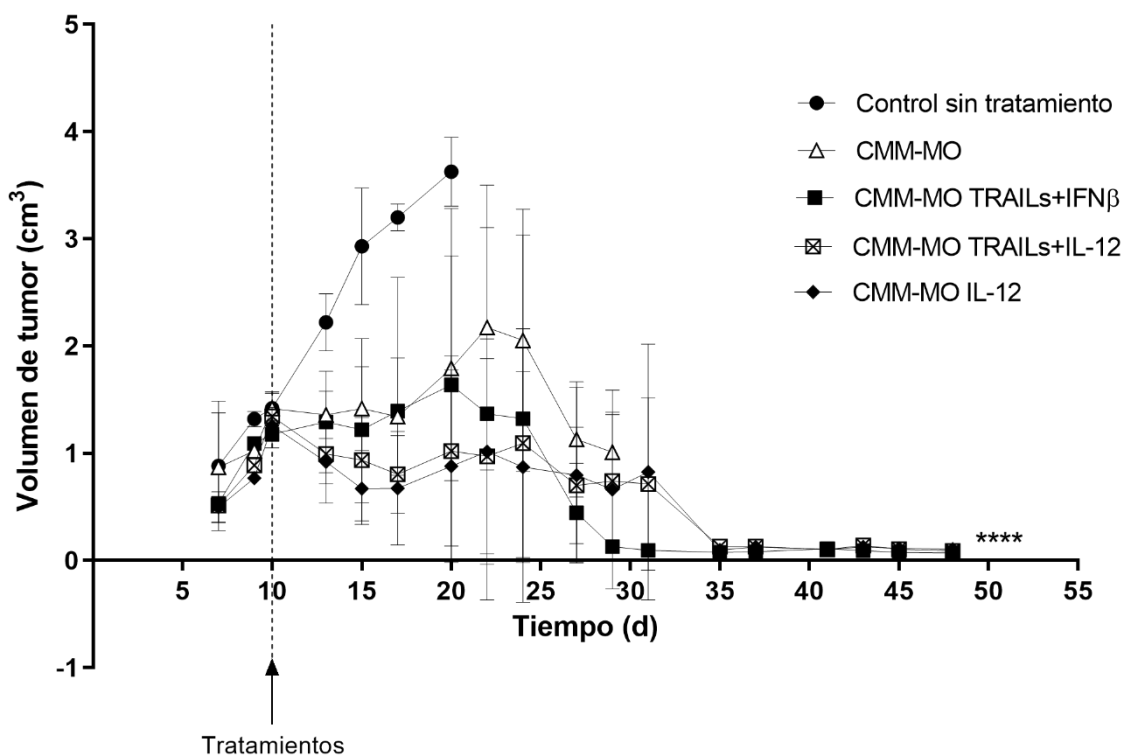


Figura 18. Desarrollo del tumor y aplicación de tratamientos. Los datos representan el valor de la media \pm desviación estándar. CMM-MO, células madre mesenquimales de médula ósea; TRAILs, fracción soluble del ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral; IFN β , interferón beta; IL-12, interleucina 12. **** $p < 0.0001$, $n = 5$ por grupo.

Adicionalmente, se llevó a cabo el seguimiento de las variaciones en el peso de los ratones, debido a que está relacionado con el estado general de salud del animal. A lo largo del estudio, no se presentaron diferencias significativas en el peso de los ratones relacionado con la aplicación de los distintos tratamientos ($p < 0.05$, ANOVA de una vía), lo que indica que dichos tratamientos no alteran las necesidades fisiológicas normales del modelo de estudio (figura 19).

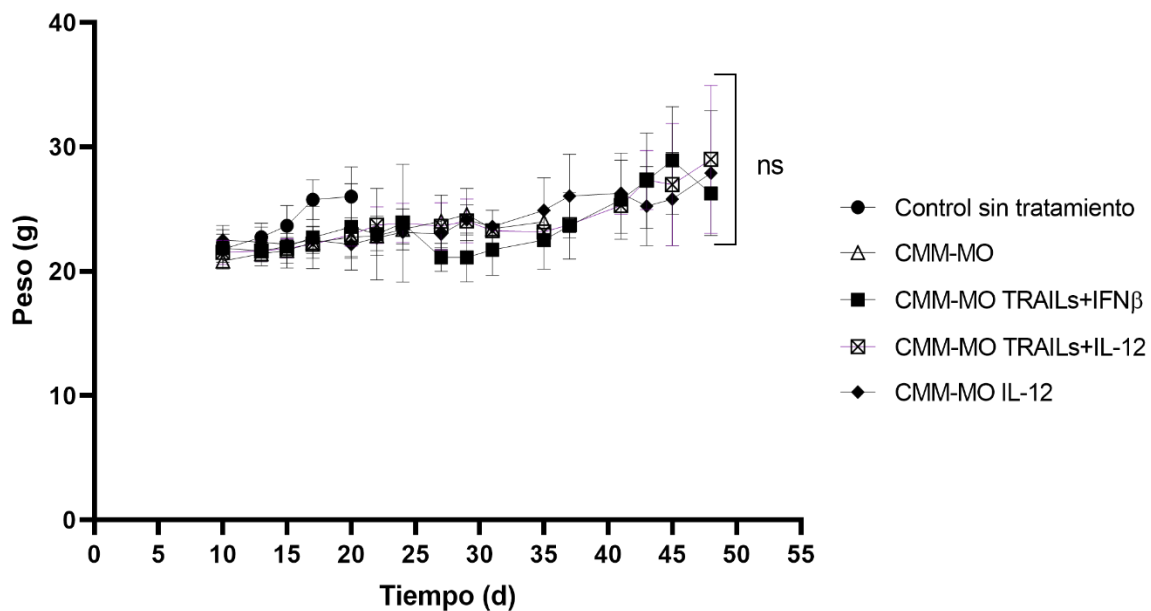


Figura 19. Pesos de ratones en el transcurso del experimento. Valor de la media \pm desviación estándar. CMM, células madre mesenquimales; TRAILs, fracción soluble del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral; IFN β , interferón beta; IL-12, interleucina 12. ns = $p > 0.05$, n = 5 por grupo.

Posteriormente, se realizó el análisis de la sobrevivencia de los ratones tratados. Conforme los ratones iban siendo sacrificados, se registraron las fechas de muerte y se realizó una gráfica de Kaplan-Meier (figura 20). El último ratón del grupo control sin tratamiento fue sacrificado el día 21 debido a la presencia de signos de dolor intenso previamente especificados. Hasta este punto, los demás grupos tenían el 100% de sobrevivencia. Por medio de la ecuación de Log-Rank (Mantel-Cox) se realizó la comparación global de la sobrevivencia de los ratones tratados con las CMM-MO transducidas y sin transducir y contra el grupo control negativo, encontrando que sí existía diferencia significativa ($p < 0.0001$). Así mismo, se hizo la comparación individual de la sobrevivencia de cada grupo, encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$ Log-Rank [Mantel-Cox]) las cuales se incluyen en la tabla 1. Se mantuvo el experimento hasta el día 50, sacrificando a los ratones conforme presentaran signos de dolor intenso, pérdida de peso de más del 20% y

peso del tumor de más del 10% del peso del ratón. Nuestro segundo control fue el grupo de CMM-MO sin transducir; observamos que al día 36 del experimento, en el cual se sacrificó el último ratón del grupo de CMM sin transducir, quedaban los siguientes porcentajes de sobrevivencia en los demás grupos: 40% CMM-MO TRAILs + IFN β , 60% CMM-MO TRAILs + IL-12 y 60% CMM-MO IL-12, no obstante, no existieron diferencias significativas entre la comparación de estos grupos y el control de CMM-MO ($p > 0.05$, Log-Rank [Mantel-Cox]) (tabla 2). Estos ratones sobrevivieron hasta el día 50, sin embargo, ya no se observaba la presencia de tumor sólido en el gastrocnemio derecho.

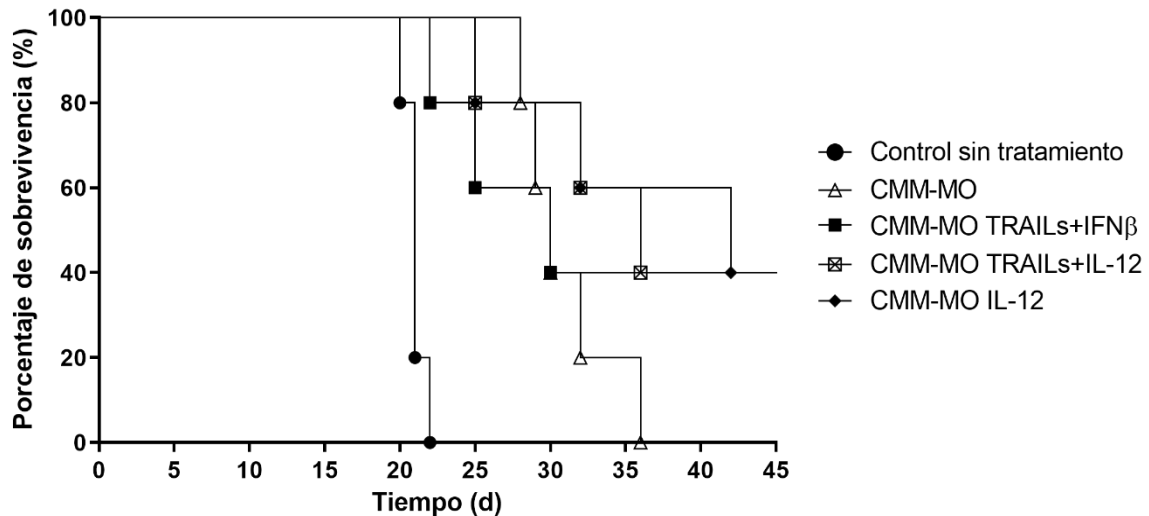


Figura 20. Porcentaje de supervivencia de ratones tratados. CMM, células madre mesenquimales; TRAILs, fracción soluble del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral; IFN β , interferón beta; IL-12, interleucina 12. $n = 5$, por grupo. **** $p < 0.0001$.

Tabla 1. Significancia estadística de las diferencias de sobrevida entre los grupos tratados y el grupo sin tratamiento.

| Tratamiento ¹ | % de sobrevida | Significancia ² |
|-----------------------------|----------------|----------------------------|
| CMM-MO TRAILs + IFN β | 80 | 0.0052 (**) |
| CMM-MO TRAILs + IL-12 | 100 | 0.0020 (**) |
| CMM-MO IL-12 | 100 | 0.0039 (**) |
| CMM-MO | 100 | <0.0001 (****) |

¹Cada tratamiento consistía en 1×10^6 CMM-MO transducidas con los transgenes de TRAILs, IFN β e IL-12, o CMM-MO sin transducir. En todos los casos las células estaban suspendidas en 100 μ L de solución salina fisiológica estéril, las cuales fueron inoculadas de forma intratumoral. Los grupos que recibieron más de un transgen se inocularon con un número proporcional de CMM-MO.

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 de los Software GraphPad Prism 8 y SPSS v.24.

Tabla 2. Significancia estadística de las diferencias de sobrevida entre los grupos tratados con CMM-MO transducidas y CMM-MO sin transducir.

| Tratamiento ¹ | % de sobrevida | Significancia ² |
|-----------------------------|----------------|----------------------------|
| CMM-MO TRAILs + IFN β | 40 | 0.5011 |
| CMM-MO TRAILs + IL-12 | 60 | 0.1434 |
| CMM-MO IL-12 | 60 | 0.0902 |

¹Cada tratamiento consistía en 1×10^6 CMM-MO transducidas con los transgenes de TRAILs, IFN β e IL-12, o CMM-MO sin transducir. En todos los casos las células estaban suspendidas en 100 μ L de solución salina fisiológica estéril, las cuales fueron inoculadas de forma intratumoral. Los grupos que recibieron más de un transgen se inocularon con un número proporcional de CMM-MO.

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 GraphPad Prism 8 y SPSS v. 24.

Al día 50 post-inoculación de las células de linfoma L5178Y, se efectuó el sacrificio de los ratones sobrevivientes en los grupos experimentales, debido a la

finalización del experimento. Los ratones fueron sacrificados en cámara de CO₂, seguido de dislocación cervical y confirmación de los signos vitales. Inmediatamente se hizo un análisis macroscópico de la extremidad inferior derecha de los ratones donde anteriormente se habían inoculado las células tumorales; las extremidades se extrajeron, pesaron y se hizo una descripción macroscópica del tejido. Se revisaron únicamente los ratones del grupo control sin tratamiento y de los grupos tratados con CMM-MO transducidas. En el grupo control sin tratamiento (solución salina) se observó la presencia de una neoplasia de forma ovoide cubierta por tejido fibroconectivo, con lobulaciones y vascularizado. En contraste con este descubrimiento, en los ratones tratados con las CMM transducidas con TRAILs, IFN β e IL-12 solo se observó la presencia de tejido muscular esquelético. En la figura 21 se incluyen imágenes representativas de cada una de las extremidades analizadas.

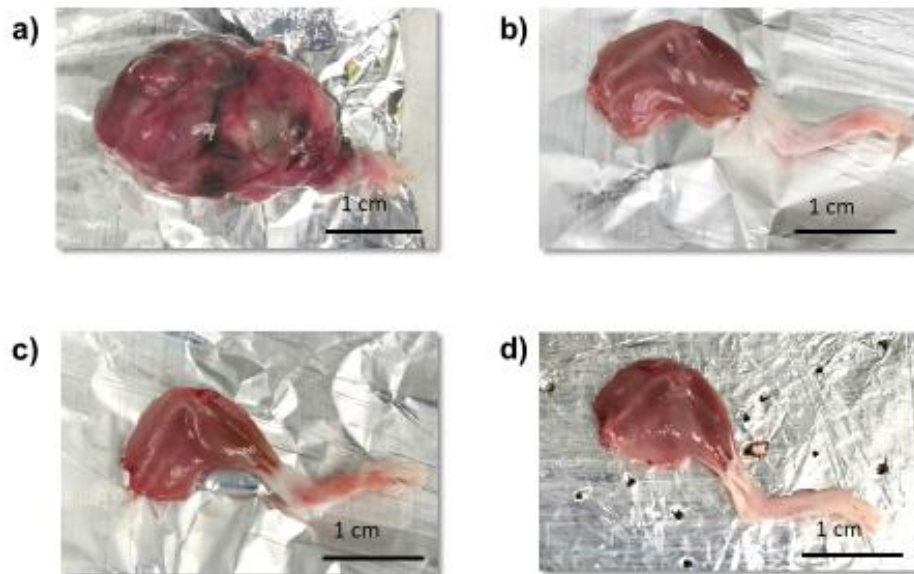


Figura 21. Análisis macroscópico de extremidad inferior derecha. Se muestra una imagen representativa de cada uno de los grupos experimentales con tratamiento de CMM transducidas y el control sin tratamiento evaluados después del sacrificio. a) Tumor de control sin tratamiento al día 20 post-inoculación de células de linfoma. Gastrocnemio

derecho de grupos tratados con b) CMM TRAILs + IFN β , c) CMM TRAILs + IL-12 y d) CMM IL-12 al día 50 post-inoculación de células de linfoma.

Además, se graficaron las mediciones del peso de los tumores sólidos *post-mortem* extraídos a lo largo del estudio de los ratones de los diferentes grupos experimentales. En la figura 22 se ilustran las diferencias de mediciones del peso de los tumores entre grupos. De forma consistente con los resultados anteriormente mostrados, los ratones tratados con las CMM transducidas presentaron tumores de menor peso a comparación del control negativo ($p < 0.05$, ANOVA de una vía, comparación múltiple de Tukey). Cabe resaltar que los grupos que presentaron mayor significancia en cuanto a la reducción del peso del tumor fueron los tratados con CMM-MO TRAILs + IL-12 y CMM-MO IL-12 ($p < 0.0001$). No obstante, no se presentaron diferencias significativas entre los grupos de CMM-MO transducidas y sin transducir ($p > 0.05$, Anova de una vía, comparación múltiple de Tukey).

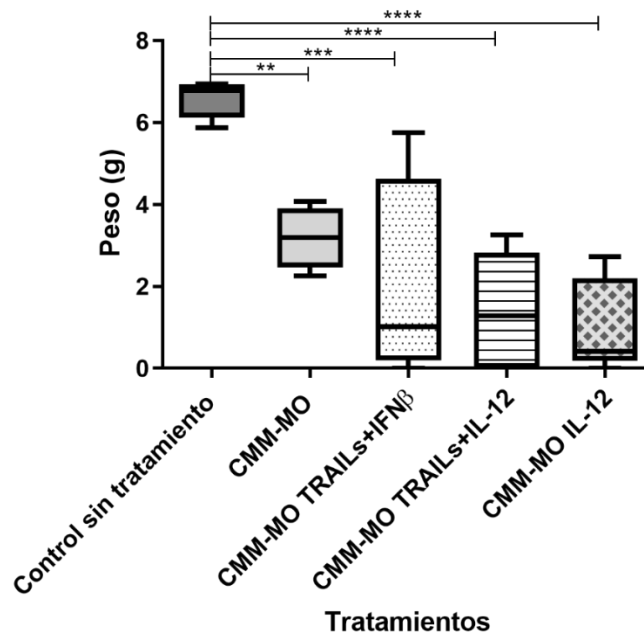


Figura 22. Diferencias en peso de tumores en grupos tratados. Cada barra corresponde a la media \pm desviación estándar. CMM, células madre mesenquimales; TRAILs, fracción soluble del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral;

IFN β , interferón beta; IL-12, interleucina 12. n = 5, por grupo. ** p = 0.0084, *** p = 0.0007, **** p < 0.0001.

8.3. Analizar la capacidad de migración de las CMM-MO transducidas con TRAILs, IFN β e IL-12 y su potencial anti-metastásico en un modelo murino mediante fluorescencia e histología.

8.3.1. Obtención y preservación del tejido tumoral.

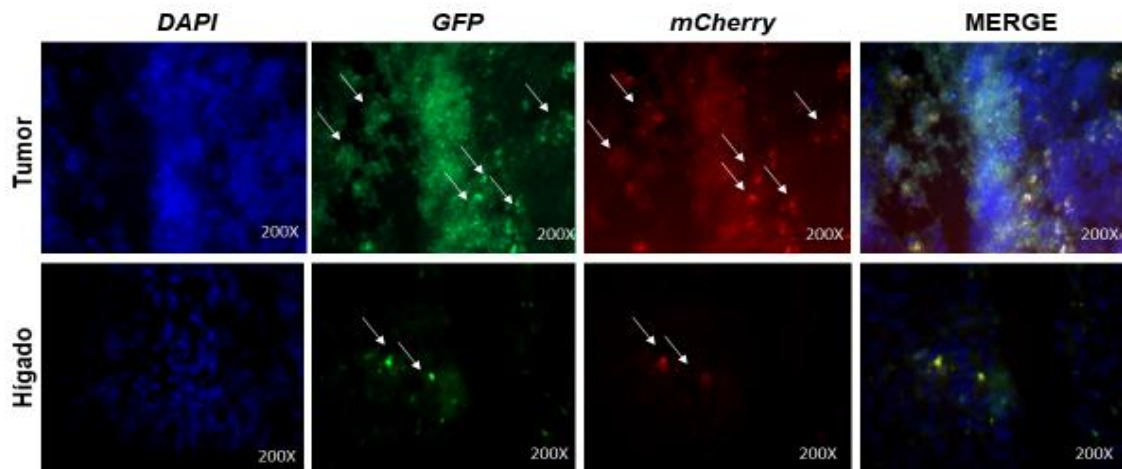
A partir de los ratones del experimento dos y, tomando en cuenta la previa detección de metástasis hepática en el experimento piloto, una vez sacrificados se les fue extraído el hígado, tumor o un fragmento del gastrocnemio derecho en aquellos donde el tumor ya no era visible. En la disección se observó la presencia de ganglios linfáticos inflamados derivados del proceso inflamatorio para eliminar el tumor. Los tejidos fueron procesados para realizar corte congelado, realizando una prefijación con acetona fría por 10 min en los tumores, y posterior inclusión en *Tissue-Tek O.C.T. compound*. Mediante un criostato se realizaron cuatro cortes de 6 μ m de grosor por cada tejido, siguiendo los pasos anteriormente descritos, colocando dos en cada laminilla. A los cortes de una laminilla se les aplicó una gota (7 μ L) de medio de montaje *Vectashield* con DAPI, el cual tiñe los núcleos celulares y se observaron con un microscopio de epifluorescencia para la evaluación de la persistencia y migración de CMM-MO y de las células tumorales L5178Y transducidas hacia el hígado. Los cortes de la otra laminilla fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina para el análisis histopatológico de los tejidos por medio de una escala semicuantitativa.

8.3.2. Análisis de migración celular a los tejidos.

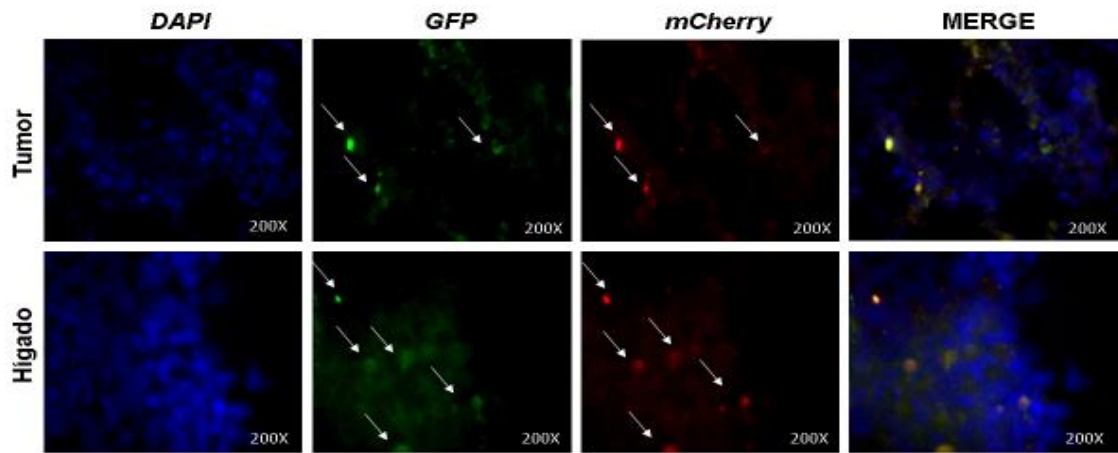
Se tomaron fotografías en el microscopio de epifluorescencia de los cortes de hígado y tumor o gastrocnemio derecho de los grupos experimentales para investigar la presencia de las CMM-MO y las células L5178Y transducidas. En todos

los casos, fue posible la visualización de las células tumorales transducidas tanto en los tumores o gastrocnemios derechos como en los hígados, debido a la presencia de señal roja y verde fluorescente correspondiente a los marcadores *mCherry/GFP*, la cual coincidía al realizar el *merge* de ambos canales. Sin embargo, no fue posible la identificación de las CMM-MO transducidas debido al ruido de fondo presentado. Aunque se observó una reducción de la señal de las células tumorales en los tejidos de los grupos tratados, aun así, se logra detectar señal, indicación de que los tratamientos probados no eliminan por completo a las células tumorales, aunque de forma macroscópica ya no se observaran residuos del tumor. Por lo tanto, continuaba la progresión de la metástasis hacia el hígado. El grupo que mostró menor señal en el gastrocnemio derecho, y donde se alcanzaban a apreciar células musculares, fue el tratado con CMM-MO IL-12. En la figura 23 se incluyen imágenes representativas de fluorescencia de cada grupo.

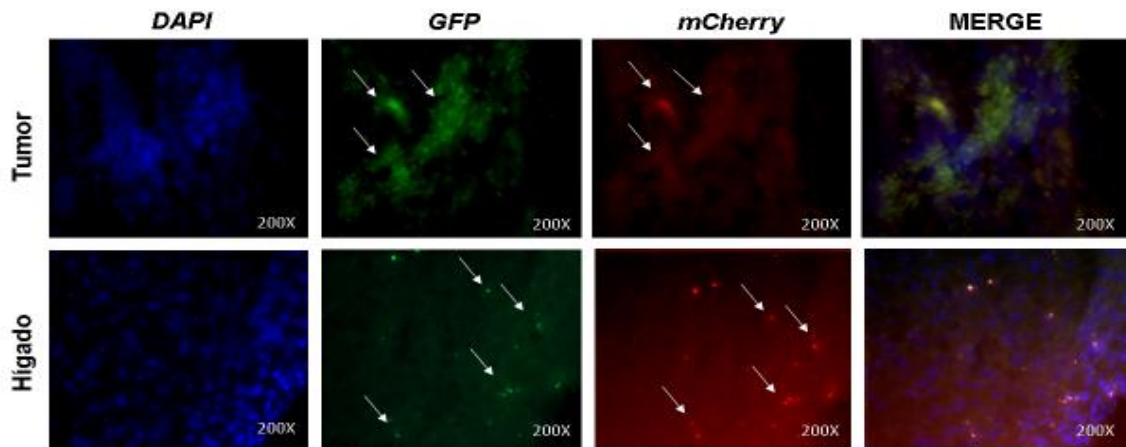
a) Control sin tratamiento



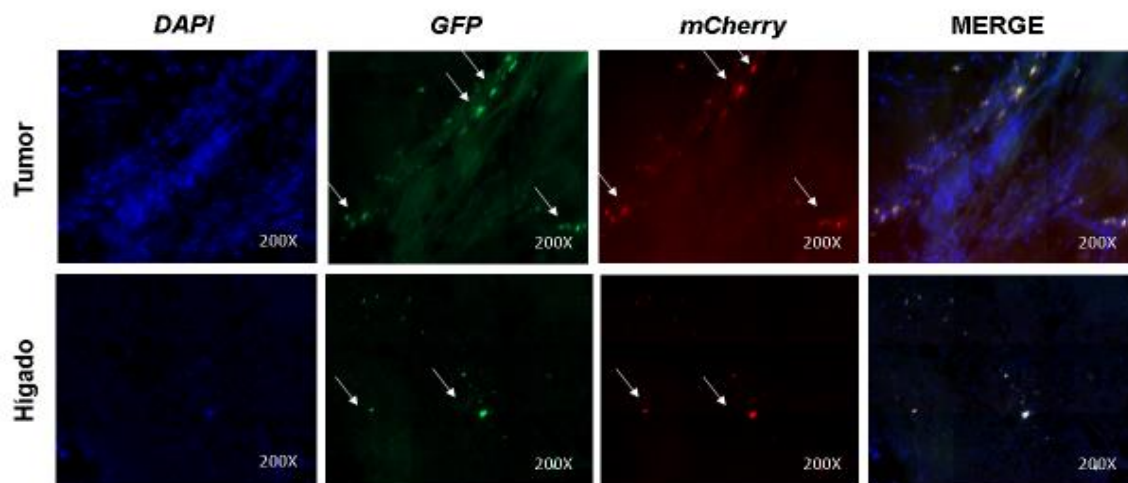
b) CMM-MO



c) CMM-MO TRAILS + IFN β



d) CMM-MO TRAILS + IL-12



e) CMM-MO IL-12

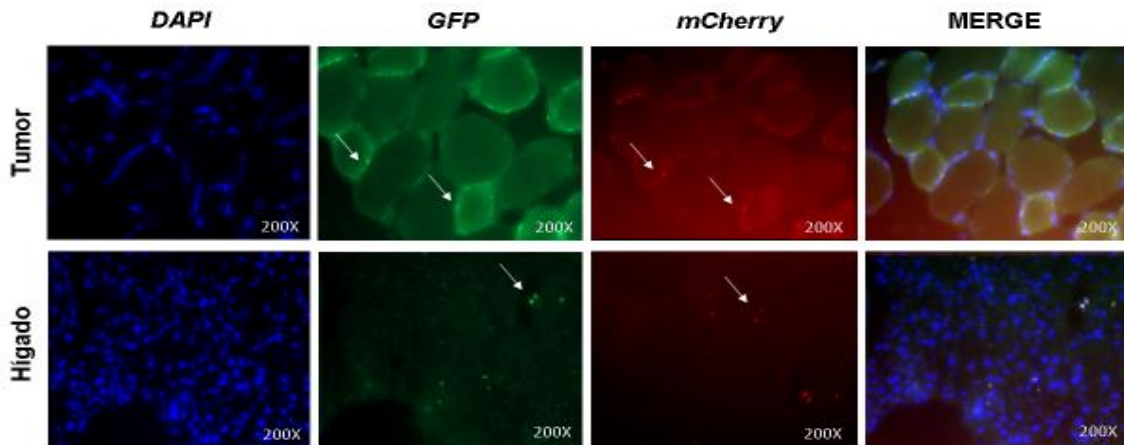


Figura 23. Fotografías de fluorescencia de tejidos de grupos experimentales. a) Cortes de tejidos de grupo control sin tratamiento, b) cortes de grupo tratado con CMM, c) cortes de grupo tratado con CMM TRAILs + IFN β , d) cortes de grupo tratado con CMM TRAILs + IL-12, e) cortes de grupo tratado con CMM IL-12. CMM, células madre mesenquimales transducidas que expresan GFP; TRAILs, fracción soluble del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral; IFN β , interferón beta; IL-12, interleucina 12. Células de linfoma L5178Y transducidas marcadas con el gen reportero *mCherry* y *GFP* se observan de color rojo y verde. Núcleos teñidos con *DAPI*. Las flechas blancas indican una célula tumoral con expresión de los genes reporteros.

Por medio del programa Image J, se hizo el análisis de la intensidad de fluorescencia del marcador *mCherry*, tomando en cuenta que su aumento o disminución es proporcional a la presencia de células tumorales en los tejidos y que esta señal fue más intensa que *GFP*. En el análisis de los tumores del gastrocnemio todos los grupos mostraron diferencias significativas en cuanto a los niveles de fluorescencia ($p < 0.05$, prueba Kruskal-Wallis), sin embargo, solamente se observó una reducción significativa ($p < 0.05$, comparación múltiple de Dunn) en el grupo tratado con CMM IL-12 al compararlo con el control sin tratamiento (figura 24). Esto se traduce en una menor proporción de células tumorales. En cambio, en los hígados no existió reducción significativa de la fluorescencia entre los distintos grupos tratados ($p > 0.05$, prueba ANOVA de una vía), ni entre cada grupo y el control

negativo ($p > 0.05$, comparación múltiple de Bonferroni); por lo tanto, a pesar de que los tratamientos de CMM transducidas sí reducen las células tumorales al aplicarlas de forma intratumoral (tumores de 1cm), éstas no evitan la progresión de la metástasis.

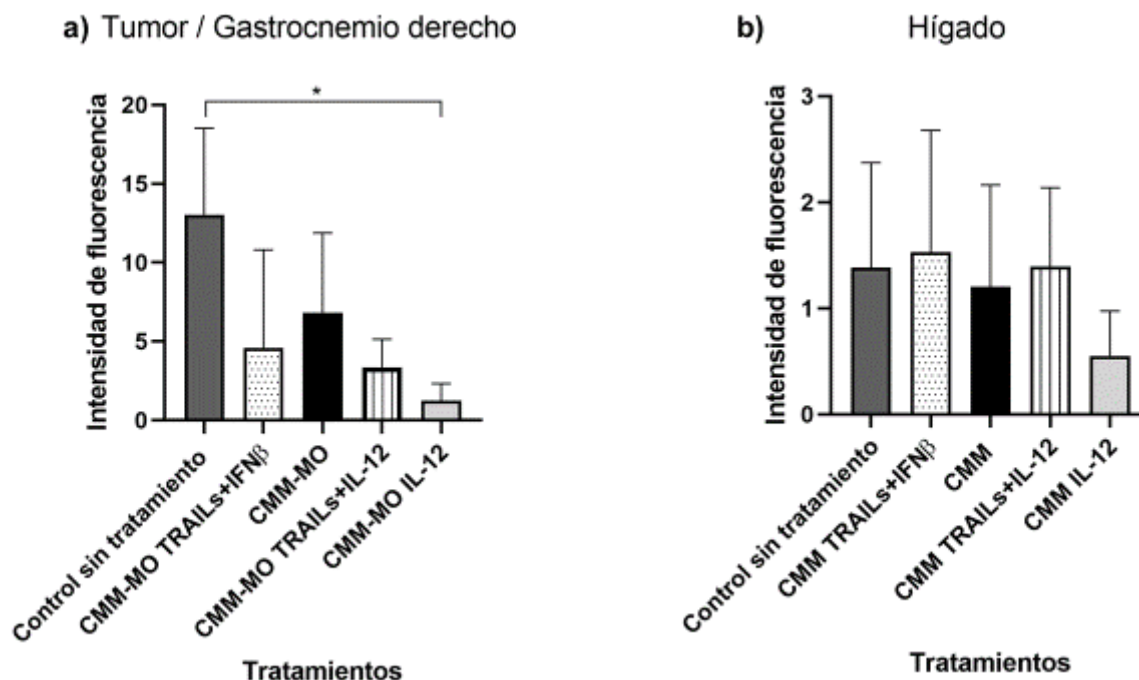


Figura 24. Señal fluorescente de *mCherry*. a) Intensidad de fluorescencia en tumor/gastrocnemio derecho en diferentes grupos tratados, $p < 0.05$. b) Intensidad de fluorescencia en hígado en diferentes grupos tratados, $p > 0.05$. CMM, células madre mesenquimales transducidas que expresan GFP; TRAILS, fracción soluble del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral; IFN β , interferón beta; IL-12, interleucina 12. Los valores graficados corresponden a la media \pm desviación estándar. ns: no significativo.

8.3.3 Análisis de alteración histológica.

Las alteraciones histológicas presentadas en los hígados y tumores o gastrocnemios derechos se analizaron por medio de la tinción Hematoxilina-Eosina.

Se elaboró una escala semicuantitativa de alteración histológica para clasificar el grado de infiltración de células tumorales y morfología observada. En la infiltración de células tumorales se establecieron los siguientes parámetros: 0, ninguna; 1, escasa; 2, moderada; 3, abundante. La morfología fue estadificada de la siguiente manera: 1, sin displasia (Sin-SD); 2, displasia leve (DS-leve); 3, displasia moderada (DS-moderada); 4, displasia severa (DS-severa). Para su elaboración se recibió asesoría del Dr. Adolfo Soto del Departamento de Histología; se tomaron 8 campos por laminilla, por triplicado y se analizaron estadísticamente por medio de la prueba Chi-cuadrada. En la figura 25 se incluyen imágenes representativas de cada grupo. El análisis estadístico realizado indicó la existencia de diferencia significativa entre los distintos tratamientos ($p < 0.0001$), en cuanto a la presencia de infiltrado de células tumorales y la morfología del tejido tanto de las muestras de tejido tumoral del gastrocnemio derecho como de los hígados. En el tumor o gastrocnemio derecho el tratamiento de CMM-MO IL-12 fue el que mostró mejores resultados, debido a que los tejidos presentaron menores alteraciones morfológicas, con tejido muscular esquelético en gastrocnemio derecho y parénquima hepático más estructurado, además de una menor proporción de células tumorales infiltradas dentro del tejido. En los hígados, sin embargo, aunque sí se observó reducción de la infiltración de células tumorales y menor displasia del tejido, ningún tratamiento logró evitar la metástasis (figura 26). Esto nos confirma los hallazgos encontrados por fluorescencia, donde a nivel localizado del gastrocnemio derecho sí hubo una reducción importante de la proporción de células tumorales empleando el tratamiento de IL-12, sin embargo, aunque se observa una reducción de las células tumorales y la displasia en el hígado, ningún tratamiento logra detener por completo la progresión de la metástasis a hígado.

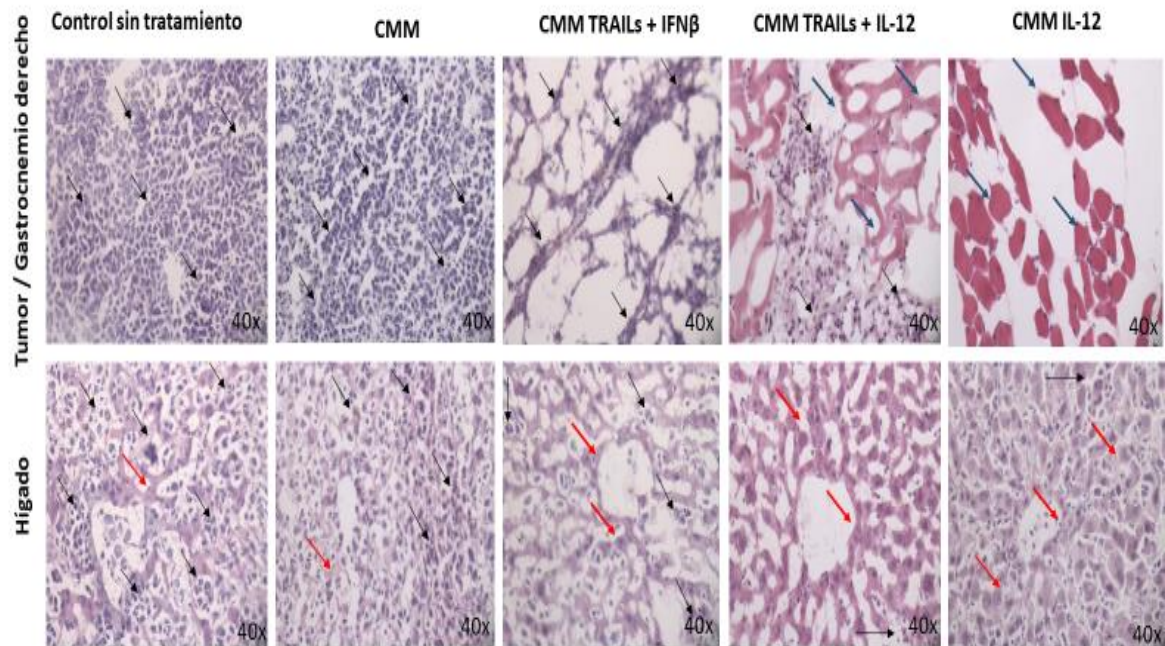
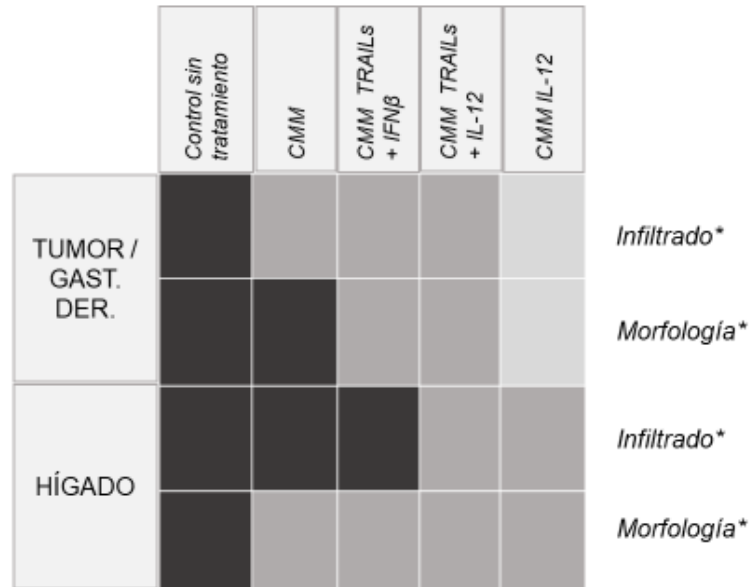


Figura 25. Histología de tumor/gastrocnemio derecho e hígado de grupos experimentales. Se incluyen imágenes representativas del tumor / gastrocnemio derecho y del hígado de cada grupo. Las flechas negras indican los infiltrados de células tumorales; las flechas azules muestran las células de músculo esquelético y las rojas los hepatocitos. Tanto en el tratamiento de CMM TRAILS + IL-12 como en el de CMM IL-12 se observó menor infiltrado de células tumorales y menor distrofia del tejido muscular y hepático. Análisis de 8 campos al azar por 3 observadores diferentes.



Infiltrado de células tumorales ○ Ninguna ● Escasa ● Moderado ● Abundante

Morfología ○ Sin-DS ● DS-leve ● DS-moderada ● DS-severa

Figura 26. Escala semicuantitativa de alteración histológica. En el cuadro se indican los resultados del análisis histopatológico con la tinción Hematoxilina-Eosina del tumor/gastrocnemio derecho e hígado. Se incluyen los cambios de infiltrado de células tumorales y morfológicos observados en los distintos tratamientos. DS: displasia; infiltrado de células tumorales: ninguna 0%, escasa <30%, moderado <60%, abundante >80%. Morfología: Sin-DS, tejido sin cambios patológicos; DS-leve, aumento del espacio sinusoidal; DS-moderada, disgregación de hepatocitos; DS-severa, pérdida de la estructura del parénquima hepático. * $p < 0.0001$, Chi cuadrada.

9. DISCUSIÓN

Las CMM son una buena opción para entrega de genes que ha sido utilizada ampliamente en la investigación contra el cáncer. Estudios recientes han demostrado que las CMM pueden infiltrarse dentro del tumor de manera uniforme y promover la distribución de agentes terapéuticos [113]. Se han empleado en ensayos clínicos líneas celulares de fibroblastos alogénicas o xenogénicas para el tratamiento de neoplasias; no obstante, un problema recurrente es su alta inmunogenicidad, que resulta en la pérdida rápida de la expresión de transgenes debido a la eliminación de las células en días o semanas [67].

En este trabajo las CMM fueron aisladas de médula ósea de ratones BALB/c (CMM-MO), las cuales cumplieron con los criterios de adherencia al plástico, expresión de marcadores CD105, CD90 en al menos un 95%, la expresión de marcadores hematopoyéticos como CD34 de menos de un 2% [45]. Además deben ser capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y osteoblastos bajo condiciones de cultivo in vitro estándar [45].

Una vez comprobada la naturaleza de las CMM-MO continuamos con la transducción lentiviral para la expresión de los transgenes de TRAIL, IFN β e IL-12. Estos vectores además del gen expresan como gen reportero a la proteína verde fluorescente (*GFP*, por sus siglas en inglés *Green fluorescent protein*). La eficiencia de transducción se analizó por medio de microscopía de epifluorescencia, siguiendo la fórmula anteriormente mencionada. Las CMM-MO TRAILs presentaron una eficiencia del 88%, CMM IFN β 95% y las CMM IL-12 un 77%, similar a lo reportado por otros grupos de investigación [39], [114]. Además, se verificó la expresión de los transgenes a nivel de proteína por medio de *Western Blot*. No obstante, la calidad de las bandas obtenidas fue deficiente, así que se mantiene como perspectiva a futuro mejorar su calidad.

También, fue posible realizar la transducción de la línea de linfoma murino L5178Y para la expresión del gen reportero *mCherry* y *GFP*, algo que no se había reportado anteriormente. Esta tuvo una eficiencia de transducción del 94%. El

procedimiento no afectó la capacidad de generar un tumor sólido al implantarse de manera intramuscular, al compararse con la línea sin transducir ($p > 0.05$). Del mismo modo la transducción no modificó la expresión del receptor de TRAIL (DR5), por lo cual las células tumorales mantenían su susceptibilidad a apoptosis vía este mecanismo.

De manera individual se ha observado la actividad antitumoral de las CMM modificadas para la expresión de TRAILs, IFN β e IL-12 [39], [79], [115], sin embargo, poco ha sido empleada la combinación de TRAIL con proteínas que presentan potencial antitumoral. En los antecedentes de este trabajo se había encontrado que la combinación de CMM expresando TRAILs + IFN β era el tratamiento antitumoral y citotóxico más eficiente *in vivo* e *in vitro* contra cáncer de colon [105], y linfoma [80]. Tomando en cuenta lo anterior, en la presente investigación se incluyó además del tratamiento combinado de CMM TRAILs + IFN β , al tratamiento de CMM IL-12 y la combinación de CMM TRAILs + IL-12. Este último tratamiento fue considerado tomando en cuenta la eficiencia reportada de forma individual de esos productos antitumorales para producir apoptosis y como inmunoterapia contra el cáncer [39], [115], [116], por lo que pudiera representar un tratamiento aún más eficiente que el previamente evaluado. Un hallazgo importante fue observar que, los tres tratamientos de CMM-MO que sobreexpresaban los transgenes (CMM TRAILs + IFN β , CMM TRAILs + IL-12 y CMM IL-12) redujeron de forma significativa el crecimiento del tumor ($p < 0.05$), presentando a su vez menor peso de los tumores ($p < 0.05$). Se monitoreó la salud del animal considerando el peso del ratón y no se encontraron diferencias entre los grupos tratados, lo que nos indica que no afectan el estado general de salud ni presentan efectos secundarios a corto plazo [39]. Así mismo, estos tratamientos permitieron incrementar la supervivencia de los grupos tratados por más tiempo al ser comparados con el grupo control negativo, ($p < 0.0001$). Al sacrificarse todos los ratones del grupo de CMM-MO, restaban 40% de individuos del grupo CMM-MO TRAILs + IFN β , 60% del CMM-MO TRAILs + IL-12 y 60% del CMM-MO IL-12, los cuales sobrevivieron hasta el día 50, cuando se decidió finalizar el experimento. No obstante, no existieron diferencias significativas

entre estos grupos y entre el control de CMM-MO. Cabe resaltar que, aunque se empleó la misma línea de linfoma murino L5178Y, los ratones inoculados del grupo control negativo fueron sacrificados en un menor tiempo debido a signos de dolor intenso y a que el peso de los tumores sobrepasaba el 10% del peso total del ratón; por lo tanto, no se reprodujeron las condiciones previamente establecidas de manera adecuada. Además, la n por grupo empleada en este estudio fue menor que en el anterior. Todo lo anterior limitó en cierto grado el alcance del estudio para la selección del tratamiento antitumoral más eficiente.

En el estudio previo de nuestro grupo de trabajo [80] se observó que el tratamiento individual de CMM-MO IFN β y CMM-MO TRAILs solo permitió la sobrevivencia del 25 y el 50% del grupo experimental hasta el día 42, pero su combinación presentaba un efecto aditivo al incrementar la sobrevivencia al 62.5%. En ascitis maligna se ha observado que el 80% de los ratones tratados con CMM IL-12 logran sobrevivir más al ser comparados con el tiempo en que mueren todos los animales del grupo tratado solo con CMM, persistiendo hasta el día 40 [117]; en otro estudio de glioma se reportó que el 70% de ratones tratados con CMM IL-12 sobreviven más de 90 días [118] mientras que CMM TRAIL sobreviven hasta el día 60 [78]. En un modelo murino de metástasis pulmonar, los ratones tratados con CMM IFN β tuvieron una sobrevivencia media de 60 días [85]. Considerando esto, se propone a CMM IL-12 como una mejor estrategia para eliminar tumores como glioma intracraneal, carcinoma de células renales, cáncer de mama, melanoma y hepatoma [67], [92], [115], [118], [119].

El análisis macroscópico de las extremidades inferiores derechas tratadas permitió comparar las diferencias anatomopatológicas, indicando que a diferencia del control sin tratamiento donde era evidente la presencia de tejido neoplásico, en los grupos de CMM-MO transducidas solo se observaba tejido de músculo esquelético estriado. Para confirmar la efectividad de los tratamientos se realizó el análisis histológico por medio de fluorescencia y Hematoxilina-Eosina de las extremidades inferiores derechas (tumor o un fragmento del gastrocnemio derecho), así como de los hígados para confirmar la ausencia o permanencia de la metástasis.

Se consideró solamente al gen reportero *mCherry* debido a que las CMM-MO transducidas también expresaban *GFP*. El análisis de la intensidad de fluorescencia indicó que solo el grupo tratado con CMM IL-12 tuvo una reducción significativa ($p < 0.05$) de la señal *mCherry* de los tumores o del gastrocnemio derecho al compararse con el control sin tratamiento. Es importante señalar que en otros trabajos se emplean múltiples aplicaciones de CMM para observar actividad antitumoral; en un estudio con CMM-TRAIL fue necesario aplicar dos dosis por administración intravenosa de 2×10^6 células para observar reducción significativa del tumor [79]. Otros estudios han inoculado tres dosis de CMM TRAILs de forma peritumoral (1×10^6 células) y han observado reducción significativa del crecimiento del tumor [39]; del mismo modo en un estudio en donde se aplicaron CMM IL-12 en tumores sólidos de mama, hepatoma y melanoma, fue necesaria la aplicación de cinco dosis (2×10^6 , 1×10^6 células) para obtener un efecto antitumoral y antimetastásico significativo [116], y en tumores pulmonares ha sido necesario aplicar tres dosis (1×10^6 células) de CMM IFN β para limitar el crecimiento de los mismos [85]. Mientras tanto, en nuestro estudio observamos que una sola aplicación de los tratamientos (1×10^6 células) permitía reducir significativamente el crecimiento de la masa tumoral. Sin embargo, ninguno de los tratamientos evaluados fue eficiente para detener la progresión del tumor, ya que en los hígados no hubo reducción significativa de la señal fluorescente ($p < 0.05$), lo que se traduce en la continuación del desarrollo de la metástasis. Esto resultó ser muy interesante ya que no se tenía descrito que la línea L5178Y TK +/- fuera capaz de desarrollar metástasis hepática, permitiendo la generación de un modelo de estudio de metástasis para la investigación de tratamientos y mecanismos de resistencia.

En cuanto a la vía de administración, aún no se ha establecido una que limite el desarrollo del tumor primario y las metástasis para todos los tipos de neoplasias, ya que mientras algunos reportan que la aplicación intratumoral tiene mayor actividad antimetastásica que la administración vía intravenosa [39], [120], otros afirman que las CMM aplicadas vía intravenosa sí desempeñan adecuadamente el *homing* hacia los sitios tumorales [85], [116], [121]. Además, creemos que la poca efectividad para reducir la metástasis en nuestro estudio fue debido a que las CMM no lograron

migrar hacia el tejido afectado, quedando limitadas al tejido tumoral como se ha observado en otros estudios [39]. No obstante, la administración por medio de vía intravenosa tampoco ha resultado una opción viable, ya que se ha observado que las CMM pueden quedarse atrapadas en los pulmones y capilares [122].

Parte del tercer objetivo era seguir la migración *in vivo* de las CMM-MO, tomando en consideración que la migración de las CMM hacia las células tumorales ya se ha demostrado *in vitro* [79]; sin embargo, la señal fluorescente *GFP* proveniente de las CMM-MO transducidas no pudo ser rastreada *in vivo* debido a diversos factores como el ruido de fondo generado por el medio de montaje empleado, grosor del corte histológico, cambios morfológicos generados por el microambiente del tumor, así como traslape con la señal *GFP* proveniente de las células tumorales, por lo que para analizar su actividad migratoria es necesario emplear otras técnicas o un anticuerpo secundario que amplifique la señal. También, muy posiblemente las CMM-MO hayan sido eliminadas por el organismo. Otros autores han reportado la localización intratumoral de las CMM transducidas con el reportero *GFP* a las 5 semanas, sin embargo, la señal detectada es muy débil [116].

La tinción de Hematoxilina-Eosina nos permite observar cambios microscópicos en la morfología de los tejidos [123]. Con esta técnica establecimos una escala semi-cuantitativa de alteraciones histológicas, encontrando diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p < 0.0001$) en cuanto a la presencia de infiltrado de células tumorales y cambios en la morfología del tejido en los tumores o fragmentos del gastrocnemio derecho y en el hígado. Nuevamente el tratamiento de CMM IL-12 fue el que presentó un mejor desempeño al mostrar menores alteraciones morfológicas, así como menor infiltrado de células tumorales en el gastrocnemio derecho. En el hígado, tanto el tratamiento de CMM TRAILS + IL-12 como el de CMM IL-12 presentaron niveles similares de infiltrado de células tumorales y alteraciones morfológicas.

Se ha observado en otros estudios que las CMM IL-12 tienen efecto antimetastásico [67], [91], [117]. Los otros tratamientos, aunque sí redujeron de forma macroscópica el crecimiento de los tumores y alargaron la sobrevida, a nivel

microscópico continuaron presentando alta densidad de células tumorales y cambios relacionados con la metástasis de hígado. Esto nos indica que los tratamientos con CMM que sobreexpresan productos antitumorales sí son útiles para limitar el crecimiento del tumor y promover apoptosis cuando se administran de forma localizada [120], sin embargo, no inhiben la progresión de la enfermedad y el desarrollo de metástasis en todos los tipos de neoplasias.

Anteriormente se había revisado que TRAILs sobreexpresado por CMM tiene la capacidad de inducir efecto antitumoral [79] y proapoptótico mediante la activación de la caspasa 8. Sin embargo, solo puede realizar esta actividad en aquellas células que sean sensibles a TRAIL, es decir, que cuenten con el receptor correspondiente [39]. Ya se ha reportado la existencia de células resistentes a TRAIL en cáncer de colon, mama, pulmón y leucemia. Estas células desarrollan varios mecanismos de resistencia en diferentes puntos a lo largo de la vía extrínseca de apoptosis. Un primer mecanismo es mediante la sobreexpresión de la proteína inhibidora similar a FLICE (FLIP), la cual bloquea la apoptosis inhibiendo el ensamble del complejo DISC; también, la sobreexpresión de miembros de la familia antiapoptótica BCL-2 bloquean la apoptosis en la mitocondria. Además se ha observado que células resistentes a TRAIL poseen una mayor activación de la vía de NF- κ B, que estimula la proliferación celular [124]. Esto podría explicar la razón de la disminución de la efectividad de los tratamientos con TRAILs, aun cuando se encuentra presente el receptor en las células de linfoma.

Se ha reportado que la expresión sistémica de IL-12 causa acidosis, hepatitis, falla renal y muerte en ensayos clínicos. No obstante, la aplicación localizada de la proteína IL-12 recombinante no genera esta toxicidad y presenta efectividad para inhibir tumores [114], [115]. IL-12 generado por las CMM induce la producción de IFN- γ y la consecuente infiltración de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, linfocitos NK y células dendríticas dentro de tumor, mostrando potencial para uso en inmunoterapia [117], [125]. Además, IFN- γ tiene efecto antiangiogénico y proapoptótico [115], [118]. A su vez, la modificación genética de las CMM con vectores adenovirales para la expresión de IL-12 puede presentar efectos antitumorales más intensos que cuando

se emplean las CMM o plásmidos recombinantes de manera individual. Cuando se emplean las CMM sin modificar se incrementa la capacidad de migración de las células cancerígenas, debido a sus propiedades inmunosupresoras en presencia de células de cáncer y condiciones de hipoxia [113]; mientras tanto la modificación genética con transgenes, como lo es en CMM IL-12, inhibe esos efectos [114], algo que confirmamos en el presente estudio. Observamos que los tumores del grupo tratado con CMM-MO sin modificarse genéticamente reanudaban su crecimiento después del día 20 post-inoculación además de la presencia de abundante infiltrado de células tumorales y displasia severa en gastrocnemio derecho e hígado. Aunque en este trabajo se evalúa el tratamiento individual de CMM-MO IL-12 en linfoma, dicha estrategia terapéutica podría aplicarse en otros tipos de neoplasias donde se presentan tumores sólidos y que hasta el momento no se hayan analizado.

Se ha estudiado la actividad de los IFNs (α , β) en una gran variedad de cánceres por sus actividades antiproliferativas y proapoptóticas, además de las ya conocidas propiedades antivirales e inmunomoduladoras [126]. Se ha observado que los IFNs inhiben el crecimiento de tumores *in vitro*, y para evitar la toxicidad sistémica generada por la aplicación de altas concentraciones de esta citocina se han modificado CMM para su expresión localizada, reduciendo el desarrollo de tumores pulmonares [85], [86]. En el estudio previo de nuestro grupo de trabajo [80] IFN β solamente tuvo actividad significativa al combinarse con TRAILs, pero al observar el efecto de IL-12, nosotros proponemos la aplicación de un nuevo tratamiento consistente de CMM IFN β + IL-12, el cual podría tener aún mayor efecto antitumoral y que hasta el momento no se ha explorado. Por otro lado, para futuras investigaciones podría adecuarse la aplicación del tratamiento en múltiples dosis, o emplearse en combinación con quimioterapia, con lo que podría mejorarse el alcance de este para la erradicación del tumor.

10. CONCLUSIÓN

1. Las CMM-MO de ratón modificadas genéticamente para que sobreexpresen TRAILs en combinación con IL-12, TRAILs en combinación con IFN β y solo IL-12, al ser implantadas intratumoralmente en un modelo de linfoma murino inmunocompetente, son capaces de reducir el tamaño de los tumores de forma significativa.
2. Estos tratamientos de CMM-MO genéticamente modificadas incrementan significativamente el tiempo de supervivencia de los grupos tratados a diferencia de los controles.
3. Las CMM-MO sin modificar son capaces de promover el desarrollo de los tumores.
4. El principal mecanismo encargado de eliminar las células tumorales es por medio de la activación del sistema inmune con la inmunidad celular, ya que los tratamientos con CMM-MO que sobreexpresan IL-12 reducen en mayor medida la infiltración de células malignas y la displasia del tejido en el gastrocnemio derecho.
5. Los tratamientos de CMM-MO genéticamente modificadas para que sobreexpresen TRAILs, IL-12 e IFN β , sólo son efectivos cuando se administran de forma localizada, ya que no logran inhibir el desarrollo y progresión de metástasis hepática.

11. PERSPECTIVAS

1. Realizar la confirmación de los *Western Blot* de las proteínas TRAILs, IFN β e IL-12, con el fin de mejorar la calidad de las bandas.
2. Buscar una técnica alternativa para estudiar la migración de las CMM-*GFP* administradas.
3. Implementar metodología para estudiar la migración de las CMM y las células tumorales *in vivo* en un modelo murino.
4. Incrementar las dosis de aplicación de CMM transducidas para mejorar su efecto antitumoral e inhibir la progresión de la metástasis.
5. Estudiar diferentes vías de administración de tratamientos que permitan inhibir progresión de la metástasis.
6. Aplicar un nuevo tratamiento de CMM IFN β + IL-12, y combinación con tratamiento quimioterapéutico.
7. Búsqueda de nuevos agentes antitumorales que puedan mejorar el alcance de la inmunoterapia y la terapia celular.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SMeO, “Prevención y diagnóstico oportuno en cáncer.,” 2016.
- [2] A. Jemal, F. Bray, and J. Ferlay, “Global Cancer Statistics,” vol. 61, no. 2, pp. 69–90, 2011.
- [3] G. Karp, *Biología celular y molecular*, 6ta edició. México: Editorial Mc Graw Hill, 2011.
- [4] F. Bray, J. Ferlay, and I. Soerjomataram, “Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” pp. 394–424, 2018.
- [5] R. Siegel, J. Ma, Z. Zou, and A. Jemal, “Cancer Statistics , 2014,” *CA CANCER J CLIN*, vol. 64, no. 1, pp. 9–29, 2014.
- [6] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: the next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [7] D. Hanahan, “Rethinking the war on cancer,” *Lancet*, vol. 383, no. 9916, pp. 558–563, 2014.
- [8] A. C. Society, “Lymphoma,” 2019. [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/lymphoma.html>.
- [9] F. N. A. Kumar Vinay, Abbas Abul, *Patología Estructural y Funcional de Robbins y Cotran*, 8va ed. Elsevier, 2010.
- [10] C. Ottensmeier, “The classification of lymphomas and leukemias,” vol. 135–136, pp. 653–664, 2001.
- [11] GLOBOCAN, “Fact Sheets México,” 2018. [Online]. Available: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>.
- [12] “Estadísticas de gestión en Nuevo León.”

- [13] Servicios de salud de Nuevo León, “Estadísticas de Gestión Nuevo León 2009-2015,” 2015.
- [14] A. D. Matasar, M. J., & Zelenetz, “Overview of Lymphoma Diagnosis and Management,” . *Radiol. Clin. North Am.*, vol. 46(2), pp. 175–198, 2008.
- [15] S. L. . Kasamon YL, “Treatment advances in adult Burkitt lymphoma and leukemia,” *Curr Opin Oncol*, vol. 16, pp. 429–435., 2004.
- [16] Rogers BB, “Overview of Non-Hodgkin’s Lymphoma,” *Semin Oncol Nurs*, vol. 22, pp. 67–72, 2006.
- [17] C. Lara-torres and C. Ortiz-hidalgo, “Diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico del linfoma de Hodgkin y su diagnóstico diferencial,” *Patología (Mex)*., vol. 47, no. 1, pp. 35–45, 2009.
- [18] A. K. Abbas, A. H. Litchman, and S. Pillai, *Inmunología celular y molecular.*, Séptima. 2012.
- [19] H. Nogai and B. Do, “Pathogenesis of Non-Hodgkin ’ s Lymphoma,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 14, pp. 1803–1811, 2012.
- [20] M. Reiser *et al.*, “T-cell non-Hodgkin’s lymphoma in adults: Clinicopathological characteristics, response to treatment and prognostic factors,” *Leuk. Lymphoma*, vol. 43, no. 4, pp. 805–811, 2002.
- [21] H. S. Park, L. McIntosh, M. Braschi-Amirfarzan, A. B. Shinagare, and K. M. Krajewski, “T-cell non-hodgkin lymphomas: Spectrum of disease and the role of imaging in the management of common subtypes,” *Korean J. Radiol.*, vol. 18, no. 1, pp. 71–83, 2017.
- [22] C. Van Der Weyden, M. Dickinson, J. Whisstock, and H. M. Prince, “Brentuximab vedotin in T-cell lymphoma,” *Expert Rev. Hematol.*, vol. 12, pp. 5–19, 2019.
- [23] M. A. Rizvi, A. M. Evens, M. S. Tallman, B. P. Nelson, S. T. Rosen, and T. Nhl, “Review article T-cell non-Hodgkin lymphoma,” *Blood*, vol. 107, no. 4,

pp. 1255–1264, 2006.

- [24] Cancer Research UK, “About radiotherapy.” [Online]. Available: http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/radiotherapy/about?_ga=2.87469532.596638489.1509986228-374525719.1509986228.
- [25] H. S. Park, L. McIntosh, M. Braschi-Amirfarzan, A. B. Shinagare, and K. M. Krajewski., “T-cell non-hodgkin lymphomas: Spectrum of disease and the role of imaging in the management of common subtypes,” *Korean J. Radiol.*, vol. 18(1), pp. 71–83, 2017.
- [26] H. F., “Human mesenchymal stromal cell therapy for prevention and recovery of chemo/radiotherapy adverse reactions.,” *Cytotherapy*, vol. 17, pp. 509–525, 2015.
- [27] Johnstone RW, R. A. A., and L. SW, “Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy,” *Cell*, vol. 108, pp. 153–164, 2002.
- [28] E. N. Garza-treviño, S. L. Said-fernández, and H. G. Martínez-rodríguez, “Understanding the colon cancer stem cells and perspectives on treatment,” *Cancer Cell Int.*, vol. 15, no. 2, pp. 1–9, 2015.
- [29] C. González-Villareal, H. G. Martínez-rodríguez, and S. Said, “How desirable and undesirable features of naïve or genetically reengineered mesenchymal stem cells are being considered in preclinical or clinical assays,” vol. 22, no. 4, pp. 812–830, 2017.
- [30] Y. Yang, “Cancer immunotherapy : harnessing the immune system to battle cancer,” *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 9, pp. 3335–3337, 2015.
- [31] R. S. Riley and C. H. June, “Delivery technologies for cancer immunotherapy,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 18, no. 3, pp. 175–196, 2013.
- [32] M. F. Sanmamed and L. Chen, “A Paradigm Shift in Cancer Immunotherapy: From Enhancement to Normalization,” *Cell*, vol. 175, no. 2, pp. 313–326, 2018.

- [33] K. SG *et al.*, “Cytotoxicity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against human malignant glioma cells,” *Childs Nerv Syst*, vol. 24, pp. 293–302, 2008.
- [34] Ben-David U and B. N, “The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells,” *Nat Rev Cancer*, vol. 11, pp. 268–277, 2011.
- [35] R. Goswami *et al.*, “Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle,” *Front. Oncol.*, vol. 9, no. April, pp. 1–25, 2019.
- [36] U.S. Food and Drug Administration, “What is Gene Therapy?,” 2018. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy>.
- [37] M. Mohammadian, E. Abasi, M. Zare, and A. Akbarzadeh, “Mesenchymal stem cell-based gene therapy: A promising therapeutic strategy,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 5, pp. 1206–1211, 2016.
- [38] G. S. Oggu, S. Sasikumar, N. Reddy, K. K. R. Ella, C. M. Rao, and K. K. Bokara, “Gene Delivery Approaches for Mesenchymal Stem Cell Therapy: Strategies to Increase Efficiency and Specificity,” *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 13, no. 6, pp. 725–740, 2017.
- [39] C. Spano *et al.*, “Soluble TRAIL Armed Human MSC As Gene Therapy For Pancreatic Cancer,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–14, 2019.
- [40] X. Yang, J. Du, X. Xu, C. Xu, and W. Song, “IFN- γ -Secreting-Mesenchymal Stem Cells Exert an Antitumor Effect *In Vivo* via the TRAIL Pathway,” *J. Immunol. Res.*, vol. 2014, pp. 1–9, 2014.
- [41] Beltrami AP *et al.*, “Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration,” *Cell*, vol. 114, pp. 763–776, 2003.
- [42] da S. M. L, C. PC, and N. NB, “Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues,” *J Cell Sci*, vol. 119, pp. 2204–2213, 2006.
- [43] Brooke G *et al.*, “Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells.,”

Semin Cell Dev Biol, vol. 18, pp. 846–858, 2007.

- [44] K. JM and L. T. GS, “Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details,” *Cell Stem Cell*, vol. 4, pp. 206–216, 2009.
- [45] D. M *et al.*, “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.,” *Cytotherapy*, vol. 8, pp. 315–317, 2006.
- [46] A. Klopp *et al.*, “Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 24, pp. 11687–95, 2007.
- [47] N. D’souza *et al.*, “Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies,” *BMC Med.*, vol. 13, no. 1, p. 186, 2015.
- [48] Q. C, M. A, L. D, G. A, X. Y, and C. M, “Treatment of traumatic brain injury in mice with marrow stromal cells,” *Brain Res*, vol. 1208, pp. 234–9, 2008.
- [49] P. Fiorina *et al.*, “Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes.,” *J Immunol*, vol. 183, no. 2, pp. 993–1004, 2009.
- [50] L. Dai, M. R. Moniri, Z. Zeng, J. X. Zhou, J. Rayat, and G. L. Warnock, “Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy,” *Cancer Lett.*, vol. 305, no. 1, pp. 8–20, 2011.
- [51] H. Hamada *et al.*, “Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy,” *Cancer Sci*, vol. 96, no. 3, pp. 149–156, 2005.
- [52] J. Ahn, Y. Coh, H. Lee, I. Shin, S. Kang, and H. Youn, “Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit Melanoma Growth In Vitro and In Vivo,” *Anticancer Res.*, vol. 35, no. 1, pp. 159–68, 2015.
- [53] F. Taraballi, A. Pasto, G. Bauza, and C. Varner, “Immunomodulatory potential of mesenchymal stem cell role in diseases and therapies: A

- bioengineering prospective,” *J. Immunol. Regen. Med.*, p. 100017, 2019.
- [54] S. M. Ridge, F. J. Sullivan, and S. A. Glynn, “Mesenchymal stem cells : key players in cancer progression,” *Mol. Cancer*, pp. 1–10, 2017.
- [55] I. Marini, M. Siegemund, M. Hutt, R. E. Kontermann, and K. Pfizenmaier, “Antitumor activity of a mesenchymal stem cell line stably secreting a tumor-targeted TNF-related apoptosis-inducing ligand fusion protein,” *Front. Immunol.*, vol. 8, no. MAY, 2017.
- [56] M. Corsten and K. Shah, “Therapeutic stem-cells for cancer treatment: hopes and hurdles in tactical warfare,” *Lancet Oncol*, vol. 9, pp. 376–384, 2008.
- [57] M. Loebinger and S. Janes, “Stem cells as vectors for antitumor therapy,” *Thorax*, vol. 65, pp. 362–369, 2010.
- [58] S. Mali, “Delivery systems for gene therapy,” *Indian J. Hum. Genet.*, vol. 19, no. 1, pp. 3–8, 2013.
- [59] D. P. Clark and N. J. Pazdernik, *Molecular Biology*, Segunda ed. Elsevier, 2013.
- [60] K. Lundstrom, “Viral Vectors in Gene Therapy,” 2018.
- [61] M. C. Milone and U. O. Doherty, “Clinical use of lentiviral vectors,” *Leukemia*, pp. 1529–1541, 2018.
- [62] D. Escors and K. Breckpot, “Europe PMC Funders Group Lentiviral vectors in gene therapy : their current status and future potential,” vol. 58, no. 2, pp. 107–119, 2011.
- [63] Y. Zhang *et al.*, “Multi-target lentivirus specific to hepatocellular carcinoma : In vitro and in vivo studies,” *J. Hepatol.*, vol. 58, no. 3, pp. 502–508, 2013.
- [64] H. Liu, D. Shi, T. Liu, Z. Yu, and C. Zhou, “Lentivirus-mediated silencing of SCIN inhibits proliferation of human lung carcinoma cells,” *Gene*, vol. 554, no. 1, pp. 32–39, 2015.
- [65] D. O. Omelchenko *et al.*, “Protection of Lymphocytes Against HIV using

- Lentivirus Vector Carrying a Combination of TRIM5 α -HRH Genes and microRNA Against CCR5,” *Mol. Biol.*, vol. 52, no. 2, pp. 251–261, 2018.
- [66] Y. Xinyuan, D. Jingchun, X. Xia, X. Chun, and S. Wu, “IFN- γ -Secreting-Mesenchymal Stem Cells Exert an Antitumor Effect In Vivo via the TRAIL Pathway,” *J. Immunol. Res.*, pp. 1–9, 2014.
- [67] L. Elzaouk, K. Moelling, and J. Pavlovic, “Anti-tumor activity of mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse melanoma model,” *Exp. Dermatol.*, vol. 15, no. 11, pp. 865–874, 2006.
- [68] R. Pitti, S. a. Marsters, S. Ruppert, C. Donahue, A. Moore, and A. Ashkenazi, “Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family,” *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 12687–12690, 1996.
- [69] S. R. Wiley *et al.*, “Identification and Characterization of a New Member of the TNF Family that Induces Apoptosis,” *Immunity*, vol. 3, pp. 673–682, 1995.
- [70] S. Wang and W. S. El-deiry, “TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors,” *Oncogene*, vol. 22, pp. 8628–8633, 2003.
- [71] J. Bodmer *et al.*, “TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8.”, *Nat Cell Biol*, vol. 2, no. 4, pp. 241–243, 2000.
- [72] G. Pan *et al.*, “The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL.”, *Science (80-)*, vol. 276, no. 5309, pp. 111–3, 1997.
- [73] J. Sheridan *et al.*, “Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors.”, *Science (80-)*, vol. 277, no. 5327, pp. 818–21, 1997.
- [74] W. Jiang, D. B. Wu, S. Y. Fu, E. Q. Chen, H. Tang, and T. Y. Zhou, “Insight into the role of TRAIL in liver diseases,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 110, no. September 2018, pp. 641–645, 2019.

- [75] D. de Miguel, J. Lemke, A. Anel, H. Walczak, and L. Martinez-Lostao, "Onto better TRAILs for cancer treatment," *Cell Death Differ*, vol. 23, no. 5, pp. 733–747, 2016.
- [76] S. A. Choi *et al.*, "Preclinical Biosafety Evaluation of Genetically Modified Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Clinical Applications to Brainstem Glioma," *Stem Cells Dev.*, vol. 25, no. 12, pp. 897–908, 2016.
- [77] Q. Deng *et al.*, "TRAIL-secreting mesenchymal stem cells promote apoptosis in heat-shock-treated liver cancer cells and inhibit tumor growth in nude mice," *Br. Dent. J.*, vol. 217, no. 1, pp. 317–327, 2014.
- [78] S. M. Kim *et al.*, "Gene therapy using TRAIL-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against intracranial glioma," *Cancer Res*, vol. 68, no. 23, pp. 9614–9623, 2008.
- [79] J. Han, H. S. Hwang, and K. Na, "TRAIL-secreting human mesenchymal stem cells engineered by a non-viral vector and photochemical internalization for pancreatic cancer gene therapy," *Biomaterials*, vol. 182, pp. 259–268, 2018.
- [80] C. González-Villareal, "Evaluación de la Actividad Antitumoral de Células Madre Mesenquimales que Sobreexpresan TRAIL e IFNB en un Modelo Murino de Linfoma.," 2018.
- [81] H. Wang, H. Hu, and K. Zhang, "Overview of Interferon: Characteristics, signaling and anticancer effect. Arch Biotechnol Biomed.," *Arch Biotechnol Biomed*, vol. 1, pp. 001–016, 2017.
- [82] L. Plataniás, "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling.," *Nat Rev Immunol*, vol. 5, pp. 375–386, 2005.
- [83] R. F. V Medrano, A. Hunger, S. A. Mendonça, J. A. M, and B. E. Strauss, "Immunomodulatory and antitumor effects of type I interferons and their application in cancer therapy," *Oncotarget*, vol. 8, no. 41, pp. 71249–71284,

2017.

- [84] C. Ren, S. Kumar, D. Chanda, J. Chen, J. D. Mountz, and S. Ponnzahagan, "Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells Producing Interferon- α in a Mouse Melanoma Lung Metastasis Model," *Stem Cells*, vol. 26, pp. 2332–2338, 2008.
- [85] M. Studeny *et al.*, "Mesenchymal Stem Cells : Potential Precursors for Tumor Stroma and Targeted-Delivery Vehicles for Anticancer Agents," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 96, no. 21, 2004.
- [86] C. Ren *et al.*, "Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells expressing interferon- β in a mouse prostate cancer lung metastasis model," *Gene Ther.*, pp. 1446–1453, 2008.
- [87] G. Mazzolini, I. Melero, and J. Prieto, "El papel de la interleuquina-12 en la inmunoterapia contra el cáncer," *Medicina (B. Aires).*, vol. 64, no. 1, pp. 77–78, 2004.
- [88] N. Jacobson *et al.*, "Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4," *J. EXP MED*, vol. 181, no. 5, pp. 1755–62, 1995.
- [89] H. Kusaba *et al.*, "Interleukin-12-induced Interferon- γ Production by Human Peripheral Blood T Cells Is Regulated by Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 2, pp. 1037–1043, 2005.
- [90] G. Mazzolini, J. Prieto, and I. Melero, "Gene therapy of cancer with interleukin-12.," *Curr Phar Des*, vol. 9, pp. 1981–91, 2003.
- [91] X. Chen *et al.*, "A tumor-selective biotherapy with prolonged impact on established metastases based on cytokine gene-engineered MSCs," *Mol Ther*, vol. 16, no. 4, pp. 749–756, 2008.
- [92] P. Gao, Q. Ding, Z. Wu, H. Jiang, and Z. Fang, "Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model

- of renal cell carcinoma,” *Cancer Lett.*, vol. 290, no. 2, pp. 157–166, 2010.
- [93] G. Mack, “Cancer researchers usher in dog days of medicine,” *Nat Med*, vol. 11, no. 1018, 2005.
- [94] T. Rosol, S. Tannehill-Gregg, B. LeRoy, S. Mandl, and C. Contag, “Animal models of bone metastasis.,” *Cancer*, vol. 97, pp. 748–757, 2003.
- [95] K. Frese and D. Tuveson, “Maximizing mouse cancer models,” *Nat Rev Cancer*, vol. 7, pp. 654–658, 2007.
- [96] S. Kendall, S. Adam, and C. Counter, “Genetically engineered human cancer models utilizing mammalian transgene expression,” *Cell Cycle*, vol. 5, no. 10, pp. 1074–9, 2006.
- [97] I. Szadvari, O. Krizanova, and P. Babula, “Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment,” *Physiol Res*, vol. 65, no. Supplementum 4, pp. S441-s453, 2016.
- [98] D. R. Welch, “Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo,” *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 15, no. 3, pp. 272–306, 1997.
- [99] F. Sharkey and J. Fogh, “Considerations in the use of nude mice for cancer research,” *Cancer Metastasis Rev*, vol. 3, no. 4, pp. 341–60, 1984.
- [100] J. Mestas and C. Hughes, “Of mice and not men: differences between mouse and human immunology,” *J Immunol*, vol. 172, pp. 2731–2738, 2004.
- [101] W. Y., O. A., N. K., and K. M., “Murine liver metastasis model using L5178Y-ML lymphoma and the effect of antitumor agents on the metastasis,” *Japanese Journal of Cancer Research*, vol. 79, no. 11. pp. 1208–1216, 1988.
- [102] F. Boylel, “Use of murine l5178y lymphoma thymidine kinase mutants for,” pp. 589–592, 1993.
- [103] M. M. Plant *et al.*, “Cytotoxic effect of the ethanolic extract of,” vol. 10, pp. 397–404, 2013.

- [104] H. M. González, "Linfoma : Aspectos clínicos y de imagen," pp. 81–97, 2009.
- [105] J. Borrego-Terrazas, "Células Madre Humanas Modificadas Genéticamente Para Expresar TRAIL e Interferon Beta Con Efecto Antitumoral in Vitro.," 2014.
- [106] Z. Yuan, S. D. S. Lourenco, E. K. Sage, K. K. Kolluri, M. W. Lowdell, and S. M. Janes, "Cryopreservation of human mesenchymal stromal cells expressing TRAIL for human anti-cancer therapy," *Cytotherapy*, vol. 18, no. 7, pp. 860–869, 2016.
- [107] A. P. Cribbs, A. Kennedy, B. Gregory, and F. M. Brennan, "Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells," *BMC Biotechnol.*, vol. 13, pp. 1–8, 2013.
- [108] J. Charan and N. Kantharia, "How to calculate sample size in animal studies?," *J. Pharmacol. Pharmacother.*, vol. 4, no. 4, p. 303, 2013.
- [109] IACUC Guidelines, "Anesthesia." [Online]. Available: <https://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guidelines-anesthesia>.
- [110] Office of Laboratory Animal Welfare, "Care and Use Institutional Animal Care and Use," *Care Use Institutional Anim. Care Use*, p. 230, 2002.
- [111] R. Committee *et al.*, *Rodent*. 1996.
- [112] IACUC Guidelines, "Analgesia." .
- [113] S. Cheng, S. K. Nethi, S. Rathi, and B. Layek, "Engineered Mesenchymal Stem Cells (MSCs) for Targeting Solid Tumors : Therapeutic Potential beyond Regenerative Therapy," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, pp. 1–36, 2019.
- [114] X. Li, P. Zhang, X. Liu, and P. Lv, "Expression of interleukin-12 by adipose-derived mesenchymal stem cells for treatment of lung adenocarcinoma," *Thorac. Cancer*, vol. 6, pp. 80–84, 2015.
- [115] R. Chung Heon *et al.*, "Gene Therapy of Intracranial Glioma Using

Interleukin-12 Secreting Human Umbilical Cord Blood–Derived Mesenchymal Stem Cells,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 22, pp. 733–743, 2011.

- [116] X. Chen *et al.*, “A tumor-selective biotherapy with prolonged impact on established metastases based on cytokine gene-engineered MSCs,” *Mol. Ther.*, vol. 16, no. 4, pp. 749–756, 2008.
- [117] J. Han, J. Zhao, J. Xu, and Y. Wen, “Mesenchymal stem cells genetically modified by lentivirus - mediated interleukin - 12 inhibit malignant ascites in mice,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 8, pp. 1330–1334, 2014.
- [118] X. Chen *et al.*, “A tumor-selective biotherapy with prolonged impact on established metastases based on cytokine gene-engineered MSCs.,” *Mol Ther.*, vol. 16, no. 4, pp. 749–56, 2008.
- [119] K. Jeong, E. Lee, S. J. Kim, S. Yang, Y. C. Sung, and J. Seong, “Irradiation-induced localization of IL-12 expressing mesenchymal stem cells to enhance the curative effect in murine metastatic hepatoma,” *Int. J. Cancer*, vol. 137, pp. 721–730, 2015.
- [120] S. H. Seo *et al.*, “The effects of mesenchymal stem cells injected via different routes on modified IL-12-mediated antitumor activity,” *Gene Ther.*, vol. 18, p. 488, 2011.
- [121] P. Gao, Q. Ding, Z. Wu, H. Jiang, and Z. Fang, “Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma,” *Cancer Lett.*, vol. 290, no. 2, pp. 157–66, 2010.
- [122] S. Kalimuthu, L. Zhu, J. M. Oh, P. Gangadaran, H. W. Lee, and S. Baek, “Migration of mesenchymal stem cells to tumor xenograft models and in vitro drug delivery by doxorubicin,” *Int. J. Med. Sci.*, vol. 15, no. 10, pp. 1051–1061, 2018.
- [123] A. T. Feldman and D. Wolfe, “Chapter 3 Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1180, 2014, pp. 31–43.

- [124] S. Von Karstedt, A. Montinaro, and H. Walczak, "Exploring the TRAILs less travelled : TRAIL in cancer biology and therapy," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 17, no. 6, pp. 352–366, 2017.
- [125] A. Wang, X. Zhou, J. Zhao, T. Liu, and J. Xu, "Therapeutic effects of bone marrow mesenchymal stem cells expressing interleukin-12 in mice bearing malignant ascites tumor," *Int. J. Clin. Exp Med*, vol. 8, no. 9, pp. 15840–15845, 2015.
- [126] Y. Morimoto, T. Kishida, S. Kotani, and K. Takayama, "Interferon- b signal may up-regulate PD-L1 expression through IRF9- dependent and independent pathways in lung cancer cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. XXX, no. xxxx, pp. 1–7, 2018.