



Universidad del  
**Rosario**

**Estrategias de Ingeniería Genética para el  
mejoramiento de terapias avanzadas basadas en  
Células Estromales Mesenquimales de gelatina  
de Wharton de cordón umbilical (CEM-GW) y sus  
derivados, con potencial de uso clínico**

**July Constanza Buitrago Gutiérrez**

Universidad del Rosario  
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud  
Bogotá D.C., Colombia  
2023



**Estrategias de Ingeniería Genética para el  
mejoramiento de terapias avanzadas basadas en  
Células Estromales Mesenquimales de gelatina de  
Wharton de cordón umbilical (CEM-GW) y sus  
derivados, con potencial de uso clínico**

**July Constanza Buitrago Gutiérrez**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Doctor en Ciencias Biomédicas y Biológicas**

Director:

MD., PhD., Gustavo Andrés Salguero López

Codirectora:

PhD., Yeny Acosta Ampudia

Línea de Investigación:

Terapia celular y génica

Grupo de Investigación:

Unidad de Terapias Avanzadas - IDCBIS

Universidad del Rosario

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

Bogotá D.C., Colombia

2023



*Gracias a esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme su ayuda. Con todo mi cariño esta tesis se las dedico a ustedes:*

*A mis abuelos y mis padres...*

*Vive como si fueras a morir mañana. Aprende como si fueras a vivir siempre*

*Mahatma Gandhi*

# Agradecimientos

A DIOS.

A mi familia, mis abuelos, mi mamá, mi papá y a mis hermanos, a ustedes quienes me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia, mi constancia para conseguir mis objetivos. Gracias por creer en mí. Gracias por motivarme y darme la mano. Gracias por hacer que este sueño de ser científica esté y siga siendo realidad.

A la Universidad del Rosario, en especial al grupo docente.

Al Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud - IDCBIS, con particular mención a la Unidad de Terapias Avanzadas. A mis compañeros de la UTA

Al Dr. Gustavo Salguero, por la dirección de este trabajo de grado.

Al Dr. Juan Manuel Anaya y la Dra. Yeny Acosta, del Centro de Estudio de Enfermedades Autoinmunes (CREA) de la Universidad del Rosario, por la codirección de este trabajo de grado

Al Dr. Jens Gruber, CSO Curexsys GmbH, por su apoyo y confianza en mis conocimientos.

A mis grandes amigos, Ivett, Mariana, Leidi, Dra. Dora Fonseca, Cristina, Carlos, Manuel, Diego Esteban, Sonia, Evelyn, Víctor, Valerie, Diana, Alejandro, César, Astrid, Stefan. Sus palabras siempre me dieron la fuerza para seguir en este proceso.

A mis maestras de vida, María Elena, Sonia y Yanet Baracaldo.

## Resumen

En la última década, los avances en la comprensión del rol de las células estromales mesenquimales (CEM) en los diversos procesos de homeostasis, reparación y regeneración tisular, así como su papel determinante en la regulación de respuestas inflamatorias a nivel local y sistémico, han acelerado el intenso desarrollo de plataformas biotecnológicas entorno a su potencial de aplicación como herramientas terapéuticas para uso clínico. Más de 1300 ensayos clínicos a nivel global se han llevado a cabo en la última década con el objetivo de determinar la eficacia terapéutica de productos medicinales basados en terapia celular con CEM. Si bien las CEM han demostrado ser seguras, los datos clínicos conseguidos señalan resultados no consistentes en términos de efectividad en distintos escenarios clínicos, principalmente debido al desempeño del producto celular durante su aplicación clínica. Estrategias para mejorar la potencia y desempeño de productos medicinales basados en CEM podrían involucrar el uso de herramientas de transferencia génica que permitan incrementar la viabilidad y el efecto terapéutico del principio activo celular *in vivo*, sin generar riesgos adicionales para el paciente tratado. Aunque existe un auge actual en el uso de este tipo de estrategias para generar productos de terapia celular avanzados, su aplicación en el mejoramiento de productos basados en CEM no ha sido significativamente explorado. En este trabajo de tesis se exploraron diversas metodologías experimentales orientadas a determinar la factibilidad y utilidad de la modificación genética de las CEM y las vesículas extracelulares (VEs) derivadas de estas, como potencial herramienta biotecnológica para el desarrollo y mejoramiento de productos medicinales derivados de estos componentes para futuro uso clínico. Con esta perspectiva, el trabajo permitió confirmar que la modificación génica de este tipo celular a partir de métodos no-virales y virales, es técnicamente factible y seguro y abre una ventana de oportunidad para el desarrollo de metodologías avanzadas para la generación de productos medicinales de terapia avanzada con alto potencial de aplicación clínica. Así mismo, el trabajo introduce y valida tecnologías para el aislamiento y caracterización de VEs derivadas de CEM que amplían el campo del conocimiento sobre este tipo de nanopartículas para su futura aplicación en el contexto médico.

**Palabras clave:**

Células estromales mesenquimales de Gelatina de Wharton, vesículas extracelulares, nucleofección, lentivirus, modificación genética, diferenciación osteogénica e inmunomodulación.

## Abstract

In the last decade, advances in understanding the role of mesenchymal stromal cells (MSCs) in homeostasis, repair and tissue regeneration, as well as regulation of inflammatory responses at local and systemic levels, have inspired prodigious efforts into the development of MSC biotechnological platforms for potential application as therapeutic tools in clinical settings. As a result, more than 1300 clinical trials worldwide have been carried out to define the therapeutic efficacy of medicinal products based on MSC cell therapy. Disappointingly, although MSCs have been shown to be safe, effectiveness studies have given inconsistent results in different clinical settings, mainly due to variable performance of the cell product during its clinical application. Therefore, strategies are still needed to improve the potency and performance of MSC-based medicinal products. One approach could include the use of gene transfer tools to increase the viability and therapeutic effect of the cells *in vivo*, without generating additional risks for the treated patient and there is increasing interest in the use of this strategy to generate advanced cell therapy products. However, its application in the improvement of MSC-based products has not been considerably explored. In this study, different experimental methodologies were examined to determine the feasibility and usefulness of genetically modifying MSCs and their extracellular vesicles (EVs) as a potential biotechnological tool for the development and improvement of medicinal products derived from these components. With this perspective, we present results confirming that genetic modification of MSCs using non-viral and viral methods is technically feasible and safe supporting existing initiatives towards the development of advanced methodologies for the generation of therapeutic products with a high potential for clinical application. In addition, we develop and validate technologies for the isolation and characterization of MSC-derived EVs extending the field of knowledge about this type of nanoparticle and supporting future applications of MSC-EVs in the medical context.

**Keywords:**

Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells, extracellular vesicles, nucleofection, lentivirus, genetic modification, osteogenic differentiation and immunomodulation

# Contenido

|  | Pág.        |
|--|-------------|
| <b>Resumen</b> .....   | <b>VII</b>  |
| <b>Lista de figuras</b> .....  | <b>XIV</b>  |
| <b>Lista de tablas</b> .....   | <b>XVI</b>  |
| <b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....  | <b>XVII</b> |
| <b>Introducción</b> .....  | <b>1</b>    |
| <b>1. Marco Teórico</b> .....  | <b>5</b>    |
| 1.1 Células Estromales Mesenquimales .....   | 5           |
| 1.1.1 Característica <i>in vitro</i> de las CEM .....  | 6           |
| 1.1.2 Diferenciación <i>in vitro</i> de las CEM .....  | 7           |
| 1.1.3 Características inmunológicas de las CEM .....   | 8           |
| 1.2 Mecanismos de inmunomodulación .....   | 9           |
| 1.2.1 Estimulación del efecto inmunomodulador de las CEM.....  | 9           |
| 1.2.2 Efecto inmunomodulador en las poblaciones celulares del sistema inmune ..  | 10          |
| 1.3 CEM de la gelatina de Wharton (CEM-GW).....  | 14          |
| 1.3.1 Potencial de diferenciación multilínea <i>in vitro</i> de las CEM-GW.....  | 16          |
| 1.3.2 Propiedades inmunomodulatorias de las CEM-GW .....   | 17          |
| 1.4 Terapia celular basada en CEM .....  | 18          |
| 1.5 Vesículas extracelulares derivadas de las CEM (CEM-VEs).....   | 22          |
| 1.5.1 Vesículas extracelulares en la reparación y regeneración de tejidos .....  | 24          |
| 1.6 Terapia génica basada en CEM .....   | 26          |
| 1.7 Factor de crecimiento fibroblástico básico – FGFb o FGF2.....  | 28          |
| <b>2. Metodología</b> .....  | <b>31</b>   |
| 2.1 Vector de expresión del gen <i>FGFb</i> .....  | 31          |
| 2.2 Amplificación por PCR del fragmento <i>FGFb-Flag</i> .....   | 32          |
| 2.3 Sub-clonación del fragmento <i>FGFb-Flag</i> en el vector de transferencia viral (VTLv):<br>Constructo p204-LV+FGFb..... | 32          |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 2.4       | Cultivo de las CEM-GW .....  | 34        |
| 2.5       | Transfección por nucleofección de las CEM-GW .....   | 34        |
| 2.6       | Producción de partículas Lentivirales (LV) de tercera generación con pseudotipo VSV-G .....  | 35        |
| 2.7       | Transducción de las CEM-GW con las partículas LV-GFP y LV-FGFb .....   | 38        |
| 2.8       | Marcación intracelular del factor FGF2-Flag en las CEM-GW transfectadas o transducidas .....   | 38        |
| 2.9       | Ensayos de ELISA para el factor FGFb .....   | 39        |
| 2.10      | Inmunofenotipo de las CEM-GW .....   | 39        |
| 2.11      | Ensayos de diferenciación (linaje osteoblastos).....   | 39        |
| 2.12      | Ensayos de inmunomodulación <i>in vitro</i> : Contacto célula-célula .....   | 40        |
| 2.13      | Ensayos de ELISA multiplex de citoquinas .....   | 40        |
| 2.14      | Producción y aislamiento de VEs derivadas de CEM-GW .....  | 41        |
| 2.15      | Análisis de nanopartículas por NTA.....  | 42        |
| 2.16      | Caracterización de marcadores de membrana en VEs por citometría de flujo .....   | 43        |
| 2.17      | Caracterización de marcadores de membrana en VEs por Exoview® .....  | 43        |
| 2.18      | Análisis estadístico .....   | 44        |
| <b>3.</b> | <b>Resultados .....</b>  | <b>45</b> |
| 3.1       | Modificación genética transitoria de las CEM-GW con un vector no viral (Nucleofección) .....   | 45        |
| 3.1.1     | Vector de transferencia no viral del gen <i>FGFb</i> .....   | 45        |
| 3.1.2     | Estandarización de la transfección de plásmidos en CEM-GW, por nucleofección.....  | 46        |
| 3.1.3     | Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la proteína FGFb en las propiedades biológicas de las CEM-GW .....                                     | 53        |
| 3.1.4     | Perfil de secreción de factores solubles de las CEM-GW modificadas genéticamente por nucleofección, para la sobreexpresión de la proteína FGFb ..... | 57        |
| 3.2       | Modificación genética estable de las CEM-GW con un vector viral (Lentivirus) ...   | 60        |
| 3.2.1     | Vector de transferencia viral del gen <i>FGFb</i> .....  | 60        |
| 3.2.2     | Estandarización de la producción de partículas LV de tercera generación: evaluación diferentes métodos de transfección.....                          | 64        |
| 3.2.3     | Establecimiento de un Banco Maestro de CEM-GW modificadas genéticamente (MCB) <sup>75</sup>  |           |
| 3.2.4     | Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la proteína FGFb en las propiedades biológicas de las CEM-GW .....                                     | 85        |
| 3.2.5     | Perfil de secreción de factores solubles de las CEM-GW modificadas genéticamente con LV, para la sobreexpresión de la proteína FGFb .....            | 92        |

|   |            |
|---|------------|
| 3.2.6 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la proteína FGFb en las propiedades funcionales de las CEM-GW .....                           | 95         |
| 3.3 CEM-GW-VEs: aislamiento, caracterización y evaluación de sus propiedades después de una estrategia de modificación genética .....             | 99         |
| 3.3.1 Condiciones de cultivo para la producción de VEs: caracterización biológica y funcional.....  | 99         |
| 3.3.1.1 Análisis por tamaño y cantidad .....  | 99         |
| 3.3.1.2 Análisis expresión de marcadores de superficie .....  | 106        |
| 3.3.2 Efecto de la modificación genética por LV en las CEM-GW-VEs .....   | 109        |
| 3.3.2.1 Modificación genética estable de las CEM-GW con LV-GFP y LV-FGFb ..   | 109        |
| 3.3.2.2 Caracterización biológica de las VEs derivadas de CEM-GW modificadas genéticamente con LV.....  | 114        |
| 3.3.2.3 Caracterización funcional de las VEs derivadas de CEM-GW modificadas genéticamente por LV .....   | 116        |
| <b>4. Discusión.....</b>  | <b>125</b> |
| 4.1 Modificación genética transitoria de las CEM-GW con un vector no viral (Nucleofección).....   | 127        |
| 4.2 Modificación genética estable de las CEM-GW con un vector viral (Lentivirus)..  | 131        |
| 4.3 VEs derivadas de CEM-GW: aislamiento, caracterización y evaluación de sus propiedades después de una estrategia de modificación genética..... | 137        |
| <b>5. Conclusiones.....</b>   | <b>147</b> |
| <b>Bibliografía .....</b>   | <b>151</b> |

## Lista de figuras

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>Figura 1.</b> Mapa conceptual general del proyecto de investigación.....   | 3    |
| <b>Figura 2.</b> Mapa del vector pCMV3-FGF2-Flag (6178bp).....  | 31   |
| <b>Figura 3.</b> Primer ensayo de transfección por nucleofección del vector pmaxGFP™ y el vector pCMV3-FGF2-Flag en las CEM-GW. ....                                  | 49   |
| <b>Figura 4.</b> Segundo ensayo de transfección por nucleofección del vector pmaxGFP™ y el vector pCMV3-FGF2-Flag en las CEM-GW .....                                 | 51   |
| <b>Figura 5.</b> Cambio en el nivel de expresión de las proteínas GFP y FGF2-Flag, durante diferentes tiempos post-nucleofección .....                                | 53   |
| <b>Figura 6.</b> Efecto de la sobreexpresión del factor de crecimiento FGF2-Flag, en el fenotipo de las CEM-GW  | 54   |
| <b>Figura 7.</b> Efecto de la sobreexpresión del factor de crecimiento FGF2-Flag, en la proliferación de las CEM-GW.....  | 56   |
| <b>Figura 8.</b> Perfil de secreción de factores solubles de las CEM-GW modificadas genéticamente por nucleofección, para la sobreexpresión de la proteína FGFb ..... | 59   |
| <b>Figura 9.</b> Diagrama de la estrategia de clonación para la sub-clonación de la ORF del factor FGFb en el vector de transferencia lentiviral p204-LV.....         | 62   |
| <b>Figura 10.</b> Sub-clonación del ORF del factor FGFb en el vector de transferencia lentiviral p204LV .....   | 63   |
| <b>Figura 11.</b> Plásmidos y estrategia molecular para la producción <i>in vitro</i> de partículas lentivirales.....   | 66   |
| <b>Figura 12.</b> Producción de partículas LV-GFP en células HEK293T, mediante transfección por nucleofección.....  | 69   |
| <b>Figura 13.</b> Producción de partículas LV-GFP en células HEK293 LTV, mediante transfección por nucleofección.....   | 71   |
| <b>Figura 14.</b> Ensayo de transducción de las CEM-GW con los LV-GFP y LV-FGFb.....  | 73   |
| <b>Figura 15.</b> Producción de partículas LV-GFP, mediante diferentes métodos de transfección .....  | 74   |
| <b>Figura 16.</b> Ensayo de transducción de las CEM-GW con los LV-GFP y LV-FGFb.....  | 77   |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 17.</b> Ensayo de transducción de las CEM-GW con los LV-GFP y LV-FGFb .....   | 82  |
| <b>Figura 18.</b> Expresión de las proteínas GFP y FGFb en los donantes de CEM-GW transducidas con los LV .....   | 84  |
| <b>Figura 19.</b> Efecto de la sobreexpresión del factor de crecimiento FGFb en las características biológicas de las CEM-GW .....  | 88  |
| <b>Figura 20.</b> Efecto de la sobreexpresión del factor de crecimiento FGFb en la cinética de crecimiento (proliferación) de las CEM-GW .....  | 91  |
| <b>Figura 21.</b> Perfil de secreción de factores solubles de las CEM-GW modificadas genéticamente por LV, para la sobreexpresión de la proteína FGFb. ....                               | 95  |
| <b>Figura 22.</b> Efecto de la sobreexpresión del factor de crecimiento FGFb en las propiedades funcionales de las CEM-GW.....  | 97  |
| <b>Figura 23.</b> Análisis de la producción de VEs con el medio de cultivo de las CEM-GW..  | 101 |
| <b>Figura 24.</b> Producción y aislamiento de VEs a partir de un cultivo de CEM-GW.....   | 103 |
| <b>Figura 25.</b> Caracterización de las vesículas extracelulares aisladas de CEM-GW por NTA .....  | 106 |
| <b>Figura 26.</b> Caracterización de las VEs aisladas de CEM-GW, por expresión de marcadores de superficie.....   | 108 |
| <b>Figura 27.</b> Transducción de CEM-GW con las partículas LV-GFP y LV-FGFb.....   | 111 |
| <b>Figura 28.</b> Análisis de la producción de VEs de las CEM-GW modificadas genéticamente .....  | 114 |
| <b>Figura 29.</b> Caracterización de las VEs aisladas de CEM-GW modificadas genéticamente, por NTA y por expresión de marcadores de superficie .....                                      | 116 |
| <b>Figura 30.</b> Caracterización funcional de las VEs derivadas de CEM-GW <i>wildtype</i> modificadas genéticamente con LV .....   | 117 |
| <b>Figura 31.</b> Estandarización del ensayo de inmunomodulación <i>in vitro</i> utilizando la fracción de Exos aislada a partir de sobrenadantes de CEM-GW.....                          | 119 |
| <b>Figura 32.</b> Rastreo de la proliferación de linfocitos T con el colorante CellTrace™ CFSE .....  | 120 |
| <b>Figura 33.</b> Ensayo de inmunomodulación <i>in vitro</i> de la fracción de Exos aislada a partir de sobrenadantes de CEM-GW, rastreando la proliferación de linfocitos con CFSE ..... | 123 |
| <b>Figura 34.</b> Ensayo de inmunomodulación <i>in vitro</i> de la fracción de Exos aislada de CEM-GW.....  | 124 |

## Lista de tablas

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>Tabla 1.</b> Condiciones experimentales para la transfección por nucleofección de las CEM-GW con el plásmido pCMV3-FGF2-Flag.....    | 46          |
| <b>Tabla 2.</b> Condiciones experimentales para la transfección por nucleofección de las CEM-GW con el plásmido pCMV3-FGF2-Flag.....    | 50          |
| <b>Tabla 3.</b> Secuencia y características de los <i>primers</i> diseñados para la amplificación por PCR del ORF del factor FGFb. .... | 61          |

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Abreviaturas

| Abreviatura                   | Término   |
|-------------------------------|---|
| <i>Amp</i>                    | Ampicilina  |
| <i>APCs</i>                   | Células presentadoras de antígeno                       |
| <i>Bregs</i>                  | Células B regulatorias                                  |
| <i>BSA</i>                    | Albúmina de suero bovino                                |
| <i>CD</i>                     | Células dendríticas                                     |
| <i>CEM-GW</i>                 | Células estromales mesenquimales de Gelatina de Wharton |
| <i>CEM-VEs</i>                | Vesículas extracelulares de CEM                         |
| <i>CM</i>                     | Medio condicionado                                      |
| <i>CMVs</i>                   | Cuerpos multivesiculares                                |
| <i>CU</i>                     | Cordón umbilical  |
| <i>EICH</i>                   | Enfermedad de injerto contra huésped                    |
| <i>Exos</i>                   | Exosomas  |
| <i>FGFb, FGF2</i>             | Factor de crecimiento fibroblástico básico              |
| <i>GW</i>                     | Gelatina de Wharton                                     |
| <i>HGF</i>                    | Factor de crecimiento hepático                          |
| <i>hLP</i>                    | Lisado de plaquetas humano                              |
| <i>IDO-1</i>                  | Indoleamina 2,3-dioxigenasa                             |
| <i>IFN<math>\gamma</math></i> | Interferón $\gamma$                                     |
| <i>IL-10, IL-8, IL-6</i>      | Interleucina 10, 8 y 6                                  |
| <i>IL-1<math>\beta</math></i> | Interleucina 1 $\beta$                                  |
| <i>LIF</i>                    | Factor inhibitorio de leucemia                          |
| <i>LV</i>                     | Lentivirus  |
| <i>LV-FGFb</i>                | Lentivirus conteniendo FGFb                             |
| <i>LV-GFP</i>                 | Lentivirus conteniendo GFP                              |
| <i>MHC</i>                    | Complejo mayor de histocompatibilidad                   |
| <i>MO</i>                     | Médula ósea   |
| <i>MSC</i>                    | Sitio de múltiple clonaje                               |
| <i>MVs</i>                    | Microvesículas  |
| <i>NK</i>                     | <i>Natural killer</i>                                   |
| <i>NKT</i>                    | <i>Natural killer T</i>                                 |
| <i>NTA</i>                    | <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>                   |
| <i>ORF</i>                    | Marco abierto de lectura                                |
| <i>PBMCs</i>                  | Células mononucleares de sangre periférica humana       |
| <i>PEG</i>                    | Polietilenglicol  |
| <i>PGE2</i>                   | Prostaglandina E2                                       |
| <i>SCU</i>                    | Sangre de cordón umbilical                              |
| <i>SFB</i>                    | Suero fetal bovino                                      |

---

| <b>Abreviatura</b>         | <b>Término</b>                            |
|----------------------------|---|
| <i>TA</i>                  | Tejido adiposo                            |
| <i>TGFβ</i>                | Factor de crecimiento transformante β     |
| <i>TLR3</i>                | Receptor <i>Toll-like</i> 3               |
| <i>TNFα</i>                | Factor de necrosis tumoral α              |
| <i>Tregs</i>               | Células T regulatorias                    |
| <i>UCWJ<sup>FGFb</sup></i> | CEM-GW expresando la proteína FGFb        |
| <i>UCWJ<sup>GFP</sup></i>  | CEM-GW expresando la proteína GFP         |
| <i>VEGF</i>                | Factor de crecimiento endotelial vascular |
| <i>VEs</i>                 | Vesículas Extracelulares                  |

## Introducción

Recientemente ha habido un gran interés en el estudio de las células estromales mesenquimales (CEM), como candidatas atractivas para el desarrollo de estrategias de terapia celular en varios contextos clínicos. Esto debido a sus características incluyendo la proliferación *ex vivo* a largo plazo, potencial de diferenciación multilineaje y propiedades de inmunomodulación. Las CEM humanas son típicamente aisladas de médula ósea (MO). No obstante, es ahora claro que la MO no representa la mejor fuente disponible de CEM. Otras fuentes han sido estudiadas, en donde la gelatina de Wharton (GW) de cordón umbilical ha llamado la atención como fuente promisoría para aislar CEM.

La Unidad de Terapias Avanzadas (UTA) se ha constituido como una plataforma de investigación traslacional en estrategias terapéuticas basadas en células, tejidos y genes. En esta plataforma científica se están realizando procesos de investigación, validación de protocolos y desarrollo de productos de terapia avanzada para el manejo de patologías degenerativas que tienen alto impacto en la calidad de vida de los pacientes y generan altos costos asistenciales en el sistema de salud. Este tipo de productos ha mostrado factibilidad en su desarrollo y su posterior implementación clínica. A nivel mundial este producto celular ya ha sido escalado a grado clínico y está siendo usado intensamente en ensayos clínicos en diferentes aplicaciones clínicas. En la base de datos Clinicaltrials.gov, se listan más de 1327 estudios hechos con más de 30 mil pacientes utilizando CEM, lo que demuestra que el campo de aplicación continúa en expansión y que la generación de productos basados en CEM-GW ofrecen una buena alternativa clínica a las CEM derivadas de fuentes adultas.

En la UTA también ha habido un gran interés por investigar los mecanismos celulares y moleculares implicados en la inmunomodulación de procesos inflamatorios de las CEM-GW. Los resultados de los diferentes modelos *in vitro* desarrollados, han permitido proponer diferentes mecanismos celulares y moleculares mediante los cuales las CEM ejercen su capacidad de inmunomodulación, dando cuenta de la participación de ciertas

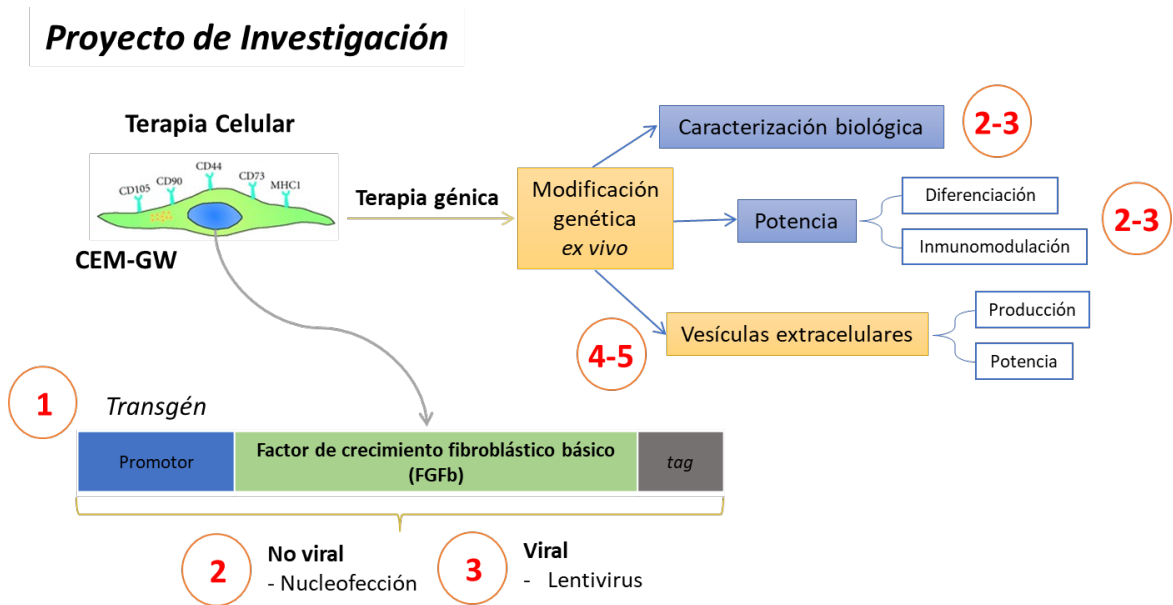
moléculas cuya función ya ha sido descrita en los diferentes procesos del sistema inmune. Esta información le ha permitido a la UTA conocer más sobre la biología de las CEM-GW y plantear nuevos desafíos científicos con los que se busca potenciar algunas de las características y funciones biológicas de las CEM-GW. Esto permitiría optimizar el desarrollo eficaz de aproximaciones terapéuticas basadas en células para condiciones patológicas relacionadas con inflamación, regeneración de tejidos y con el sistema inmune (por ejemplo, enfermedades autoinmunes).

En este trabajo, se pretendió implementar algunos protocolos para la modificación genética de las CEM utilizando diferentes herramientas de ingeniería genética (terapia génica). Por otro lado, una aplicación de gran interés es el uso de vesículas extracelulares (VEs) derivadas de las CEM-GW modificadas genéticamente en diferentes ensayos funcionales *in vitro*, tales como inmunomodulación y regeneración de tejidos. La modificación genética de las CEM-GW busca potenciar las propiedades de aplicación de las VEs en los procesos biológicos anteriormente mencionados. En ese sentido, un elemento innovador importante que pretendió introducir el presente proyecto de investigación es el aislamiento y caracterización de las VEs derivadas de cultivos de CEM-GW modificadas genéticamente, e indagar su efecto biológico sobre el proceso biológico específico de inmunomodulación. Dado que la investigación de las CEM en este aspecto no está completamente desarrollada, los resultados de este trabajo podrán generar datos inéditos dentro del campo de investigación en VEs. Esto permitirá optimizar el desarrollo eficaz de aproximaciones terapéuticas basadas en un sistema libre de células en el que se utilicen las VEs derivadas de las CEM para condiciones patológicas relacionadas con inflamación, regeneración de tejidos y autoinmunidad.

De acuerdo con resultados previos de los análisis de transcriptómica de las CEM-GW en el grupo de investigación de la UTA, se identificó la expresión de algunas moléculas cuya función ha sido implicada en importantes mecanismos de supervivencia, diferenciación e inmunomodulación (Cruz-Barrera et al., 2020). Por lo tanto, diseñar una estrategia de transferencia génica para sobreexpresar una molécula de interés cuya función es fundamental en los mecanismos de proliferación, supervivencia y de diferenciación de las CEM, fue objetivo de este proyecto. En este caso se planteó expresar y evaluar el papel de un factor de crecimiento crítico para la supervivencia y diferenciación de las CEM como lo es el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb, FGF2), en las propiedades

funcionales de las células, así como de las VEs derivadas de las células modificadas. De manera general, se propuso modificar genéticamente las CEM para sobreexpresar esta molécula y, posteriormente evaluar el impacto de la modificación genética en las características biológicas y propiedades funcionales de las CEM, en experimentos de diferenciación e inmunomodulación *in vitro*.

El esquema general de este proyecto de investigación se resume en la **Figura 1**.



**Figura 1.** Mapa conceptual general del proyecto de investigación. Los círculos en rojo muestran la ubicación de los objetivos específicos propuestos para el proyecto.

### *Objetivo General*

Desarrollar estrategias de ingeniería genética utilizando herramientas de transferencia génica, para el mejoramiento de terapias avanzadas basadas en células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton de cordón umbilical (CEM-GW) y sus derivados, las VEs, para uso clínico.

### *Objetivos Específicos*

1. Diseñar y construir una estrategia de ingeniería genética basada en la incorporación de un gen funcional en un vector no-viral y uno viral, como herramientas para la modificación de CEM-GW.
2. Aplicar herramientas de modificación genética mediante vectores no-virales en CEM-GW y evaluar sus efectos biológicos en términos de diferenciación e inmunomodulación.
3. Aplicar herramientas de modificación genética mediante vectores virales en CEM-GW y evaluar sus efectos biológicos en términos de diferenciación e inmunomodulación.
4. Evaluar metodologías para el aislamiento de vesículas extracelulares derivadas de las CEM-GW, mediante la caracterización biofísica y la función biológica en inmunomodulación.
5. Evaluar estrategias de modificación genética y su aplicación en el mejoramiento de la producción y propiedades funcionales de las VEs derivadas de las CEM-GW, para su posterior aplicación clínica.

# 1. Marco Teórico

## 1.1 Células Estromales Mesenquimales

La presencia de células madre no hematopoyéticas en la médula ósea (MO) fue sugerido por primera vez a partir de las observaciones del patólogo alemán Cohnheim hace 130 años. Su trabajo planteó la posibilidad de que la MO podría ser fuente de fibroblastos durante el proceso normal de reparación de una herida (Prockop, 1997).

Posteriormente, el trabajo de Friedenstein evidenció que la MO contenía células que podrían diferenciarse en otros tipos celulares mesenquimales, similar al de los fibroblastos. También observaron que las células podían diferenciarse en ciertas colonias que parecían tener depósitos de hueso y cartílago (Friedenstein, Gorskaja, & Kulagina, 1976). Posteriormente, otros grupos confirmaron las mismas observaciones de Friedenstein (Ashton et al., 1980; Bab et al., 1986), y desde entonces se estableció que estas células aisladas mostraban características de multipotencialidad y podían diferenciarse en linajes consistentes con osteoblastos, condrocitos, adipocitos, e incluso mioblastos. Estos hallazgos condujeron a explorar el uso de estas células como progenitores para reemplazar o reparar tejidos dañados de origen mesenquimal en el campo de la ingeniería de tejidos. Desde su identificación se han propuesto varios nombres para reflejar la comprensión variable de las propiedades de las células estromales mesenquimales (CEM), lo que resulta en el uso de varios términos diferentes para describir el mismo tipo de célula. En 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso el término “Células Estromales Mesenquimales Multipotentes”. Más recientemente, Arnold Caplan (Caplan & Correa, 2011) sugirió que el acrónimo MSC (CEM por sus siglas en inglés) podría referirse a “*Medicinal Signaling Cells*” (Células de Señalización Medicinal), para reflejar que el beneficio terapéutico primario de las CEM puede atribuirse a la secreción de moléculas bioactivas en lugar de la regeneración de tejidos.

Para ser consistente con la caracterización de las CEM y facilitar el intercambio de datos entre los investigadores, la ISCT propuso un set mínimo de criterios para definir las CEM. Primero, las CEM deben ser adherentes al plástico durante el cultivo y presentar morfología como fibroblastos. Segundo, las CEM deben presentar un inmunofenotipo específico por la expresión de las moléculas de superficie CD105, CD73 y CD90, y la no expresión de las moléculas CD45, CD34, CD31, CD14 (alternativamente CD11b), CD79 alfa o moléculas del antígeno leucocitario humano clase II (HLA)-DR. Tercero, las CEM deben diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Dominici et al., 2006).

### **1.1.1 Característica *in vitro* de las CEM**

Las CEM han sido aisladas de diferentes fuentes de tejidos adultos, médula ósea (MO), tejido adiposo (TA), tejido gingival, dermis, sangre, y de tejidos fetales como fluido amniótico, placenta y cordón umbilical (CU, gelatina de Wharton – GW y sangre de cordón umbilical - SCU); mostrando heterogeneidad fenotípica (Colter, Class, DiGirolamo, & Prockop, 2000; Zuk et al., 2002). Una vez las células se adhieren al plástico y llegan a una fase logarítmica, estas se dividen rápidamente con tiempos de doblaje que dependen del donante y la densidad sembrada inicialmente.

Fenotípicamente, las CEM expresan una serie de marcadores, ninguno específico de estas células. De manera general se acepta que las CEM no expresan los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11. Estas células tampoco expresan las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 o CD40, o las moléculas de adhesión CD31 (molécula de adhesión de las células endoteliales/plaquetarias – PECAM-1), CD18 (antígeno-1 asociado a la función leucocitaria – LFA-1), o CD56 (molécula-1 de adhesión celular neuronal); y expresan CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71, y Stro-1 así como las moléculas de adhesión CD106 (molécula de adhesión celular vascular – VECAM-1), CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados – ALCAM-1), molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), y CD29 (Conget & Minguell, 1999; Haynesworth, Baber, & Caplan, 1992; Le Blanc, Tammik, Rosendahl, Zetterberg, & Ringden, 2003). Las CEM aisladas de otras especies no expresan todas las mismas moléculas que las células de origen humano, por ejemplo, las CEM de fuentes humanas y de ratas no han mostrado expresión de CD34, mientras que las células de una fuente de ratón muestran expresión variable del marcador (Peister et al., 2004). Por otro lado, la

expresión de las moléculas de superficie está influenciada por los factores secretados por otros tipos celulares presentes en los pasajes iniciales de aislamiento, así que la expresión *in vitro* de algunos marcadores de las CEM no siempre correlaciona con los modelos de expresión *in vivo* (Gronthos, Simmons, Graves, & Robey, 2001). También hay expresión variable de muchos de los marcadores mencionados debido a la variación en la fuente de tejido, el método de aislamiento y cultivo.

### 1.1.2 Diferenciación *in vitro* de las CEM

Además de la identificación de las CEM basada en sus características morfológicas y fenotípicas, una manera adicional para caracterizar las poblaciones de CEM es por su capacidad de diferenciación *in vitro* en hueso, grasa y cartílago. El método clásico de diferenciación *in vitro* de las CEM en osteoblastos involucra la incubación de una monocapa confluyente de CEM con ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato y dexametasona durante 2-3 semanas. Las CEM forman agregados o nódulos que muestran acumulación de calcio durante el tiempo e incrementan la expresión de fosfatasa alcalina (Pittenger et al., 1999). Estos agregados son positivos a tinción con rojo de alizarina. Sin embargo, estas condiciones no reflejan las señales fisiológicas que las CEM reciben para inducir osteogénesis de manera *in vivo*. En la diferenciación adipogénica, las CEM son incubadas con dexametasona, insulina, isobutil metil xantina e indometacina. Bajo estas condiciones experimentales hay acumulación de vacuolas ricas en lípidos dentro de las células y hay expresión del receptor  $\gamma 2$  activado por proliferación de peroxisoma, lipoproteína lipasa y la proteína de unión a ácidos grasos aP2 (Pittenger et al., 1999). Las vacuolas se combinan y llenan las células, esta acumulación de lípidos en las vacuolas se tiñen con *Oil red*. En la diferenciación condrogénica, un *pellet* de CEM (micromasa) se obtiene por centrifugación y se cultiva en presencia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). El *pellet* de células desarrolla una morfología rica en matriz, cuya tinción con azul de toluidina indica abundancia de glicosaminoglicanos. Las células también producen colágeno tipo II, el cual es característico del cartílago articular (Mackay et al., 1998).

Estudios posteriores han demostrado que las CEM también pueden diferenciarse, bajo las condiciones *in vitro* apropiadas, en tenocitos, miocitos esqueléticos, neuronas y células del mesodermo visceral (células endoteliales). Se ha reportado que la diferenciación en células similares a neuronas (*neuron-like cells*) expresan marcadores típicos de neuronas

maduras. Sin embargo, existe evidencia de que estas células diferenciadas carecen de los canales iónicos controlados por voltaje necesarios para generar potenciales de acción, por lo tanto, estas células no pueden ser actualmente clasificadas como neuronas verdaderas (Kohyama et al., 2001; Wakitani, Saito, & Caplan, 1995; Woodbury, Schwarz, Prockop, & Black, 2000).

### **1.1.3 Características inmunológicas de las CEM**

El fenotipo inmune de las CEM, descrito como MHC I<sup>+</sup>, MHC II<sup>-</sup>, CD40<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup> y CD86<sup>-</sup>, es definido como no inmunogénico, lo que sugiere que el trasplante a un receptor alogénico no requiere inmunosupresión. Aunque la presencia de moléculas MHC I podrían activar las células T, la ausencia de las moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 y CD86) no acoplaría una segunda señal, generando células T anérgicas. Existen diferentes reportes que demuestran que las CEM tienen propiedades inmunomoduladoras, en las que se incluyen modular la función y activación de las células T (Bartholomew et al., 2002; Di Nicola et al., 2002), afectar la función y maduración de las células dendríticas (X. X. Jiang et al., 2005) e inhibir de manera *in vitro* la proliferación, diferenciación y quimiotaxis de las células B (Corcione et al., 2006). Algunos reportes han demostrado que el contacto célula-célula se requiere para generar el efecto inmunomodulador, mientras otros reportes han mostrado que el efecto depende de factores solubles.

A pesar de la discrepancia en los mecanismos por los cuales las CEM ejercen su efecto inmunomodulador, hay evidencia que demuestra que las observaciones *in vitro* pueden trasladarse al escenario *in vivo*. Se ha reportado que la administración *in vivo* de CEM aisladas de babuinos prolonga de manera significativa la supervivencia de injertos de piel no compatible con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en babuinos inmunocompetentes (Bartholomew et al., 2002). Otros reportes muestran que las CEM aisladas de fuentes humanas al ser administradas *in vivo* mejoran el resultado del trasplante alogénico al promover el injerto hematopoyético (Lazarus et al., 2005) e impedir el desarrollo de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) (Le Blanc et al., 2004). En modelos animales de enfermedades autoinmunes existen reportes en los que la administración sistémica de las CEM generó un notable mejoramiento en los síntomas de la enfermedad (Zappia et al., 2005). Estos resultados de ensayos pre-clínicos, así como de ensayos clínicos en fases tempranas (I – I/II) han demostrado que las CEM pueden

tratar de manera eficiente enfermedades relacionadas con inflamación y autoinmunidad debido a las diversas propiedades de inmunomodulación de estas células. Sin embargo, otros estudios han mostrado que las CEM no ofrecen beneficio en algunos modelos animales de enfermedad inflamatoria (Djouad et al., 2005). Por lo tanto, se ha sugerido que las CEM no modificadas serían inadecuadas para el tratamiento de ciertas enfermedades inflamatorias.

## 1.2 Mecanismos de inmunomodulación

### 1.2.1 Estimulación del efecto inmunomodulador de las CEM

Durante la respuesta inmune las CEM se comunican con el microambiente inflamatorio, donde interactúan activamente con células del sistema inmune innato y adaptativo (Najar et al., 2016). Estas interacciones celulares son favorecidas por la expresión de un gran número de moléculas de superficie que incluyen miembros de la familia de integrinas y moléculas de adhesión (Majumdar et al., 2003). De manera paralela a estas interacciones las CEM también son sensibles a moléculas del microambiente inflamatorio, el cual determina el destino biológico de las células. En efecto, la propiedad de inmunomodulación de las CEM no es constitutiva sino inducida por las citoquinas inflamatorias secretadas principalmente por las células activas del sistema inmune (innato y adaptativo). Las citoquinas influyen críticamente en el efecto inmunomodulador de las CEM, esto dependiendo del tipo de citoquina y su concentración, confirmando que la inmunomoduladora de las CEM demuestra gran plasticidad (D. Wang et al., 2014).

Dependiendo del ambiente en el que las CEM son expuestas y su origen tisular, las células pueden adoptar un fenotipo anti-inflamatorio (inmunosupresor) o pro-inflamatorio (Waterman, Tomchuck, Henkle, & Betancourt, 2010). Las citoquinas pro-inflamatorias activan a las CEM vía el receptor *Toll-like 3* (TLR3) y las dirigen a un fenotipo inmunosupresor: supresión de proliferación y activación de células dendríticas (CDs), macrófagos, células B, células T, células *natural killer* (NK), células *natural killer T* (NKT) y neutrófilos. De esta manera, en un ambiente pro-inflamatorio las CEM responden secretando citoquinas anti-inflamatorias, como TGF- $\beta$ , IL-10, factor inhibitorio de leucemia (LIF), galectina-1, galectina-3 y semaforina-3A (Bright, Kerr, & Sriram, 1997; Kalinski, 2012; Lepelletier et al., 2010; Nasef et al., 2008). Todos estos factores suprimen la proliferación

de las células T y son sobre-regulados (*upregulated*) ante la estimulación de CEM con inductores inmunes tales como TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ) e IFN- $\gamma$  (interferón  $\gamma$ ) (Sivanathan, Gronthos, Rojas-Canales, Thierry, & Coates, 2014). Por otro lado, la activación del receptor *Toll-like 4* (TLR4) conduce a las CEM a un fenotipo pro-inflamatorio, en el cual las células secretan factores pro-inflamatorios, como IL-6 e IL-8, promoviendo la activación de células T y neutrófilos e intensificando la respuesta inmune (Yan et al., 2014). Estos hallazgos sugieren que las CEM requieren estimulación para manifestar sus propiedades de inmunomodulación. Los factores de estimulación más utilizados para la activación de las CEM son IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . A través de la compleja interacción entre estos factores pro-inflamatorios, se establece la producción y actividad de varias moléculas de inmunomodulación producidas por las CEM (Zachar, Bačenková, & Rosocha, 2016).

### **1.2.2 Efecto inmunomodulador en las poblaciones celulares del sistema inmune**

Los mecanismos implicados en las funciones de inmunomodulación de las CEM aún no están totalmente claros. Se ha reportado que los mecanismos involucran el contacto célula-célula, la secreción de factores solubles, la inducción de anergia, de apoptosis y de células inmunes regulatorias. En este sentido, las CEM se proponen como células moduladoras del sistema inmune. Un gran número de estudios se han enfocado en el papel que desempeñan los mediadores solubles en la inmunomodulación dependiente de las CEM. Se ha reportado que muchos factores y citoquinas toman parte en estos efectos, con resultados divergentes (Soleymanejadian, Pramanik, & Samadian, 2012). Adicionalmente, el perfil de expresión, así como el papel de estos mediadores de regulación, no es el mismo en diferentes especies (S. Ma et al., 2014). De manera paralela, poco se conoce sobre los componentes celulares que contribuyen con los efectos de inmunomodulación. Las CEM pueden impedir las respuestas inmunes mediadas por las células T, células B, células presentadoras de antígeno (APCs) y células NK. Al inducir cambios críticos en la inmunobiología (Duffy, Ritter, Ceredig, & Griffin, 2011; Franquesa, Hoogduijn, Bestard, & Grinyo, 2012; Ribeiro et al., 2013) de estas poblaciones celulares, se ha propuesto que las CEM pueden re-educar las células del sistema inmune para inducir la generación de tipos celulares de características inmune regulatorias (*Tregs*, *Bregs*, APCs y NKs regulatorias) con propiedades tolerogénicas (Hoogduijn, 2015). Para ello, las CEM utilizan múltiples vías de regulación en donde la IL-10 tiene un papel central. A

continuación, se presenta evidencia actual sobre los diversos tipos celulares inmunes que son modulados por las CEM y sus principales efectos.

*Células presentadoras de antígeno (APCs):* Los diferentes estudios han demostrado que las CEM modulan a las CDs en diferentes niveles. De manera general, las CEM alteran el fenotipo, la liberación de citoquinas, la diferenciación y la maduración de las CDs y comprometen su capacidad de presentación de antígeno (Spaggiari & Moretta, 2013). Como resultado, las CDs no son capaces de preparar (*prime*) eficientemente a las células T para una respuesta inmune robusta. Aún no se sabe si estas CDs moduladas son alteradas o son inducidas a tolerogenicidad *de novo*; su efecto sin embargo parece determinar la estimulación de células Tregs. Las CEM tienen la capacidad de inducir CDs regulatorias (CEM-CDs) con propiedades supresoras de células T. Estas CEM-CDs se caracterizan por su baja inmunogenicidad, incapacidad para estimular células T y capacidad para inducir Tregs (Zhao et al., 2012). La inducción de estas CEM-CDs involucra diferentes moléculas, como STAT3 (Gur-Wahnon, Borovsky, Beyth, Liebergall, & Rachmilewitz, 2007), Notch (Li et al., 2008), SOCS I (Y. Deng et al., 2014) y PGE2 derivada de las CEM. De manera importante, las CEM-CDs muestran secreción elevada de IL-10.

Los macrófagos en respuesta a las diferentes señales muestran plasticidad y adaptan su fisiología. Por lo tanto, diferentes poblaciones de macrófagos con diferentes funciones pueden encontrarse, incluyendo el subtipo pro-inflamatorio (M1, macrófagos activados clásicamente) y el subtipo regulador (M2, macrófagos activados alternativamente). Se ha reportado que la actividad de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO1) derivada de las CEM está involucrada en la generación de macrófagos anti-inflamatorios M2 (Francois, Romieu-Mourez, Li, & Galipeau, 2012). Estas células M2 derivadas de monocitos están directamente relacionadas con la inhibición de linfocitos T de manera independiente de IL-10, amplificando el efecto inmunosupresor de las CEM.

*Células T regulatorias (Tregs):* Las CEM son capaces de alterar la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos, y de generar células T con propiedades regulatorias (Duffy et al., 2011). Sin embargo, el papel de las *Tregs* en la inmunomodulación de las CEM es controversial. Algunos estudios sugieren que las CEM modulan la respuesta inmune indirectamente a través de la inducción de *Tregs*, mientras que otros estudios no sugieren un papel de este tipo celular (X. Jiang et al., 2014). Por lo tanto, de manera general se

estima que las CEM provocan la generación y/o expansión de subsets de células T que presentan diferentes fenotipos regulatorios. Se ha demostrado que las CEM inducen la generación de *Tregs* a partir de linfocitos CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, y que estas tienen efectos inmunoregulatorios que inhiben de manera significativa los linfocitos (Prevosto, Zancolli, Canevali, Zocchi, & Poggi, 2007). Diferentes moléculas durante el co-cultivo de las CEM y las células T han sido asociadas con la diferenciación y activación de *Tregs*, entre estas HLA-G5 (Selmani et al., 2008), PGE2, TGF- $\beta$  (English et al., 2009), IL-2, IDO-1, ILT-3, ILT-4 e IL-1 $\beta$ /CCL-1 (Burr, Dazzi, & Garden, 2013). Sin embargo, autores describen que ciertos factores solubles como IL-10, TGF- $\beta$  y PGE2 no parecen estar involucrados con la generación de *Tregs* ni en su función inmunoregulatoria (Prevosto et al., 2007).

Además de las clásicas *Tregs* CD4<sup>+</sup>, las *Tregs* CD8<sup>+</sup> emergen como un importante subset de células T inhibitorias. Estas *Tregs* tienen la capacidad de inhibir la respuesta de células T y suprimir autoinmunidad, así como, aloinmunidad (Y. M. Wang & Alexander, 2009). Liu *et al.*, propuso que las CEM derivadas de MO incrementan la frecuencia y la función supresora de las *Tregs* CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> modulando la expresión de IL-10 y FasL (Liu et al., 2015). Durante la generación de las CD8<sup>+</sup>-*Tregs*, la IL-10 se sobre-regula de manera paralela con otros factores, demostrando de nuevo una asociación entre la IL-10 y otros factores regulatorios que conducen finalmente a la modulación de las células T por parte de las CEM. Si bien, posteriores estudios no han demostrado que la IL-10 es estrictamente esencial para la expansión de *Tregs*, su expresión podría ser crítica para la inhibición de las células T a través de mecanismos moleculares complementarios (Gangi, Vasu, Cheatem, & Prabhakar, 2005; Spaggiari et al., 2008).

*Células B regulatorias (Bregs)*: Se ha reportado que la proliferación, diferenciación y producción de inmunoglobulinas de las células B están afectadas significativamente por las CEM, de manera dosis dependiente en ensayos *in vitro* (Corcione et al., 2006). La inhibición de las células B se atribuye a un arresto en las fases G0/G1 del ciclo celular, tal como ocurre con las células T. Las *Bregs* son un nuevo subset de células B con propiedades regulatorias, que contribuyen con el mantenimiento o la inducción de la tolerancia, suprimiendo y/o regulando la respuesta inmune (Mauri & Bosma, 2012). En modelos animales, la carencia o pérdida de las *Bregs* se ha relacionado con diferentes enfermedades autoinmunes (Bouaziz, Yanaba, & Tedder, 2008). Pocos estudios han abordado el impacto de las CEM en las *Bregs*. Guo *et al.*, reportó la primera observación

relativa a la modulación de las *Bregs* por las CEM en un modelo murino de esclerosis múltiple (Guo et al., 2013). El tratamiento con las CEM suprimió la severidad de la enfermedad al incrementar la frecuencia y actividad de las *Bregs* junto con el incremento en la secreción de IL-10. Park *et al.*, observó que las CEM mejoraron la autoinmunidad en un modelo murino de lupus eritematoso sistémico (LES) al inducir la expansión de las *Bregs* y la secreción de IL-10 (M. J. Park et al., 2015). En un estudio clínico prospectivo de enfermedad de injerto contra huésped crónica refractaria (cEICH), los pacientes infundidos con CEM tuvieron un mejoramiento clínico que fue asociado con un incremento en la supervivencia y proliferación de *Bregs*, así como un incremento en la producción de IL-10 (Peng et al., 2015). Dado que las *Bregs* son inhibidores importantes de la respuesta inmune y la inflamación, las CEM pueden ser consideradas como una estrategia terapéutica promisoriosa para enfrentar enfermedades autoinmunes mediadas por células B. Vadasz et al., propone que la potenciación de la función de las *Bregs* debería ser objetivo en el desarrollo de medicamentos inmunomoduladores, al contribuir a un mejor control de las enfermedades autoinmunes (Vadasz, Haj, Kessel, & Toubi, 2013). En este contexto, comparado con los medicamentos convencionales, la terapia celular basada en CEM podría ser más beneficiosa y eficiente por ser potentes inmunosupresoras con bajos niveles de toxicidad.

*Células Natural Killer (NKs)*: Las células NKs son células efectoras de linfocitos citotóxicos granulares y son uno de los principales componentes celulares de la inmunidad innata. Las células NKs juegan un papel importante tanto en la respuesta innata como adaptativa contra el aloinjerto al poder distinguir entre lo propio y lo no propio (Reinders & Hoogduijn, 2014). Las células NKs pueden regular la actividad de otras células inmunes, como células T y APCs. La mayoría de los datos con respecto a las interacciones entre las CEM y las NKs derivan de estudios *in vitro*, si bien a la fecha hay muy pocos estudios *in vivo* (Consentius, Reinke, & Volk, 2015). La interacción celular CEM:NKs es interesante en cuanto a la modulación de la función de las NKs, y el resultado de un trasplante. Diferentes autores han mostrado que las CEM son capaces de inhibir el potencial citotóxico, la proliferación y la producción de citoquinas de las células NKs activadas. Adicionalmente, las CEM alteran el fenotipo de las células NKs al disminuir la expresión de marcadores de activación, como NKp44, NKp30, NKG2D y CD132 (Spaggiari et al., 2008). Chatterjee et al., demostró que un subconjunto de células NK adquirió la expresión de CD73 después del cocultivo con CEM (Chatterjee et al., 2014). Estas nuevas células NK CD73<sup>+</sup> son capaces de

convertir adenosina-5'-monofosfato en adenosina, la cual es conocida por sus efectos inmunoregulatorios, y la modulación de la biología de las células NKs de manera autocrina y paracrina. Es así como este subtipo de NKs CD73<sup>+</sup> podrían representar un nuevo subset de células NKs regulatorias que son generadas después del co-cultivo con CEM.

Un mayor entendimiento del mecanismo de comunicación entre CEM:NKs persiste como principal objeto de investigación. Anteriormente, las células NKs fueron solo reconocidas como asesinas. Sin embargo, actualmente se piensa que ellas tienen funciones importantes en la modulación de la respuesta inmune adaptativa. Para asegurar el beneficio terapéutico, es importante la optimización de la inmunoterapia basada en CEM, lo que podría involucrar la reducción o reprogramación de la actividad de las células NKs. De este modo, re-educar las células NKs con las CEM con el objetivo de inducir fenotipos más regulatorios (como células NK CD73<sup>+</sup>) o tolerogénicos podría allanar el camino para nuevas aproximaciones inmunoterapéuticas. Este nuevo subset de células NKs regulatorias podría generar un ambiente tolerogénico para controlar la inflamación y mantener la homeostasis inmune (Fu, Tian, & Wei, 2014).

### **1.3 CEM de la gelatina de Wharton (CEM-GW)**

Por más de 40 años desde su descripción inicial, las CEM de MO representan la población de CEM adultas más extensamente estudiada y aún se consideran el estándar de oro en la aplicación clínica. No obstante, es ahora claro que la MO no representa la mejor fuente disponible de CEM, ni la más efectiva. Las CEM están presentes a muy baja frecuencia (aproximadamente 0,001-0,01% de las células mononucleares de la MO (Castro-Malaspina et al., 1980) en aspirados de MO y adicionalmente sus propiedades cualitativas y cuantitativas disminuyen con la edad del donante (Mueller & Glowacki, 2001). Su baja frecuencia implica que se requiere una extensa expansión *in vitro* de las células que permita obtener un número suficiente para aplicaciones terapéuticas. Esto trae consigo, un riesgo incrementado en la aparición de daños epigenéticos, así como contaminaciones bacterianas y virales. En un intento por superar estos obstáculos, se han identificado fuentes alternas, más abundantes, y alcanzables de CEM para uso terapéutico. A este respecto el CU el cual es considerado un desecho médico y es obtenido en un procedimiento no invasivo, simple y seguro ha llamado la atención durante los últimos años como fuente promisoría para aislar CEM (Batsali, Kastrinaki, Papadaki, & Pontikoglou,

2013). Las CEM de CU no forman teratomas luego del trasplante (Troyer & Weiss, 2008) y su investigación no implica problemas legales o éticos. Estas características las hacen atractivas para su propagación e ingeniería para terapias basadas en células. Las CEM han sido encontradas tanto en la sangre del cordón umbilical (SCU), como en sus tejidos. Sin embargo, la escases de CEM en la SCU y la carencia de una técnica robusta y reproducible para recolección y expansión ha obstaculizado su uso en aplicaciones clínicas (Perdikogianni, Dimitriou, Stiakaki, Martimianaki, & Kalmanti, 2008). Por otro lado, los protocolos existentes de aislamiento han generado grandes cantidades de CEM de tejidos del CU.

El CU contiene dos arterias y una vena dentro de un tejido conectivo gelatinoso o mucoso, conocido como gelatina de Wharton (GW), encerrada por el epitelio amniótico. La gelatina de Wharton está compuesta principalmente por proteoglicanos y varios tipos de colágeno, formando un tejido esponjoso, dentro del cual las CEM están embebidas (Nanaev, Kohnen, Milovanov, Domogatsky, & Kaufmann, 1997). Las CEM de la GW (CEM-GW) poseen propiedades similares a sus contrapartes en la MO adulta, y conservan propiedades de células madre primitivas, como la expresión de marcadores de célula madre embrionarias (CME) (Fong, Richards, Manasi, Biswas, & Bongso, 2007). Las CEM derivadas de la GW mantienen su capacidad de autorrenovación *in vitro* por largos periodos de tiempo, tienen tiempos cortos de doblaje y una amplia pluripotencia, en comparación con las CEM-MO (Troyer & Weiss, 2008). Por otro lado, son fácilmente aisladas desde un tejido el cual es rutinariamente desechado, en ausencia de riesgo para el donante. Dadas las ventajas de las CEM-GW sobre las CEM adultas, existe un gran interés en el estudio de este tipo celular y su contribución al campo de la biología de las células madre (Batsali et al., 2013).

El primer reporte que proporcionó evidencia sobre la caracterización de las células estromales aisladas del CU fue publicado en el 2004. En este estudio, las células extraídas de la GW mostraron un fenotipo fibroblastoide durante su expansión *in vitro* y diferenciación a osteoblastos, condrocitos y adipocitos bajo estimulación (H. S. Wang et al., 2004). Adicionalmente, mostraron alta expresión de CD29, CD44, CD51, CD73 y CD105, y carecieron de la expresión de los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45. Estudios posteriores, han proporcionado información adicional del fenotipo de las CEM-CU, demostrando la expresión de varias moléculas de membrana que están asociadas con la identidad de las CEM incluyendo, CD90, CD146, CD166 y gangliosina 2 (GC2) (Weiss et

al., 2006; J. Xu et al., 2009). La morfología, inmunofenotipo y diferenciación cumplen con los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, en inglés), para CEM. Debido a que no existe un marcador específico para definir las CEM-CU, la expresión mencionada de marcadores de superficie, junto con la demostración del potencial de diferenciación multilínea *in vitro* son necesarias para identificar CEM en tejidos derivados del CU.

### **1.3.1 Potencial de diferenciación multilínea *in vitro* de las CEM-GW**

Existe evidencia que sugiere que las CEM-CU se pueden inducir para diferenciación en linajes mesodermales y no-mesodermales. Diferentes grupos han establecido que las CEM-CU pueden generar osteoblastos, adipocitos y condrocitos en condiciones *in vitro* (M. Y. Chen, Lie, Li, & Wei, 2009; Karahuseyinoglu et al., 2007; H. S. Wang et al., 2004). Sin embargo, la acumulación de lípidos toma más tiempo en las CEM-GW y los adipocitos son menos maduros que los derivados de las CEM-MO (Hsieh, Fu, Chang, Tsuang, & Wang, 2010; Karahuseyinoglu et al., 2007). Adicionalmente, las CEM-GW han mostrado poseer un potencial osteogénico y condrogénico más débil comparado con las CEM-MO (L. Wang, Tran, Seshareddy, Weiss, & Detamore, 2009). También se ha reportado que las CEM-CU pueden diferenciarse en células endoteliales (M. Y. Chen et al., 2009), y de hecho, demuestran un potencial de diferenciación endotelial más alto que las CEM-MO. Las CEM-GW no diferenciadas muestran alta expresión de genes endoteliales incluyendo FLT1, GATA4, GATA6, ISL1, LAMA1, SOX17 y SERPINA1 (Nekanti et al., 2010).

Adicionalmente, se ha sugerido que las CEM-CU pueden generar células del músculo esquelético cuando se cultivan en el medio apropiado, no obstante, esta diferenciación es aún controversial. Por ejemplo, se ha demostrado que las CEM-CU podían ser inducidas para formar células con morfología de cardiomiocito y mostraron expresión de marcadores cardiacos (Y. M. Wang & Alexander, 2009). Sin embargo, en otro estudio no se logró la detección de marcadores de expresión de cardiomiocitos después de la inducción *in vitro* de las CEM aisladas de la GW. De esta manera, la evidencia es escasa para cardiomiocitos derivados de CEM (Martin-Rendon et al., 2008) y su función contráctil está ampliamente debatida.

Otros estudios han mostrado que las CEM-GW podrían adquirir propiedades morfológicas y bioquímicas de células neuronales (Karahuseyinoglu et al., 2007; L. Ma et al., 2005; Mitchell et al., 2003). Mitchell et al., fueron los primeros en observar diferenciación neurogénica siguiendo un complejo proceso de inducción. La diferenciación fue evaluada a partir de cambios morfológicos y expresión de moléculas específicas. Las CEM-CU mostraron alta expresión de genes asociados a neuronas en estado no diferenciado. Sin embargo, aún no hay evidencia definitiva de la actividad electrofisiológica de las neuronas derivadas de CEM-CU (Mitchell et al., 2003).

Recientes estudios, sugieren que las CEM-CU pueden también diferenciarse en linajes endodermales (Anzalone et al., 2010). Campard et al., reportaron que las células no diferenciadas expresan marcadores de linaje hepático. Luego de la inducción *in vitro*, las células mostraron morfología como hepatocitos y sobre-regularon la expresión de ciertos marcadores, pero carecieron de las propiedades funcionales necesarias para la maduración de células hepáticas (Campard, Lysy, Najimi, & Sokal, 2008). Otros grupos han mostrado que las CEM-CU pueden ser inducidas para formar células como islotes, capaces de expresar genes pancreáticos asociados y liberar insulina en respuesta a los niveles de glucosa (Chao, Chao, Fu, & Liu, 2008; Wu, Wang, Liu, & Wei, 2009).

### **1.3.2 Propiedades inmunomodulatorias de las CEM-GW**

Además del potencial multilinaje, las CEM-CU poseen varias propiedades inmunoregulatorias. Se ha encontrado que las CEM-CU tienen baja expresión de moléculas del complejo HLA clase I, carecen de la expresión de HLA-DR y muestran concentraciones intracelulares altas de la molécula inmunosupresora HLA-G (Deuse et al., 2011), así como un aumento en la producción de IDO. Estos hallazgos junto con el hecho de que las CEM-GW no expresan moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86, ni provocan respuesta proliferativa de células T alogénicas *in vitro* (Weiss et al., 2008), sugieren que las CEM-GW se caracterizan por una inherente baja inmunogenicidad.

Varios estudios han demostrado el potencial inmunosupresor de las CEM-CU en linfocitos T (Deuse et al., 2011; Najar et al., 2010; Zhou et al., 2011). Se ha reportado que las CEM-GW actúan sobre subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y son capaces de inhibir la proliferación de las células T independientemente del estímulo usado para activar dichas

células. La inmunosupresión de las CEM-GW fue mediada por las enzimas ciclooxigenasa 1 (COX1) y COX2, regulando la síntesis de PGE2, y por la producción de PGE2 *per se* (Najar et al., 2010). Un estudio posterior mostró que mientras las CEM-CU intrínsecamente secretan bajos niveles de PGE2, su producción es sobrerregulada cuando las células son co-cultivadas en presencia de células mononucleares de sangre periférica humana (hPBMCs) activas. Los autores atribuyen el aumento en la expresión de COX-2 y en la producción de PGE2, por parte de las CEM; y a las citoquinas inflamatorias (IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ ) producidas por las hPBMCs (K. Chen et al., 2010).

De manera interesante, varios estudios han reportado que las características inmunes de las CEM-CU pueden ser modificadas luego de la exposición a citoquinas inflamatorias y/o células T/hPBMCs activadas. Deuse et al., reportaron que el IFN- $\gamma$  a dosis por debajo de 50ng/ml sobrerregula la expresión de HLA-I/HLA-DR incrementando la inmunogenicidad de las CEM-CU. Además, el IFN- $\gamma$  indujo tolerogenicidad induciendo la expresión de HLA-G intracelular, HLA-E superficial, liberación de TGF- $\beta$  e IL-10, y estimulando la producción deIDO (Deuse et al., 2011). Por su parte, altas dosis del IFN- $\gamma$  incrementaron el fenotipo inmunosupresor a partir de la reducción de la expresión de HLA-DR e incremento deIDO. Los efectos inmunomodulatorios no son sólo en linfocitos T sino también en linfocitos B. El impacto de las CEM-CU en las células B ha sido poco investigado. Un estudio reportó que las CEM-CU inhiben la proliferación de células B, diferenciación y producción de anticuerpos *in vitro*. El efecto es mediado en parte por factores solubles, que pueden sobrerregular Blimp-1 y PAX-5, dos moléculas inductoras de la diferenciación de células B (Che et al., 2012).

## 1.4 Terapia celular basada en CEM

Las CEM han demostrado un gran potencial para el tratamiento de distintas enfermedades, incluyendo desordenes inmunológicos y no inmunológicos. Los datos hasta ahora disponibles han revelado diferentes modelos de trabajo que promueven los efectos benéficos de las CEM (Wei et al., 2013). El potencial terapéutico de estas células se deriva de varias propiedades, incluyendo su capacidad para: diferenciarse en varios linajes celulares, secretar factores solubles de supervivencia y proliferación, modular la respuesta inmune y migrar al sitio de daño (Squillaro, Peluso, & Galderisi, 2016). El mecanismo de migración de las CEM reside en su capacidad para alcanzar el tejido dañado en respuesta

a una combinación correcta de moléculas de señalización del tejido lesionado y los receptores correspondientes en las CEM. Los estudios en humanos y modelos animales demuestran que las CEM migran específicamente a los sitios de tejidos lesionados en presencia de inflamación (Forte et al., 2008; Horwitz et al., 2002; Mahmood, Lu, Lu, & Chopp, 2003). Los mecanismos involucran quimioquinas, moléculas de adhesión y metaloproteinasas de matriz (MMPs) (D. Wang et al., 2013).

Con relación al potencial de diferenciación, las CEM pueden diferenciarse en varios tejidos mesenquimales. Como se mencionó anteriormente, debido a su alta capacidad de diferenciación a fenotipos del linaje mesodérmico (L. B. Chen, Jiang, & Yang, 2004), este potencial ha contribuido a incrementar el interés en estas células y promover nuevas perspectivas clínicas en campos como la ingeniería de tejidos y la terapia celular. La infusión de las CEM podría beneficiar la reparación de órganos y tejidos dada la capacidad de las células para diferenciarse en las células del tejido blanco y reemplazar las células residentes dañadas. La evidencia *in vivo* sugiere que los beneficios de las CEM en el tratamiento de enfermedades no se limitan a su potencial de diferenciación, este aspecto es sólo una parte de los mecanismos que subyacen su efecto terapéutico (Squillaro et al., 2016).

Otro de los beneficios de las CEM es atribuido a su capacidad de secretar una amplia variedad de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento. Diferentes hallazgos sugieren que el principal papel de las CEM al interactuar con el microambiente involucra la liberación de diversos factores biológicos activos que ejercen efectos en la dinámica celular local (Galderisi & Giordano, 2014). Se ha demostrado también que estos factores pueden evitar que células vecinas sufran apoptosis y estimulan su proliferación, de este modo promoviendo la regeneración del tejido dañado (J. Wang, Liao, & Tan, 2011). Estudios *in vitro* e *in vivo* han reportado que las CEM interactúan con un amplio rango de células del sistema inmune, haciéndolas candidatas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y la EICH (Popp et al., 2008). Las CEM podrían convertirse en el *gold standard* para el tratamiento de cualquier tejido u órgano dañado asociado con una actividad inflamatoria intensa (por ejemplo, artritis reumatoide) (Squillaro et al., 2016).

De acuerdo con la base de datos oficial del Instituto Nacional de Salud de EU (NIH), 1327 ensayos clínicos basados en CEM habían sido reportados para marzo de 2023. La mayoría

fueron realizados para evaluar el potencial terapéutico y el perfil de seguridad de productos medicinales basados en CEM en el tratamiento de enfermedades hematológicas, la EICH, diabetes, enfermedades inflamatorias y enfermedades en el hígado, riñones y pulmones, así como enfermedades cardiovasculares, de hueso y cartílago, neurológicas y autoinmunes. Nuestro grupo realizó una revisión sistemática de literatura en distintas bases de datos (NIH, NCBI y PubMed), con énfasis en las siguientes enfermedades autoinmunes: lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR) y esclerosis sistémica (SSc) (Quintana & Buitrago 2023, sometido). Para marzo de 2023, se encuentran reportados 18 ensayos clínicos para LES, 17 para AR y 9 para SSc. Menos del 36% de estos ensayos han publicado resultados, y la mayoría están aún en curso o se han completado sin ninguna publicación.

En relación con el LES, a la fecha se registran 18 ensayos registrados que usan las CEM para el tratamiento del LES, con seis en la fase 1 (33%), cinco en la fase combinada 1/2 (28%) y siete en la Fase 2 (39%). Las fuentes de CEM utilizadas en estos ensayos fueron CU (n = 10, 55%), MO (n = 3, 17%) y mucosa (n = 1, 5%). Estas fuentes fueron alogénicas (n = 13, 73%) y autólogas (n = 1, 5%). La vía principal de administración fue intravenosa (n = 14, 78%). Hay 4 (22%) ensayos clínicos publicados de 18 registrados. De manera general, las CEM de MO o CU han sido seguras a pesar de un estudio en el que se registraron cuatro eventos adversos graves. Del mismo modo, las CEM han inducido una respuesta clínica satisfactoria en pacientes con LES, porque los índices serológicos y renales mejoraron y disminuyeron la actividad de la enfermedad. En contraste, en el estudio de Deng et al., no se reprodujo el efecto dramático previamente reportado del tratamiento con CEM. Sin embargo, los autores propusieron que esto no significa que las CEM-CU no tengan ningún efecto inmunosupresor. En esta perspectiva, la eficacia del tratamiento con CEM debe ser respaldada por otros ensayos clínicos de fase 2 más robustos. En curso hay un ensayo clínico multicéntrico y aleatorizado de fase 2 (D. Deng, Zhang, Guo, & Lim, 2017; Liang et al., 2010; D. Wang et al., 2014; D. Wang et al., 2013).

Claramente, todos los ensayos clínicos informados expusieron que las fuentes alogénicas a diferencia de las autólogas representan un tratamiento más efectivo en pacientes con LES. Algunos autores han informado que una fuente autóloga podría tener una aplicación clínica limitada debido a su función anormal. Algunas limitaciones en los ensayos clínicos

publicados fueron: muestra de tamaño pequeño y falta de uniformidad en las condiciones de los pacientes en el ensayo multicéntrico.

Para la AR actualmente, hay 17 ensayos registrados que usan CEM para la AR con seis en fase 1 (35,2%), siete en fase 1/2 (41,1%), dos en fase 2 (11,8%) y uno en fase combinada 2/3. Más del 50% de los ensayos usaron CU (47%) como fuente de CEM, mientras que otros usaron MO (12%) y TA (17%). Estas fuentes fueron autólogas (n = 4, 23,5%) y alogénicas (n = 9, 53%), infundidas IV (n = 14, 82,3%) o IT (n = 2, 11,8%). Al igual que en la enfermedad autoinmune anterior, se han publicado algunos ensayos (n = 4). En los hallazgos publicados se puede ver que la terapia con CEM (CEMT) para pacientes con AR fue segura, bien tolerada y no hubo una relación aparente entre la dosis y la toxicidad. Las investigaciones que han utilizado una fuente alogénica convergen en torno a sus beneficios clínicos en lugar de una fuente autóloga, porque estas no podían mantener el potencial clonogénico y proliferativo como las CEM normales (Kastrinaki et al., 2008). En general, los pacientes tratados con CEM mostraron superioridad en los resultados clínicos en comparación con el grupo placebo. A pesar de esto, los resultados no han sido significativos debido a algunas limitaciones en los estudios informados: el pequeño número de pacientes reclutados y su tratamiento desde un solo centro. Por lo tanto, se requieren estudios multicéntricos más grandes para aclarar la efectividad del tratamiento con CEM para pacientes con AR. A la luz de los posibles mecanismos, el efecto antiinflamatorio parece ser uno de los principales mecanismos de las CEM, dado que algunas de las citoquinas proinflamatorias que se encuentran en las articulaciones de los pacientes con AR (Brennan & McInnes, 2008) mostraron reducción después del tratamiento con CEM. En resumen, las CEM pueden ofrecer una opción adicional a muchos pacientes con AR (Alvaro-Gracia et al., 2017; Brennan & McInnes, 2008; Kastrinaki et al., 2008; L. Wang et al., 2013).

Para esclerosis sistémica, hasta ahora existen 9 ensayos clínicos registrados que utilizan CEM. La mayoría de ellos son fase 1/2 combinada (n = 4, 44,4%). El CU y TA se han utilizado como fuentes de CEM (22,2%, 33,3%, respectivamente). Estas fuentes fueron alogénicas (n = 6, 66,6%) y autólogas (n = 3, 33,3%), infusión IV (n = 5, 55,5%), subcutánea (n = 3, 33%) e intramuscular (n = 1, 11%). Solo se ha publicado un estudio (H. Zhang, Liang, et al., 2017). Los autores no observaron eventos adversos graves, mientras que observó una disminución significativa de algunos marcadores de inflamación que les

permitió proponer algunos mecanismos relacionados con la enfermedad, tales como: angiogénesis temprana, producción de colágeno que conduce a fibrosis y reducción de la activación de las células B. De esta manera, esta terapia ofrece un posible beneficio clínico para los pacientes con SSc. La limitación de este estudio fue el pequeño tamaño de la muestra.

Es importante resaltar que muchos de los ensayos clínicos se encontraron en fases tempranas (1, 1/2 o 2), demostrando que la efectividad terapéutica de las CEM requiere aún ser investigada. Adicionalmente, la seguridad a largo plazo de las terapias basadas en CEM continua por establecerse y plantea una limitación persistente para el uso definitivo de las CEM en la práctica clínica.

## **1.5 Vesículas extracelulares derivadas de las CEM (CEM-VEs)**

Una hipótesis interesante relacionada con el potente efecto inmunosupresor de las CEM está relacionada con el hecho de que su secretoma *per se* puede inducir respuestas anti-inflamatorias y que los sobrenadantes generados del cultivo poseen un efecto inmunomodulador relevante (Miranda Rodríguez, Galván Cabrera, & de León Delgado, 2015). Esto ha llevado a postular que los efectos inmunomodulatorios y regenerativos de las CEM pueden estar mediados por mecanismos paracrinicos derivados de factores solubles (Fierabracci, Del Fattore, Luciano, Muraca, & Teti, 2015). Mientras que algunos autores consideran que el contacto célula-célula es importante en el proceso, otros han registrado que los efectos inmunomodulatorios de las CEM son resultado de factores solubles (Nasef et al., 2007) tales como el factor de crecimiento TGF- $\beta$ 1, el factor de crecimiento hepático (HGF), PGE2 e IL-10, moléculas que suprimen la respuesta mediada por las células T (Fierabracci et al., 2015). En este contexto, la actividad paracrina celular está íntimamente ligada con la producción activa de vesículas extracelulares (VEs), las cuales han adquirido recientemente un gran interés debido a su papel en la señalización extracelular.

Las VEs son una población heterogénea de estructuras esféricas y pequeñas compuestas de una membrana bi-lipídica, y que contienen un amplio rango de moléculas biológicas (cargos), entre ellas proteínas, lípidos, metabolitos y una gran diversidad de ARN y ADN.

Estas cargas biológicas se encuentran dentro o son expresadas en la superficie de las VEs. La comprensión actual de la función de las VEs incluye el transporte de esas señales biológicas de una manera protegida, lo que permite que la carga sea transportada de manera segura hacia blancos a larga distancia. Las VEs han sido clasificadas dependiendo de su tamaño y vía de biogénesis. La clasificación de las VEs de acuerdo con el tamaño ha sido inconsistente y algo confusa, ya que las diferentes poblaciones de VEs se sobrelapan en tamaño. Desde entonces, las VEs han sido clasificadas de acuerdo con los mecanismos de biogénesis como microvesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos (Kalra et al., 2012). Las microvesículas (MVs; 50nm – 1000nm en diámetro) son vesículas más grandes, en tamaño, que los exosomas (Exos; 30nm – 120nm). Las MVs y Exos tienen diferentes vías de biogénesis, pero ambas involucran procesos de tráfico de membranas. Los Exos se forman como vesículas intraluminales en los compartimentos endosómicos llamados cuerpos multivesiculares (CMVs). Cuando los CMVs maduran, liberan los exosomas a través de la vía exocítica mediante la fusión con la membrana plasmática (Tofino-Vian, Guillen, & Alcaraz, 2018). Las MVs se generan por protuberancias de la membrana plasmática seguidas por la fisión y separación de las membranas (Kalra et al., 2012). Finalmente, los cuerpos apoptóticos son las VEs más grandes, con un diámetro de 1000nm a 5000nm, y son liberados durante la apoptosis celular (Akers, Gonda, Kim, Carter, & Chen, 2013; Gyorgy et al., 2012). En la base de datos de Exos (ExoCarta) se han descrito más de 4000 proteínas diferentes y 2400 ARNs (Mathivanan & Simpson, 2009).

La caracterización de las VEs incluye normalmente técnicas como *western blotting* y citometría de flujo para detectar ciertas proteínas marcadores en las VEs (Gyorgy et al., 2012). Los marcadores específicos incluyen las tetraspaninas CD63, CD9 y CD81, y los marcadores endosomales sintetinina-1, proteína X de interacción con ALG-2 (Alix) y, para los Exos la proteína del gen de susceptibilidad de tumor (TSG101). Las MVs pueden incluir componentes del citoesqueleto, enzimas, moléculas de membrana, proteínas involucradas en la biogénesis y el tráfico vesicular. Un set de componentes específicos celulares está también presente, por ejemplo, las VEs derivadas de las CEM expresan en su superficie los marcadores propios de CEM como CD29, CD73, CD44 y CD105, así como las moléculas de adhesión y los receptores de los factores de crecimiento. Dentro de las VEs, pueden encontrarse un rango amplio de moléculas activas como citoquinas, enzimas,

receptores nucleares, miRNAs y otros ARNs (Bobrie, Colombo, Raposo, & Thery, 2011; Gyorgy et al., 2012; Kowal et al., 2016; Simons & Raposo, 2009).

De manera interesante se ha descrito que posiblemente las VEs contienen moléculas de las células de origen y, por lo tanto, el subconjunto de proteínas, mRNA, miRNA y lípidos específicos del tipo celular se pueden identificar y usar con fines terapéuticos. Se ha descrito que las condiciones de estrés o la activación de la señalización intracelular por mediadores como las citoquinas, cambian la composición de las VEs y por lo tanto, la respuesta de las células receptoras (Eldh et al., 2010). La actividad de inmunomodulación de las VEs derivadas de las CEM ha sido poco evaluada. Un estudio observó que las MVs aisladas de las CEM inhibieron la proliferación de linfocitos T e indujeron apoptosis en células T activadas (Budoni et al., 2013). Por otro lado, se ha descrito que los Exos secretados por las CEM cargan FasL, lo cual estaría asociado con la inducción de la apoptosis de las células T (Clayton, Mitchell, Court, Mason, & Tabi, 2007).

En cultivo, las CEM secretan miRNAs lo cual en principio puede estar asociado con la producción de Exos y MVs. Los miRNAs son producidos y secretados de forma no sólo constitutiva, sino también en respuesta a estímulos. Así que, un pre-acondicionamiento de las células por estímulos químicos, físicos e incluso inflamatorios podría inducir la generación y secreción de moléculas reguladoras, que asociadas con las VEs podrían funcionar como potenciales agentes terapéuticos (Madrigal, Rao, & Riordan, 2014). De este modo profundizar en el conocimiento de la biosíntesis y fisiología de las VEs generadas desde las CEM y, su potencial efecto es de gran interés para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en CEM y sus derivados.

### **1.5.1 Vesículas extracelulares en la reparación y regeneración de tejidos**

Esfuerzos de investigación recientes se han centrado en aprovechar a las VEs como una poderosa herramienta terapéutica en la reparación y regeneración de tejidos. Las VEs transportan mensajes biológicos de las células madre que interactúan con las células receptoras e influyen en su destino en la reparación de tejidos. La evidencia muestra que las VEs derivadas de células madre mejoran las enfermedades cardiovasculares, protegen contra el daño renal, recuperan lesiones pulmonares y hepáticas y protegen contra el daño nervioso, lo cual es debido en gran parte a sus efectos anti-inflamatorios, anti-apoptóticos

y capacidad pro-angiogénica (Nawaz et al., 2016). Por lo tanto, es de esperar que las VEs derivadas de las CEM sean esenciales en la angiogénesis durante la regeneración de tejidos. La angiogénesis es un paso vital para la reparación de tejidos debido a que los vasos proveen a las células con nutrientes y oxígeno, en el sitio de herida (Eming, Brachvogel, Odoriso, & Koch, 2007). Se considera que la angiogénesis inadecuada contribuye muy probablemente a una incorrecta cicatrización de la herida en los tejidos epiteliales-mesenquimales, como la piel, el intestino, los pulmones y el hígado (Eming, Martin, & Tomic-Canic, 2014). Por lo tanto, una angiogénesis efectiva y normal es esencial para la regeneración y reparación de tejidos.

Las VEs derivadas de las CEM han abierto una nueva vía para el tratamiento de lesiones tisulares en enfermedades cardiovasculares, daño por radiación de las células hematopoyéticas de la médula ósea (Wen et al., 2016), reparación de fracturas (Furuta et al., 2016) y neurodegeneración (de Godoy et al., 2018). A pesar de estas ventajas, uno de los mayores obstáculos para la aplicación clínica basada en VEs derivadas de las CEM es la producción ineficiente a gran escala y su purificación. Las CEM cultivadas de manera *in vitro*, especialmente estas derivadas de tejidos adultos tienen una capacidad de proliferación limitada incluso bajo condiciones enriquecidas de cultivo, es decir, en medios suplementados con suero fetal bovino (SFB) o lisados de plaquetas humanas (hLP). Además, el SFB y el hLP también contienen abundantes VEs. Actualmente, los estudios están evaluando los rendimientos, las funciones y la capacidad de producción de VEs de las CEM que se expanden con diversos medios definidos y otras condiciones de cultivo (Bobis-Wozowicz et al., 2017; Bobis-Wozowicz et al., 2015).

Existe una gran necesidad de desarrollar aproximaciones para mejorar los rendimientos de producción de las VEs sin afectar su funcionalidad y, en última instancia, mejorar su eficiencia también. Se ha descrito que mejorar las condiciones del cultivo de las CEM influye significativamente no sólo en el rendimiento de la producción sino también en la eficiencia de las VEs derivadas de estas células, considerando la complejidad proteómica y genómica de estos (Cha et al., 2018; Luan et al., 2017; Willis, Kourembanas, & Mitsialis, 2017). Sin embargo, las condiciones de cultivo por sí solas pueden no ser suficientes para abordar las limitaciones adicionales en la eficiencia de las vesículas extracelulares derivadas de las CEM.

## 1.6 Terapia génica basada en CEM

Debido a sus notables propiedades de autorrenovación, multipotencia, inmunosupresión y orientación al sitio de daño, las CEM son candidatas atractivas para la terapia basada en células. Estas células pueden regenerar tejidos dañados, ser vehículos para entregar genes o agentes terapéuticos y ejercer efectos paracrinós, que conducen al reclutamiento de las células efectoras necesarias para la terapia regenerativa y el tratamiento de la enfermedad. De manera reciente, los investigadores han tratado de mejorar aún más las propiedades terapéuticas de las CEM. A través de diferentes enfoques, las CEM pueden ser modificadas para expresar genes exógenos, incorporar moléculas terapéuticas o presentar modificaciones dirigidas para mejorar su supervivencia, direccionamiento y eficacia terapéutica. Estas estrategias pueden llegar a ofrecer dosis terapéuticas de las CEM y agentes activos en el sitio objetivo, evitando la necesidad de administración sistémica repetitiva. Muchos estudios han investigado el uso de las CEM en terapia génica, incluyendo el implante de CEM transfectadas con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) para el mejoramiento de la función cardíaca (Matsumoto et al., 2005; J. Yang et al., 2007), CEM como vehículos de entrega de IFN- $\beta$  en tumores de ratón (Studený et al., 2002) y terapia génica con CEM expresando proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) para promover la formación de hueso (Tang et al., 2005; X. S. Zhang et al., 2004).

Aunque las terapias basadas en CEM han mostrado ser seguras, la eficacia es baja en muchos casos cuando las CEM se aplican en su estado nativo. La aplicación clínica de las CEM está frecuentemente limitada dado la limitada viabilidad *in vivo* de las células, así como su retención e implante y función regenerativa final. Por lo tanto, los investigadores han utilizado la ingeniería genética o la modificación de la superficie celular para incrementar la eficacia terapéutica de las CEM minimizando cualquier pérdida de su función. Las CEM se modifican genéticamente para secretar factores que las protejan de apoptosis, incrementen su supervivencia en condiciones de hipoxia, e incrementen otras propiedades innatas, como migración, diferenciación e inmunomodulación. La modificación genética de las CEM se realiza generalmente utilizando vectores virales, aunque también se usan vectores no virales (J. S. Park, Suryaprakash, Lao, & Leong, 2015).

*Transducción viral:* Las CEM son susceptibles a la modificación con vectores virales. Los protocolos estándar conducen a un 90% de células transducidas sin efecto en la

diferenciación (Nolta, Hanley, & Kohn, 1994). Los vectores más comunes incluyen: retrovirus (RTs), lentivirus (LVs), baculovirus y virus adeno-asociados (AAVs). Los RTs y LVs generan la integración del transgén en el genoma del huésped. Mientras esto genera una expresión estable, podría también incrementar el riesgo de mutagénesis y activación de oncogenes, especialmente en vectores basados en gamaretrovirus (Hacein-Bey-Abina et al., 2008). Los AAVs son uno de los vectores más usados en terapia génica en la actualidad ya que no es patogénico para los humanos, aunque si bien generan una expresión génica a largo plazo (Nayak & Herzog, 2010), la expresión no es constitutiva. Otras alternativas de transferencia génica que evitan el potencial riesgo de activación de oncogenes hacen uso de la integración sitio-dirigida utilizando tecnologías como TALENS o CRISPR.

*Transfección no viral:* Aunque la transducción viral es altamente efectiva, su traducción a la clínica ha sido obstaculizada por altos costos de producción y reacciones inmunes adversas. Algunos vectores tienen limitación en la capacidad de empaquetamiento del ADN exógeno. Por lo tanto, las aproximaciones no virales, son capaces de escalarse, tienen baja estimulación inmune y son versátiles, ofrecen amplia gama de opciones de diseño. El uso de la entrega de genes no virales también es favorable para la medicina regenerativa, que requiere solo una expresión transitoria. Los métodos actuales utilizados para transfectar CEM se pueden dividir en métodos físicos y métodos químicos. Los métodos físicos incluyen electroporación y nucleofección. Los métodos químicos incluyen el uso de agentes lipídicos, portadores poliméricos, dendrímeros y nanopartículas inorgánicas (J. S. Park et al., 2015).

Para su traslación al ámbito clínico, se deben establecer protocolos óptimos de manipulación y preservación *ex vivo* para el perfil de calidad y seguridad de las CEM. El uso de las CEM para medicina personalizada y reparación de tejidos ha sido prometedor y la posibilidad de modificación genética amplía aún más esa frontera. A medida que se descubren propiedades nuevas e inesperadas de las CEM, como ha sido el caso en la última década, es probable que la combinación de terapia génica y celular basada en CEM se vuelva aún más prominente. Las estrategias de ingeniería que existen hasta ahora para modificar las CEM mejorarán aún más su funcionalidad y potencia. De ninguna manera es una tarea fácil superar los obstáculos científicos para la modificación de las CEM, pero es un desafío científico dada su potencial y prometedora aplicación terapéutica.

## 1.7 Factor de crecimiento fibroblástico básico – FGFb o FGF2

La proteína FGF2, también conocida como factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb) o FGF $\beta$ , es un factor de crecimiento y proteína de señalización codificada por el gen FGF2. Se sintetiza principalmente como un polipéptido de 155 aminoácidos (aá), que genera una proteína de 18KDa. El transcrito (mRNA) de este gen tiene 3 exones, contiene múltiples sitios de poliadenilación y es traducido alternativamente desde el codón de inicio AUG y no-AUG (CUG), resultando en cinco isoformas diferentes con distintas propiedades. Las isoformas que inician con el codón CUG están localizadas en el núcleo y son responsables por el efecto intracrino de la proteína, mientras que la isoforma que inicia con el codón ATG es citosólica y es responsable por el efecto paracrino y autocrino de la proteína FGFb. En el transcrito (mRNA) hay cuatro codones de inicio alternos los cuales proporcionan extensiones en la región N-terminal de 41, 46, 55 o 133 aminoácidos, generando proteínas de 22KDa (196 aá), 22,5KDa (201 aá), 24KDa (210 aá) y 34KDa (288 aá), respectivamente.

FGFb es una proteína de hoja  $\beta$  que contiene dos sitios de unión a receptores, ubicados en los residuos 13–30 y 106–129 (Baird, Schubert, Ling, & Guillemin, 1988). Estos residuos se unen a los receptores del FGF (FGFR) en la superficie celular (Powers, McLeskey, & Wellstein, 2000). La familia de receptores FGFR consta de cuatro subtipos: FGFR1, FGFR2, FGFR3, y FGFR4. La capacidad de unión de FGFb a sus receptores puede conducir a un respuesta celular diferente (Powers et al., 2000). Los niveles de expresión y tipos de receptores son factores cruciales que regulan la señalización de FGFb. Los niveles de expresión de FGFR se alteran durante la proliferación o la diferenciación celular. Por ejemplo, las células que proliferan activamente expresan más FGFR que las células confluentes, lo que implica un efecto del factor sobre la proliferación celular (Nowwarote, Sawangmake, Pavasant, & Osathanon). La unión de FGFb a sus receptores genera la activación de tirosina quinasa y, posteriormente, conduce a la activación de varias vías de señalización intracelular, incluyendo fosfolipasa C (PLC)-g, proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa activada por mitógeno- Ras (pequeña GTPasa) (MAPK), fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (PI-3 quinasa)/proteína quinasa B (AKT), entre otras (Bikfalvi, Klein, Pintucci, & Rifkin, 1997; Powers et al., 2000). Como otros miembros de la familia de FGF, este factor posee amplias actividades mitogénicas y de supervivencia celular, y está

involucrado en una variedad de procesos celulares que incluyen, desarrollo embionario, crecimiento celular, morfogénesis, reparación de tejidos, crecimiento de tumores e invasión (Delaune, Lemaire, & Kodjabachian, 2005; Feldman, Poueymirou, Papaioannou, DeChiara, & Goldfarb, 1995). El factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb), un miembro de la familia FGF, a menudo se considera un factor de crecimiento importante dentro del campo de investigación de células madre. FGFb tiene un papel crucial en el mantenimiento de las propiedades de las células madre embrionarias humanas (ES) y pluripotentes inducidas (iPS). En general, FGFb se utiliza como factor de crecimiento suplementario en el medio de cultivo de estas células para mantenerlas en un estado indiferenciado (J. H. Park & Hong, 2014; C. Xu et al., 2005). La suplementación con FGFb es capaz de mantener la expresión del marcador pluripotente en cultivo a largo plazo de células madre embrionarias humanas (Vallier, Alexander, & Pedersen, 2005).

Se ha demostrado previamente que el FGFb desempeña un papel en el mantenimiento del potencial de diferenciación de las CEM y en el aumento de la longitud de sus telómeros en varios sistemas de cultivo (Solchaga et al., 2005; Sotiropoulou, Perez, Salagianni, Baxevanis, & Papamichail, 2006; Tsutsumi et al., 2001). Varios estudios publicados han demostrado que el FGFb ejerce un efecto mitógeno significativo en las CEM y, al mismo tiempo, mejora su capacidad de diferenciación trilineaje (hueso, cartílago, grasa) (Martin, Muraglia, Campanile, Cancedda, & Quarto, 1997; Solchaga, Penick, Goldberg, Caplan, & Welter, 2010; Tsutsumi et al., 2001). La condrogénesis, quizás el potencial de diferenciación que se pierde con mayor facilidad en las CEM durante el cultivo *in vitro*, se mejora particularmente mediante la expansión en un medio suplementado con FGFb (Solchaga et al., 2005). Sin embargo, el papel de FGFb en la diferenciación de células madre es aún controversial. Se ha descrito que tiene un efecto inhibitorio sobre la diferenciación osteogénica de las CEM (Osathanon, Nowwarote, & Pavasant, 2011). Similarmente, los efectos de FGFb en la diferenciación adipogénica son controvertidos (Nowwarote et al.). Estos resultados contradictorios pueden ser consecuencia de diferentes tipos de células, concentraciones, tiempos de exposición y condiciones de cultivo

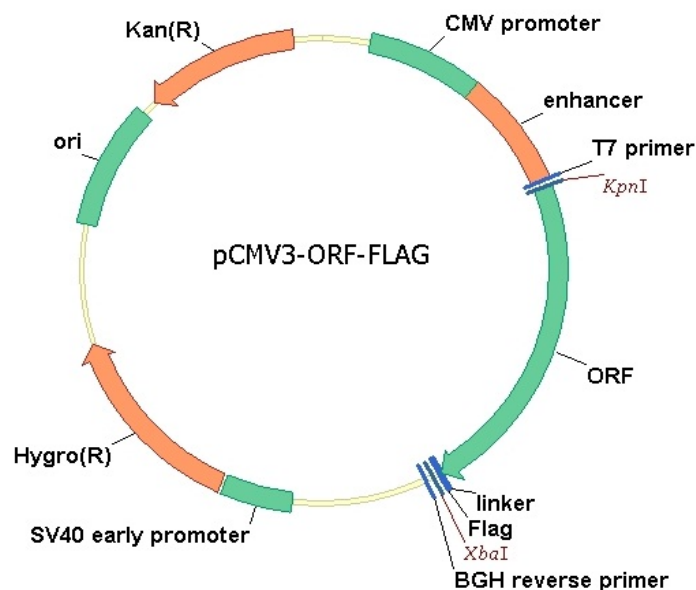


## 2. Metodología

### 2.1 Vector de expresión del gen *FGFb*

El plásmido de transferencia no viral para la modificación genética de las CEM seleccionado corresponde a un vector de expresión diseñado para la expresión estable o transitoria, y de alto nivel del gen *FGF2* en células mamíferas: pCMV3-FGF2-Flag (Sino Biological Inc. Catalog number: HG10014-CF) (**Figura 2.**). El vector tiene un tamaño de 6158bp y contiene los siguientes elementos:

- Promotor del citomegalovirus (CMV), promotor de expresión ubicuo, de alta eficiencia, presente en una amplia variedad de células mamíferas.
- Gen de resistencia a higromicina para la selección de líneas celulares mamíferas, Hygro (R).
- Secuencia consenso *Kosak* para la traducción del mRNA células mamíferas.
- Gen de resistencia a kanamicina para la selección en bacterias *E. coli*, Kan (R).



**Figura 2.** Mapa del vector pCMV3-FGF2-Flag (6178bp)

Se realizaron preparaciones masivas del plásmido pCMV3-FGF2-Flag (maxipreps) después de transformar el plásmido en bacterias *E. coli TOP10* por el método clásico de choque térmico. Las colonias que crecieron en platos con medio de selección (LB-Agar suplementado con ampicilina) se inocularon posteriormente en medio de selección LB líquido (LB suplementado con ampicilina). A partir de 150ml del cultivo de bacterias transformadas, se realizó extracción del plásmido utilizando el kit comercial ZymoPURE™ II Plasmid Maxiprep Kit (Zymo Research). Las maxipreps fueron cuantificadas utilizando un Nanodrop y se utilizaron para realizar la transfección de las CEM-GW mediante nucleofección.

## 2.2 Amplificación por PCR del fragmento *FGFb-Flag*

La amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando como plantilla el vector comercial pCMV3-FGF2-Flag (Sino Biological Inc. Catalog number: HG10014-CF) y los *primers* diseñados: 5'- tgcTCT AGA ACC ATG GCA GCT GGG AGC ATC ACC -3' (hFGFb-alfa-LV-XbaI) y 5'- ccgGAA TTC TTA CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA A -3' (hFGFb-omega-LV-EcoRI). Las condiciones de la amplificación fueron: *primers* 0,2µM, dNTPs 200µM, 1,25U Taq DNA Polimerasa (Taq DNA Polymerase with ThermoPol® Buffer, M0267G, Biolabs) y 100ng de ADN plasmídico, en un volumen final de 30µl. El ciclo térmico óptimo utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial (94°C por 4min.), 30 ciclos de 94°C/30s (desnaturalización), 55°C/30s (anillamiento) y 72°C/1min (extensión), y una extensión final a 72°C/5min. Los productos obtenidos en la amplificación por PCR se sometieron a electroforesis horizontal en gel de agarosa 1,5%, en buffer TAE 0,5X, y posterior tinción con bromuro de etidio durante 20 minutos. El producto de PCR fue purificado utilizando el kit comercial QIAquick PCR Purification kit (Qiagen).

## 2.3 Sub-clonación del fragmento *FGFb-Flag* en el vector de transferencia viral (VTLv): Constructo p204-LV+ FGFb

El vector de transferencia lentiviral disponible en el laboratorio corresponde al vector #204 RRL-cPPT-CMV-oPRE (6709bp, p204LV). Este vector se obtuvo del laboratorio del Regenerative Immune Therapies Applied (Medizinische Hochschule Hannover, Alemania)(Salguero et al., 2014). El cultivo de bacterias con el vector, almacenado en glicerol, se inoculó en un cultivo de 5ml de medio LB suplementado con ampicilina

(minicultivo) e incubó a 37°C durante 16h. Posteriormente, 1,5ml de este minicultivo fue utilizado para inocular 150ml de medio LB+Amp (maxicultivo). Después de 24h de incubación a 37°C, el plásmido fue extraído utilizando el kit comercial ZymoPure II Plasmid Maxiprep kit (Zymo Research) y se cuantificó con Nanodrop. En dos reacciones diferentes, 890ng del fragmento FGFb-Flag purificado y 1000ng del vector p204LV fueron digeridos con 14U de la enzima de restricción XbaI y 20U de EcoRI (New England BioLabs®) en el buffer 10X NEBuffer 3.1, durante 4h a 37°C. Posteriormente, la digestión fue visualizada mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% en buffer TAE 0,5X y tinción con bromuro de etidio. Los fragmentos visualizados se cortaron del gel, se purificaron utilizando el kit comercial Monarch® DNA Gel extraction un kit (New England BioLabs®) y finalmente, se cuantificaron por Nanodrop.

La ligación de los productos purificados se realizó con dos relaciones inserto:vector, 3:1, 5:1 y también utilizando la fórmula  $\text{ng inserto} = (R \times \text{ng plásmido} \times \text{bp inserto}) / \text{bp plásmido}$  (donde R es la relación molar entre el plásmido e inserto), con la enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs®). El plásmido recombinante obtenido, p204-LV+FGFb, fue transformado en células competentes *E. coli TOP10* y *Stb13* por choque térmico o utilizando el kit comercial Mix & Go! E.coli Transformation Kit (Zymo Research). Las colonias de bacterias que crecieron en las placas con el medio de selección (LB-agar y ampicilina) fueron inoculadas en medio LB líquido con ampicilina (minicultivos de 3ml), a partir de los cuales se realizó extracción del ADN plasmídico (miniprep) por lisis alcalina. El ADN plasmídico aislado fue utilizado para verificación de la construcción, por doble digestión con las enzimas de restricción BamHI – NcoI y XbaI – EcoRI (New England BioLabs®) en el buffer 10X NEBuffer 3.1, durante 4h a 37°C. La digestión fue visualizada mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 0,5X. Finalmente, el ADN plasmídico cuyo patrón de fragmentación coincidió con el esperado, fue enviado para confirmación por secuenciamiento. A partir de los gliceroles de las colonias verificadas por secuenciamiento, se prepararon maxicultivos (150ml de medio LB con ampicilina), para realizar extracción a gran escala del plásmido utilizando el kit comercial ZymoPURE™ II Plasmid Maxiprep Kit (Zymo Research); las maxipreps fueron cuantificadas utilizando un Nanodrop y se utilizaron para los ensayos posteriores de transfección.

## 2.4 Cultivo de las CEM-GW

Las CEM aisladas del cordón umbilical humano se obtuvieron del banco de células estromales mesenquimales de la UTA-IDCBIS. El proceso de aislamiento y caracterización de estas células se encuentra estandarizado y debidamente especificado, lo que asegura alta viabilidad, homogeneidad e identidad de los cultivos primarios que se utilizaron en este estudio (Silva-Cote et al., 2019). A partir de viales criopreservados en nitrógeno líquido del banco de células de la UTA-IDCBIS, se establecieron cultivos de las CEM-GW en frascos T75 y en el medio DMEM completo: DMEM bajo en glucosa (1g/ml glucosa, Gibco™) suplementado con 10% hLP, heparina (8IU/ml) y antibiótico 1X Penicilina/Estreptomina (Gibco™ Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml), a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Los donantes utilizados en este trabajo fueron caracterizados mediante expresión de marcadores de superficie específicos para CEM (CD90, CD73, CD105, CD45, CD34, HLA-DR y HLA-ABC) y potencial de diferenciación hacia los linajes de osteoblastos, condroblastos y adipocitos, cumpliendo el set mínimo de criterios para definir las CEM según la ISCT. Para el mantenimiento de los cultivos, se realizó pase de las células una vez alcanzaron el 80-90% de confluencia utilizando el reactivo TrypLE™ Express Enzyme (1x) (Gibco™) para el desprendimiento de las células. Posteriormente, las células se sembraron utilizando la relación 4600 células/cm<sup>2</sup> en nuevos frascos o placas de cultivo. Todos los experimentos fueron realizados entre los pases 2 y 7.

## 2.5 Transfección por nucleofección de las CEM-GW

CEM-GW en cultivo por al menos 8 días, en confluencia del 80% y con un pase menor a 7, se utilizaron en los ensayos de transfección del vector comercial pCMV3-FGF2-Flag (Sino Biological Inc. Catalog number: HG10014-CF), por nucleofección. Utilizando maxipreps del vector y el kit comercial P1 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit (Lonza, Cat. No. V4XP-1024), se siguió el protocolo estandarizado en este trabajo. A continuación, se describe brevemente: la solución de nucleofección (Human MSC Nucleofector Solution) y el suplemento, se dejaron a temperatura ambiente, mientras que el medio DMEM completo y RPMI incompleto a 37°C. Posteriormente, se preparó una placa de 6 pozos, adicionando 1 ml del medio DMEM completo en la cantidad de pozos correspondientes con el ensayo, y se mantuvo a 37°C. Se colectaron las CEM-GW, se contaron con cámara de Neubauer y se tomó la alícuota correspondiente al número de células del ensayo, para tener 545.000 células/cubeta. Las células se centrifugaron a 200xg por 10min y

paralelamente, se preparó la solución de nucleofección correspondiente, mezclando 82µl de la solución de nucleofección (Human MSC Nucleofector Solution) y 18µl del suplemento por cubeta de transfección. El *pellet* de células se resuspendió en el volumen correspondiente de solución de nucleofección para obtener una concentración de  $5,45 \times 10^5$  células/100µl; se evitó mantener esta suspensión celular durante más de 15 minutos, ya que se reduce la viabilidad celular y eficiencia de transferencia de genes. La suspensión celular fue dividida en tubos *ependorf*, de acuerdo con los diferentes plásmidos ensayados, y se adicionó el volumen correspondiente a 2µg del plásmido a cada 100µl de suspensión celular; la mezcla se transfirió a las cubetas de nucleofección (100µl Nucleocuvette™ Vessels), evitando la formación de burbujas de aire. Estas cubetas se sometieron al pulso eléctrico utilizando el equipo 4D-Nucleofector™ System X Unit (Lonza Biosciences) y el programa FF-104. Inmediatamente finalizó el pulso, las cubetas se llevaron a la cabina de flujo, se adicionó 500µl de medio RPMI a 37°C y se incubaron a esta temperatura durante 15min. Una vez transcurridos los 15 min, las células se mezclaron por pipeteo suave y se transfirieron de manera correspondiente a la placa de 6 pozos. Finalmente, las células se incubaron a 37°C hasta análisis posterior. El medio fue reemplazado después de 24h post-nucleofección. Como control positivo se utilizó el vector pmaxGFP™ (3486pb), y como control negativo se utilizaron células en la solución de nucleofección sin ADN, y con el pulso eléctrico.

## 2.6 Producción de partículas Lentivirales (LV) de tercera generación con pseudotipo VSV-G

**Plásmidos estructurales y de transferencia (VTLv):** Los tres plásmidos estructurales, pMD2.G (5824bp), pMDLg/RRE (8895bp) y pRSV/Rev (4174bp) utilizados para la producción de las partículas LV se obtuvieron del Medizinische Hochschule Hannover (Alemania) (Salguero et al., 2014). Los plásmidos fueron transformados en bacterias *E. coli* *Stbl* 3 quimiocompetentes utilizando el método de choque térmico. Las colonias aisladas en placas LB agar+Amp se inocularon en 3 ml de medio líquido LB+Amp, para realizar extracción del ADN plasmídico utilizando el método de lisis alcalina. Los plásmidos extraídos fueron verificados mediante digestión con la enzima EcoRI, y posteriormente la digestión fue visualizada mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 0,5X. Se tomaron 1,5ml del minicultivo para inocular 150ml de medio LB+Amp (maxicultivo), de las colonias cuyo ADN plasmídico mostró el patrón de fragmentación esperado. Después

de 24h de incubación a 37°C, el plásmido fue extraído utilizando el kit comercial ZymoPure II Plasmid Maxiprep kit (Zymo Research) y cuantificado con Nanodrop. Se utilizaron también maxi preparaciones de los vectores de transferencia lentiviral p204-LV+FGFb (descrito anteriormente) y p#202-LV+GFP (p202-GFP, 7454bp), que contiene el gen que codifica para la proteína GFP.

**Cultivo de HEK 293 LTV y transfección:** A partir de un cultivo de células HEK 293 LTV (293LTV Cell Line, Cell Biolabs, Inc) mantenido en DMEM alto en glucosa (4,5g/L) con L-glutamina (4mM) (Gibco™, Ref. 11965-084) suplementado con 10% SFB (Suero Fetal Bovino, Gibco™), 0,1mM (1X) aminoácidos no esenciales (MEM Non-Essential Amino Acids Solution 100X, Gibco™, Ref. 11140050) y antibiótico 1X (Penicilina/Estreptavidina), se sembraron  $1 \times 10^6$  células por pozo en 1,5ml del medio descrito anteriormente, en placas de 6 pozos. Las células se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante toda la noche. Al siguiente día, se llevó a cabo la transfección de los cuatro plásmidos para la producción de los LV-GFP (pMD2.G + pMDLg/RRE + pRSV/Rev + p202-GFP, control) y LV-FGFb (pMD2.G + pMDLg/RRE + pRSV/Rev + p204-LV+FGFb), utilizando el procedimiento estandarizado y que se describe a continuación. Las cantidades descritas para la transfección de 1 pozo fueron: en un tubo *ependorf* (Tubo A) se mezclaron 171,8µl de OptiMEM™ (Gibco™) y 20,2µl de Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen™), mientras que en otro tubo se mezclaron los volúmenes correspondientes de cada uno de los 4 plásmidos, para tener 9,19µg de ADN plasmídico en total: 1,97µg pMD2.G, 3,05µg pMDLg/RRE, 1,53µg pRSV/Rev y 2,64µg p204-LV+FGFb o p202-LV+GFP. Esta mezcla se incubó durante 1 min a temperatura ambiente. En otro tubo (Tubo B), se adicionó el volumen correspondiente de OptiMEM™ para obtener un volumen final de 192µl junto con la mezcla de los plásmidos. Después de un *spin* a la mezcla de los plásmidos, estos fueron adicionados al Tubo B. Posteriormente, y sólo en este orden, se adicionó el Tubo A al B y se mezcló dando pequeños golpes al tubo. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Paralelamente, se tomó la placa de 6 pozos con las células HEK 293 LTV y se adicionaron 1244µl del medio descrito para estas células. Una vez finalizó el tiempo de incubación, se adicionó al pozo y gota a gota 256µl de la mezcla de transfección (ADN+Lipofectamina), distribuyendo uniformemente en las células. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24h.

**Recolección de las partículas LV:** la transfección se verificó por microscopia de fluorescencia. Sólo si esta fue al menos del 80% se continuó con la recolección de las

partículas LV. Se preparó medio DMEM alto en glucosa completo suplementado con HEPES 20mM y se precalentó a 37°C. Posteriormente, se recolectó el sobrenadante de los pozos y de manera correspondiente para los LV-GFP y LV-FGFb, 24h post-transfección (LV-24h), y se adicionó 1,5ml de medio de cultivo fresco con HEPES a los pozos con las HEK transfectadas para incubar las células por 24h adicionales. Posterior a este tiempo, nuevamente los sobrenadantes fueron recolectados (LV-48h). Los sobrenadantes con las partículas LV se centrifugaron a 2000xg durante 5min a 4°C y se filtraron por 0,45µm. Una alícuota de los sobrenadantes se mantuvo a 4°C para el ensayo de título funcional y el volumen restante se almacenó a -80°C, para los ensayos de transducción de las CEM-GW.

**Ensayo de título funcional:** Este ensayo se realizó con los LV-GFP. A partir de un cultivo de células HEK 293T mantenido en medio DMEM alto en glucosa (4,5g/L) con L-glutamina (4mM) suplementado con 10% SFB y antibiótico 1X, se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pozo en 500µl del medio descrito, en placas de 24 pozos. Se realizaron 3 diluciones (1:2, 1:5 y 1:10) de los LV utilizando la alícuota de los sobrenadantes recolectados a las 24 y 48h post-transfección, en un volumen final de 1100µl. Cada dilución se suplementó con 5,5µl de una solución de 1mg/ml de sulfato de protamina, para obtener una concentración final de 5µg/ml. Se retiró el medio de los pozos con las células HEK adheridas y se adicionó 500µl/pozo de las diluciones de los LV, así como los sobrenadantes sin diluir (1:1). Las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 72h. Una vez transcurrido este tiempo, las células se recolectaron y se analizaron en el citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, San José, EE. UU.). El análisis de los datos se realizó con el paquete de software de análisis de datos FlowJo vX.7.0 (Treestar, EE. UU.), para obtener el porcentaje de expresión de la proteína GFP en cada una de las diluciones. El título viral (Partículas virales por ml, PVI/ML) se calculó con la dilución del virus que mostrara el 50% del nivel expresión de la proteína GFP y con la siguiente fórmula:

$$\frac{PVI}{ml} = \frac{\#células HEK \times \% Nivel de expresión}{100} \times \frac{1000}{Volumen de la alícuota para la dilución}$$

## 2.7 Transducción de las CEM-GW con las partículas LV-GFP y LV-FGFb

A partir de un cultivo de células CEM-GW en frascos T75 en pase 1, se sembraron  $1 \times 10^5$  células/pozo en 1,5ml de medio DMEM completo (descrito en la sección de cultivo para las CEM-GW), en placas de 6 pozos. Se sembraron para cada donante, 3 pozos para infección con las partículas LV-GFP, 3 para LV-FGF y 3 pozos sin infección (células *wildtype*). Las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24h. Al día siguiente, se preparó la mezcla de infección para GFP y FGFb, así: el volumen correspondiente de los LV-GFP y -FGFb 48h para un valor de multiplicidad de infección (MOI) de 5, es decir, para obtener 500.000 PVI/ml, sulfato de protamina a una concentración final de 50µg/ml y DMEM bajo en glucosa suplementado con 10% SFB, en un volumen final de 1200µl/porozo. Se retiró el medio de los pozos y se adicionó 1200µl de la mezcla de infección, de manera correspondiente en los pozos para GFP y FGFb. La infección de las CEM-GW se dejó en incubación a 37°C y 5%CO<sub>2</sub> durante 72h. Una vez transcurrido este tiempo, las células fueron recolectadas para expansión y verificación de la infección midiendo el porcentaje de expresión de las proteínas por citometría de flujo. Para medir el nivel de expresión de la proteína GFP, las células fueron recolectadas, se lavaron con PBS 1X y se midieron directamente en el citómetro de flujo, utilizando CEM-GW sin infección (*wildtype*), como control. Para medir el nivel de expresión de la proteína FGFb, se realizó marcación intracelular de las CEM-GW utilizando el anticuerpo contra la proteína reportera del factor, anti-flag.

## 2.8 Marcación intracelular del factor FGF2-Flag en las CEM-GW transfectadas o transducidas

Después del tiempo de transfección por nucleofección o 72h post-infección se retiró el medio de las CEM-GW modificadas genéticamente y no modificadas (*wildtype*), y se adicionó 1ml de medio DMEM suplementado con BrefedinA (1000X, Invitrogen™) a una concentración final de 1X. Una vez se incubaron las células 4h con este medio, se recolectaron para fijación con el buffer de fijación eBioscience™ IC Fixation (2X) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con PBS1X y se permeabilizaron con 500µl de una dilución 1X del buffer eBioscience™ IC Permeabilization durante 7 min. Después de retirar el buffer de permeabilización, se realizó tinción de las células con el anticuerpo anti-flag (APC anti-DYKDDDDK Tag Antibody, Biolegend®, Cat.#

637307) utilizando una dilución de 1:40 (2,5µl/100µl) en buffer de permeabilización 1X. Las células se incubaron por 45min a 4°C, se lavaron con PBS 1X y se midieron en el citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, San José, EE. UU.). Los datos se analizaron con el paquete de software de análisis de datos FlowJo vX.7.0 (Treestar, EE. UU.).

## 2.9 Ensayos de ELISA para el factor FGFb

Los sobrenadantes tomados después de los ensayos de transfección por nucleofección, transducción por lentivirus y curvas de crecimiento de las UCWJ<sup>GFP</sup> y UCWJ<sup>FGFb</sup> almacenados a -80°C, se utilizaron para determinación de la concentración del factor de crecimiento FGFb por ensayos de ELISA utilizando el kit comercial Quantikine® ELISA Human FGF basic Immunoassay (R&D Systems, Inc), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este ensayo emplea la técnica de inmunoensayo enzimático cuantitativo tipo sándwich.

## 2.10 Inmunofenotipo de las CEM-GW

La expresión de antígenos de superficie celular relacionados con CEM se evaluó mediante citometría de flujo utilizando los marcadores de membrana CD90 (APC), CD73 (PECy7), CD105 (PE), CD45 (APC/Cy7), CD34 (PerCPCy5.5), HLA-DR (Azul Pacífico) y HLA-ABC (FITC) (Biolegend®). Ciento cincuenta mil (150.000) células se incubaron con las diluciones estandarizadas de los anticuerpos durante 30min a 4 °C, se centrifugaron a 300xg durante 6 min y se resuspendieron en 200µl de PBS 1X. Posteriormente, las células fueron leídas en el citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, San José, EE. UU.), y los datos se analizaron con el paquete de software de análisis de datos FlowJo vX.7.0 (Treestar, EE. UU.).

## 2.11 Ensayos de diferenciación (linaje osteoblastos)

Los ensayos de diferenciación celular *in vitro* se realizaron teniendo en cuenta los protocolos estandarizados previamente en la UTA y publicados (Silva-Cote et al., 2019). La capacidad potencial multilínea de CEM-GW transfectadas con plásmidos no virales y transducidas con partículas LV, se examinó mediante la inducción de la diferenciación celular utilizando un medio comercial de diferenciación osteogénica. A continuación, se describe brevemente el ensayo: en placas de 24 pozos se sembraron 5x10<sup>4</sup> células/pozo

hasta un 60% de confluencia y se expusieron al medio de diferenciación osteogénica (StemPro Osteogenesis Differentiation Kit, Life Technologies) durante 21 días, realizando cambio de medio de diferenciación cada 3 días. La deposición de calcio se evidenció mediante tinción con rojo de Alizarina (Alizarin Red-S, SigmaAldrich).

## 2.12 Ensayos de inmunomodulación *in vitro*: Contacto célula-célula

Los ensayos de inmunomodulación *in vitro* se realizaron teniendo en cuenta los protocolos estandarizados previamente en la UTA (Cruz-Barrera et al., 2020). Se evaluó el co-cultivo directo de CEM-GW/PBMC (contacto célula-célula). A continuación, se describe brevemente el ensayo: hPBMCs se cultivaron durante 24h en medio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado con 10% SFB y antibiótico 1X. Paralelamente, a partir de cultivos de las CEM-GW *wildtype* o modificadas genéticamente, se sembraron  $5 \times 10^4$  células/pozo en 500µl de medio DMEM completo, en cajas de 24 pozos. Después de 24h de incubación, se retiró el medio de cultivo y se adicionó la cantidad de células PBMCs activadas para evaluar las diferentes relaciones PBMCs: CEM (1:10, 1:20, 1:50 y 1:100). Para la activación de células T dependientes de TCR, se utilizaron las perlas de activación de células T anti-CD2, -CD3, -CD28 ( $\alpha$ CD3/CD28) de Miltenyi Biotec (T Cell Activation/Expansion Kit human, Cat.# 130-091-441) siguiendo las instrucciones del fabricante. PBMCs sin activación y activadas con las perlas sin CEM-GW, fueron los controles negativo y positivo del ensayo. Los co-cultivos se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 días. Cada ensayo se realizó por triplicado. El efecto inhibitorio de las CEM-GW sobre la proliferación de linfocitos se determinó mediante recuentos absolutos de células CD3<sup>+</sup> utilizando las perlas de conteo CountBright Absolute Counting Beads (Invitrogen, Life Technologies), en un citómetro de flujo (FACSCanto II™, BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). Los datos se analizaron con el paquete de software FlowJo vX.7.0 (TreeStar, EE. UU.).

## 2.13 Ensayos de ELISA multiplex de citoquinas

La determinación cuantitativa de citoquinas y factores de crecimiento contenidos en sobrenadantes colectados en los ensayos de curvas de crecimiento para las CEM-GW transducidas con los LV-GFP y LV-FGFb se analizaron mediante ensayos de ELISA múltiplex de citoquinas (R&D Systems, Germany). Los factores analizados fueron: angiogenina, regulada por activación, expresada y secretada por células T normales

(RANTES), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP)-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IL-10, IL-6, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), proteína estimulante de macrófagos (MSP/MST1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-AA, PDGF -BB, PDGF-AB, factor de crecimiento transformante alfa (TGF $\alpha$ ), osteoprotegerina y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A). El ensayo multiplex de citoquinas se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las señales de fluorescencia se detectaron utilizando el sistema de detección Luminex 200TM (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EE. UU.) y los datos se analizaron en el software xPONENT. Las concentraciones se presentan en pg/mL.

## 2.14 Producción y aislamiento de VEs derivadas de CEM-GW

Para el aislamiento de VEs, se cultivaron CEM-GW *wildtype* (UCWJ<sup>wt</sup>) o CEM-GW transducidas con LV-GFP y LV-FGFb (UCWJ<sup>GFP</sup> y UCWJ<sup>FGFb</sup>) en 5 frascos T75 hasta alcanzar una confluencia del 80% en medio DMEM completo. Después de 3-4 días de crecimiento, se reemplazó el medio de cultivo (8mL/Frasco T75) de las células para inducir la producción de las VEs utilizando dos condiciones de cultivo: *starvation* y pro-inflamación. Para la condición de *starvation* se utilizó medio DMEM suplementado con antibiótico 1X, mientras que para la condición de pro-inflamación se utilizó medio DMEM suplementado con las citoquinas TNF- $\alpha$  (Recombinant Human IL-1 $\beta$ , carrier-free) e IL-1 $\beta$  (Recombinant Human TNF- $\alpha$ , carrier-free) (Biolegend®) a una concentración final de 50ng/ml y antibiótico 1X. Las células se incubaron durante 48h en estos medios de cultivo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, los sobrenadantes (40ml) se colectaron de manera correspondiente (medio acondicionado, CM), y se utilizaron para el aislamiento de las VEs, mediante polietilenglicol (PEG) y cromatografía de afinidad con columnas FAB-TACS® (IBA Lifesciences GmbH)

**Aislamiento de las VEs con Polietilenglicol (PEG):** Los CMs se centrifugaron a 2000xg durante 10 min para eliminar las células muertas y restos celulares, posteriormente se

centrifugaron a 20.000xg durante 30min a 4°C. El sedimento resultante (fracción de MVs) se resuspendió en 500µl de PBS 1X filtrado previamente por 0,22µm, para análisis por NTA y análisis de marcadores de membrana. El sobrenadante resultante se filtró por 0,22µm y se mezcló en proporción 1:5 con solución de PEG (PEG8000) en PBS a 500 mg/ml y se incubó a 4 °C. Después de 16 h, el sobrenadante se centrifugó a 1500xg durante 30 min a 4°C y el sedimento resultante (fracción de Exos) se resuspendió en 500µl de PBS 1X filtrado previamente por 0,22µm, para análisis por NTA y análisis de marcadores de membrana.

***Aislamiento de las VEs por cromatografía de afinidad (columnas FAB-TACS®):*** Los Exos se aislaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante para los kits de aislamiento de exosomas CD9 y CD81 Fab-TACS® Exosome Agarose Column Starter kit (IBA Lifesciences GmbH, Alemania, Cat. no. 6-3319-002 y 6-3381-002). Brevemente: los CM se centrifugaron a 2000xg por 30min y se filtraron utilizando filtros de polietersulfona (PES) 0,22µm; paralelamente, se preparó la solución del anticuerpo diluyendo el anticuerpo CD9 o CD81 (Fab-Strep, 50 µg) en 1ml de PBS 1X filtrado por 0,22µm. Posteriormente, se preparó la columna (Strep-Tactin® TACS Agarose Column, 1 ml) lavando con 5ml de PBS 1X filtrado, una vez terminó el flujo del paso de lavado, se cargó la dilución del anticuerpo correspondiente (anticuerpo/columna) y se incubó por 2min. Nuevamente, la columna se lavó con 5ml de PBS 1X filtrado y se continuó con el paso del aislamiento de los exosomas. Máximo 20ml de los CM (*starvation* y pro-inflamación) se pasaron por la columna en pasos de 1ml, se lavó la columna con 10ml de PBS 1X y los exosomas fueron eluidos de la columna aplicando inicialmente 1ml del buffer de elución de Biotina 1mM e incubando por 5min, y posteriormente 3x1ml Biotina 1mM, para un volumen final de 3ml. Esta fracción de exosomas se analizó por NTA y marcadores de membrana.

## **2.15 Análisis de nanopartículas por NTA**

Las fracciones de MVs y Exos obtenidos en los dos procedimientos de aislamiento, se caracterizaron en función del tamaño de partícula y concentración mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA). Brevemente, las MVs y Exos se diluyeron 10 a 100 veces, con PBS filtrado por 0,22µm para la medición de 20 a 100 partículas/campo y se analizaron con el equipo NanoSight NS300 (Malvern Panalytical), como describe en el protocolo del fabricante. Las muestras se registraron por

triplicado durante 60s cada una, a 25°C. La configuración del equipo para la adquisición de datos se mantuvo constante entre las mediciones con el nivel de la cámara establecido en 14, la ganancia de pantalla establecida en 1 y el umbral de detección de las partículas en 5. El análisis de los datos se realizó con el software NTA 2.3 (Malvern Panalytical).

## 2.16 Caracterización de marcadores de membrana en VEs por citometría de flujo

Para la expresión de proteínas de superficie, los marcadores de superficie de VEs, CD9, CD81 y CD63, se analizaron mediante citometría de flujo de acuerdo con el siguiente protocolo: 10 µl de una dilución 1:100 de perlas de látex aldehído/sulfato de 4 µm (Aldehyde/Sulfate Latex Beads, 4% w/v, 4 µm, LifeTechnologies™) se mezclaron con el volumen de VEs equivalente a 800 MV o 1600 Exos/perla y PBS 1X filtrado por 0,22µm, en condiciones estériles en un volumen final de 200µl. La mezcla se incubó en un agitador orbital durante 1h, posteriormente el complejo VEs-perla se centrifugó e incubó con BSA al 7,5 % (BSA Fracción V – 7,5 %, Gibco®) durante 30 min a temperatura ambiente seguido por incubación con los anticuerpos anti-CD63 (FITC, H5C6), anti-CD9 (PE, HI9a) y anti-CD81 (APC, 5A6) (Biolegend®) durante 30 min a 4°C. Después de una centrifugación adicional, los complejos se resuspendieron en PBS 1X filtrado por 0,22µm y los datos se adquirieron utilizando el citómetro de flujo BD LSR II (Becton Dickinson, San José, EE. UU.). Los datos se analizaron con el paquete de software FlowJo vX.7.0 (TreeStar, EE. UU.).

## 2.17 Caracterización de marcadores de membrana en VEs por Exoview®

Los CM obtenidos después de 48h en las dos condiciones de cultivo para la producción de las nanopartículas, se diluyeron entre 10 a 20 veces en la Solución A (solución con Tween-20), y un volumen de 150µl fue incubado con los chips ExoView® Tetraspanin chips (EV-TC-TTS-01) durante 16h a temperatura ambiente, en placas de 24 pozos. Los chips contienen *spots* individuales a los que se han unido los anticuerpos anti-CD63 (clon H5C6), anti-CD81 (clon JS81) o anti-CD9 (clon H19a) o anticuerpos de isotipo IgG1k de ratón, utilizados como control para la unión no específica de las VEs. Posteriormente, los chips se lavaron 3 veces con la Solución A durante 3 min bajo agitación suave y constante, y se incubaron con la mezcla de los anticuerpos fluorescentes ExoView® Tetraspanin Labeling

(EV-TC-AB-01), que contiene los anticuerpos anti-CD63, anti-CD81 y anti-CD9 (los mismos clones descritos anteriormente), todos diluidos 1:5000 en Solución A con BSA al 2%. Posteriormente, los chips se lavaron una vez en la Solución A y tres veces en la Solución B, seguido de un lavado con agua desionizada filtrada y puestos a secar. Las soluciones A y B se proporcionaron del kit de chips ExoView Tetraspanin (EV-TC-TTS-01). Finalmente, se tomaron imágenes de los chips con el lector ExoView R100 utilizando el software de adquisición ExoScan 2.5.5. Las imágenes adquiridas se analizaron con el software ExoViewer 2.5.0, con umbrales de tamaño EV establecidos en un diámetro de 50 a 200 nm. La señal registrada en los *spots* con los isotipos se utilizó como control de fondo.

## 2.18 Análisis estadístico

Para determinar diferencias con significancia estadística, se utilizaron pruebas t de Student y ANOVA para datos paramétricos y la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Se consideró nivel de significancia cuando el valor de p fue inferior a 0,05. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism versión 6.0 (La Jolla, CA, EE. UU.).

## **3. Resultados**

### **3.1 Modificación genética transitoria de las CEM-GW con un vector no viral (Nucleofección)**

#### **3.1.1 Vector de transferencia no viral del gen *FGFb***

Se realizó búsqueda de un vector comercial de expresión del factor de crecimiento FGFb: pCMV3-FGF2-Flag. El vector contiene la secuencia de nucleótidos dentro del marco abierto de lectura (ORF, cDNA) que codifica para el factor de crecimiento fibroblástico básico humano (FGFb, FGF2), cuyo tamaño es de 468bp. El gen se encuentra flanqueado por las secuencias para las enzimas de restricción KpnI en el extremo 5' y XbaI en el extremo 3'. Estas secuencias permiten la subclonación del OFR por digestión con enzimas de restricción. El transcrito (mRNA) traduce para una proteína recombinante de 155 aminoácidos (18KDa) que se encuentra en fase con el tag FLAG. El tag FLAG se encuentra en la región C-terminal de la proteína FGFb, y corresponde a un polipéptido de ocho aminoácidos (DYKDDDDK, donde D: ácido aspártico, Y: tirosina y K: lisina). El tag FLAG es un antígeno artificial que funciona como un reportero, para el que han sido desarrollados anticuerpos específicos (monoclonales) y de alta afinidad, y por lo tanto puede ser usado para la purificación de las proteínas por cromatografía de afinidad y también para su rastreo y localización subcelular en células. En este sentido la fusión del tag FLAG a la proteína permite que la proteína sea estudiada por técnicas de inmunofluorescencia o citometría de flujo. Para este estudio, el tag FLAG fue utilizado para la validación de la sobreexpresión del factor de crecimiento FGFb después de la transfección por nucleofección o transducción con las partículas LV, de las CEM-GW.

En la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) se encuentran referenciadas dos variantes del gen identificadas como NM\_001361665.1 (NP\_001348594.1) y NM\_002006.5 (NP\_001997.5), que representan la isoforma más

corta (18KDa) y la más larga (34KDa), respectivamente. El alineamiento múltiple entre la secuencia de nucleótidos reportada en la base de datos NCBI (NM\_002006.5) y la secuencia reportada del ORF clonado en el vector comercial, utilizando la herramienta bioinformática *muscle* (EMBL's European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI), muestra que no hay un 100% de coincidencia entre las secuencias. La secuencia clonada en el vector comercial presenta una serie de cambios en la secuencia nucleotídica con respecto a la reportada en la base de datos NCBI. Sin embargo, al realizar una traducción *in silico* y realizar un posterior alineamiento en aminoácidos se observa un 100% de coincidencia entre la secuencia peptídica del NCBI y el vector comercial. Esta observación podría ser el resultado de un proceso de optimización de codones empleado para mejorar la eficiencia de la transcripción del constructo. Por otro lado, estos cambios en la secuencia nucleotídica pueden también introducirse para aumentar el nivel de expresión de la proteína en el sistema *E. coli*. Este vector de transferencia no viral para el factor de crecimiento FGFb, fue utilizado para la transfección de las CEM-GW, por nucleofección.

### 3.1.2 Estandarización de la transfección de plásmidos en CEM-GW, por nucleofección

La nucleofección es un método físico de transfección, que consiste en una electroporación optimizada para dirigir los ácidos nucleicos no sólo al citoplasma, sino al núcleo celular. Se utilizó el equipo 4D-Nucleofector™ System X Unit (Lonza Biosciences) para tiras (20µl Nucleocuvette™ Strip) y cubetas (100µl Nucleocuvette™ Vessels). Con el objetivo de optimizar el procedimiento se realizó un experimento inicial utilizando tiras, con las condiciones experimentales mostradas en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Condiciones experimentales para la transfección por nucleofección de las CEM-GW con el plásmido pCMV3-FGF2-Flag.

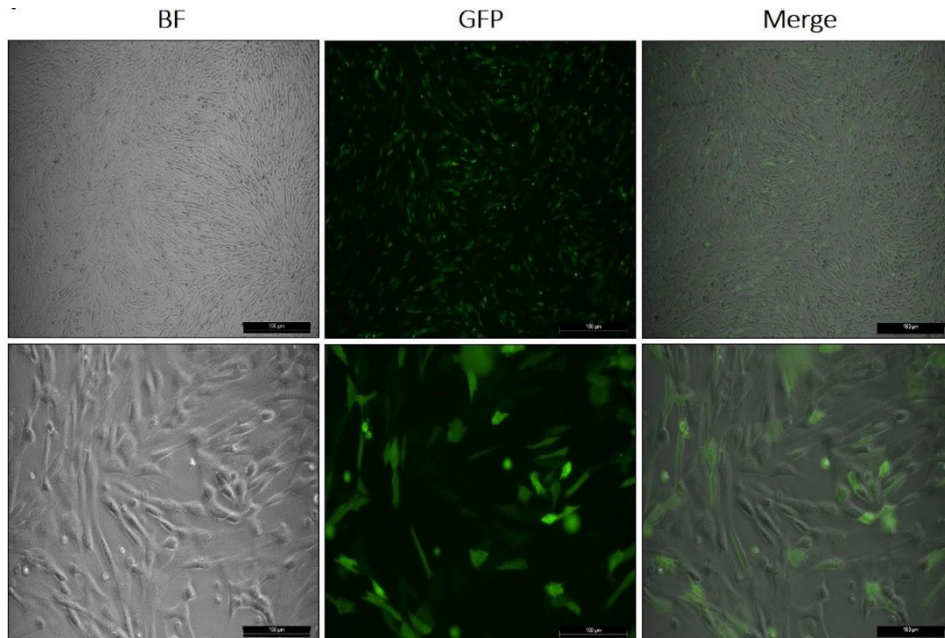
| Condición         | Características          | Cantidad |
|-------------------|--------------------------|----------|
| CEM-GW            | UCWJ 126 – P4            |          |
| Número de células | 75.000                   |          |
| Control positivo  | Plásmido pmaxGFP™        | 0,6 µg   |
| Control negativo  | Sin ADN con programa     | -        |
| Tratamiento       | Plásmido pCMV3-FGF2-Flag | 0,5 µg   |
|                   |                          | 0,8 µg   |

Se siguió el protocolo sugerido para el fabricante “Amaxa™ 4D-Nucleofector™ Protocol for Undifferentiated Human Mesenchymal Stem Cells (MSC) For 4D-Nucleofector™ X Unit–Transfection in suspension”, con el kit comercial P1 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit. El control positivo consiste en la transferencia del plásmido pmaxGFP™ (3464bp) que contiene el kit comercial, para la expresión de la proteína GFP. La expresión de esta proteína permite evaluar la eficiencia de la nucleofección. Por su parte el control negativo, consiste en someter a las células al pulso eléctrico en ausencia del material genético, lo que permite evaluar el impacto del efecto físico generado por el procedimiento sobre la viabilidad de las células. Después de 7 días post-nucleofección se evaluó la expresión de la proteína recombinante (FGF2-Flag) por citometría de flujo. Para la detección de la proteína FGF2-Flag se realizó arresto intracelular de la proteína, debido a que esta es secretada al medio de cultivo, con BrefeldinA. Esta molécula es un inhibidor del transporte de proteínas generando su acumulación en el complejo retículo endoplásmico/aparato de Golgi, de esta manera se utiliza para incrementar la concentración intracelular de proteínas que son secretadas (Jung, Schauer, Heusser, Neumann, & Rieger, 1993).

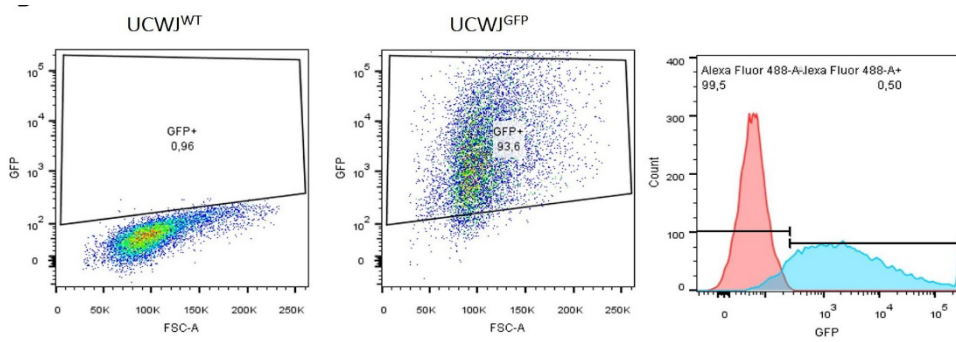
La **Figura 3A.**, muestra alta proporción de las CEM-GW transfectadas con el vector pmaxGFP están expresando la proteína GFP, evidenciando que el protocolo seguido y las condiciones experimentales ensayadas permitieron la obtención de una transfección adecuada. Esta observación cualitativa en las fotos por microscopia de fluorescencia se soporta con la medición por citometría de flujo, en la que se obtuvo que el 93,6% de células CEM-GW están expresando la proteína GFP (**Figura 3B.**). Como se espera las células CEM-GW sin transfección (*wildtype*) no muestran expresión de la proteína GFP (UCWJ<sup>WT</sup>, **Figura 3B.**). Adicionalmente, se observa en las fotografías de campo claro (BF) que la transfección no afecta de manera significativa la morfología y capacidad de auto-renovación de las CEM-GW. Estos resultados con el plásmido pmaxGFP™ utilizado como control positivo evidencian que la técnica de nucleofección permite bajo las condiciones experimentales adecuadas una alta eficiencia de transfección de un plásmido en células primarias, como lo son las CEM-GW. Por otro lado, se esperaba resultados similares en la transfección del vector comercial de la proteína FGF2-Flag. En una primera lectura, la transfección del plásmido pCMV3-FGF2-Flag (**Figura 3C.**) mostraron un bajo nivel de expresión de la proteína FGF2-Flag en las CEM-GW al día 7 post-transfección, sólo el 10% de la población celular fue positiva para la marcación con el anticuerpo anti-Flag. Por otro

lado, con los resultados se observa que no hay diferencia entre las dos cantidades de plásmido utilizadas en el ensayo, el porcentaje de CEM-GW positivas es el mismo.

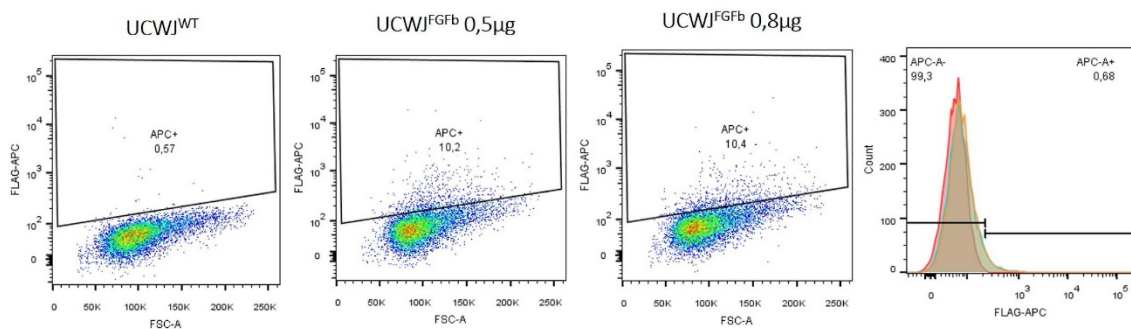
**A.**



**B.**



**C.**



**Figura 3. Primer ensayo de transfección por nucleofección del vector pmaxGFP™ y el vector pCMV3-FGF2-Flag en las CEM-GW. A.** Fotos de microscopía de fluorescencia tomadas a las células CEM-GW después de 48h post-nucleofección (hpn) con el vector pmaxGFP™. El panel superior corresponde a un aumento de 5X, el panel inferior a un aumento de 20X. BF: campo claro. **B.** Citometría de flujo de las células CEM-GW después de 7 días post-nucleofección (pn) con el vector pmaxGFP™. **C.** Citometría de flujo de las CEM-GW después de 7 días post-nucleofección con el vector pCMV3-FGF2-Flag. UCWJ<sup>WT</sup>: CEM-GW no transfectadas. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW transfectadas con el vector pmaxGFP™, expresando la proteína GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW transfectadas con el vector pCMV3-FGF2-Flag, expresando la proteína FGF2-Flag.

Sobre este resultado y su comparación con el resultado de la proteína GFP, se propusieron diferentes causas que conllevaron a los resultados, una de ellas está relacionada con el tamaño de los plásmidos, el plásmido pmaxGFP™ es más pequeño que el plásmido pCMV3-FGF2-Flag lo que aumenta su probabilidad de ingreso a la célula, lo que se refleja en la diferencia del nivel de expresión de las proteínas. Otra causa, está relacionada con el tiempo de incubación de las células con el reactivo BrefeldinA, se ha descrito que este parámetro debe ser estandarizado para cada tipo celular, por lo tanto, si el tiempo de incubación no fue el suficiente para generar el arresto intracelular de la proteína FGF2-Flag, esta se secretó al medio de cultivo. Finalmente, el tiempo post-nucleofección para evaluar la expresión de la proteína FGF2-Flag en las CEM-GW fue muy prologado (7 días), ya que la transfección es transitoria existe una alta probabilidad de pérdida del plásmido durante la duplicación celular, lo que se refleja en el bajo nivel de expresión de la proteína recombinante detectada.

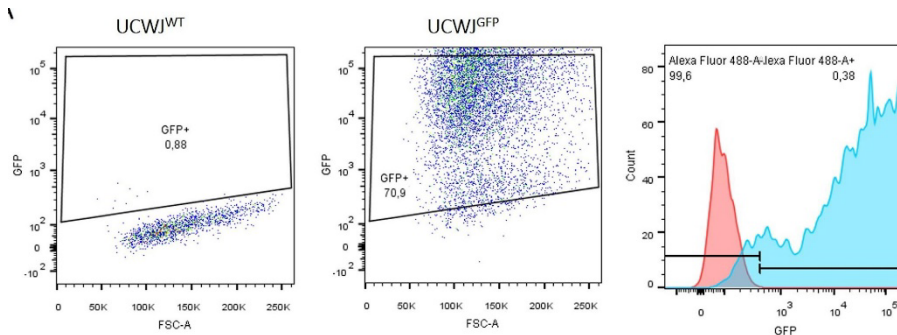
Teniendo en cuenta las causas mencionadas, se dio paso a un nuevo ensayo con las siguientes variaciones experimentales: 1. Formato de la nucleofección en cubetas, 2. Tiempo de incubación con la BrefeldinA 4h y 3. Tiempo de medición de la expresión de la proteína FGF2-Flag post-nucleofección, 48h. Las condiciones experimentales se muestran en la **Tabla 2**. Se siguió el mismo protocolo, el del fabricante, mencionado anteriormente y se utilizó el mismo kit de nucleofección. Después de 48 horas post-nucleofección (hpn) se evaluó la expresión de la proteína recombinante (FGF2-Flag) por citometría de flujo siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente, incrementando el tiempo de incubación con BrefeldinA.

**Tabla 2.** Condiciones experimentales para la transfección por nucleofección de las CEM-GW con el plásmido pCMV3-FGF2-Flag.

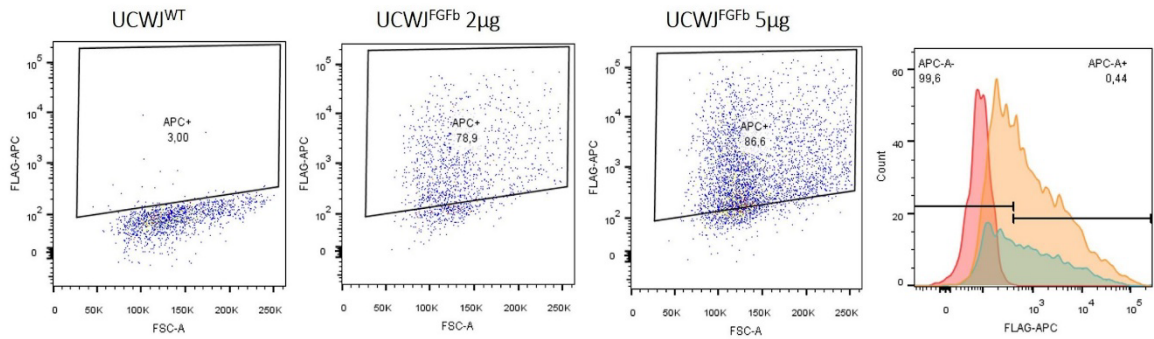
| Condición         | Características          | Cantidad |
|-------------------|--------------------------|----------|
| CEM-GW            | UCWJ 126 – P6            |          |
| Número de células | 545.000                  |          |
| Control positivo  | Plásmido pmaxGFP™        | 2 µg     |
| Control negativo  | Sin ADN con programa     |          |
| Tratamiento       | Plásmido pCMV3-FGF2-Flag | 2 µg     |
|                   |                          | 5 µg     |

La **Figura 4A.**, muestra una vez más alta proporción de las CEM-GW transfectadas con el vector pmaxGFP™ expresando la proteína GFP (70,9%), validando que las condiciones experimentales ensayadas permitieron la obtención de una transfección adecuada que es reproducible. Por otro lado, las células CEM-GW sin transfección (*wildtype*) no muestran expresión de la proteína GFP (UCWJ<sup>WT</sup>, **Figura 4A.**). Con relación al nivel de expresión de la proteína FGF2-Flag, la **Figura 4B.** muestra que bajo las condiciones experimentales ensayadas se logró un incremento significativo en el nivel de expresión de la proteína recombinante en las CEM-GW, ya que el porcentaje de células positivas a la fluorescencia se encuentra entre el 78,9 – 86,6%. En este ensayo se observa diferencia entre las dos cantidades de plásmido utilizadas en el ensayo, hay una relación proporcional entre la cantidad de plásmido transferido y el porcentaje de CEM-GW positivas, 78,9% y 86,6%, para 2µg y 5µg de plásmido pCMV3-FGF2-Flag, respectivamente (**Figura 4B.**). De esta manera los resultados muestran que las condiciones experimentales establecidas en este ensayo conducen a una eficiente transfección de las CEM-GW por nucleofección, del plásmido pCMV3-FGF2-Flag, lo que permitió evaluar el efecto de la modificación genética en las características biológicas de las células.

**A.**



## B.

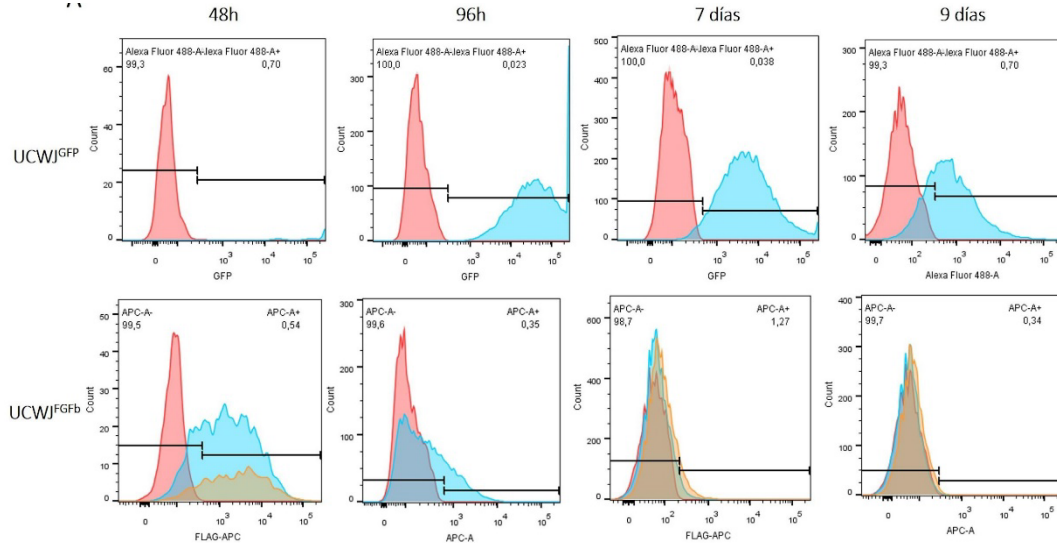


**Figura 4. Segundo ensayo de transfección por nucleofección del vector pmaxGFP™ y el vector pCMV3-FGF2-Flag en las CEM-GW. A.** Citometría de flujo de las células CEM-GW después de 48 horas post-nucleofección (hpn) con el vector pmaxGFP™. Histograma rojo: UCWJ<sup>WT</sup> h, histograma azul: UCWJ<sup>GFP</sup>. **B.** Citometría de flujo de las CEM-GW después de 48 horas post-nucleofección (hpn) con el vector pCMV3-FGF2-Flag. Histograma rojo: UCWJ<sup>WT</sup> h, histograma azul: UCWJ<sup>FGFb</sup> 2µg, histograma naranja: UCWJ<sup>FGFb</sup> 5µg. UCWJ<sup>WT</sup>: CEM-GW no transfectadas. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW transfectadas con el vector pmaxGFP™, expresando la proteína GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW transfectadas con el vector pCMV3-FGF2-Flag, expresando la proteína FGF2-Flag.

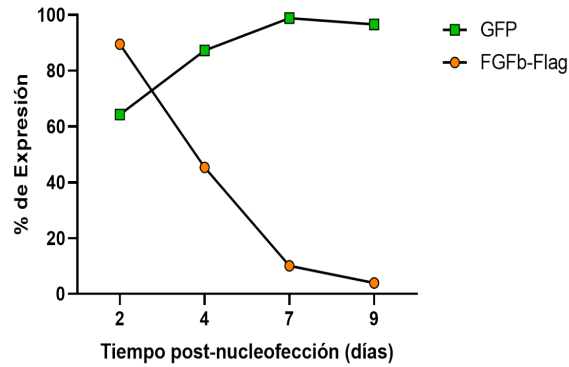
Teniendo en cuenta la dependencia del nivel de expresión de las proteínas GFP y FGF2-Flag con el tiempo de post-nucleofección, se realizó un ensayo para evaluar el cambio en el nivel de expresión de las proteínas dependiendo del tiempo post-nucleofección. Las condiciones experimentales para la transfección del vector pCMV3-FGF2-Flag por nucleofección en las CEM-GW, corresponden a las establecidas en este último experimento (ver **Tabla 2.**). Posteriormente, se colectaron las células durante los siguientes tiempos post-nucleofección: 48h, 96h (4 días), 7 días y 9 días. El nivel de expresión de las proteínas (GFP y FGF2-Flag) se midió por citometría de flujo. La **Figura 5A.**, muestra que a medida que aumenta el tiempo post-nucleofección, la fluorescencia de la proteína FGF2-Flag (APC<sup>+</sup>, panel inferior) va disminuyendo de manera significativa (corrimiento hacia la izquierda de la curva azul y naranja), casi hasta superponerse con la condición basal. De manera contraria, la fluorescencia de la proteína GFP no disminuye, se observa fluorescencia positiva en la mayoría de las células incluso a los 9 días post-transfección posiblemente debido a que la eficiencia en la expresión proteica y su acumulación en diversos compartimientos celulares. La disminución de la fluorescencia de la proteína FGF2-Flag se graficó como el porcentaje del nivel de expresión de la proteína en las CEM-GW (**Figura 5B.**). La disminución del porcentaje de expresión de la proteína FGFb-Flag se relaciona con el carácter transitorio del método de transferencia génica utilizado, ya que hay alta probabilidad de pérdida del plásmido durante la duplicación celular, y por lo tanto

disminución del nivel de expresión de la proteína recombinante. Estos resultados fueron validados mediante la determinación de la concentración del factor en los sobrenadantes del ensayo por ELISA (**Figura 5C.**)

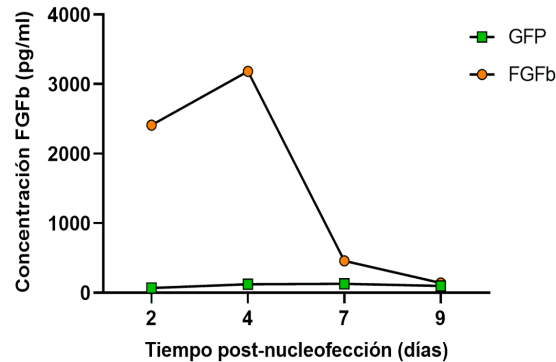
**A.**



**B.**



**C.**

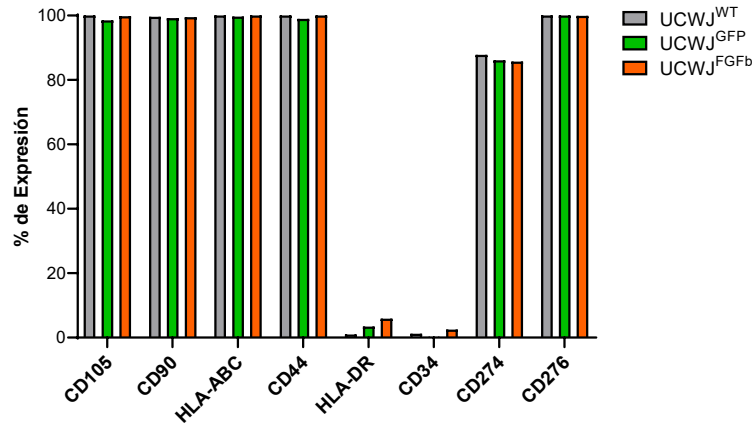


**Figura 5. Cambio en el nivel de expresión de las proteínas GFP y FGF2-Flag, durante diferentes tiempos post-nucleofección.** **A.** Citometría de flujo de las células CEM-GW después de 48h, 96h, 7 y 9 días post-nucleofección con el vector pmaxGFP™ (panel superior) y con el vector pCMV3-FGF2-Flag (panel inferior). **B.** Gráfica del cambio en el nivel de expresión de las proteínas GFP y FGF2-Flag, medido por citometría de flujo. **C.** Gráfica del cambio en la concentración del factor FGFb, medida en los sobrenadantes por ELISA. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW transfectadas con el vector pmaxGFP™, expresando la proteína GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW transfectadas con el vector pCMV3-FGF2-Flag, expresando la proteína FGF2-Flag.

Los resultados de estos ensayos evidencian que el método de nucleofección, bajo las condiciones experimentales estandarizadas, permite realizar con alta eficiencia transfección de vectores no virales en un cultivo de células primarias, como lo son las CEM-GW. Esta transferencia, que es transitoria, generó altos niveles de expresión de la proteína recombinante FGF2-Flag hasta por 96h post-nucleofección, según la cuantificación realizada por citometría de flujo. Las condiciones experimentales estandarizadas fueron utilizadas para evaluar el efecto de la modificación genética transitoria, en las características biológicas de las CEM-GW.

### **3.1.3 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la proteína FGFb en las propiedades biológicas de las CEM-GW**

Una vez estandarizadas las condiciones de transfección por nucleofección del plásmido pCMV3-FGF2-Flag, para la expresión de la proteína recombinante FGF2-Flag en las CEM-GW, se evaluó el efecto de la sobreexpresión del factor en las propiedades biológicas de las células en términos de fenotipo y de proliferación. El experimento para la medición del efecto de la sobreexpresión de la proteína recombinante FGF2-Flag en las dos propiedades biológicas, consistió en la nucleofección de las CEM-GW con el vector pCMV3-FGF2-Flag, y como controles experimentales células transfectadas con el vector pmaxGFP™ y células no transfectadas. Después de 96h post-nucleofección (hpn) las células fueron recolectadas para la medición por citometría de flujo del nivel de expresión de las proteínas GFP y FGF2-Flag. Se encontró que el 87,6% de las CEM-GW mostraron expresión de la proteína GFP, mientras que el 48,8% mostraron expresión de la proteína FGF2-Flag. Las células se marcaron con los anticuerpos dirigidos hacia los marcadores de superficie: CD105, CD90, HLA-ABC, CD44, HLA-DR, CD34, CD274 y CD276. Se midieron células no marcadas y marcadas con los correspondientes isotipos de los marcadores de superficie, como controles.



**Figura 6. Efecto de la sobreexpresión del factor de crecimiento FGF2-Flag, en el fenotipo de las CEM-GW.** Las CEM-GW fueron transfectadas por nucleofección con los vectores pmaxGFP<sup>TM</sup> y pCMV3-FGF2-Flag. 96h post-nucleofección fueron recolectadas para lectura de GFP directamente en el citómetro de flujo, y para marcación con los anticuerpos anti-Flag y los dirigidos hacia los diferentes marcadores de superficie evaluados. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW transfectadas con el vector pmaxGFP<sup>TM</sup>, expresando la proteína GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW transfectadas con el vector pCMV3-FGF2-Flag, expresando la proteína FGF2-Flag. Los datos son resultados de dos mediciones (n=2 por grupo).

La **Figura 6** muestra el resultado obtenido del porcentaje de expresión de los marcadores de superficie en las CEM-GW modificadas genéticamente con el vector no viral pCMV3-FGF2-Flag (UCWJ<sup>FGFb</sup>), en comparación con el nivel de expresión de los marcadores en CEM-GW sin la modificación genética (UCWJ<sup>WT</sup>) y expresando GFP (UCW<sup>GFP</sup>). Las poblaciones celulares muestran expresión de los marcadores de superficie característicos de las CEM-GW, CD105, CD90, CD44 y HLA-ABC. Los marcadores CD105 y CD44 son glicoproteínas relacionadas con la interacción célula-célula. El marcador de superficie HLA-ABC es un antígeno de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I). Por otro lado, las poblaciones celulares muestran carencia de expresión de los marcadores de superficie HLA-DR y CD34. El marcador de superficie HLA-DR es un antígeno de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I), mientras que CD34 es un marcador hematopoyético. Estos resultados están de acuerdo con lo que se ha reportado en la literatura sobre la expresión y ausencia de ciertas proteínas de membrana que caracterizan la población celular de CEM. A pesar de que no encuentran en el panel de caracterización de CEM, se evaluaron otros dos marcadores de superficie, CD274 y CD276, PD-L1 y PD1, respectivamente. Resultados previos en nuestro grupo de investigación han mostrado que la expresión de estas moléculas podría estar asociada con unos de los mecanismos por medio del cual las CEM-GW ejercen su potencial inmunomodulador (Cruz-Barrera et al., 2020). Por tal razón, fueron incluidos en este experimento. Se observa que las poblaciones

celulares muestran expresión de las dos proteínas de superficie, en donde CD274 se encuentra a un nivel de expresión menor que CD276.

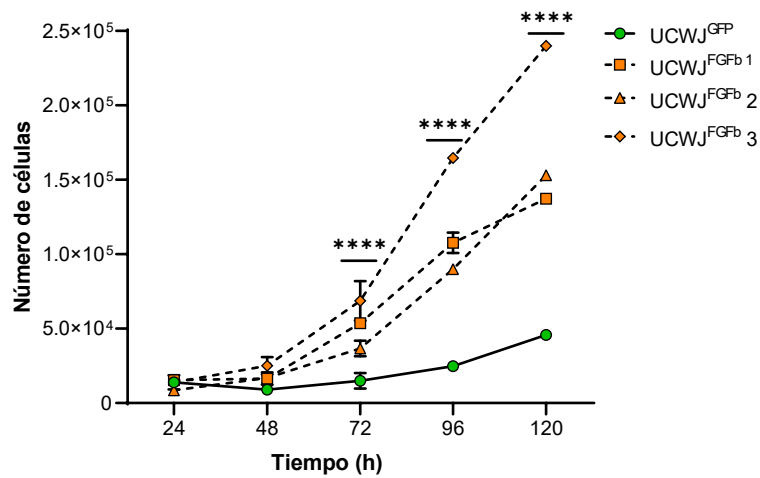
Es importante resaltar que no hay cambio significativo en el nivel de expresión de los marcadores de superficie entre las CEM-GW modificadas genéticamente en comparación con las células no modificadas. El resultado de la evaluación de la expresión de los marcadores de superficie evidencia que la modificación genética no viral de las CEM-GW para la sobreexpresión del factor de crecimiento FGFb, no modifica su propiedad biológica en términos de fenotipo o expresión de marcadores de superficie característicos de las CEM, relacionados con interacción célula-célula, adhesión celular, inmunofenotipo e inmunomodulación. De esta manera, se sugiere que la sobreexpresión del factor FGFb no va a influir de manera negativa en las propiedades innatas de las CEM-GW.

En el siguiente experimento se evaluó el efecto de la sobreexpresión de la proteína FGF2-Flag en la proliferación de las CEM-GW. El ensayo consistió en la nucleofección de las CEM-GW (3 donantes) con el vector pCMV3-FGF2-Flag, y como control experimental células transfectadas con el vector pmaxGFP™. Durante 5 días post-nucleofección se realizó conteo celular, cada 24h. Adicionalmente, se colectaron los sobrenadantes de cada uno de los tiempos post-nucleofección para la medición del nivel de expresión de la proteína FGF2-Flag por ensayos de ELISA. En la **Figura 7A.**, los resultados muestran que los conteos celulares para las CEM-GW transfectadas con el vector pCMV3-FGF2-Flag fueron mayores (símbolos color naranja) en comparación con las células control (círculos verdes), durante los cinco tiempos post-nucleofección evaluados. Este comportamiento que es el mismo en los 3 donantes evaluados, evidencia que es un comportamiento reproducible. Por otro lado, es interesante notar que si bien las curvas de crecimiento para las células transfectadas con el vector pCMV3-FGF2-Flag están siempre por encima del control, el comportamiento entre ellas es diferente entre cada donante, es decir es donante-dependiente. Esta observación es de esperar ya que las células corresponden a un cultivo primario, razón por la cual las propiedades biológicas de las células van a depender del donante.

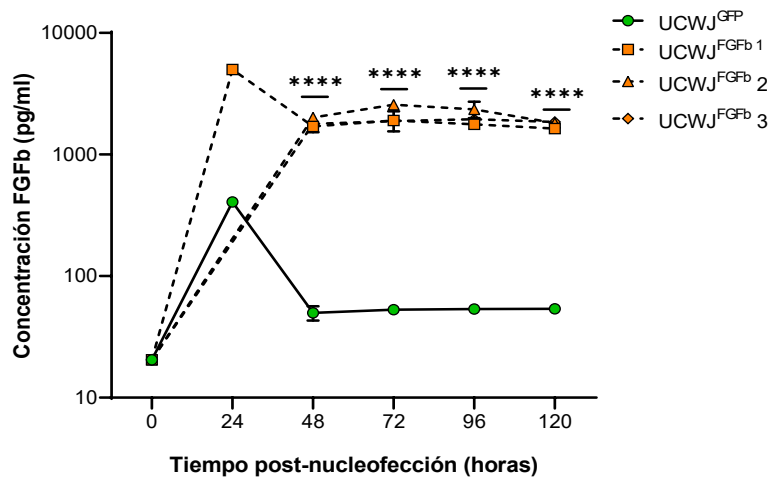
El incremento en la proliferación de las CEM-GW transfectadas con el vector pCMV3-FGF2-Flag está relacionado con el incremento en la concentración de la proteína FGF2-Flag medida en los sobrenadantes por ELISA (**Figura 7B.**). Las CEM-GW transfectadas

con el vector pCMV3-FGF2-Flag muestran incremento en el nivel de expresión de la proteína FGF2-Flag (**Figura 7B.**, símbolos color naranja) en comparación con las células control, las cuales muestran un nivel de expresión basal del factor (**Figura 7B.**, círculos verdes). Este comportamiento es reproducible entre los donantes de CEM-GW evaluados. Es notable en el comportamiento medido, que hay un pico de concentración a las 24h post-nucleofección que se estabiliza luego de 48hpn hasta las 120hpn. Por otro lado, es interesante notar que el incremento en el nivel de expresión de la proteína FGF2-Flag es similar entre donantes, lo estaría sugiriendo una eficiencia de transfección uniforme entre los donantes.

**A.**



**B.**



**Figura 7. Efecto de la sobreexpresión del factor de crecimiento FGF2-Flag, en la proliferación de las CEM-GW.** Las CEM-GW fueron transfectadas por nucleofección con los vectores pmaxGFP™ y pCMV3-FGF2-Flag. Durante 5 días post-nucleofección se realizaron conteos

celulares cada 24h. **A.** Curva de crecimiento de los donantes transfectados con el vector pCMV3-FGF2-Flag (símbolos naranjas) y de las células control (círculos verdes). **B.** Concentración del factor FGFb en los sobrenadantes de las CEM-GW transfectadas con el vector pCMV3-FGF2-Flag (símbolos naranjas) y de las células control (círculos verdes). UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW transfectadas con el vector pmaxGFP<sup>TM</sup>, expresando la proteína GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW transfectadas con el vector pCMV3-FGF2-Flag, expresando la proteína FGF2-Flag. Los resultados son de dos mediciones (n=2 por grupo). \*\*\*\* p<0,0001 de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples ANOVA de dos vías, Sidak.

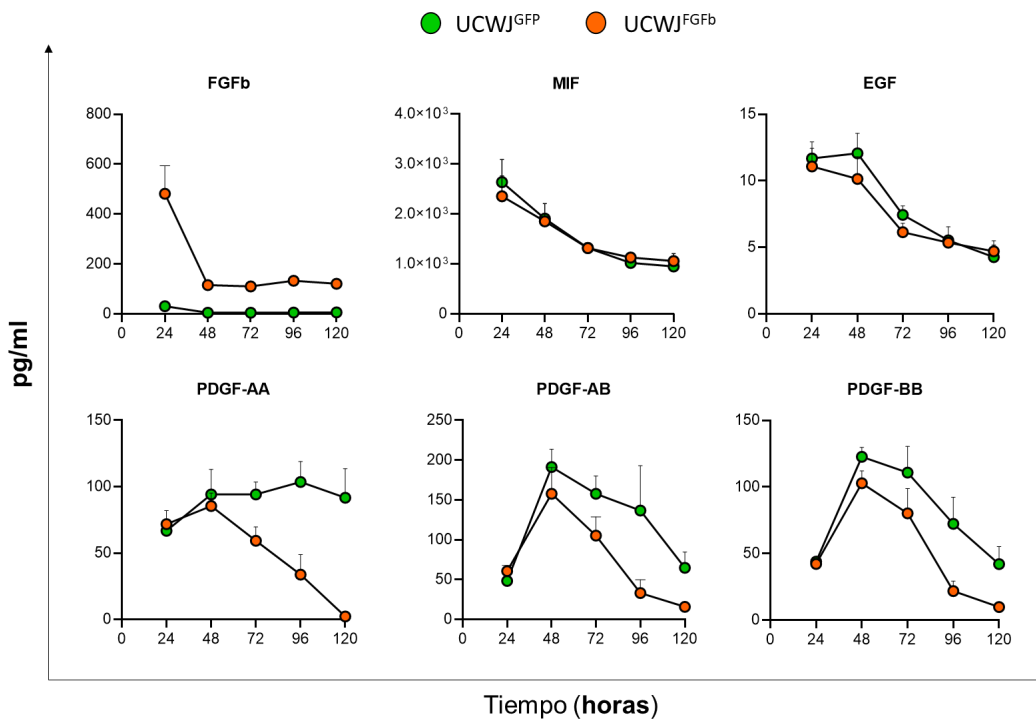
### 3.1.4 Perfil de secreción de factores solubles de las CEM-GW modificadas genéticamente por nucleofección, para la sobreexpresión de la proteína FGFb

Los sobrenadantes colectados de las curvas de crecimiento para los tres donantes de CEM-GW nucleofectadas para la sobreexpresión del factor FGFb, en comparación con CEM-GW expresando GFP, se analizaron en un ensayo multiplex de ELISA para determinar la cinética de producción y consumo de citoquinas y factores de crecimiento, que están directa o indirectamente relacionados con la proliferación de las CEM. Inicialmente, es interesante observar que las CEM-GW transfectadas con el vector pCMV3-FGF2-Flag (UCWJ<sup>FGFb</sup>) muestran siempre mayor concentración del factor FGFb (**Figura 8A**, panel FGFb, círculos naranjas) en comparación con las células control (UCWJ<sup>GFP</sup>), las cuales muestran la cinética normal de consumo del factor durante la proliferación de las CEM-GW (**Figura 8A**, panel FGFb círculos verdes). Este comportamiento fue reproducible entre los donantes de CEM-GW evaluados. Posteriormente, el análisis de los resultados evidenció un panel de factores solubles que son principalmente consumidos por las CEM-GW durante su expansión con hLP, con un patrón similar entre las CEM-GW modificadas genéticamente para la sobreexpresión del factor FGFb, y las células control. Específicamente, encontramos una reducción significativa de la familia PDGF AA (96,9%), AB (89,7%), BB (90,5%) y FGFb (74,4%) en UCWJ<sup>FGFb</sup> expuestas a hLP después de 5 días de cultivo (en comparación con el día 1, **Figura 8A**). Además, las UCWJ<sup>FGFb</sup> también consumieron activamente otros factores fuertemente enriquecidos en hLP durante 5 días de cultivo, incluidos MIF (55,0%) y EGF (57,3%). Resultados previos en nuestro grupo de investigación validaron que el consumo de los factores evaluados se correlaciona con la alta concentración de estos en el hLP en comparación con las concentraciones iniciales presentes en el suero humano y el suero fetal bovino. Por lo tanto, bajo una alta disponibilidad de factores de crecimiento, las CEM-GW muestran una clara dependencia

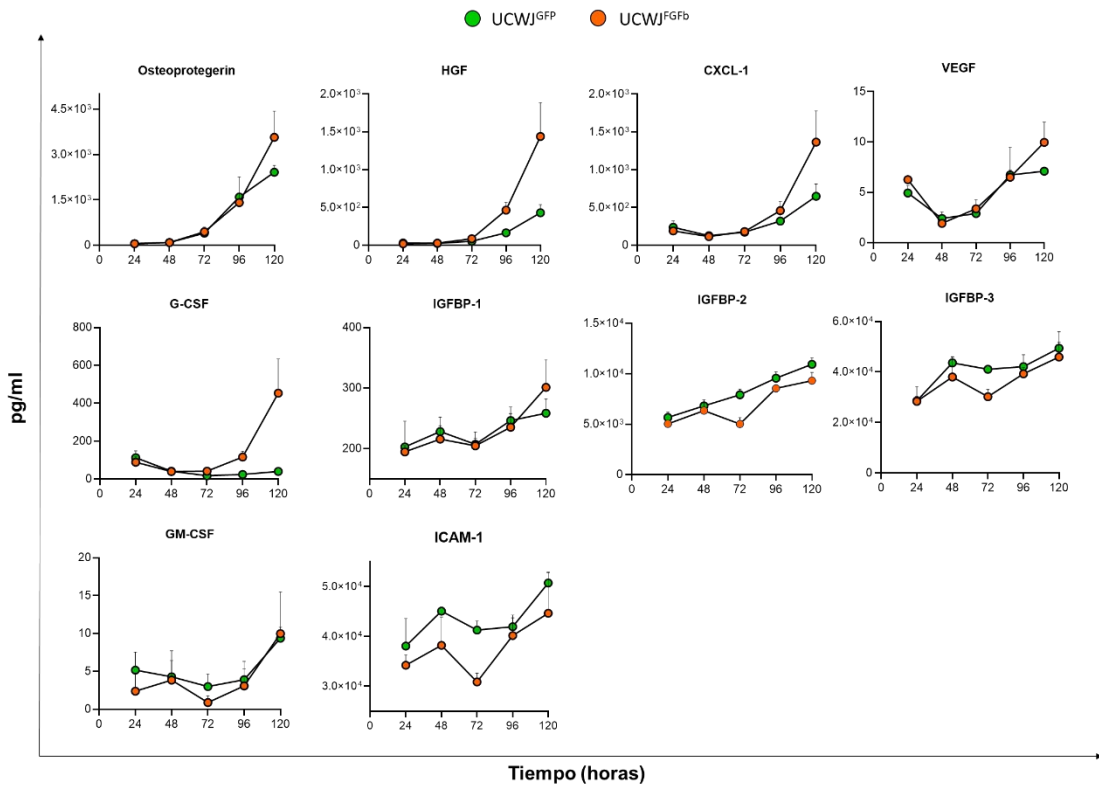
de estos factores y los utiliza para apoyar la proliferación activa (Cañas-Arboleda, Beltrán, Medina, Camacho, & Salguero, 2020).

Por otro lado, los resultados evidenciaron un panel de factores solubles que son producidos por las CEM-GW durante su expansión con hLP, con un patrón similar entre las CEM-GW modificadas genéticamente para la sobreexpresión del factor FGFb, y las células control. En el día 5, se detectó una acumulación significativa de osteoprotegerina (62,6X), HGF (48,0X), CXCL-1 (7,1X), GM-CSF (4,2X) y G-CSF (5,1X) en sobrenadantes de UCWJ<sup>FGFb</sup> cultivados en hLP (en comparación con el día 1, **Figura 8B**). Factores adicionales como VEGF (1,5 veces), ICAM-1 (1,3X) y la familia IGFBP-1, -2 y -3 (1,5X, 1,8X y 1,6X, respectivamente), en comparación con el día 1, también mostraron un enriquecimiento en la cinética de proliferación de las UCWJ<sup>FGFb</sup> con hLP. Finalmente, los resultados mostraron un último panel de proteínas evaluadas, en las que se observó equilibrio en la cinética de consumo y producción durante la fase de proliferación de las CEM-GW modificadas genéticamente: Angiogenina, RANTES, IL-10, IL-6, TNF $\alpha$ , MSP/MST-1 y VCAM-1 (**Figura 8C**).

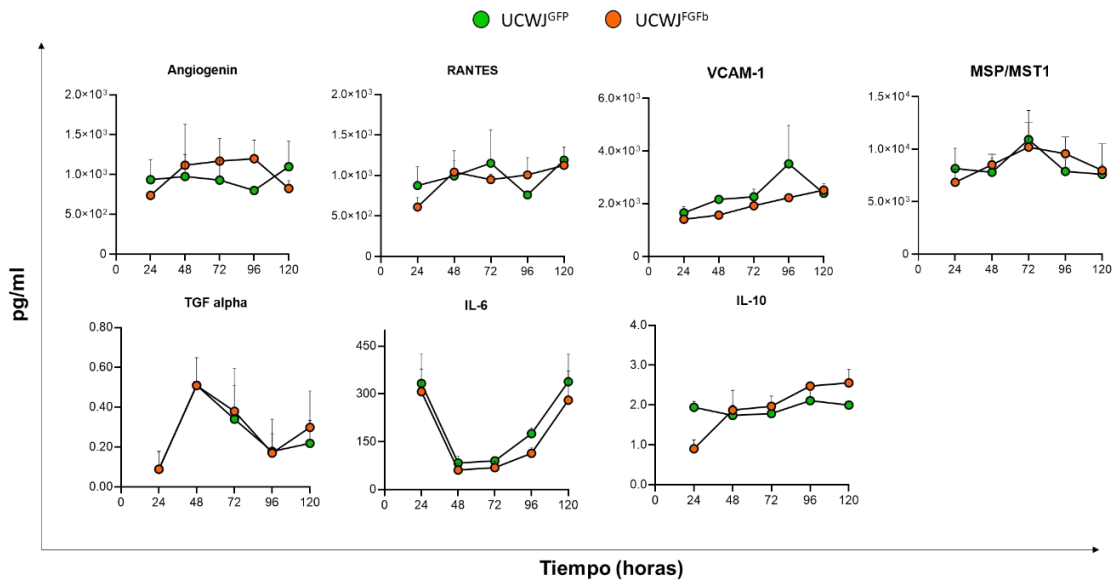
A.



B.



C.



**Figura 8. Perfil de secreción de factores solubles de las CEM-GW modificadas genéticamente por nucleofección, para la sobreexpresión de la proteína FGFb.** Las CEM-GW (n=3 donantes) fueron transfectadas por nucleofección con los vectores pmaxGFP™ y pCMV3-FGF2-Flag. Durante 5 días post-nucleofección se colectaron sobrenadantes cada 24h. **A.** Citocinas y factores de crecimiento consumidos por UCWJ<sup>FGFb</sup> cultivados en hLP, en comparación con células control,

UCWJ<sup>GFP</sup>. **B.** Citocinas y factores de crecimiento secretados por UCWJ<sup>FGFb</sup> cultivados en hLP, en comparación con células control, UCWJ<sup>GFP</sup>. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW transfectadas con el vector pmaxGFP<sup>TM</sup>, expresando la proteína GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW transfectadas con el vector pCMV3-FGF2-Flag, expresando la proteína FGF2-Flag. Los resultados son de tres donantes (n=3 por grupo).

## 3.2 Modificación genética estable de las CEM-GW con un vector viral (Lentivirus)

Las partículas virales seleccionadas para la modificación genética de las CEM-GW fueron las partículas lentivirales (LV). Los LV son herramientas versátiles por su habilidad de transducir células que no se dividen. Estos virus generan expresiones génicas estables a largo plazo y el material genético transportado por las partículas se integra en el genoma del huésped. Esta sección de los resultados describe la estandarización para optimizar la producción de partículas LV de tercera generación, la estandarización para la transducción de las CEM-GW y la evaluación del impacto de una infección controlada en las propiedades biológicas de las CEM-GW, en términos de expresión de marcadores de superficie, proliferación, diferenciación e inmunomodulación.

### 3.2.1 Vector de transferencia viral del gen *FGFb*

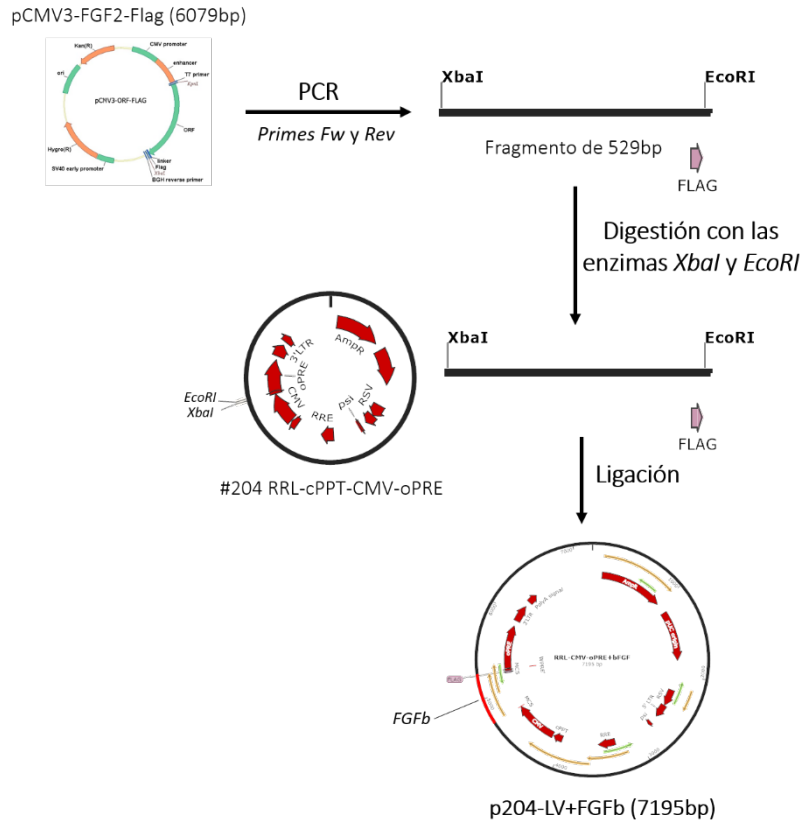
El sistema lentiviral permite el empaquetamiento de partículas LV de tercera generación a partir de la transfección de cuatro plásmidos en la línea celular mamífera HEK293. Uno de estos vectores corresponde al vector de transferencia lentiviral, el cual contiene el gen de interés, que para este estudio corresponde al factor de crecimiento FGFb. El vector de transferencia lentiviral disponible en el laboratorio fue el vector identificado como #204 RRL-cPPT-CMV-oPRE (6709bp, p204LV). La estrategia de clonación diseñada se basó en la sub-clonación del gen utilizando enzimas de restricción (**Figura 9**). La estrategia como se describirá más adelante incluyó un paso de amplificación por PCR, ya que las enzimas de restricción que flanquean la secuencia en el vector comercial, no se encuentran en el SMC del vector p204-LV. Esta estrategia de sub-clonación fue validada *in silico* utilizando las herramientas bioinformáticas Benchling (Life Sciences R&D - R&D platform - <https://www.benchling.com/> y Genome Compiler (Corporation - [www.genomecompiler.com](http://www.genomecompiler.com)).

Para la amplificación por PCR, se diseñaron *primers* (*forward* hFGFb-alfa-LV-XbaI y *reverse* hFGFb-omega-LV-EcoRI) utilizando como plantilla la secuencia reportada en el

vector comercial (pCMV3-FGF2-Flag). Los primers contienen las secuencias de las enzimas de restricción XbaI en el extremo 5' y EcoRI en el extremo 3', que se seleccionaron teniendo en cuenta diferentes aspectos: 1) Secuencias presentes en el SMC del vector p204-LV. 2) Secuencias ausentes dentro de la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína FGFb. 3) Disponibilidad de las enzimas en el laboratorio. Por otro lado, es importante resaltar que la ubicación de las enzimas de restricción permitió la clonación del gen en la dirección correcta para la generación apropiada del transcrito (mRNA) y proteína. Adicionalmente, el primer *forward* contiene la secuencia Kosak (ACCATGG) corriente abajo de la secuencia para la enzima de restricción XbaI, en la que se encuentra el codón de inicio ATG. Por su parte, el primer *reverse* contiene el codón *stop* corriente abajo de la secuencia de la enzima de restricción EcoRI. La **Tabla 3** muestra la secuencia de los *primers* diseñados y las características descritas anteriormente.

**Tabla 3.** Secuencia y características de los *primers* diseñados para la amplificación por PCR del ORF del factor FGFb.

| <i>Primer</i>        | Secuencia (5' → 3')                     | Características  |
|----------------------|---|--|
| hFGFb-alfa-LV-XbaI   | tgcTCTAGAACCATGGCAGCTGGGAGC<br>ATCACC   | Secuencia <b>Kosak</b><br><b>XbaI</b> Sitio de restricción |
| hFGFb-omega-LV-EcoRI | ccgGAATTCCTTACTTATCGTCGTCATCC<br>TTGTAA | Codón <b>STOP</b><br><b>EcoRI</b> Sitio de restricción     |

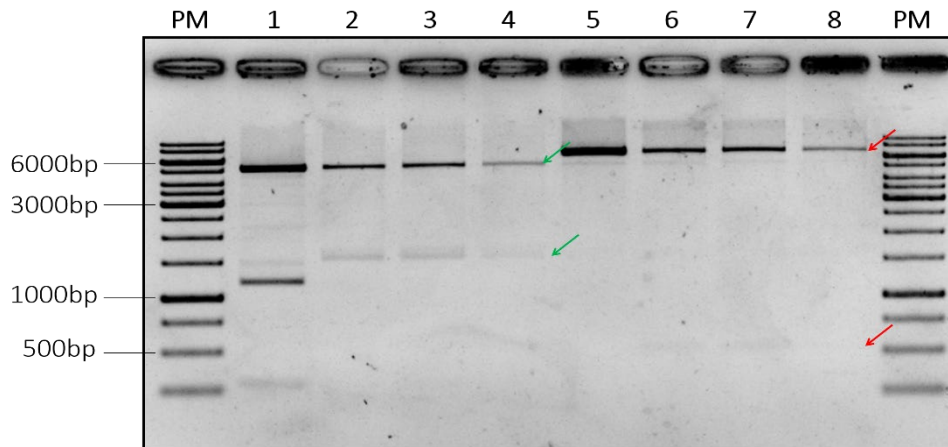


**Figura 9.** Diagrama de la estrategia de clonación para la sub-clonación de la ORF del factor FGFB en el vector de transferencia lentiviral p204-LV.

Una vez se amplificó por PCR el ORF de la proteína recombinante FGF2-Flag y se ligó en el vector p204-LV, se realizó verificación de la construcción por digestión con enzimas de restricción. El ADN plasmídico aislado fue utilizado para verificar por digestión con enzimas de restricción la construcción que corresponde a la sub-clonación del ORF del factor FGFB en el vector p204LV. Utilizando una herramienta bioinformática se realizó la simulación de la digestión *in silico* con las enzimas seleccionadas, para conocer el tamaño de los fragmentos generados y comparar con el resultado de la digestión. La digestión se realizó con dos pares de enzimas de restricción para validar los resultados, BamHI - NcoI, y XbaI - EcoRI. La pareja de enzimas BamHI - NcoI genera tres fragmentos con tamaños de 291bp, 1189bp y 5529bp, mientras que la pareja de enzimas XbaI - EcoRI, dos fragmentos con tamaños de 516bp y 6679bp. Las digestiones fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa.

La **Figura 10** muestra que el patrón de fragmentación de los plasmídicos obtenidos de tres colonias, corresponde con el tamaño de los fragmentos según el patrón de fragmentación

simulado *in silico*. De esta manera, el ADN plasmídico corresponde a la construcción esperada, es decir, la sub-clonación del ORF del factor FGFb en el vector p204LV. Estas construcciones (minipreps) fueron enviadas para confirmación por secuenciamiento. El secuenciamiento de las construcciones fue realizado con dos *primers* internos (hFGFb-102SeqF 5'- CAAGAATGGTGGCTTCTTCC -3'; hFGFb-345SeqR 5'- TGGTGTACTTCCTT GACCTG -3'). Las secuencias leídas en los electroferogramas fueron alineadas con la secuencia de la construcción obtenida por el análisis *in silico*. Los alineamientos mostraron un emparejamiento de las bases de las secuencias del 100%, para las tres construcciones evaluadas. La traducción *in silico* de estas secuencias y posterior alineamiento con la secuencia reportada en aminoácidos para el vector comercial, mostró que la secuencia de nucleótidos de la construcción obtenida traduce para la proteína del factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb) en fase con el tag FLAG. Esta construcción será de ahora en adelante identificada como p204-LV+FGFb, y se utilizó para la producción de las partículas LV-FGFb.



**Figura 10. Sub-clonación del ORF del factor FGFb en el vector de transferencia lentiviral p204LV.** Gel de electroforesis en gel de agarosa de la digestión del vector p204-LV+FGFb. Los carriles del 1 al 4 corresponden a la digestión del vector con las enzimas de restricción BamHI - NcoI. Los carriles del 5 al 8 corresponden a la digestión con las enzimas de restricción XbaI - EcoRI. Las flechas verdes señalan bandas de 1189bp y 5529bp, mientras que las flechas rojas señalan bandas de 516bp y 6679bp. Carriles: PM: marcador de peso molecular. 1 y 5: Vector p204LV vacío. 2 y 6: Vector p204-LV+FGFb Colonia 1. 3 y 7: Vector p204-LV+FGFb Colonia 2. 4 y 8: Vector p204-LV+FGFb Colonia 3.

### 3.2.2 Estandarización de la producción de partículas LV de tercera generación: evaluación diferentes métodos de transfección

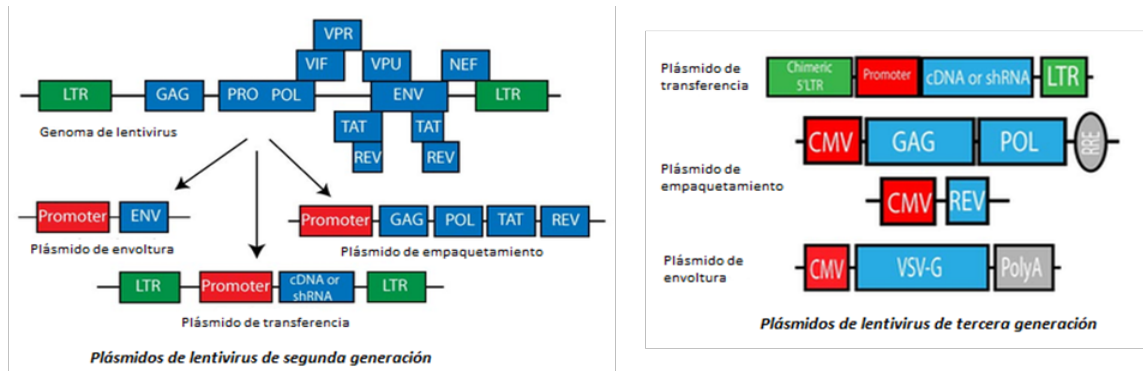
Las partículas lentivirales utilizadas para la transducción de las CEM-GW corresponden a partículas de tercera generación generadas a partir de la transfección simultánea de 4 plásmidos en células HEK. Los 4 plásmidos contienen los componentes necesarios para la producción de las partículas lentivirales. Los componentes son:

1. Vector o plásmido de transferencia lentiviral (VTLv) que contiene el gen de interés (que en este trabajo corresponde al plásmido p204-LV+FGFb): la secuencia del transgén es flanqueada por las secuencias de repetición terminal larga (LTR por su siglas en inglés), las cuales facilitan la integración de la secuencia del transgén en el genoma del huésped. La mayoría de los plásmidos de transferencia lentiviral se basan en el virus VIH-1. Por razones de seguridad, todos los plásmidos de transferencia son incompetentes para la replicación y pueden contener una eliminación adicional en el extremo 3'LTR, lo que hace que el virus se "autoinactivo" (*self-inactivating*, SIN) después de la integración (**Figura 11A**, panel derecho).
2. Plásmidos de empaquetamiento (pMDLg/pRRE y pRSV/Rev) (**Figura 11A**, panel derecho).
3. Plásmido de envoltura (pMD2.G) (**Figura 11A**, panel derecho).

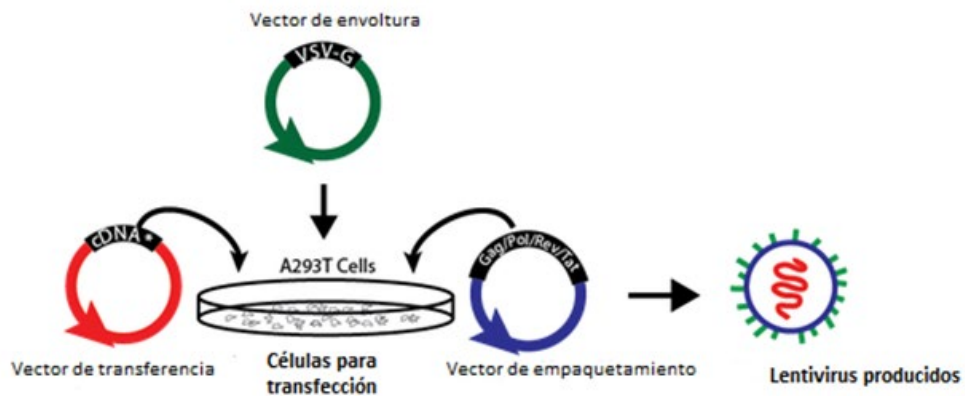
El panel izquierdo de la **Figura 11A**, muestra cómo el genoma del lentivirus es editado y distribuido a través de tres plásmidos que comprenden el sistema de lentivirus de segunda generación. Este sistema contiene un plásmido de empaquetamiento que codifica para los genes de las proteínas Gag, Pol, Rev y Tat (proteínas estructurales necesarias para la replicación del lentivirus). El plásmido de transferencia contiene los LTRs virales. A menos de que un promotor interno sea proporcionado, la expresión génica es conducida por el extremo 5'LTR, el cual es un promotor y requiere la presencia de Tat para activar la expresión. La proteína de envoltura, generalmente el pseudotipo del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G, debido a su amplia infectividad) es codificada en un tercer plásmido, plásmido de envoltura. El sistema de tercera generación mejora posteriormente la seguridad de la segunda generación (panel derecho **Figura 11A**). Primero, el sistema de empaquetamiento es dividido en dos plásmidos: uno codificando para Rev y otro para Gag y Pol. Aunque es más seguro, este sistema puede ser más difícil de usar y genera títulos

virales más bajos debido a la adición de un plásmido adicional. Segundo, el gen Tat es eliminado mediante la adición de un extremo 5'UTR quimérico unido a un promotor heterólogo en el plásmido de transferencia. La expresión del transgén desde este promotor ya no depende de la transactivación de Tat. (<https://www.addgene.org/guides/lentivirus/>). El proceso de producción de las partículas LV transgénicas se describe en el esquema mostrado en la **Figura 11B**. Tres o cuatro plásmidos son transfectados en células HEK 293T. Después de un cambio de medio y un periodo de incubación, el sobrenadante que contiene las partículas LV se cosecha y se almacena o centrifuga para concentrar las partículas virales. Los virus son entonces utilizados para transducir las células de interés. Aunque existen muchos protocolos publicados para la transfección de los plásmidos y después de varios ensayos utilizando un protocolo base, en este trabajo se decidió realizar la estandarización de diferentes condiciones experimentales para generar una producción estable y reproducible de las partículas LV.

**A.**



**B.**



**Figura 11. Plásmidos y estrategia molecular para la producción *in vitro* de partículas lentivirales.** **A.** Genoma del lentivirus y su distribución en los plásmidos de envoltura, empaquetamiento y transferencia, que corresponden al sistema lentiviral de segunda generación (panel izquierdo) y de tercera generación (panel derecho). **B.** Esquema del proceso de producción de partículas lentivirales *in vitro*. Los plásmidos son transferidos a células HEK293T utilizando diferentes métodos de transfección, que influyen en el título viral. El sobrenadante contiene las partículas lentivirales.

Los tres plásmidos estructurales (pMD2.G 5824bp, pMDLg/RRE 8895bp y pRSV/Rev 4174bp) utilizados en este trabajo han sido publicados anteriormente (Salguero et al., 2014) y hacen parte del banco de plásmidos de la UTA-IDCBIS. Los plásmidos fueron transformados en bacterias *E. coli* *Stbl 3* quimiocompetentes y el ADN plasmídico aislado fue verificado mediante digestión con enzimas de restricción. A partir de glicerol de bacteria, de los clones verificados, se realizaron preparaciones masivas (maxipreps) de los tres plásmidos mencionados, así como del VTLv p204-LV+FGFb, y un segundo VTLv, que contiene el gen que codifica para la proteína GFP, p#202-LV+GFP (p202-GFP, 7454bp). Una vez se verificó la cantidad y calidad de los plásmidos se iniciaron los ensayos de transfección en células mamíferas HEK 293. Estos ensayos se iniciaron con un protocolo que utiliza el fosfato de calcio. Este método químico de transfección se basa en la formación de un precipitado, entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos; estos forman unos agregados que son endocitados/fagocitados por las células, permitiendo la entrada del material genético exógeno. La eficiencia de la transfección se evidenció mediante microscopia de fluorescencia en las células transfectadas con el vector p202-GFP, mientras que la formación de las partículas LV funcionales se evaluó mediante un ensayo de titulación funcional. El ensayo de titulación funcional consiste en la transducción de células HEK293 con diferentes diluciones de las partículas LV que contienen GFP, después de 72h la transducción se evalúa por citometría de flujo a partir del porcentaje de expresión de la proteína en las células. Utilizando estos datos de citometría se calculó cuantitativamente el título viral (PVI, partículas virales infectivas), el cual se define cómo la cantidad de virus que infecta el 50% de una monocapa celular inoculada.

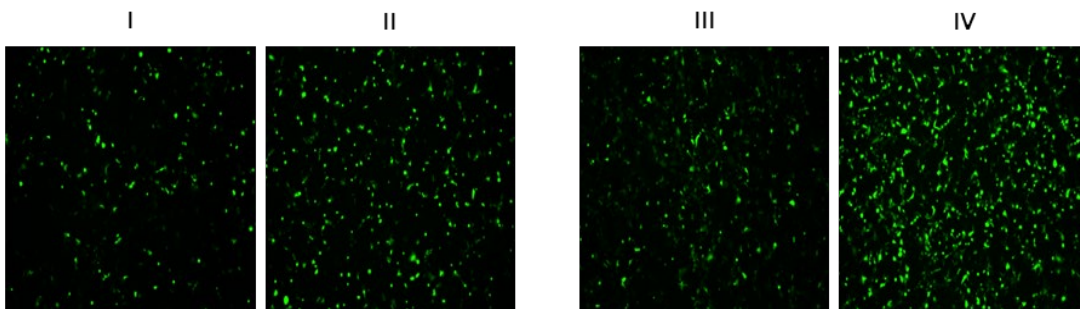
Los resultados que se describen a continuación se produjeron durante una estadía de investigación en el marco de la colaboración científica entre la UTA-IDCBIS y el Grupo de investigación "Medical RNA Biology" del Deutsches Primatenzentrum (DPZ) en Göttingen, Alemania. Los primeros ensayos de transfección evaluando dos cantidades de células HEK ( $5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^6$  células/pozo) y dos cantidades totales de ADN plasmídico ( $5 \mu\text{g}$  y

9,5µg), mostraron baja eficiencia de transfección, así como un bajo porcentaje de expresión de la proteína GFP, de menos del 20%. En ensayos posteriores repitiendo las condiciones experimentales y también modificando algunos pasos del protocolo inicial, se continuó obteniendo baja eficiencia de transfección y como consecuencia títulos virales muy bajos. En estos ensayos siempre se evidenció formación de un precipitado. Por lo tanto, los resultados mostraron que diferentes condiciones experimentales para la transfección de los plásmidos debían ser estandarizadas. En el siguiente protocolo de transfección ensayado se realizó ajuste en el pH de la solución de fosfatos de 7,05 a 7,12, así como la adición de butirato de sodio (BuNa) 24h post-transfección (hpt). Este reactivo incrementa la transcripción dependiente de potenciadores (*enhancers*). El tratamiento de las células transfectadas con BuNa puede resultar en un aumento de 2 a 3 veces en el número de células capaces de expresar el inserto. Con estas condiciones experimentales se obtuvo un incremento en la eficiencia de transfección al observar por microscopia una mayor señal de fluorescencia de la proteína GFP en las células HEK. Este resultado evidenció que el factor crítico de este método químico de transfección es el pH de la solución de fosfatos. Con los sobrenadantes colectados durante 5d post-transfección no se observó infección de las células HEK, lo que indicó que no se formaron muchas partículas virales. Otros ensayos se realizaron con estas condiciones experimentales sin resultados en la transducción (o infección). Estos resultados revelaron que la obtención de células HEK con expresión de la proteína GFP después de 24 hpt, no significa la formación de las partículas lentivirales, porque la formación de estas requiere el ingreso de los 4 plásmidos transfectados. Por otro lado, una célula HEK con expresión de la proteína GFP también revela que al menos el VTLv ingresó a la célula HEK. Debido a que con este ensayo se evidenció el efecto del pH, se realizó un último ensayo con este método de transfección evaluando tres valores de pH (7,05 – 7,10 y 7,15). Una vez más no se observó infección con los sobrenadantes colectados.

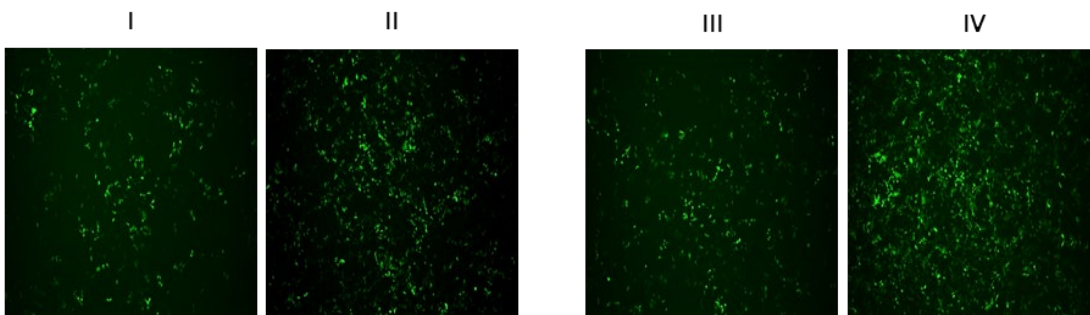
Debido a que no se obtuvieron los resultados esperados con el método químico de fosfato de calcio, los siguientes experimentos para la obtención de las partículas virales se realizaron con el método de transfección por nucleofección. De la misma manera, se evaluaron dos cantidades de células HEK ( $5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^6$  células/pozo) y dos cantidades de ADN plasmídico (5µg y 9,5µg). Se evaluaron diferentes relaciones HEK:ADN:  $5 \times 10^6$  células+5µg ADN (I),  $5 \times 10^6$  células+9,5µg ADN (II),  $1 \times 10^6$  células+5µg ADN (III) y  $1 \times 10^6$  células+5µg ADN (IV). Como control de la eficiencia del método de transfección se utilizó

el plásmido pmaxGFP™ (3464bp). Por microscopia de fluorescencia se evidenció la eficiencia de la transfección (**Figura 12A**), en la cual la expresión de la proteína GFP presentó un comportamiento de dosis dependencia, la expresión más alta de la proteína se obtuvo con la relación IV,  $1 \times 10^6$  células +  $9,5 \mu\text{g}$  ADN (**Figura 12A**, panel IV). Los sobrenadantes colectados 48hpt fueron evaluados mediante el ensayo de titulación funcional. En este ensayo se evaluaron 4 diluciones de los sobrenadantes incubando un número conocido de células HEK durante 72h. Después de este tiempo se observó expresión de la proteína GFP en las células HEK por microscopia de fluorescencia, como consecuencia de la transducción de las partículas LV formadas, donde la intensidad de la fluorescencia verde fue más intensa para la relación experimental IV (**Figura 12B**, panel IV). La **Figura 12C** muestra la cuantificación de la expresión de la proteína GFP por citometría de flujo, donde se evidenció un comportamiento dosis-dependiente de la transducción, además que se validó que el porcentaje más alto de expresión de la proteína GFP se obtuvo con la relación  $1 \times 10^6$  células –  $9,5 \mu\text{g}$  ADN (**Figura 12C**, línea punteada con triángulos blancos). A partir de estos datos se calculó para esta relación un título viral de 215.000 PVI/ml. Con los resultados obtenidos, se concluyó que la nucleofección, cómo método de transfección es eficiente para la transferencia de los 4 plásmidos necesarios para la formación de las partículas LV con el gen de interés.

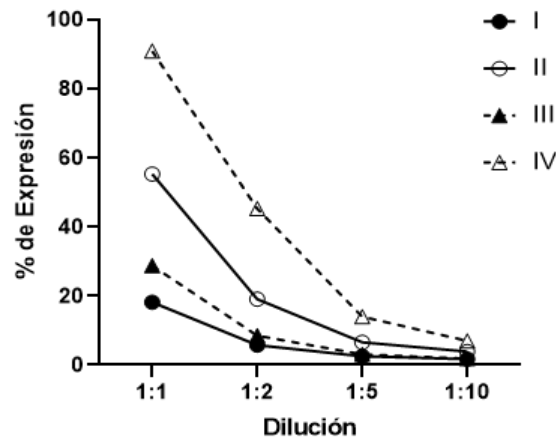
**A.**



**B.**



C.



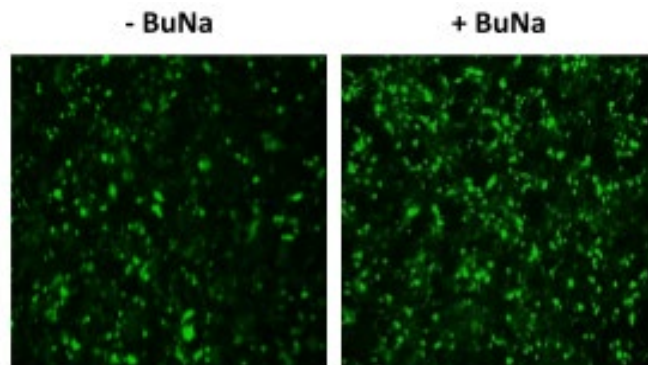
**Figura 12. Producción de partículas LV-GFP en células HEK293T, mediante transfección por nucleofección.** **A.** Fotos de microscopía de fluorescencia tomadas a las células HEK293T después de 24h post-nucleofección con los plásmidos estructurales pMD2.G, pMDLg/RRE y pRSV/Rev, y el VTLv p202LV+GFP, para la producción de las partículas LV. **I.**  $5 \times 10^6$  células+5 $\mu$ g ADN, **II.**  $5 \times 10^6$  células+9,5 $\mu$ g ADN, **III.**  $1 \times 10^6$  células+5 $\mu$ g ADN y **IV.**  $1 \times 10^6$  células+5 $\mu$ g ADN. **B.** Fotos de microscopía de fluorescencia tomadas a las células HEK293T transducidas con los LV recolectados (sobrenadantes) después de 48h post-nucleofección (hpn). **C.** Cuantificación del nivel de expresión de la proteína GFP en las células HEK293T transfectadas los LV recolectados 48hpn. Los resultados son de una medición (n=1 por grupo).

Durante el desarrollo de este trabajo se obtuvo acceso a una línea celular comercial especializada de células HEK para la producción de partículas LV (HEK293-LTV, Cell Biolabs Cat. N° LTV-100). La línea celular 293LTV es una línea celular permanente derivada de HEK293T que fue seleccionada para tener un alto rendimiento lentiviral. Esta línea celular se expande rápidamente y se adhiere firmemente a la placa de cultivo, lo que a veces puede ser problemático con las células 293T estándar. Una vez establecido el cultivo celular, se llevó a cabo el experimento de transfección de los plásmidos por nucleofección utilizando la relación  $1 \times 10^6$  células + 9,5 $\mu$ g ADN. En estos experimentos, dos condiciones experimentales adicionales se ensayaron, adición de BuNa después de 16hpt y recolección de los sobrenadantes 24h y 48h más tarde.

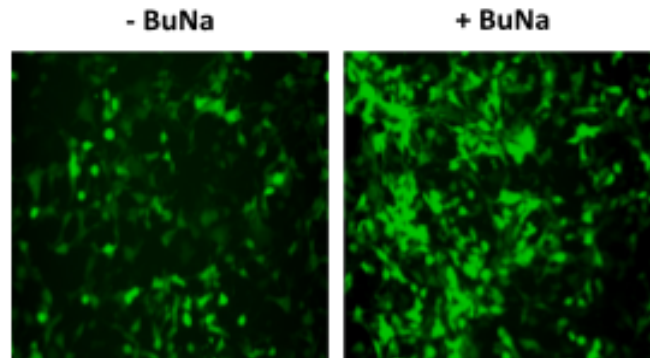
Por microscopía de fluorescencia se observó en las células 293LTV intensidad más fuerte de la expresión de GFP en comparación con las HEK estándar, así como una mejor viabilidad de las células y adhesión al frasco de cultivo, características que en los primeros ensayos influyeron en la eficiencia de producción de las partículas LV. Con la adición del BuNa se observó incremento en la expresión de la proteína GFP (**Figura 13A**, panel derecho) durante el proceso de transfección. La **Figura 13B**, muestra la microscopía de

fluorescencia de la infección de las células HEK293 con los sobrenadantes colectados 24h después de pre-incubar con y sin BuNa (panel derecho e izquierdo, respectivamente). Se observa expresión de la proteína GFP en las células HEK como consecuencia de la infección por las partículas LV formadas, además de un incremento en la expresión cuando las células fueron infectadas con los virus colectados de las células 293LTV tratadas con BuNa (**Figura 13B**, panel derecho). El análisis de los resultados obtenidos en el ensayo de titulación funcional con los sobrenadantes colectados 24 y 48h después de la pre-incubación y no, con BuNa, se muestran en la **Figura 13C**. Los datos muestran que hay una disminución significativa del porcentaje de expresión de GFP con los sobrenadantes colectados 48h después de pre-incubar con BuNa, indicando así una menor transducción (**Figura 13C**, líneas azules). Esto se asocia con la presencia de 13 veces más partículas virales en el título de los sobrenadantes colectados a las 24h con respecto al de 48h, 248.000 y 19.000 PVI/ml, respectivamente (**Figura 13C**, líneas negras). También se evidencia cuantitativamente que, para un mismo tiempo de colección, la pre-incubación de las células 293LTV con el BuNa durante la transfección, incrementa el título viral en 2,5 veces, 610.000 y 248.000 PVI/ml, con y sin BuNa, respectivamente. De este experimento se observó que una de las condiciones experimentales que tiene mayor impacto en la producción de las partículas virales es el tiempo de recolección de los sobrenadantes. Con estos resultados se establecieron diferentes condiciones experimentales para la producción eficiente de partículas LV mediante transfección por nucleofección.

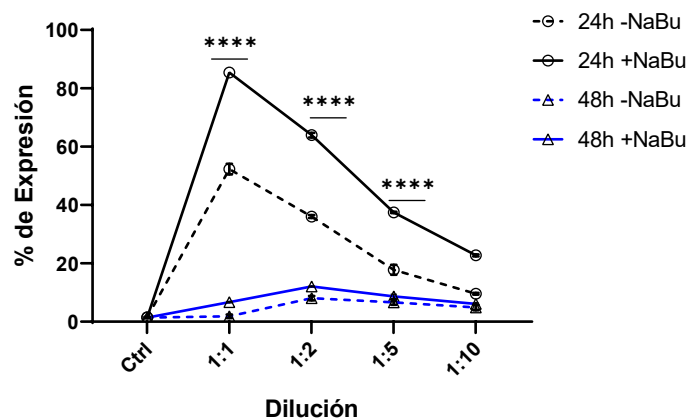
A.



B.



C.



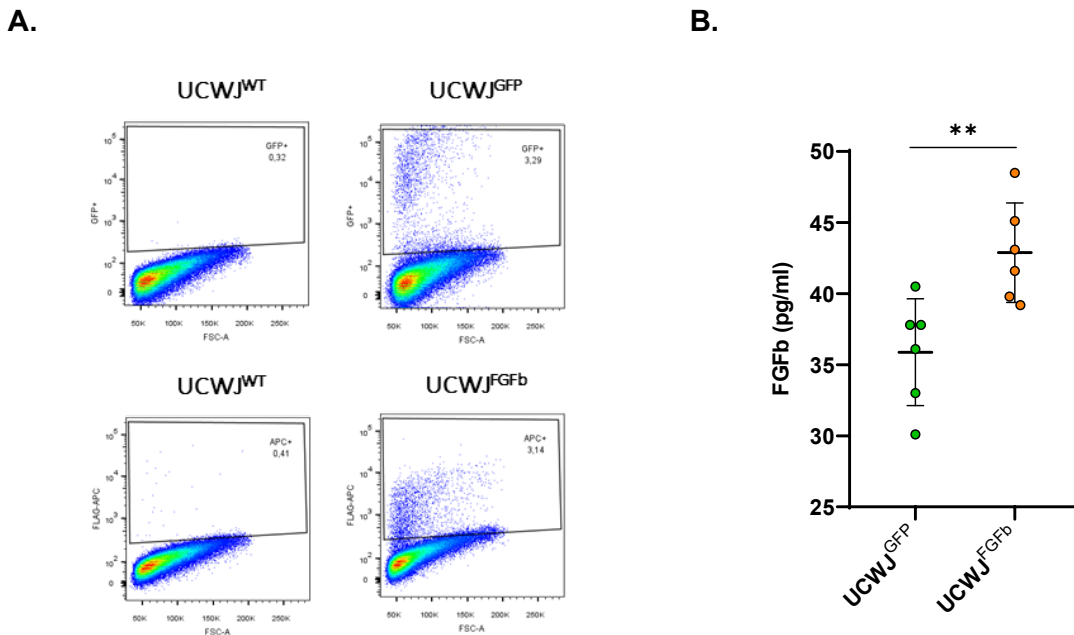
**Figura 13. Producción de partículas LV-GFP en células HEK293 LTV, mediante transfección por nucleofección A.** Fotos de microscopía de fluorescencia tomadas a las células HEK293 LTV después de 16h post-nucleofección más 8h de incubación con BuNa (panel derecho), y sin adición de BuNa (panel izquierdo). **B.** Fotos de microscopía de fluorescencia tomadas a las células HEK293 LTV infectadas con los LV recolectados (sobrenadantes) 24h después de la incubación con el BuNa (panel derecho) y sin BuNa (panel izquierdo). **C.** Cuantificación del nivel de expresión de la proteína GFP en las células HEK293T infectadas con los LV recolectados 24h y 48hpn, incubando con y sin BuNa. Los resultados son de dos mediciones (n=4 por grupo) \*\*\*\* p<0,0001 de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples ANOVA de dos vías, Sidak.

Estableciendo estas condiciones experimentales se inició la producción de partículas LV para el transgén FGFb-Flag, en paralelo con el transgén GFP, como control del proceso de producción y como medida de monitoreo rápido del proceso de empaquetamiento viral y eficiencia de transducción. Se utilizaron las condiciones experimentales estandarizadas en los ensayos anteriores, para la transfección de las células HEK293 LTV, con los VTLv p202-LV+GFP o p204-LV+FGFb. Con el análisis de los datos de citometría se calculó un título viral de 131.000 y 47.000 PVI/ml, para 24h y 48h, respectivamente. Una vez más el título viral disminuye en los sobrenadantes colectados a las 48h; sin embargo, en este experimento el título viral fue menor que el obtenido en el ensayo anterior. Estas partículas

virales se utilizaron para un ensayo inicial de transducción de tres donantes de CEM-GW, utilizando dos relaciones de multiplicidad de infección (MOI) 1 y 5, y la adición de sulfato de protamina. La relación MOI hace relación al número de viriones que son adicionados por célula durante la infección, si es 1 significa que 100.000 células son infectadas con 100.000 partículas virales. Por su parte, el sulfato de protamina es un polication cuya eficiencia de infección es comparable con la eficiencia obtenida con el polibreno, el reactivo más utilizado para incrementar la eficiencia de la infección retroviral. Se ha descrito que la eficiencia de la infección es hasta 7 veces más alta que en ausencia del polication. Por otro lado, debido a que el sulfato de protamina es aprobado para uso en humanos por la FDA de Estados Unidos, proporciona una alternativa eficaz al polibreno al desarrollar protocolos de terapia génica humana (Cornetta & Anderson, 1989). Las CEM-GW fueron colectadas después de 24, 48 y 72h post-transducción. La modificación genética de las CEM-GW para la sobreexpresión de las proteínas GFP y FGFb se analizó por citometría de flujo. El máximo porcentaje de sobreexpresión de la proteína FGFb obtenido para las CEM-GW infectadas fue de 1,4% con las condiciones experimentales ensayadas. Este primer ensayo mostró que la transducción de las CEM-GW con las partículas LV requería optimizar diferentes parámetros experimentales para obtener un porcentaje de sobreexpresión de al menos 30%.

Con el fin de continuar optimizando la producción de las partículas virales, otra serie de ensayos se realizaron variando algunas condiciones experimentales, tales como el pase de las células 293LTV, diferentes métodos de transfección y recolección de los sobrenadantes en diferentes tiempos post-transfección. El primer ensayo de esta serie de experimentos se realizó con células 293LTV en un pase más temprano manteniendo las demás condiciones experimentales (número de células, cantidad de ADN plasmídico, adición de BuNa y colección de virus 24h y 48h). El título viral calculado para los sobrenadantes fue de 627.000 y 104.000 PVI/ml, para 24 y 48h, respectivamente. Una vez más el título viral en el sobrenadante de 24h es mayor que 48h, por otra parte, el pase de las células es otra variable experimental que influyó en la producción de las partículas LV. Con estas condiciones experimentales se realizó la producción de partículas LV para el transgén FGFb-Flag, y un nuevo ensayo de transducción con los LV producidos. En estos ensayos se obtuvieron porcentajes de expresión para la proteína GFP y FGFb entre 2,5 – 3,5% de acuerdo con los análisis de la citometría de flujo (**Figura 14A**, panel UCWJ<sup>FGFb</sup>). La sobreexpresión de la proteína FGFb se validó mediante ensayos de ELISA en los

sobrenadantes de las CEM-GW transducidas. La **Figura 14B**, muestra un valor promedio de concentración de FGFb de 35,9pg/ml y 42,9pg/ml, en los donantes transducidos con el LV-GFP y LV-FGF, respectivamente. Es decir, hay un incremento de 1,2X en la concentración de FGFb en comparación con las CEM-GW control. Además, observamos baja variabilidad entre los donantes transducidos.

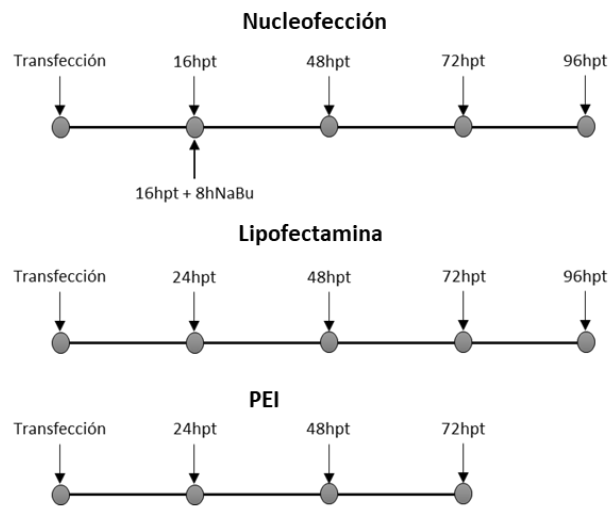


**Figura 14. Ensayo de transducción de las CEM-GW con los LV-GFP y LV-FGFb.** **A.** Citometría de flujo de las células CEM-GW después de 72h post-transducción con las partículas LV-GFP (panel superior) y LV-FGFb (panel inferior). CEM-GW no infectadas fueron utilizadas como control de expresión de las proteínas. **B.** Concentración del factor FGFb medida por ELISA, en los sobrenadantes de las CEM-GW infectadas con los LV-GFP (puntos verdes) y LV-FGFb (Puntos naranjas). UCWJ<sup>WT</sup>: CEM-GW no infectadas. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-FGFb. Los resultados son de tres donantes CEM-GW y mediciones (n=6 por grupo) \*\* p<0,05 de acuerdo con la prueba t.

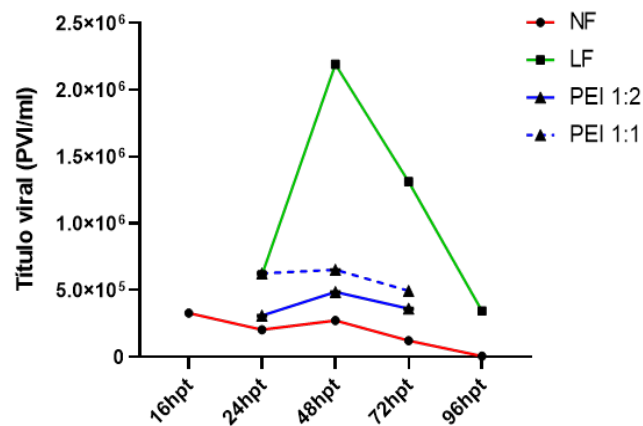
Aunque los resultados del ensayo anterior mostraron datos promisorios para la transducción de las CEM-GW se decidió evaluar diferentes métodos de transfección para la producción de las partículas LV. En estos ensayos se utilizaron los plásmidos para la producción del LV-GFP. Los métodos de transfección evaluados fueron: nucleofección (NF), lipofectamina (LF) y polietilenimina (PEI). En los ensayos de transfección con PEI se evaluaron dos relaciones ADN: PEI (1:1; 1:2), mientras que en los ensayos con nucleofección se utilizó BuNa de acuerdo con los anteriores resultados. Se recolectaron los sobrenadantes post-transfección cada 24h hasta por 4 días y posteriormente se evaluaron por el ensayo de título funcional (**Figura 15A**). La **Figura 15B**, muestra la

cinética de producción de las partículas LV, donde el comportamiento de las curvas es diferente entre los métodos de transfección. Inicialmente se observa que los títulos virales más altos se obtuvieron utilizando LF (**Figura 15B**, línea verde), mientras que los valores más bajos se obtienen con el método de NF (**Figura 15B**, línea roja). El método de NF muestra una producción constante de virus, con un título viral de hasta 274.000 PVI/ml a las 48hpt; posteriormente la producción presenta una caída del título viral a 6.500 PVI/ml. Con el método de PEI se logran títulos más altos que con NF, de 487.000 para PEI 1:2 y 653.000 PVI/ml para PEI 1:1, también 48hpt; posteriormente el título cae a 362.000 y 496.000 PVI/ml, respectivamente.

### A.



### B.



**Figura 15. Producción de partículas LV-GFP, mediante diferentes métodos de transfección.**  
**A.** Esquemas de tiempo para la recolección de los sobrenadantes después de la transfección de los plásmidos estructurales y de transferencia, para los 3 métodos de transfección ensayados:

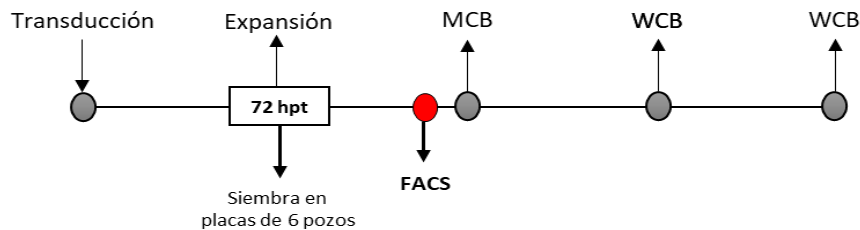
nucleofección, lipofectamina y polietilenimina. **B.** Cinética de producción de las partículas LV para los 3 métodos de transfección: nucleofección (NF, línea roja), lipofectamina (LF, línea verde) y polietilenimina (PEI, líneas azules) con dos relaciones ADN: reactivo: 1:2 (línea azul continua) y 1:1 (línea azul discontinua). Los resultados son de dos mediciones (n=4 por grupo).

En comparación, los métodos de NF y PEI muestran una producción de partículas virales constante hasta por 2 días después de la transfección (48hpt) y una caída posterior a este tiempo, de 24-16% para PEI y 56% para NF, a las 72hpt. Para NF la caída del título viral es hasta de 98% a las 96hpt. Por otro lado, la PEI incrementa hasta 2 veces la producción de los LV. La cinética de producción de los LV con LF es claramente distintivo de los dos métodos descritos anteriormente, presenta un pico de producción a las 48hpt, con un valor del título funcional de  $2,2 \times 10^6$  PVI/ml. Este valor es 3,4 veces el valor máximo para PEI 1:1, 4,5 veces para PEI 1:2 y 8 veces para NF. Posterior a las 48hpt, la producción de LV disminuye 40% y 84%, a las 72hpt y 96hpt, respectivamente. Es interesante notar que el valor más bajo de producción con la LF es mayor que el título máximo con la NF, y es intermedio para los valores máximos logrados con la PEI. De acuerdo con la cinética de producción de partículas LV observada para los tres métodos de transfección, concluimos que el método de transfección más eficiente es la lipofectamina, con el que se obtiene a las 48hpt un máximo en la concentración de virus. Estas condiciones experimentales fueron seleccionadas para escalar la producción de LV y continuar con la estandarización de la transducción de las CEM-GW. Adicionalmente, fue interesante observar que se obtuvo un título viral alto con el método de LF en los sobrenadantes colectados, sin necesidad de concentrar los LV, generando así un protocolo menos complejo y más eficiente para la producción de las partículas LV.

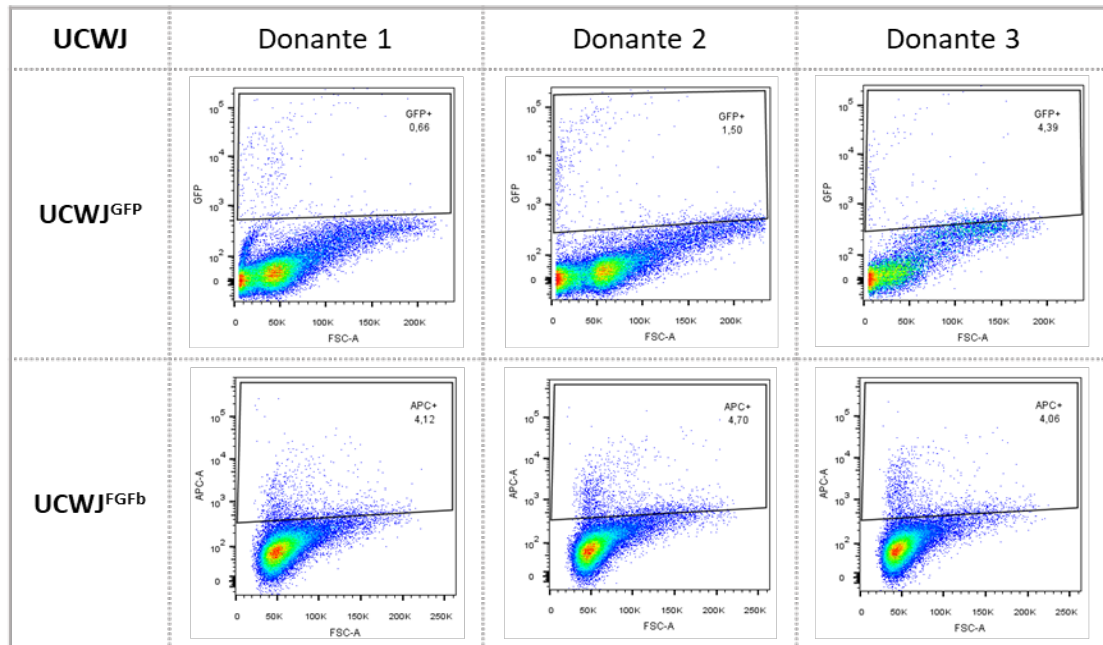
### **3.2.3 Establecimiento de un Banco Maestro de CEM-GW modificadas genéticamente (MCB)**

En paralelo con los anteriores experimentos, se continuó con la estandarización de la transducción de las CEM-GW. En el siguiente ensayo se realizaron dos modificaciones experimentales: medio de cultivo para las CEM-GW e incremento de la concentración del sulfato de protamina al medio de cultivo de transducción. En este caso, las CEM-GW fueron sembradas utilizando medio DMEM suplementado con 10% SFB, mientras que la concentración del sulfato de protamina se incrementó 10 veces, de 5  $\mu\text{g/ml}$  a 50  $\mu\text{g/ml}$ . Tres donantes de CEM-GW en pase temprano (P2-P3) fueron transfectados utilizando un MOI de 5 y LV producidos con nucleofección. Se diseñó también un flujo de trabajo para

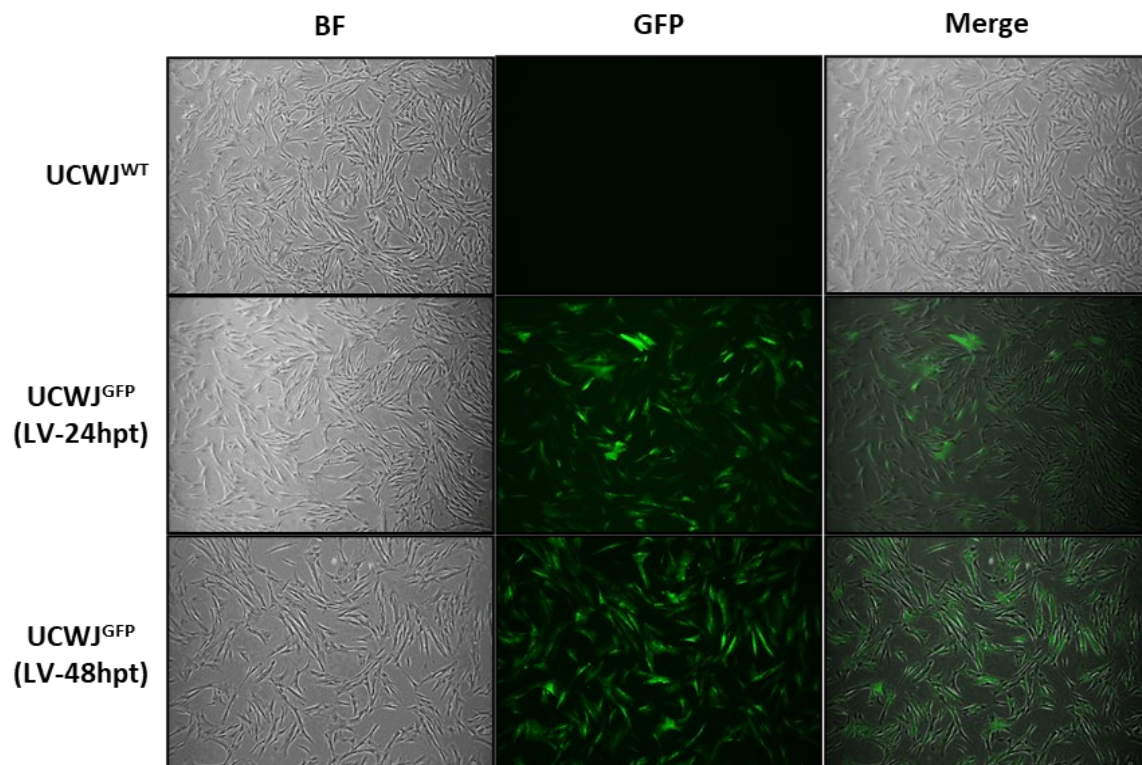
el establecimiento del banco maestro (MCB) y de trabajo (WCB) de las CEM-GW modificadas genéticamente (**Figura 16A**). Una vez se realizó la transducción de las células con los LV-GFP y LV-FGFb, se validó la transducción mediante microscopia de fluorescencia después de 72h. Posteriormente se verificó la sobreexpresión de las proteínas GFP y FGFb por FACS, antes del primer ciclo de congelamiento de las células. Una vez caracterizada la transfección de las células, estas se colectaron para realizar una nueva expansión y el primer ciclo de congelamiento, con el cual se conformó el MCB. Las siguientes dos expansiones de las CEM con sus respectivos ciclos de congelamiento conformaron el WCB. La evaluación de la transfección mostró un porcentaje de expresión para GFP entre 0,7 – 4,4%, y para FGFb de 4,0 – 4,7% (**Figura 16B**). En este ensayo, el rango de porcentaje fue un poco más variable entre los donantes transducidos con LV-GFP; sin embargo, se logró un ligero incremento en la sobreexpresión de las proteínas. Aunque el rango de expresión de las proteínas GFP y FGFb fue bajo, se continuó con el flujo de trabajo propuesto y con estos donantes se inició la generación de los bancos mencionados.

**A.**

B.



C.



**Figura 16. Ensayo de transducción de las CEM-GW con los LV-GFP y LV-FGFb. A.** Esquema del flujo de trabajo para el establecimiento del banco maestro de CEM-GW modificadas genéticamente (MCB) y de trabajo (WCB). **B.** Citometría de flujo de tres donantes de CEM-GW después de 72h post-transducción con los LV-GFP y LV-FGFb, producidos por nucleofección. CEM-

GW no infectadas fueron utilizadas como control de expresión de las proteínas. **C.** Fotos de microscopía de fluorescencia tomadas a las CEM-GW infectadas con los LV-GFP recolectados después de 24h (LV-24hpt) y 48h (LV-48hpt) post-transfección utilizando lipofectamina. UCWJ<sup>WT</sup>: CEM-GW no infectadas UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-FGFb.

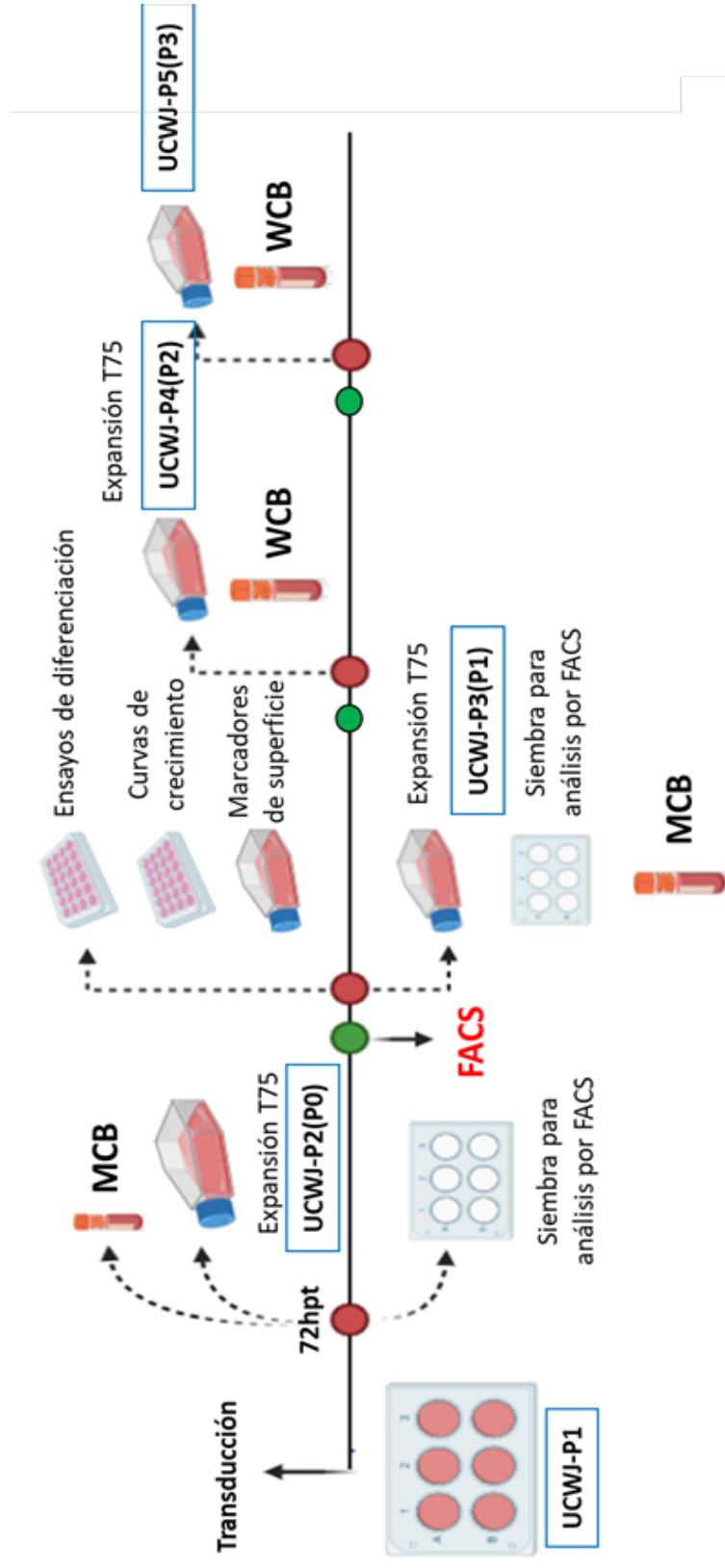
Una vez se establecieron las condiciones experimentales para la producción de las partículas LV, se realizó una producción mayor de los vectores virales con el objetivo de generar un *batch* para los experimentos de transducción. El título funcional calculado para este *batch* fue de  $2,6 \times 10^6$  PVI/ml, en el sobrenadante recolectado 48hpt. Esta nueva producción generó un título funcional similar a la anterior producción, validando la reproducibilidad en el protocolo estandarizado. Utilizando este *batch* se diseñó un experimento pequeño de transducción de CEM-GW con un donante utilizando las condiciones descritas en el párrafo anterior, siembra de las células en medio suplementado con 10% SFB y sulfato de protamina 50 $\mu$ g/ml. La transducción de las CEM se realizó con los LV recolectados a las 24h y 48h. Después de 72h de transducción, por primera vez observamos una transducción eficiente de las CEM-GW, ya que la fluorescencia de la proteína GFP se observó en un porcentaje significativo de las células en el campo de observación (**Figura 16C**). Por otro lado, por microscopía se evidenció también la capacidad infectiva de los virus producidos 24h y 48h utilizando una relación de MOI baja. Esta observación fue importante en toda la estandarización realizada, ya que uno de los objetivos de este trabajo era lograr una transducción eficiente de las CEM-GW utilizando un valor bajo de MOI.

Una vez se logró la estandarización de la producción de partículas LV y la transducción de las CEM-GW, se diseñó un experimento de transducción de tres donantes de CEM-GW en pase temprano, siguiendo un flujo de trabajo más completo basado en el anteriormente descrito (**Figura 17A**). El flujo de trabajo se describe a continuación: se sembraron las CEM-GW P1 en medio suplementado con 10% SFB para transducción con las partículas LV-GFP y LV-FGFb, así como células sin infección (*wildtype*, WT). Utilizando una relación de infección de 1:5 y sulfato de protamina se adicionaron los LV y la transducción se incubó por 72h. Una vez transcurrido este tiempo se verificó la expresión de las proteínas GFP por microscopía, y las células expandieron (**Figura 17A**, primer punto rojo). Adicionalmente, en este punto, algunas células se congelaron para el MCB. A las células sembradas en este punto se les asignó el pase P2 (P0, después de la transducción). La expansión de las células se realizó en medio suplementado con 10% hLP, y un día antes

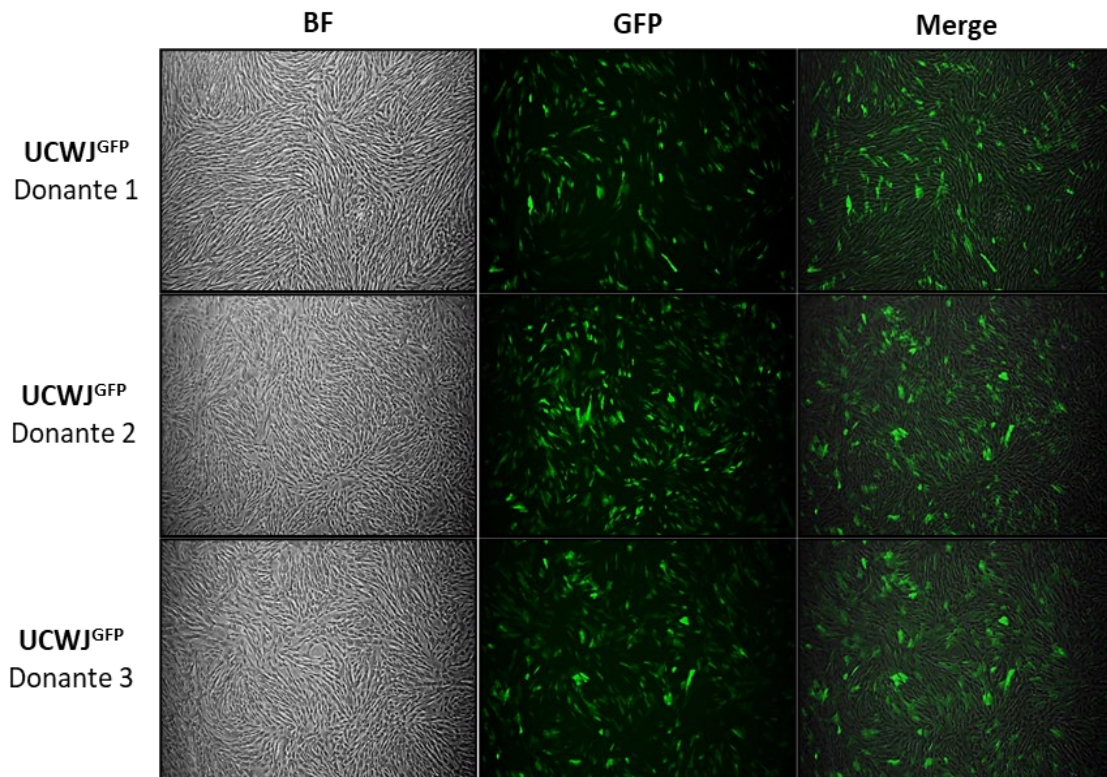
---

de alcanzar confluencia se realizó citometría de flujo para validar la sobreexpresión de las proteínas en las células (**Figura 17A**, primer punto verde). Una vez las células alcanzaron 80-90% de confluencia, se expandieron nuevamente, P3 (P1 post-transducción) y se realizaron los experimentos de caracterización por expresión de marcadores de superficie, diferenciación y curvas de crecimiento (**Figura 17A**, segundo punto rojo). Con las células se realizaron otras dos rondas más de expansión, junto con la validación de la sobreexpresión de las proteínas GFP y FGFb (**Figura 17A**, 2<sup>do</sup> y 3<sup>er</sup> punto verde), para conformar el WCB, P4 (P2 post-transducción) y P5 (P3 post-transducción) (**Figura 17A**, 3<sup>er</sup> y 4<sup>to</sup> punto rojo).

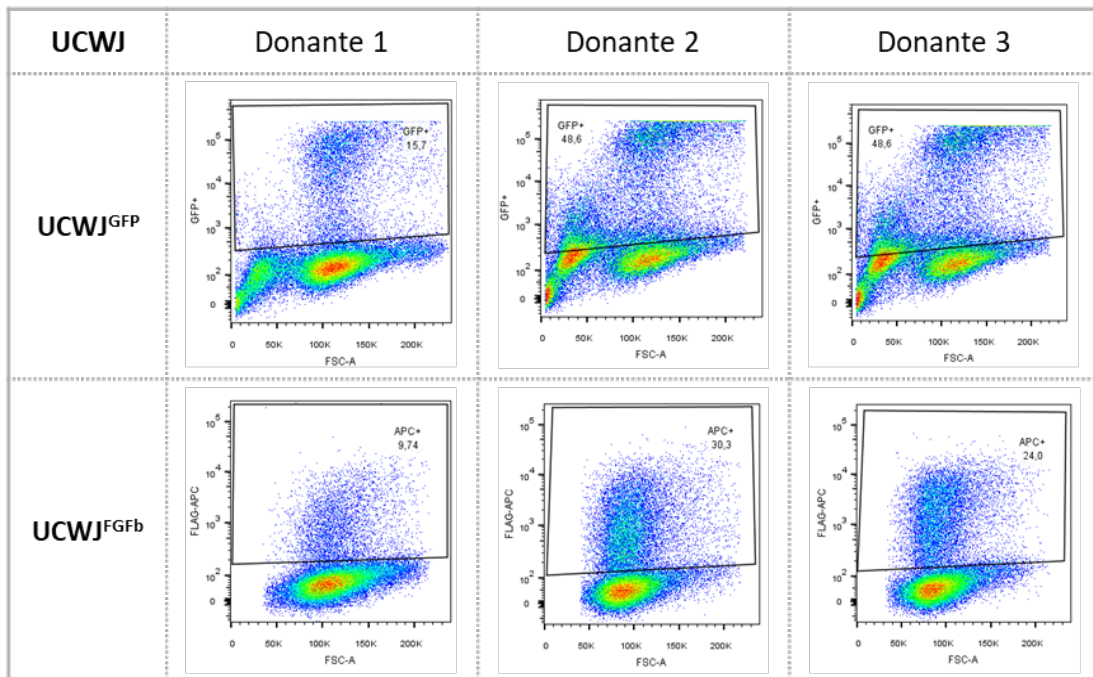
A.



**B.**



**C.**



**Figura 17. Ensayo de transducción de las CEM-GW con los LV-GFP y LV-FGFb. A.** Esquema del flujo de trabajo para establecer el banco maestro de CEM-GW modificadas genéticamente (MCB) y de trabajo (WCB) de tres donantes de CEM-GW. **B.** Fotos de microscopía de fluorescencia tomadas a los tres donantes de CEM-GW infectados con los LV-GFP recolectados después de 48hpt utilizando lipofectamina. **C.** Citometría de flujo de los tres donantes de CEM-GW después de 72h post-transfección con los LV-GFP y LV-FGFb, producidos con lipofectamina. CEM-GW no infectadas fueron utilizadas como control de expresión de las proteínas. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-FGFb.

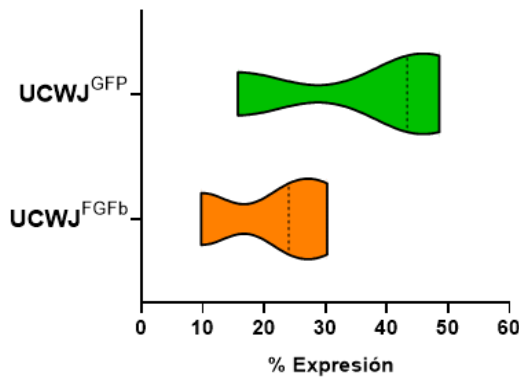
La **Figura 17B**, corresponde a las imágenes de la microscopía de fluorescencia de los tres donantes de CEM-GW infectados con los LV-GFP (UCWJ<sup>GFP</sup>). Inicialmente, se observa una transducción eficiente de las células por los LV, la fluorescencia de las células es intensa, con niveles que varían dependiendo del donante, encontrándose un porcentaje significativo del campo observado en campo claro. Es así que, para el donante 1 la fluorescencia se presenta en un menor porcentaje de células en comparación con los donantes 2 y 3. La intensidad de la fluorescencia diferente para un mismo donante está relacionada con el número de copias integradas en el genoma de las células, a pesar de que en este trabajo no se realizó esta caracterización, se espera que sea bajo para evitar que la inserción al azar de la secuencia transferida afecte genes funcionales importantes de las CEM-GW, principal razón para el uso de MOI bajo. La evaluación de la infección por citometría mostró un porcentaje de expresión entre 15,7%, 43,3% y 48,6% para GFP, y 9,74%, 30,3% y 24,9% para FGFb, para el donante 1,2 y 3 respectivamente (**Figura 17C**). En este ensayo, se logró para dos donantes de CEM-GW una sobreexpresión de la proteína FGFb de al menos 30%, mientras que para GFP de hasta el 50% (**Figura 18A**). Ya que para uno de los donantes de CEM-GW se obtuvo una sobreexpresión menor al 30%, así como para los donantes del ensayo anterior, nos preguntamos si el porcentaje de sobreexpresión podría llegar a estar relacionado con la caracterización biológica y funcional de las CEM-GW modificadas genéticamente. Por tal razón, se definieron tres categorías de sobreexpresión: baja ( $\leq 5\%$ ), media (5-15%) y alta (16-30%).

La cuantificación del factor FGFb en los sobrenadantes de las células transducidas, por ensayos de ELISA, muestra concentraciones de la proteína en las UCWJ<sup>FGFb</sup> que están siempre por encima de la concentración del factor en las UCWJ<sup>GFP</sup>. La concentración mínima del factor fue de 80pg/ml y la máxima de 600pg/ml para las UCWJ<sup>FGFb</sup>, mientras que para las UCWJ<sup>GFP</sup> fue de máximo 60pg/ml (**Figura 18B**). El rango de la concentración del factor FGFb medida en las UCWJ<sup>FGFb</sup> es consistente con el porcentaje de sobreexpresión medido por citometría de flujo, es decir, las CEM-GW con bajo porcentaje

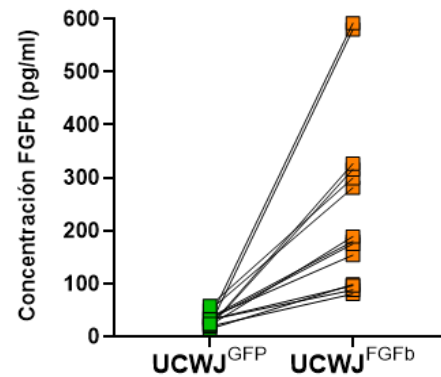
de sobreexpresión medido por FACS corresponde con la menor concentración del factor medido por ELISA. De tal manera, mediante dos técnicas de análisis se validó la modificación genética de las CEM-GW para la sobreexpresión del factor de crecimiento FGFb.

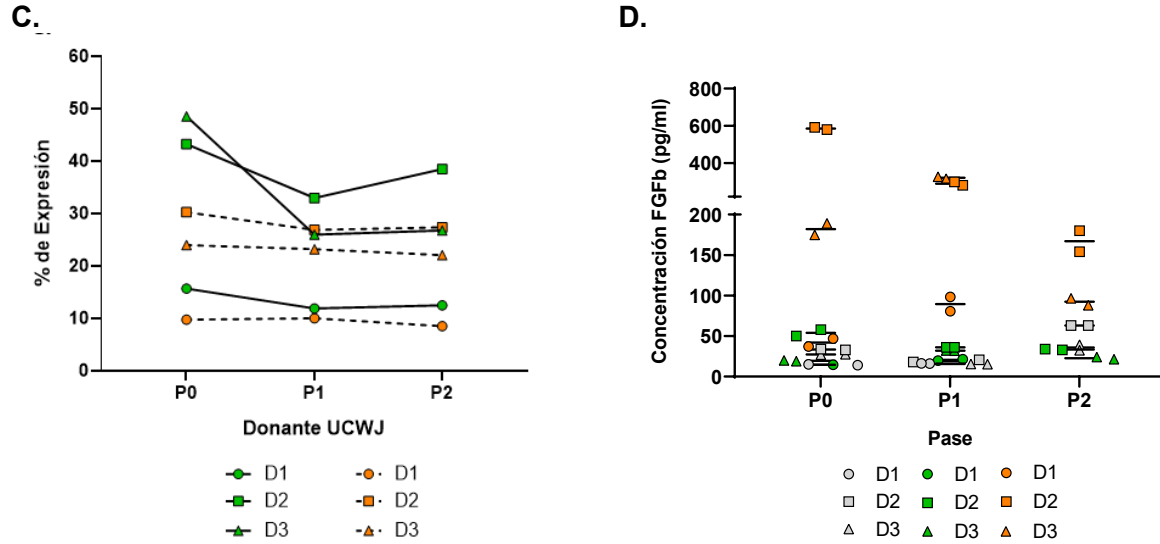
La determinación del nivel de expresión de las proteínas GFP y FGFb en las CEM-GW modificadas con los LV, en cada uno de los pases realizados durante el flujo de trabajo seguido (**Figura 17A**, puntos verdes) mostró de manera interesante expresión del factor FGFb-Flag constante dos pases adicionales después de la transducción (aproximadamente 14 días), validando la expresión constitutiva de la proteína recombinante (**Figura 18C**). Este comportamiento fue reproducible en los tres donantes modificados con los LV, y con diferente nivel de expresión de la proteína recombinante. Con relación a la proteína GFP, los resultados mostraron que para dos de los donantes de CEM-GW, D1 y D2, la expresión de la proteína es constante (**Figura 18C**, punto y cuadrado verdes), sin embargo, para el donante 3 (D3) se observó disminución del nivel de expresión de la proteína en los siguientes dos pases (**Figura 18C**, triángulo verde). A pesar de este resultado, los resultados validan que la transducción con partículas LV modificaron genéticamente las CEM-GW para la expresión constitutiva de las proteínas recombinantes.

A.



B.





**Figura 18. Expresión de las proteínas GFP y FGFb en los donantes de CEM-GW transducidas con los LV. A.** Nivel de expresión de la proteína GFP (violín verde) y FGFb-Flag (violín naranja) en los diferentes donantes de CEM-GW después de 72h de infección con LV-FGFb, medido por citometría de flujo. **B.** Concentración del factor FGFb medido por ELISA en los sobrenadantes de las CEM-GW transducidas con los LV-GFP (cuadrados verdes) y LV-FGFb (cuadrados naranjas). Los resultados son de tres donantes CEM-GW y dos mediciones (n=2 por grupo). **C.** Cambio en el nivel de expresión de las proteínas GFP y FGFb-Flag, en tres diferentes pases de cultivo de las CEM-GW transducidas con LV-GFP (símbolos verdes, líneas continuas) o LV-FGFb (símbolos naranjas, líneas discontinuas). Expresión medida por citometría de flujo. **D.** Cambio en la concentración del factor FGFb, en diferentes pases de cultivo las CEM-GW transducidas con LV-GFP (símbolos verdes) o LV-FGFb (símbolos naranjas). Sobrenadantes evaluados por ELISA. D1: donante 1. D2: donante 2. D3: donante 3. P0: Pase 0. P1: Pase 1. P2: Pase 2. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-FGFb. Los resultados son de tres donantes CEM-GW y dos mediciones (n=6 por grupo).

Cuando el factor FGFb es medido en los sobrenadantes por ensayos de ELISA, los resultados muestran diferentes comportamientos entre donantes durante los pases celulares, por ejemplo para el D1 hay un ligero incremento de la concentración del factor en el pase 1 (P1) (**Figura 18D**, círculos naranjas), para el D2 la concentración en el P1 disminuye casi a la mitad de su valor en P0, y luego vuelve a disminuir en el siguiente pase (P2) (**Figura 18D**, cuadrado naranja), finalmente, para el D3 la concentración del factor incrementa en el P1 y disminuye en el P2 (**Figura 18D**, triángulo naranja). Esta dinámica puede estar relacionada con el efecto del factor de crecimiento en la biología de las CEM-GW. A pesar de estas fluctuaciones entre donantes, es interesante notar que hay correspondencia entre el nivel de expresión del factor medido por citometría de flujo y la concentración medida por ELISA, es decir, los donantes con nivel de expresión mayor al 20% (D2 y D3) presentaron en el P0 y P1 mayores concentraciones del factor en comparación con el D1, cuyo nivel de expresión fue menor al 10%. Por otro lado, para los

donantes transducidos con el LV-FGFb, la concentración del factor siempre estuvo por encima de los donantes transducidos con el LV-GFP (**Figura 18D**, símbolos verdes) y los donantes *wildtype* (**Figura 18D**, símbolos grises).

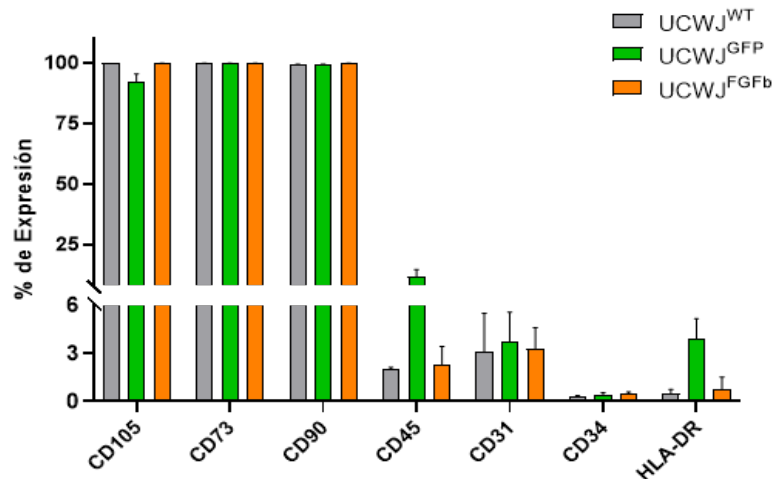
### 3.2.4 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la proteína FGFb en las propiedades biológicas de las CEM-GW

Para evaluar el efecto de la modificación genética en la caracterización de las CEM-GW, se plantearon ensayos para medir la expresión de ciertos marcadores de superficie presentes en las células, así como, ensayos para medir el efecto de la sobreexpresión del factor en la cinética de crecimiento de las CEM-GW. La **Figura 19A**, muestra el nivel de expresión de los marcadores de superficie evaluados en las UCWJ<sup>FGFb</sup>, en comparación con el nivel de expresión de los marcadores en las UCWJ<sup>GFP</sup> y sin la modificación genética (UCWJ<sup>WT</sup>). Las poblaciones celulares muestran expresión de los marcadores de superficie característicos de las células estromales mesenquimales CD105, CD73 y CD90, sin cambio en el nivel de expresión entre las CEM-GW modificadas genéticamente y las células no modificadas. Por otro lado, las poblaciones celulares muestran muy bajo nivel de expresión de los marcadores de superficie CD45, CD31, HLA-DR, y casi no detectable para CD34. Se evidencia diferencia en el nivel de expresión para CD45 y HLA-DR para las UCWJ<sup>GFP</sup>. Este resultado muestra que la modificación genética por LV de las CEM-GW para la sobreexpresión del factor de crecimiento FGFb, no modifica la propiedad biológica en términos de fenotipo o expresión de marcadores de superficie característicos de las CEM, relacionados con interacción célula-célula, adhesión celular e inmunofenotipo.

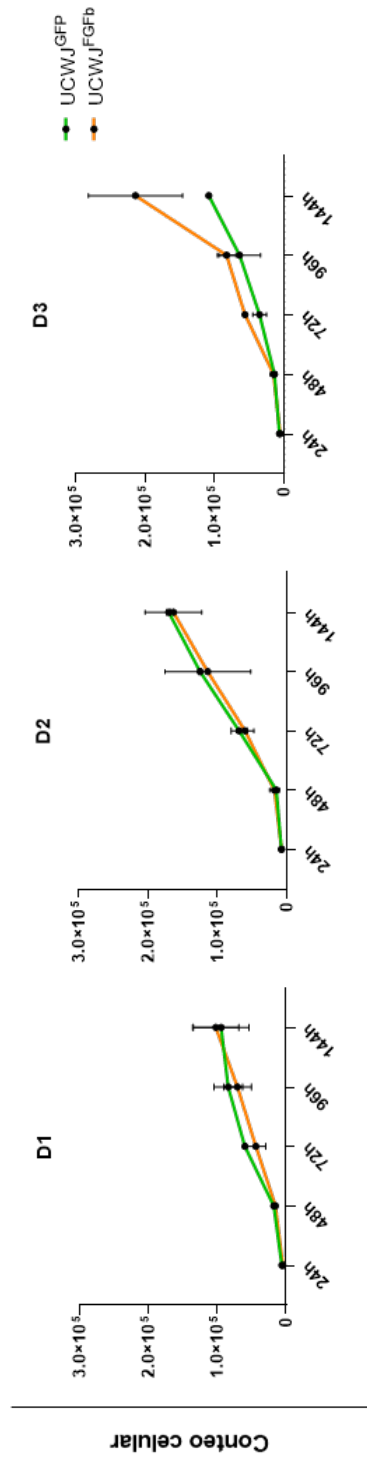
En el siguiente experimento se evaluó el efecto de la sobreexpresión de la proteína FGFb en la cinética de crecimiento o proliferación de las CEM-GW. Para este experimento se sembraron las células que se expandieron en la segunda ronda después de las 72h post-infección, es decir en pase P3 (P1 post-transducción) (**Figura 17A**, 2<sup>do</sup> punto rojo), en medio suplementado con 10% hLP. En el experimento se evaluaron tres donantes de las CEM-GW infectados con LV-GFP y LV-FGFb, y se realizaron conteos celulares cada 24h durante 5 días. Adicionalmente, se colectaron los sobrenadantes de cada uno de los tiempos medidos para la cuantificación de la proteína FGFb mediante ensayos de ELISA. En la **Figura 19B**, los resultados muestran que la cinética de crecimiento para los tres donantes UCWJ<sup>FGFb</sup> es lenta durante las primeras 48h, las células crecen 3,3 - 2,3 y 2,7

veces, para los donantes 1,2 y 3, respectivamente; posteriormente hay una mayor inclinación de las curvas que significa un incremento en la velocidad de crecimiento (línea naranja continua, **Figura 19B**), las células crecen 6,6 – 9,1 y 14,1 veces, para los donantes 1,2 y 3 (D1, D2 y D3). Es también notable que los conteos celulares para el D1 fueron siempre menores que para los D2 y D3, alcanzando un máximo de  $1,0 \times 10^5$  células en 5 días, mientras que para D2 y D3 los conteos fueron de  $1,6 \times 10^5$  y  $2,1 \times 10^5$  células, respectivamente. Como se espera, la cinética crecimiento es dependiente del donante de CEM-GW, sin embargo, es interesante observar que, entre ellas, las curvas para el D2 y D3 presentan similitud en su comportamiento. Ya que para D2 y D3 se midió un mayor nivel de sobreexpresión del factor FGFb, se sugiere que esta concentración del factor FGFb, está relacionado con el incremento de la velocidad de crecimiento en comparación con el D1 después de 48h. Finalmente, para ninguno de los donantes evaluados se encontraron diferencias en los conteos celulares entre las células modificadas para la sobreexpresión del factor FGFb, y las células modificadas tomadas como control (UCWJ<sup>GFP</sup>).

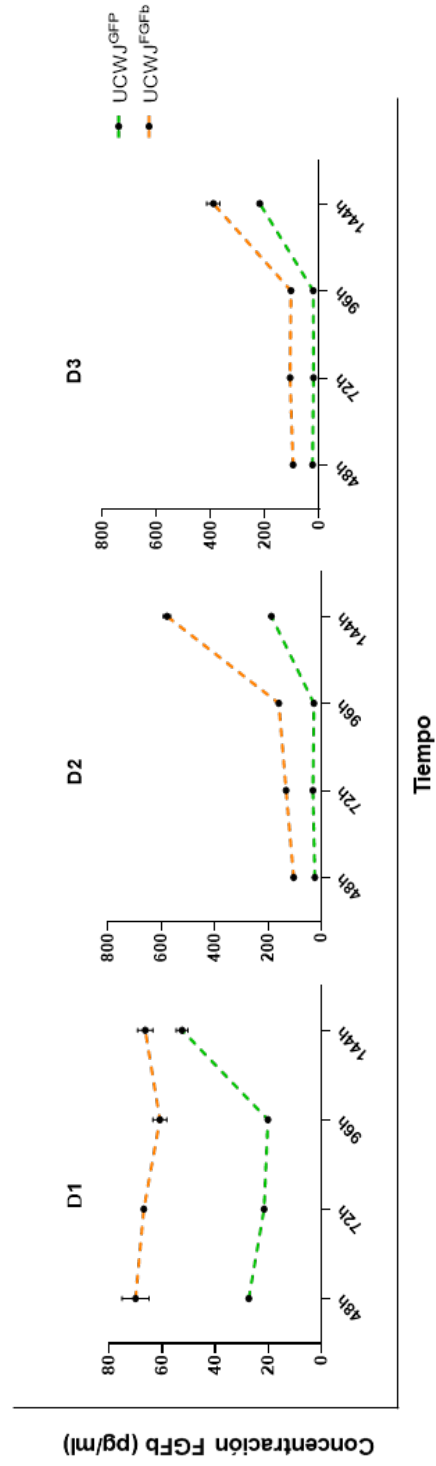
### A.



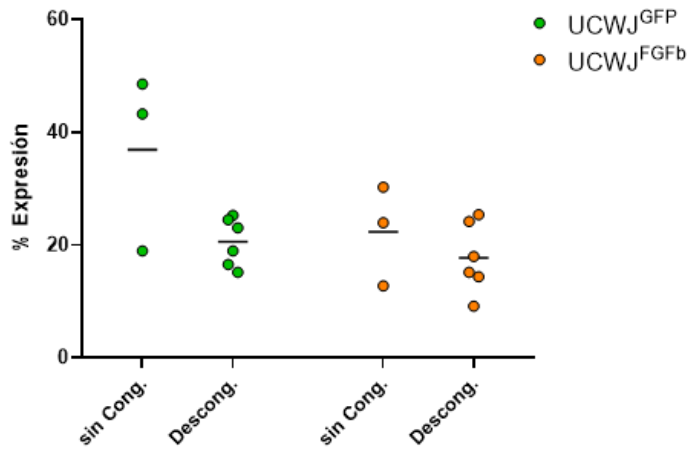
B.



C.



## D.



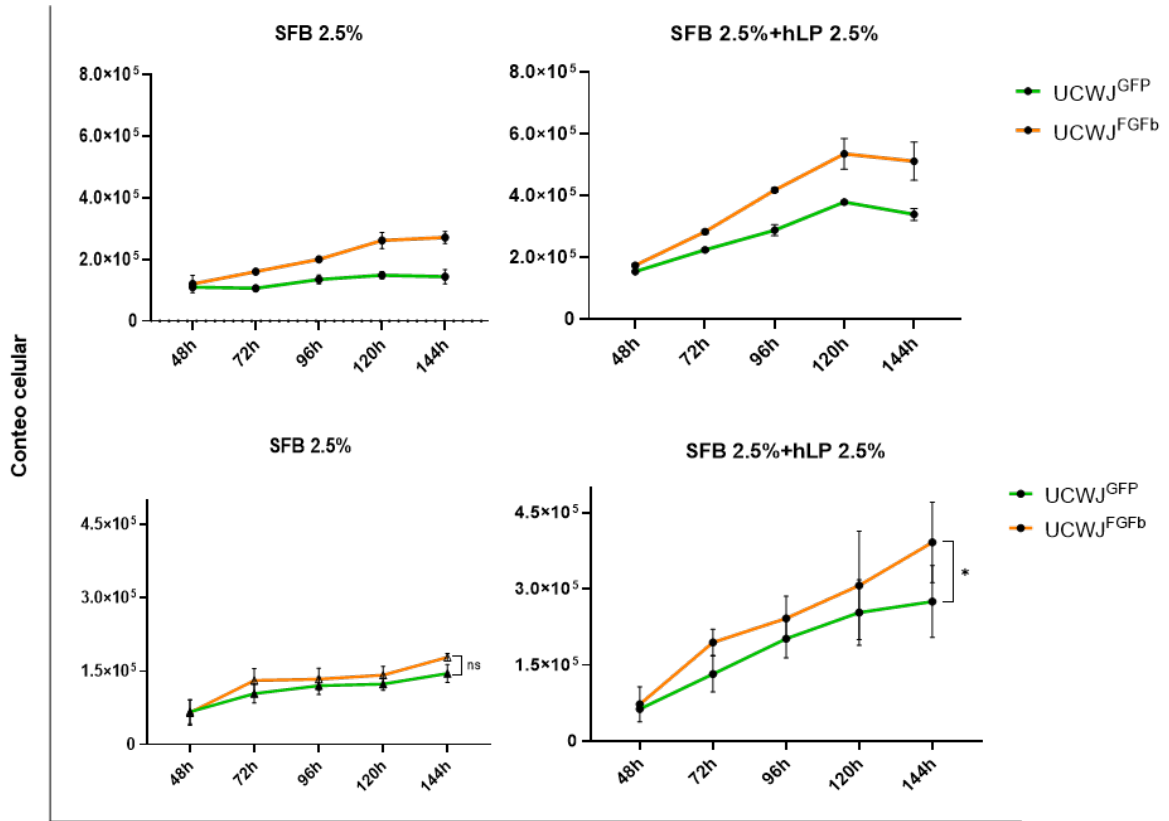
**Figura 19. Efecto de la sobreexpresión del factor de crecimiento FGFB en las características biológicas de las CEM-GW.** **A.** Inmunofenotipo o nivel de expresión de los marcadores de superficie característicos de las CEM, medido por citometría de flujo, en los diferentes donantes UCWJ<sup>GFP</sup> (barras verdes) y UCWJ<sup>FGFB</sup> (barras naranjas). Comparación con los donantes *wildtype* UCWJ<sup>WT</sup> (barras grises). Los resultados son de tres donantes CEM-GW. **B.** Curvas de crecimiento de tres donantes UCWJ<sup>GFP</sup> (líneas verdes) y UCWJ<sup>FGFB</sup> (líneas naranjas) en medio suplementado con 10% hPL. Los resultados son de dos mediciones (n=2) por cada tiempo. **C.** Concentración del factor FGFB medida por ELISA, en los sobrenadantes de las curvas de crecimiento de los donantes UCWJ<sup>GFP</sup> (líneas discontinuas verdes) y UCWJ<sup>FGFB</sup> (líneas discontinuas naranjas). Los resultados son de dos mediciones (n=2) por cada tiempo. D1: donante 1. D2: donante 2. D3: donante 3. **D.** Efecto del ciclo de congelamiento en el nivel de expresión de las proteínas GFP y FGFB, de tres donantes CEM-GW transducidos. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-GFP. UCWJ<sup>FGFB</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-FGFB.

Cuando se analiza el comportamiento de la concentración del factor FGFB en la cinética de crecimiento, se observa que para el D1 la concentración está siempre por debajo de 80pg/ml y es prácticamente estable durante los 5 días. Para el D2 y D3 la concentración del factor inicia en 100pg/ml, se mantiene estable durante 4 días y muestra un incremento el 5to día de medición (líneas naranjas punteadas, **Figura 19C**). El incremento es de 1,1 – 3,6 y 3,7 veces para los D1, D2 y D3, respectivamente. Que el incremento sea mayor para los D2 y D3 puede estar relacionado con el nivel de sobreexpresión del factor medido por FACS. Es interesante notar que la concentración del factor para los donantes UCWJ<sup>GFP</sup> muestran el mismo comportamiento visto en los donantes UCWJ<sup>FGFB</sup>, una concentración estable durante 4 días y un incremento en el día 5 (líneas verdes punteadas, **Figura 19C**). Sin embargo, las curvas de estos últimos siempre están por encima de las curvas obtenidas para los donantes GFP, en un factor de 1,3 a 3,1X; de 3,1 a 5,5X y 1,8 a 5,1X, para los D1, D2 y D3, respectivamente.

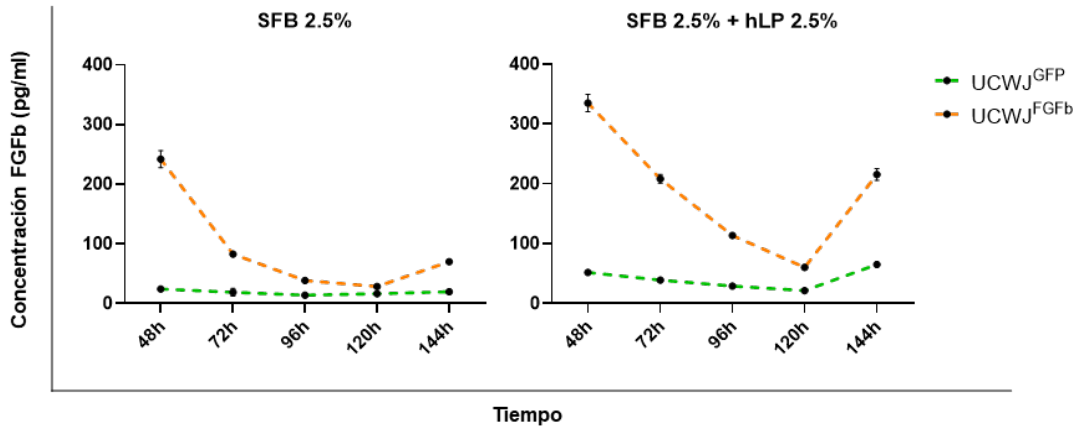
A pesar de no haber visto un efecto general en la cinética de crecimiento de las CEM modificadas genéticamente para la sobreexpresión del factor FGFb, nos preguntamos si la concentración basal del factor presente en el suplemento de cultivo (lisado de plaquetas), podría enmascarar el efecto de la sobreexpresión del factor de crecimiento en la proliferación. Ya que uno de los objetivos de este trabajo es evaluar el efecto del factor FGFb en la viabilidad y sobrevivencia de las células en un ambiente que se asemeje a un escenario *in vivo*, reducido de nutrientes principalmente factores de crecimiento, se decidió evaluar la cinética de crecimiento de los donantes de CEM-GW transducidos en medio DMEM suplementado con SFB. El primer ensayo fue realizado con 1 donante de CEM-GW en medio DMEM suplementado con 1%, 2,5% y 5% de SFB. Durante los primeros 4 días se realizaron conteos celulares cada 48h, posteriormente cada 24h hasta 8 días, para la condición de 2,5% y 5% SFB y de 10 días para 1% SFB. Después de analizar los resultados, no se observó crecimiento de las células para las condiciones de 1% y 2,5% SFB, los conteos celulares fueron siempre los mismos, mientras que para la condición de 5% SFB se observó crecimiento de las células hasta por 6 días, pero sin diferencias entre las células UCWJ<sup>GFP</sup> y UCWJ<sup>FGFb</sup>. Para este donante el nivel de expresión de la proteína GFP fue de 24,0% y de 15,2% para FGFb, después del proceso de descongelamiento. Al comparar estos valores con los porcentajes de valores de expresión medido una vez el donante fue transducido, se calculó una disminución del nivel de expresión de 51% y 34%, para GFP y FGFb, respectivamente. Con estos resultados se evidenció, que el nivel de expresión de las proteínas recombinantes en las células modificadas siempre se va a afectar con los ciclos de descongelamiento, debido a que este procedimiento afecta la viabilidad de las células de manera generalizada. Por otro lado, estos resultados indicaron la necesidad de estudios de caracterización o de función posteriores utilizando las células modificadas del WCB a partir de la evaluación por citometría de flujo como control de calidad del nivel de sobreexpresión del transgén de interés. Basados en esta observación, se realizó un experimento paralelo para evaluar el impacto de la criopreservación en el nivel de sobreexpresión de las proteínas después de un ciclo de descongelamiento. Una vez descongelados los donantes del WCB se evidenció una disminución del nivel de expresión de ambas proteínas, con mayor impacto sobre las UCWJ<sup>GFP</sup> con expresión superior al 45% de la proteína, medida una vez las células fueron transducidas (**Figura 19D**).

Con los resultados obtenidos para las curvas de crecimiento con el medio de cultivo suplementado con SFB y hLP, se decidió evaluar la cinética en una mezcla 1:1 de los dos suplementos (2,5% SFB + 2,5% hLP), sembrando las células en un formato más grande de placas, con el objetivo de eliminar variaciones técnicas en los conteos celulares. Paralelamente, se evaluó la cinética de crecimiento en medio DMEM suplementado con 2,5% SFB. En un experimento inicial con un donante de CEM-GW expresando GFP y FGFb (con niveles de expresión de 19,1% y 12,8%, respectivamente), se encontraron conteos celulares más altos para las células UCWJ<sup>FGFb</sup> a partir de 72h, y en las dos condiciones de cultivo (**Figura 20A**, panel superior). Los conteos celulares para las curvas con la mezcla 1:1 de SFB y hLP, fueron en todos los tiempos medidos más altos que los conteos celulares con SFB, mostrando el efecto del hLP en el crecimiento de las CEM-GW. En la repetición del anterior ensayo con 3 donantes de CEM-GW cuyo nivel de expresión fueron 15,2%, 16,6% y 23,1% para FGFb, y de 9,20%, 18,0% y 15,2% para GFP, se observaron conteos celulares más altos para las curvas con el medio suplementado con hLP indicando una mayor tasa o velocidad de crecimiento para las CEM-GW. Sin embargo, las células UCWJ<sup>FGFb</sup> crecieron 2,7X y 5,4X en 2,5% SFB y 2,5%SFB+2,5%hLP, un nivel significativamente superior al encontrado en las células UCWJ<sup>GFP</sup> (2,2X y 4,3X, respectivamente). De este modo se pudo confirmar que los conteos celulares son más altos para las células UCWJ<sup>FGFb</sup> a partir de 72h, pero con diferencia estadística sólo para la condición de cultivo con la mezcla 1:1 de los suplementos (**Figura 20A**, panel inferior), mostrando un incremento del crecimiento celular para las células UCWJ<sup>FGFb</sup> de 32,6% en comparación con las células UCWJ<sup>GFP</sup>.

A.



B.



**Figura 20. Efecto de la sobreexpresión del factor de crecimiento FGFb en la cinética de crecimiento (proliferación) de las CEM-GW.** **A.** Curvas de crecimiento de los donantes UCWJ<sup>GFP</sup> (líneas verdes) y UCWJ<sup>FGFb</sup> (líneas naranjas) en medio suplementado con 2,5% SFB (panel izquierdo) y 2,5% SFB + 2,5% hPL (panel derecho). Los resultados son de un donante y dos medidas (n=4 por grupo) para el panel superior y de tres donantes (n=3 por grupo) para el panel inferior. \* p<0,05 de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples ANOVA de dos vías, Sidak. **B.** Concentración del factor FGFb medida por ELISA, en los sobrenadantes de las curvas de crecimiento de los donantes UCWJ<sup>GFP</sup> (líneas discontinuas verdes) y UCWJ<sup>FGFb</sup> (líneas discontinuas naranjas). UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW transducidas con los LV-GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW transducidas con los LV-FGFb.

Cuando se analiza la cinética de la concentración del factor FGFb en las curvas de crecimiento (**Figura 20A**, panel superior) se observa un comportamiento similar en las dos condiciones de cultivo evaluadas. En el donante UCWJ<sup>GFP</sup> la concentración del factor se mantiene estable durante el tiempo del experimento, mientras que para el donante UCWJ<sup>FGFb</sup> la curva inicia con un valor máximo del factor que es de 242pg/ml y 335pg/ml; posteriormente, y hasta el día 5 la curva desciende hasta un mínimo de concentración, 28,6pg/ml y 60,3pg/ml; para el día 6, las curvas muestran de nuevo incremento en la concentración, 70,2pg/ml y 215,7pg/ml, para la condición de 2,5% SFB (**Figura 20B**, línea verde punteada) y 2,5%SFB+2,5%hLP, respectivamente (**Figura 20B**, línea naranja punteada). Es interesante observar que el punto más bajo de presencia de FGFb (120h) de las curvas coincide con el punto máximo del conteo celular medido en las curvas de crecimiento del donante. Lo anterior indicaría que cuando el factor se agota en el medio de cultivo, se estaría activando de nuevo la sobreproducción del factor por las células modificadas genéticamente (144h). Estos resultados son respuesta a la sobreexpresión del factor inducida en las CEM-GW después de la transducción con LV. En general, observamos que, bajo las condiciones de cultivo evaluadas, el incremento en la concentración del factor FGFb genera un impacto en la proliferación de las células. Se puede sugerir que una transducción de hasta 20% en las CEM-GW con partículas LV no afecta la viabilidad de las células e incrementa ligeramente su potencial de proliferación celular, es decir, la sobrevivencia de las células en un medio desprovisto de nutrientes.

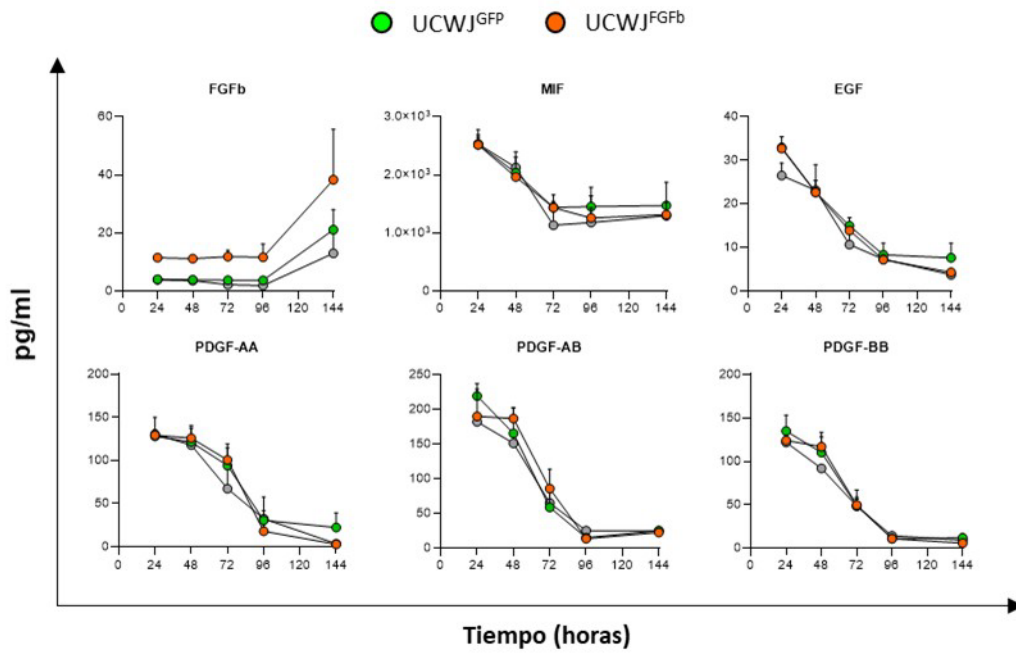
### **3.2.5 Perfil de secreción de factores solubles de las CEM-GW modificadas genéticamente con LV, para la sobreexpresión de la proteína FGFb**

Los sobrenadantes colectados de las curvas de crecimiento para los tres donantes de CEM-GW modificadas genéticamente con LV para la sobreexpresión del factor FGFb, en comparación con CEM-GW modificadas genéticamente con LV-GFP y células no modificadas genéticamente, se analizaron en un ensayo multiplex de ELISA para determinar la cinética de producción y consumo de citoquinas y factores de crecimiento, que están directa o indirectamente relacionados con la proliferación de las CEM. Los tres grupos celulares se cultivaron durante 6 días en hLP y los sobrenadantes se colectaron cada 24h. Inicialmente, es interesante observar que las CEM-GW transducidas con LV-FGFb (UCWJ<sup>FGFb</sup>) muestran siempre mayor concentración del factor FGFb (**Figura 21A**, panel FGFb, círculos naranjas) en comparación con las células control (UCWJ<sup>GFP</sup>, **Figura**

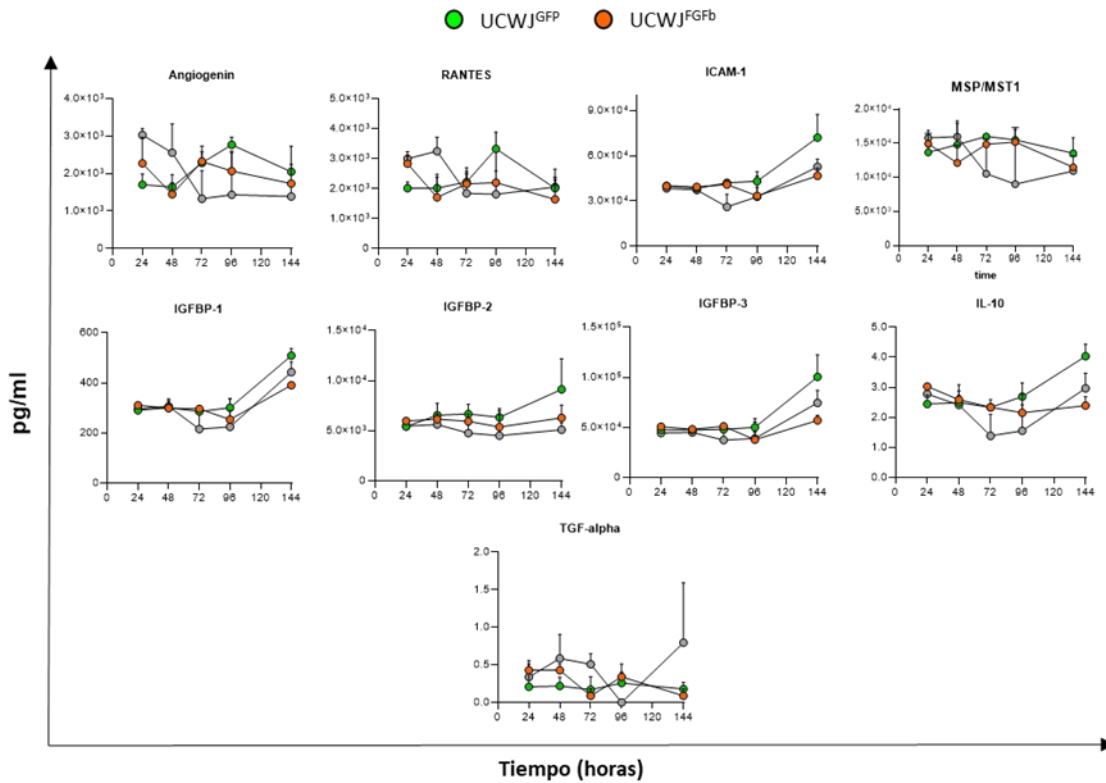
**21A**, panel FGFb círculos verdes) y las células de referencia (UCWJ<sup>WT</sup>, **Figura 21A**, panel FGFb círculos grises). Este comportamiento fue similar entre los donantes de CEM-GW evaluados. También se observa que el nivel del factor se mantiene estable hasta por 4 días, luego su concentración aumenta hasta el día 6. Posteriormente, el análisis de los resultados evidenció un panel de factores solubles que son principalmente consumidos por las CEM-GW durante su expansión con hLP, con un patrón similar entre las CEM-GW modificadas genéticamente para la sobreexpresión del factor FGFb, y las células control y de referencia. Específicamente, encontramos una reducción significativa de la familia PDGF AA (97,2%), AB (86,8%), BB (95,1%) y EGF (88,6%) en UCWJ<sup>FGFb</sup> expuestas a hLP después de 6 días de cultivo (en comparación con el día 1, **Figura 21A**). Además, las UCWJ<sup>FGFb</sup> también consumieron activamente otro factor fuertemente enriquecido en hLP durante 6 días de cultivo, MIF (48,8%).

Por otro lado, los resultados evidenciaron un panel de factores solubles que son producidos por las CEM-GW durante su expansión con hLP, con un patrón similar entre las CEM-GW modificadas genéticamente para la sobreexpresión del factor FGFb, y las células control y de referencia. En el día 6, se detectó una acumulación significativa de osteoprotegerina (25,4X), CXCL-1 (25,5X), G-CSF (14,8X), VEGF (6,2X) e IL-6 (12,2X) en sobrenadantes de UCWJ<sup>FGFb</sup> cultivados en hLP (en comparación con el día 1, **Figura 21B**). Factores adicionales como HGF (2,7X), GM-CSF (2,4X) y VCAM-1 (1,8X), en comparación con el día 1, también mostraron un enriquecimiento en la cinética de proliferación de las UCWJ<sup>FGFb</sup> con hLP. Finalmente, los resultados mostraron un último panel de proteínas evaluadas, en las que se observó equilibrio en la cinética de consumo y producción durante la fase de proliferación de las CEM-GW modificadas genéticamente: Angiogenina, RANTES, ICAM-1, MSP/MST-1, la familia IGFBP-1, -2 y -3 e IL-10 (**Figura 21C**).

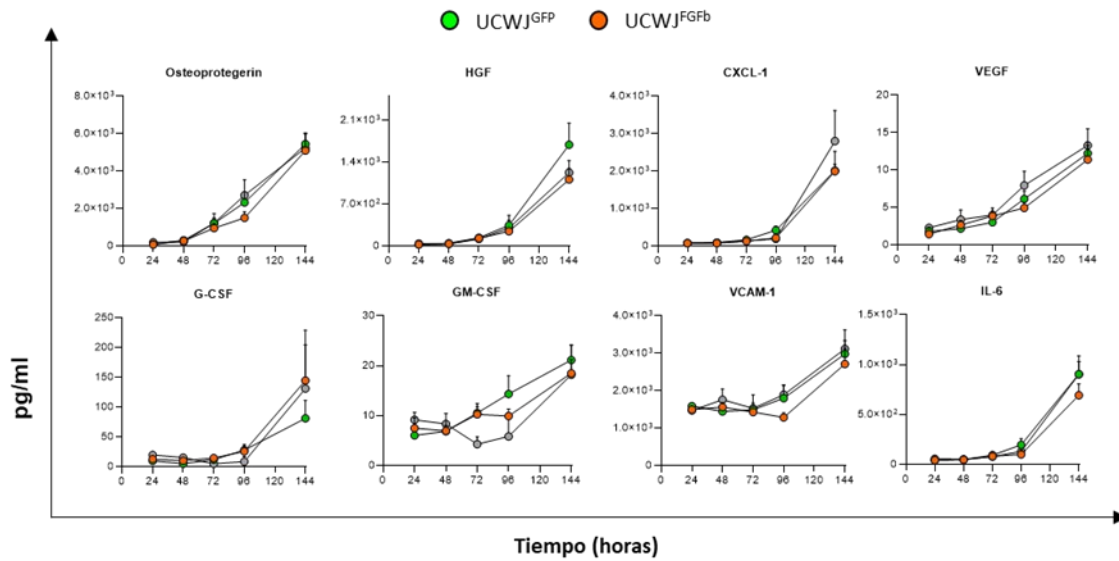
A.



B.



C.



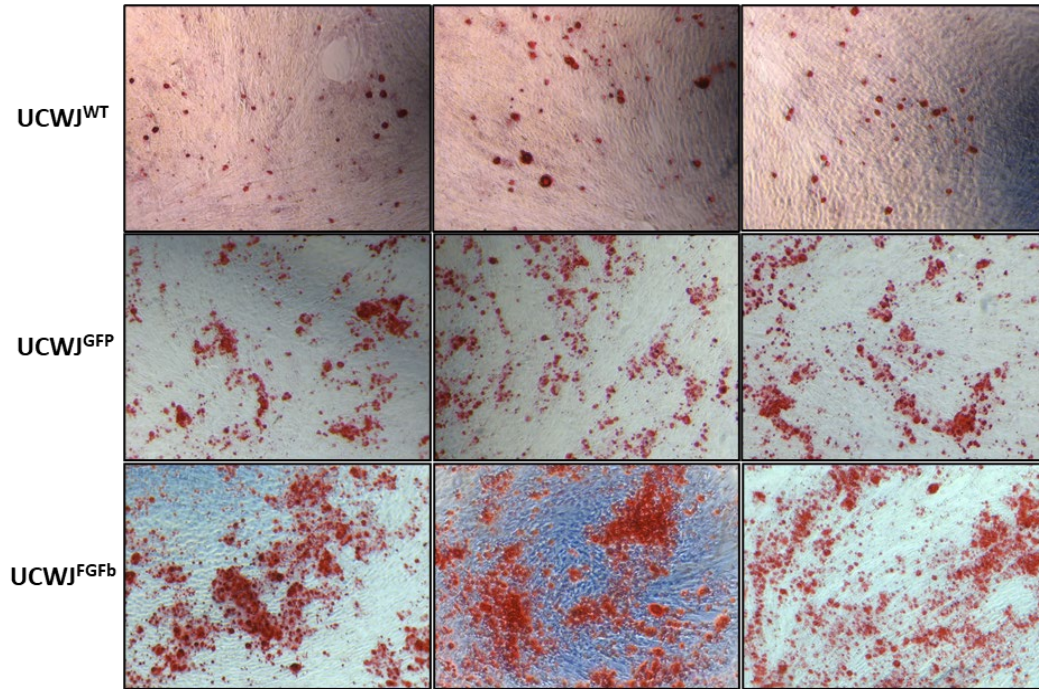
**Figura 21. Perfil de secreción de factores solubles de las CEM-GW modificadas genéticamente por LV, para la sobreexpresión de la proteína FGFB.** Las CEM-GW fueron transducidas con LV-FGFB y LV-GFP. Durante 6 días post-nucleofección se colectaron sobrenadantes cada 24h. **A.** Citocinas y factores de crecimiento consumidos por UCWJ<sup>FGFB</sup> cultivados en hLP, en comparación con células control (UCWJ<sup>GFP</sup>) y de referencia (UCWJ<sup>WT</sup>). **B.** Citocinas y factores de crecimiento secretados por UCWJ<sup>FGFB</sup> cultivados en hLP, en comparación con células control (UCWJ<sup>GFP</sup>) y de referencia (UCWJ<sup>WT</sup>). UCWJ<sup>WT</sup>: CEM-GW *wildtype*. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW transducidas con los LV-GFP. UCWJ<sup>FGFB</sup>: CEM-GW transducidas con los LV-FGFB. Los resultados son de tres donantes (n=3 por grupo).

### 3.2.6 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la proteína FGFB en las propiedades funcionales de las CEM-GW

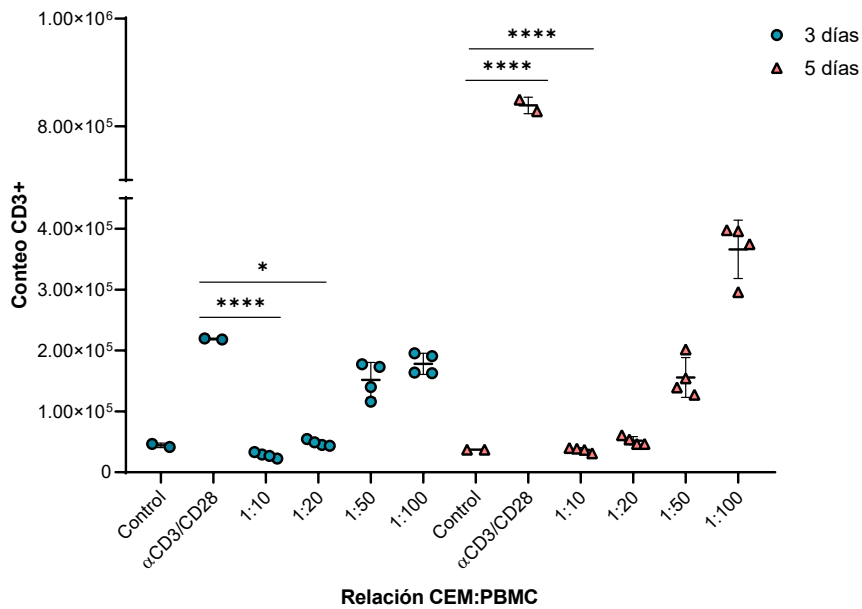
En los siguientes experimentos se evaluó el efecto de la sobreexpresión del factor FGFB en las CEM-GW sobre su función biológica, en términos del potencial de diferenciación y de inmunomodulación. Para ello, se realizaron ensayos de diferenciación celular *in vitro*, dirigidos hacia el linaje celular de osteoblastos. Las imágenes de microscopia tomadas después de la tinción de las células no modificadas y modificadas genéticamente, con rojo de Alizarina a los 21 días en medio de diferenciación, mostraron acumulación de calcio en los diferentes grupos experimentales (**Figura 22A**). Esta acumulación se evidencia por los puntos o zonas de color rojo. Es notable que las células CEM-GW modificadas genéticamente para la sobreexpresión del factor muestran incremento de estas zonas, evidenciando un incremento en la acumulación de calcio (**Figura 22A**, panel inferior UCWJ<sup>FGFB</sup>). Este resultado fue reproducible en dos donantes de CEM-GW cuyas diferencias en el cambio de la acumulación de calcio se relacionan con la variación del

nivel de sobreexpresión del factor obtenida después de la transducción. Con este resultado se sugiere que la sobreexpresión del factor en CEM-GW incrementa su potencial de diferenciación hacia osteoblastos. Así mismo se sugiere validación de estos resultados con otras técnicas analíticas.

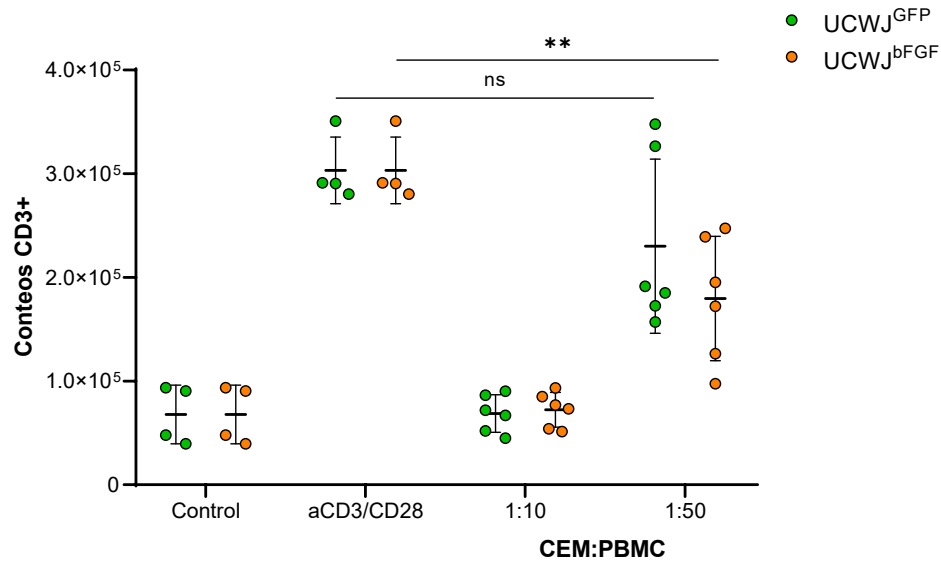
**A.**



**B.**



C.



**Figura 22. Efecto de la sobreexpresión del factor de crecimiento FGFb en las propiedades funcionales de las CEM-GW.** **A.** Micrografías representativas de los ensayos *in vitro* de diferenciación osteogénica de UCWJ<sup>GFP</sup> (segundo panel) y UCWJ<sup>FGFb</sup> (tercer panel). Comparación con los donantes *wildtype* (UCWJ<sup>WT</sup>, primer panel). **B.** Estandarización del ensayo de inmunomodulación *in vitro* de las CEM-GW *wildtype*. Se realizó un ensayo de inmunomodulación *in vitro* directo (contacto célula-célula) con dos donantes de CEM-GW, evaluando las relaciones CEM:PBMCs 1:10, 1:20, 1:50 y 1:100. Las células fueron colectadas después de 3 y 5 días de interacción. **C.** Ensayo de inmunomodulación *in vitro* de las UCWJ<sup>GFP</sup> (puntos verdes) y UCWJ<sup>FGFb</sup> (puntos naranjas). Se realizó un ensayo de inmunomodulación *in vitro* directo (contacto célula-célula), con tres donantes de CEM-GW transducidos y las relaciones CEM:PBMCs 1:10 y 1:50. Control: PBMCs sin estímulo.  $\alpha$ CD3/CD28: PBMCs activadas con las perlas de activación. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW transducidas con los LV-GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW transducidas con los LV-FGFb. Los resultados son de dos mediciones (n=2 por grupo). \* p<0,05, \*\* p>0,01 \*\*\*\* p<0,0001 de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples ANOVA, Tukey.

De manera previa a los ensayos para evaluar el efecto de la sobreexpresión del factor FGFb en la propiedad de inmunomodulación de las CEM-GW, se evaluaron diferentes relaciones celulares de CEM:PBMCs, para obtener menos del 50% de inhibición en la proliferación de los linfocitos CD3+. El ensayo de inmunomodulación *in vitro* directo o en contacto célula-célula se evaluó durante 3 y 5 días, en donde finalmente, el efecto inmunomodulador se midió determinando el cambio en el nivel de proliferación de la subpoblación de linfocitos CD3+. Esta estandarización permite evaluar el efecto de la sobreexpresión del factor sobre la propiedad de inmunomodulación de las CEM. En el ensayo de inmunomodulación *in vitro*, los linfocitos T contenidos en las hPBMCs presentaron inducción de la proliferación ante el estímulo con las perlas de activación. Esta activación en términos cuantitativos representó un índice de proliferación (*fold change*) de 5 y 22 con respecto a células no estimuladas, a los 3 y 5 días, respectivamente (**Figura**

**22B**,  $\alpha$ CD3/CD28). En presencia de CEM-GW, se evidencia una supresión en la función de proliferación de los linfocitos T que fue dependiente de la dosis presente de CEM-GW. es así como una relación celular CEM:PBMCs más alta (1:10, 1:20, 1:50 y 1:100), disminuye la capacidad de inmunomodulación de las CEM; en otras palabras, aumenta el conteo de la subpoblación de linfocitos CD3<sup>+</sup> (**Figura 22B**). Este comportamiento fue similar en los dos días de medición del ensayo (3 y 5 días). Con estos resultados, se evidencia que para evaluar el efecto de la modificación genética de las CEM-GW se debe seleccionar un rango de relación celular de CEM: PBMCs entre 1:20 -1:50, ya que en este rango se encuentra al menos el 50% de inhibición en la proliferación de los linfocitos CD3<sup>+</sup>.

Los ensayos de inmunomodulación utilizando las CEM-GW modificadas genéticamente para la sobreexpresión de las proteínas GFP y FGFb, se realizaron siguiendo el protocolo estandarizado, con el que se estableció el rango de la relación CEM: PBMCs que presenta menos del 50% de inhibición de la proliferación de linfocitos T por las CEM-GW. En estos ensayos se evaluaron dos relaciones CEM:PBMCs, 1:10 y 1:50. En el ensayo de inmunomodulación *in vitro*, las PBMCs mostraron activación ante el estímulo con las perlas de activación, con un índice de proliferación de linfocitos T (*fold change*) entre 3,1 y 8,9. De manera interesante, se evidencia que las CEM-GW modificadas genéticamente redujeron drásticamente el número de células T CD3<sup>+</sup>, con un patrón de respuesta similar al observado en las células no modificadas (**Figura 22B**). Los conteos celulares CD3<sup>+</sup> utilizando la relación 1:10 (CEM: PBMC) se reducen al nivel del control, o las PBMCs sin estímulo de proliferación. Por otro lado, se observa también un comportamiento dosis-dependiente de la capacidad de inmunomodulación de las CEM-GW modificadas genéticamente, cuando se reduce el número de CEM por hPBMCs, donde se disminuye el efecto inhibitorio en la proliferación de la población CD3<sup>+</sup> (**Figura 22C**). Cuando se analiza el efecto de inmunomodulación de las CEM-GW modificadas genéticamente, UCWJ<sup>GFP</sup> y UCWJ<sup>FGFb</sup>, se observa que para la relación 1:50, la disminución de los conteos CD3<sup>+</sup> tiene significancia estadística para los donantes UCWJ<sup>FGFb</sup>. Lo que sugiere que la modificación genética de las CEM-GW con LV, para la sobreexpresión del del factor de crecimiento FGFb, no afecta la función biológica de las CEM, en términos del potencial de inmunomodulación. De hecho, la expresión constitutiva adicional de FGFb genera un incremento en el efecto inmunosupresor sobre la proliferación de células T.

### **3.3 CEM-GW-VEs: aislamiento, caracterización y evaluación de sus propiedades después de una estrategia de modificación genética**

Una línea de evidencia de gran interés científico y desarrollo biotecnológico en la actualidad está relacionada con el estudio y uso de las vesículas extracelulares (VEs) derivadas de las CEM, en regeneración tisular e inmunomodulación. A pesar de que el conocimiento sobre las propiedades de las VEs secretadas por las CEM ha aumentado, aún existen limitaciones para su aplicación clínica. Ya que en este proyecto proponemos explorar estrategias basadas en tecnología de transferencia génica para diseñar y manipular las células estromales mesenquimales de la gelatina de Wharton (CEM-GW) y sus derivados (las VEs), el primer abordaje experimental que se planteó en este objetivo se enfocó en evaluar algunas condiciones de cultivo para producir VEs y metodologías para el aislamiento de las VEs. Los resultados que se describen a continuación se produjeron durante una estadía de investigación en el marco de la colaboración científica entre la UTA-IDCBIS y el Grupo de investigación “Medical RNA Biology” del Deutsches Primatenzentrum (DPZ) en Göttingen, Alemania.

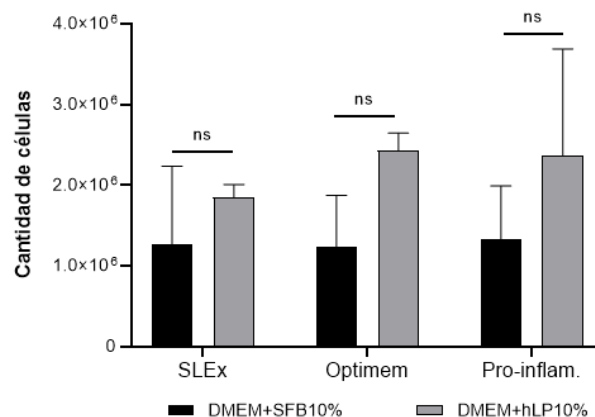
#### **3.3.1 Condiciones de cultivo para la producción de VEs: caracterización biológica y funcional**

##### **3.3.1.1 Análisis por tamaño y cantidad**

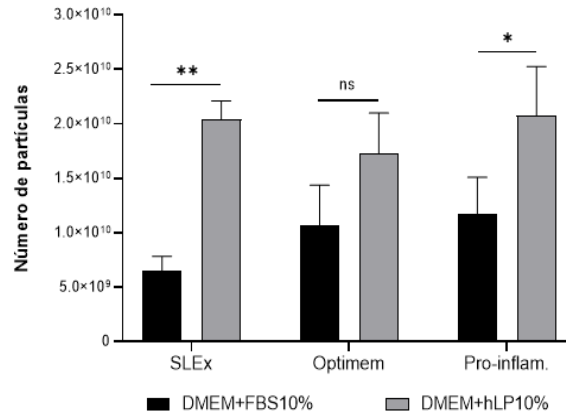
Ampliamente ha sido descrito que el control de las condiciones de crecimiento de las CEM con propiedades físicas, como variación de oxígeno y el pre-acondicionamiento de los medios de cultivo con factores solubles puede influir en la biogénesis y la función biológica de las vesículas extracelulares (Mas-Bargues & Borrás, 2021). De esta manera, antes de realizar el aislamiento de las VEs a partir de los sobrenadantes, se decidió evaluar el efecto de dos diferentes suplementos, SFB y hLP, en la fase de crecimiento de las células para alcanzar confluencia, y diferentes medios de producción de las VEs. Debido a que una pregunta de interés que se abordó en esta fase de investigación es si la aplicación de estímulos inflamatorios sobre CEM-GW como células productoras de VEs afecta la cinética de generación y el contenido de MVs y Exos. Experimentalmente las CEM-GW en confluencia se cultivaron en dos condiciones de cultivo: *starvation* o privación de nutrientes y pro-inflamación mediante la adición de dos citoquinas pro-inflamatorias, IL1 $\beta$

y TNF $\alpha$ . Para este ensayo se sembraron CEM-GW en medio DMEM suplementado con 10% SFB o 10% hLP, una vez se la confluencia fue de 80% el medio fue reemplazado por 3 condiciones para la producción de las VEs: DMEM suplementado con SFB libre de exosomas (SLEx) 10%, Optimem (*starvation*) y DMEM suplementado con dos citoquinas pro-inflamatorias (Pro-inflam.), IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ . Después de 48h de incubación las células fueron contadas y los sobrenadantes fueron colectados para análisis de nanopartículas con NTA y. Con el hLP se obtuvo un conteo más alto de células en comparación con el SFB, sin embargo, con la variabilidad de los datos no hay significancia estadística, la cual está mayormente relacionada con la variación de donantes en el ensayo (**Figura 23A.**). Por otro lado, si bien el cambio en la condición de cultivo para la producción de las VEs no afecta la proliferación de las CEM-GW, cuando se analiza el número de nanopartículas presentes en los sobrenadantes, se observan diferencias con significancia estadística cuando las células son cultivadas en hLP (**Figura 23B.**) y con SLEx en presencia de citoquinas pro-inflamatorias, al comparar con el cultivo de las células en SFB. Se determinaron conteos de 3,1, 1,7 y 1,8 veces más nanopartículas, en las condiciones de SLEx, Optimem y Pro.inflam., respectivamente. Al graficar los datos correspondientes al conteo de partículas vs el conteo celular, con el fin de observar alguna correlación (**Figura 23C.**), se observa que, para una misma cantidad de células, se induce un mayor número de VEs utilizando hLP como suplemento de crecimiento celular. Todos estos resultados, sugirieron seleccionar el hLP como el suplemento de crecimiento de las células, para la posterior inducción de la producción de las VEs. Así mismo, estos datos sugieren que la producción de VEs no está directamente relacionada con el número de células, sino con el estado metabólico de ellas.

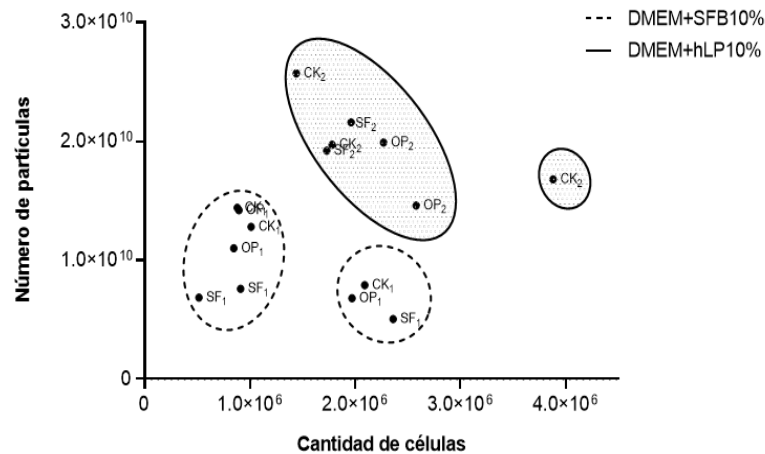
## A.



## B.



## C.

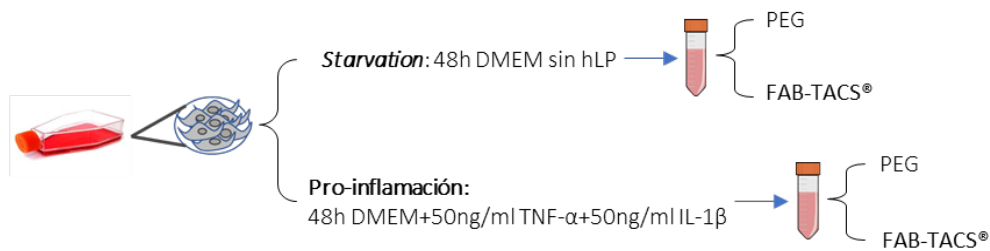


**Figura 23. Análisis de la producción de VEs con el medio de cultivo de las CEM-GW. A.** Cuento de células después 48h post-incubación con tres medios para inducir la producción de vesículas: DMEM con SFB libre de exosomas (SLEx), Optimem (*starvation*) y DMEM con citoquinas pro-inflamatorias (Pro-inflam.). **B.** Cuento de las nanopartículas en los sobrenadantes colectados después de 48h post-incubación en los medios de inducción de VEs. Los resultados son de tres donantes de CEM-GW (n=3 por grupo). \*\* indica  $p < 0,005$ , \*  $p < 0,05$  de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples ANOVA de dos vías, Sidak. **C.** Correlación entre el número de células y la cantidad de VEs en las diferentes condiciones de cultivo. SF: Suero fetal bovino libre de exosomas, OP: Optimem, CK: pro-inflamación. 1: DMEM+SFB10%, 2: DMEM+hPL10%. Los resultados son de tres donantes de CEM-GW (n=3 por grupo). \*\* indica  $p < 0,005$ , \*  $p < 0,05$  de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples ANOVA de dos vías, Sidak.

A continuación, se probaron distintas metodologías para el aislamiento de las VEs generadas bajo las dos condiciones de cultivo anteriormente mencionadas. Aquí se utilizaron dos metodologías de aislamiento: precipitación con polietilenglicol (PEG) y cromatografía de afinidad (columnas FAB-TACS®) (**Figura 24A.**). El primer protocolo fue establecido en el laboratorio de la UTA (IDCBIS-Bogotá, Colombia), mientras que el

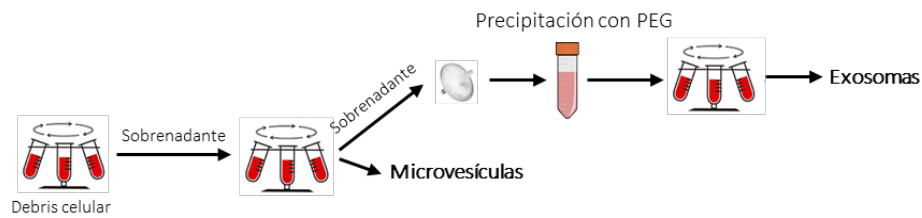
segundo fue desarrollado en el laboratorio del grupo MrB (DPZ-Göttingen, Alemania). En la primera metodología (**Figura 24B**, panel superior), los sobrenadantes de CEM-GW recuperados se someten a un paso de aclaramiento por centrifugación y se aíslan dos tipos de VEs: MV correspondientes a la fracción vesicular de más de 500nm de diámetro y Exos de menos de 200nm. La segunda metodología (**Figura 24B**, panel inferior) corresponde a una nueva tecnología propuesta por la compañía alemana iba Solutions for Life Sciences, en la cual el aislamiento de los exosomas se realiza por medio de una columna de afinidad. La columna Fab-TACS® está compuesta de una matriz a la cual fragmentos del anticuerpo contra CD9 se unen específicamente. Posteriormente, los exosomas se unen a la matriz y las demás micropartículas se eliminan con lavados. En un paso final, la adición de biotina provoca la elución de los exosomas. La caracterización de las diferentes fracciones de VEs obtenidas, mediante tamaño y cantidad de nanopartículas producidas, se realizó utilizando NTA.

### A.

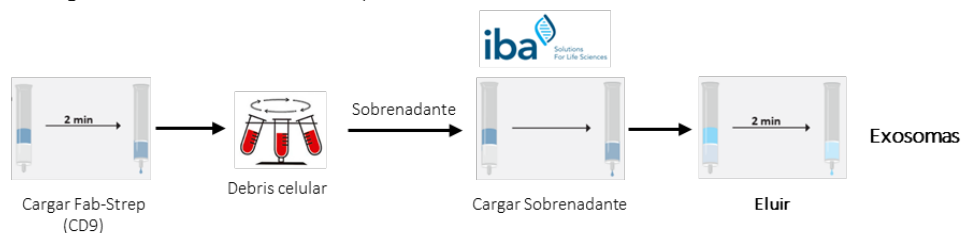


### B.

#### Metodología 1: Precipitación con PEG



#### Metodología 2: Exosome FAB-TACS® Gravity kit

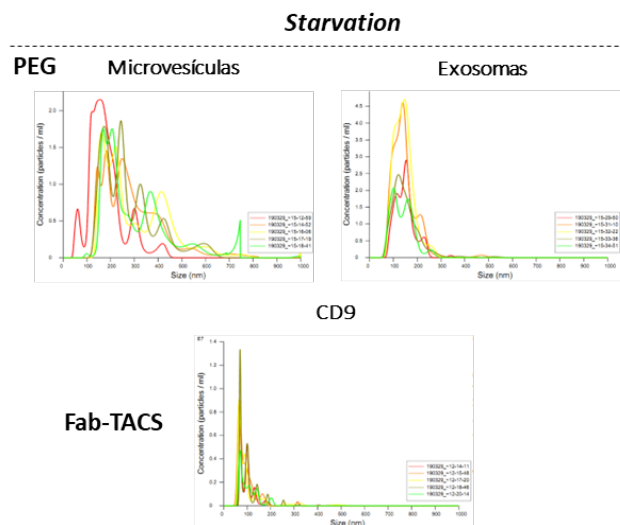


**Figura 24. Producción y aislamiento de VEs a partir de un cultivo de CEM-GW. A.** Esquema del flujo de trabajo y las condiciones experimentales para la obtención de los sobrenadantes a partir de un cultivo de células CEM-GW. Los sobrenadantes fueron obtenidos después de 48h en condición de *starvation* y de pro-inflamación. **B.** Metodologías de aislamiento de VEs derivadas de CEM-GW. La primera metodología comprende una serie de centrifugaciones y un paso de precipitación con PEG, con la que se obtienen dos tipos de VEs: MVs y Exos. La segunda metodología es una cromatografía de afinidad, en la que utilizando fragmentos del anticuerpo contra la tetraspanina CD9, se aísla la fracción de Exos.

La **Figura 25A.**, muestra la distribución del tamaño de las VEs aisladas de las dos condiciones de cultivo evaluadas, con las dos metodologías ensayadas. El panel de la izquierda correspondiente a la condición de *starvation* muestra que en la fracción de MVs aislada en el procedimiento con PEG, la distribución de tamaño de las nanopartículas es heterogénea, inicia aproximadamente en 150nm y se extiende hasta 600nm, mientras que la distribución de tamaño de las nanopartículas en la fracción de Exos es un poco más homogénea, iniciando en tamaños menores a 100nm y de máximo 200nm. De manera interesante, la fracción de Exos aislada con la columna Fab-TACS CD9 muestra una distribución de tamaño de nanopartículas aún más homogénea, en un rango de entre 50-100nm. Es importante resaltar que, de acuerdo con los resultados obtenidos, no hay diferencias significativas entre las dos metodologías evaluadas, para el aislamiento de las exosomas, PEG y Fab-TACS. Sin embargo, se observa que existe una pequeña diferencia, en donde el aislamiento con la columna Fab-TACS permite la obtención de nanopartículas más pequeñas. Este mismo comportamiento se presenta cuando las CEM-GW reciben un estímulo pro-inflamatorio (**Figura 25A.**, panel derecho). Cuando se analiza el tamaño promedio de las nanopartículas en las fracciones aisladas con PEG y Fab-TACS (**Figura 25B.**) se observa de manera clara que la fracción de MVs presenta partículas de mayor tamaño, mientras que la fracción de Exos se encuentra en un rango de menor tamaño. Por otro lado, aunque se observa una pequeña disminución en el promedio del tamaño de las MVs en la condición de pro-inflamación y utilizando PEG (**Figura 25B.**, triángulos), la diferencia no tiene significancia estadística. En cuanto a la fracción de Exos no hay diferencias en el promedio de tamaño en las dos condiciones de cultivo y utilizando PEG; mientras que con la columna Fab-TACS se observa un pequeño incremento en el promedio de tamaño, aunque sin significancia estadística. Los resultados sugieren que el estímulo inflamatorio no afecta la distribución de tamaño de las VEs producidas. Adicionalmente, los tamaños observados en las fracciones de MVs y Exos aisladas corresponden con lo que se ha reportado previamente en literatura.

A continuación, se evaluó la producción de las VEs mediante el conteo de las distintas fracciones nanopartículas por NTA (**Figura 25C.**). En las fracciones aisladas, MVs y Exos, utilizando PEG se observa que independientemente de la condición de cultivo, se obtuvo menor conteo de nanopartículas en la fracción de MVs que en la de Exos. A pesar de que se observa una mayor variabilidad en el conteo de nanopartículas en la fracción de Exos aislados de la condición de pro-inflamación y con PEG, es posible afirmar que el número de nanopartículas en la fracción de Exos incrementa significativamente cuando las CEM-GW reciben el estímulo de pro-inflamación, mientras que no hay diferencia en el conteo de nanopartículas en la fracción de MVs. Cuando se comparan los resultados del conteo de nanopartículas en la fracción de Exos aislada con la columna Fab-TACS, no se observan diferencias entre las dos condiciones de cultivo, mientras que es interesante notar la diferencia en la cantidad de vesículas aisladas con cada una de las metodologías, donde con la metodología utilizando PEG se obtiene una mayor cantidad de VEs, en cualquier condición de cultivo. En la condición de pro-inflamación la diferencia es más grande. Esta observación responde a una limitación técnica de las columnas Fab-TACS, ya que la resina de agarosa tiene un límite de saturación, generando la retención de hasta cierta cantidad de VEs que es independiente del volumen del sobrenadante que se pasa a través de la columna. Los resultados permiten sugerir que el estímulo inflamatorio afecta el número de VEs producidas, incrementando significativamente su número, principalmente en la fracción de exosomal. Sin embargo, la metodología de aislamiento de las VEs genera un sesgo en los resultados de conteo de las nanopartículas.

## A.





**Figura 25. Caracterización de las vesículas extracelulares aisladas de CEM-GW por NTA. A.** Distribución del tamaño de las nanopartículas en las dos fracciones aisladas utilizando PEG (MV y Exos), y la fracción de Exos aislada con la columna Fab-TACS, a partir de los sobrenadantes obtenidos de las CEM-GW cultivadas en *starvation* y en condiciones de pro-inflamación. **B.** Análisis de la distribución del tamaño de las nanopartículas en las fracciones aisladas con PEG y Fab-TACS. Los resultados son de 4 donantes de CEM-GW (n=4 por grupo). ns de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples ANOVA de dos vías, Sidak. **C.** Análisis de la cuantificación de nanopartículas en las fracciones aisladas con PEG y Fab-TACS. Los resultados son de tres donantes de CEM-GW (n=3 por grupo). \*  $p < 0,05$  de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples ANOVA de dos vías, Sidak.

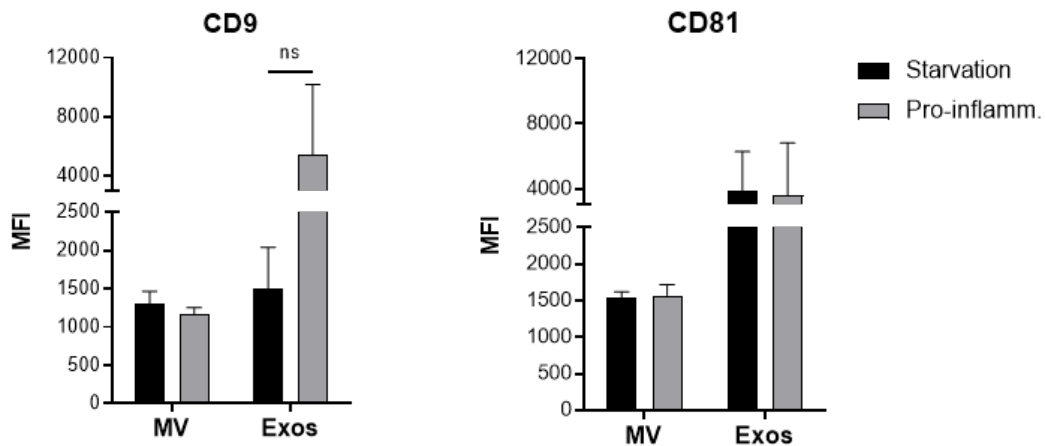
### 3.3.1.2 Análisis expresión de marcadores de superficie

El análisis de la expresión de los marcadores de superficie que son característicos de las VEs, entre ellos, CD9, CD81 y CD63, fue realizado inicialmente mediante citometría de flujo. Se utilizaron perlas de látex para permitir la adherencia de nanovesículas. Las proteínas CD9 y CD81 enriquecidas en las VEs se detectaron en las dos fracciones aisladas con PEG, MVs y Exos, según el análisis de citometría de flujo (**Figura 26A.**). La fracción de MVs muestra para las dos tetraspaninas valores similares de MFI, lo que sugiere que en esta vesícula hay una misma distribución de moléculas para las dos proteínas, además que el pre acondicionamiento de las CEM-GW en el ambiente pro-inflamatorio, no cambia su nivel de expresión (**Figura 26A.**, grupo MV, barras grises). Por su parte, en la fracción de Exos se observa, en las dos condiciones de cultivo valores de MFI mayores para la tetraspanina CD81 en comparación con la tetraspanina CD9, es decir que hay más moléculas de CD81 en los exosomas. De manera interesante, sólo CD9 muestra un incremento de MFI en la condición de pro-inflamación, sin embargo, no tiene significancia estadística (**Figura 26A.**, grupo Exos, barras grises). Con esta metodología, no se logró la detección de la tetraspanina CD63 en las fracciones aisladas.

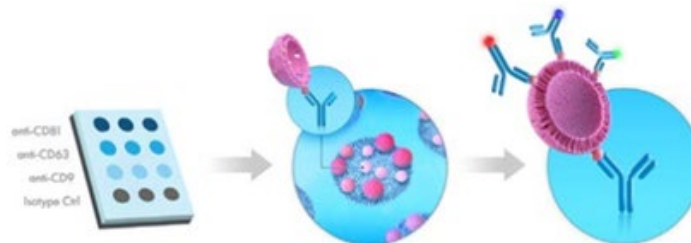
La segunda metodología utilizada para el análisis de la expresión de las tetraspaninas fue la plataforma ExoView® desarrollada por la compañía NanoView Biosciences (Brighton, MA, Estados Unidos). Esta tecnología analítica se encuentra diseñada para el análisis de virus, exosomas y otras VEs con alta especificidad y sensibilidad. Adicionalmente, permite realizar el análisis de VEs única directamente de la muestra. La plataforma ExoView® funciona sin necesidad de purificación de muestras. Los exosomas se capturan en un chip ExoView® que se fusiona con anticuerpos estándar (CD9, CD63, CD81 y CD41a) o anticuerpos personalizados. Posteriormente, las VEs se pueden teñir con anticuerpos fluorescentes con capacidad de hasta tres proteínas adicionales (**Figura 26B.**). Mientras

que las tecnologías que no detectan específicamente las VEs (como NTA) están sesgadas por la presencia de contaminantes comunes en las mediciones de tamaño y concentración, NanoView emplea la captura dirigida de VEs y, por lo tanto, las mediciones no están influenciadas por las lipoproteínas o los VEs de los suplementos (SFB) que a menudo se encuentran en los medios de cultivo celular. NanoView mide específicamente sólo las VEs de interés. Una de las aplicaciones de la tecnología es la colocalización de biomarcadores. El analizador ExoView® superpone imágenes de cuatro canales de fluorescencia y proporciona información cuantitativa sobre la colocalización de biomarcadores en cada vesícula individual. Las subpoblaciones de VEs se pueden caracterizar por su perfil de proteínas, así como por la expresión relativa de proteínas en cualquier canal de fluorescencia. El análisis de colocalización de biomarcadores ExoView permite analizar completamente las subpoblaciones de VEs e investigar la relación entre la expresión de biomarcadores y el estado de la enfermedad. Adicionalmente, con esta metodología, los resultados no tienen el sesgo que los datos pueden presentar por la metodología de aislamiento y el conteo de partículas con NTA.

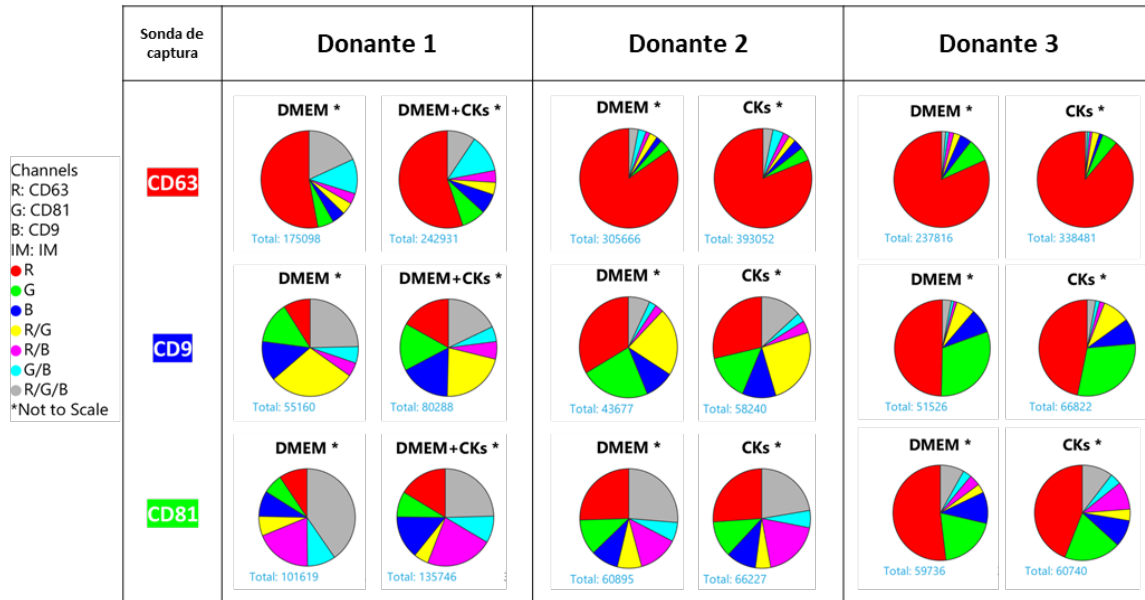
A.



B.



C.



**Figura 26. Caracterización de las VEs aisladas de CEM-GW, por expresión de marcadores de superficie. A.** Análisis de la expresión de las tetraspaninas CD9 y CD81 en la fracción de MVs y Exos aislados con PEG, mediante citometría de flujo. Los resultados son de 3 mediciones (n=3 por grupo). ns de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples ANOVA de dos vías, Sidak. **B.** Principio de funcionamiento del modo de fluorescencia ExoView. Una vez que la muestra se incubó en el chip, las VEs se pueden teñir con anticuerpos fluorescentes para hasta tres proteínas adicionales. **C.** Análisis de la expresión de las tetraspaninas CD63, CD9 y CD81 en los sobrenadantes obtenidos después de cultivar las CEM-GW en condiciones de *starvation* (DMEM) y de pro-inflamación (DMEM+CKs o CKs), mediante la plataforma ExoView®.

El análisis de la expresión de las tetraspaninas en las VEs derivadas de las CEM-GW, mediante ExoView permitió tener una descripción más amplia de la distribución de las tetraspaninas en los sobrenadantes analizados bajo las dos condiciones de cultivo. Inicialmente, se observa que la tetraspanina con mayor nivel de expresión en las nanovesículas es CD63 (**Figura 26C.**, color rojo), ya que el número total de vesículas que se capturan cuando el anticuerpo contra esta proteína se utiliza como sonda captura, es superior en comparación con CD9 y CD81 (**Figura 26C.**, panel sonda de captura CD63). Por otro lado, se muestra que más del 50% de la población medida lleva un único marcador de superficie, CD63 (color rojo), CD9 (color azul) y CD81 (color verde), donde CD63 es notablemente la tetraspanina más representada (**Figura 26C.**, panel sonda de captura CD63). Un bajo porcentaje de la población de vesículas también muestra colocalización de dos marcadores, en las 3 combinaciones posibles de las 3 tetraspaninas (**Figura 26C.**, colores amarillo, violeta y cian). Para los dos primeros donantes, se observa también un bajo porcentaje de vesículas que muestran colocalización de las 3 tetraspaninas (**Figura**

**26C.**, color gris). Es importante anotar que la distribución de la expresión de las tres tetraspaninas es usualmente diferente entre donantes, para cada una de las condiciones de cultivo, cuando CD9 (color azul) y CD81 se utilizan como sondas de captura, la distribución de las tetraspaninas como único marcador o en colocalización, es comparable. De manera interesante, se observa que la distribución de los marcadores de superficie no cambia significativamente, al comparar las dos condiciones de cultivo, *starvation* (DMEM) y pro-inflamación (DMEM+CKs). Sin embargo, el número total de partículas medidas en la condición de pro-inflamación es siempre mayor, en los tres donantes medidos. Con esta metodología y con mayor precisión se observa que el pre-acondicionamiento de las CEM-GW con un estímulo inflamatorio, no afecta la expresión de las tetraspaninas ubicuas en las VEs, mientras que se incrementa el número de VEs producidas, el cual va es dependiente del donante.

### **3.3.2 Efecto de la modificación genética por LV en las CEM-GW-VEs**

En línea con los anteriores resultados y el objetivo final del presente trabajo, el último abordaje experimental que se planteó fue evaluar el efecto de la modificación genética por LV en las CEM-GW, sobre las características y propiedades funcionales de las VEs, aplicando algunas de las metodologías y los resultados obtenidos en el abordaje experimental anterior. Los resultados que se describen a continuación se produjeron en la cooperación científica con la Unidad de investigación y desarrollo de la firma biotecnológica Curexsys GmbH en Göttingen, Alemania.

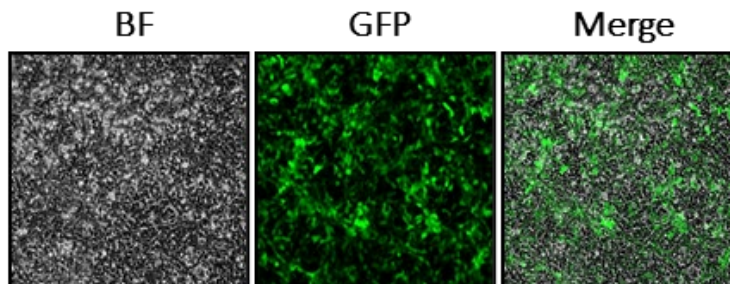
#### **3.3.2.1 Modificación genética estable de las CEM-GW con LV-GFP y LV-FGFb**

Para esta fase de investigación, se estableció un nuevo banco maestro de células modificadas genéticamente. La producción de partículas LV-GFP y LV-FGFb se realizó teniendo en cuenta el protocolo establecido en este estudio, utilizando lipofectamina para la transfección de los 4 plásmidos en células HEK. Las partículas virales recolectadas después de 48h post-transfección se utilizaron directamente para infectar células HEK y calcular el título funcional. La **Figura 27A.**, panel superior, muestra alta tasa de infectividad de las partículas producidas sobre las HEK, ya que un porcentaje >80% de las células muestran fluorescencia verde. Después de la lectura por citometría de flujo y el análisis de

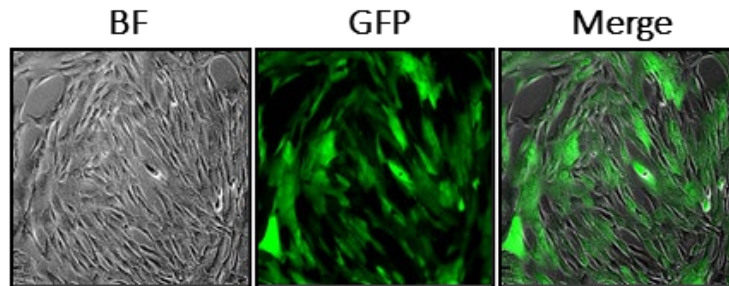
los datos, el valor del título funcional obtenido fue de  $5,5 \times 10^6$  PVI/ml. Este valor fue 2,5 veces el valor obtenido en la estandarización del protocolo, mostrando no sólo alta eficiencia de transfección, si no reproducibilidad del protocolo establecido. Con las partículas LV se realizó transducción de dos donantes de CEM-GW utilizando las condiciones experimentales estandarizadas en este trabajo. Se siguió el flujo de trabajo diseñado para el establecimiento del banco maestro (MCB) y de trabajo (WCB) de las CEM modificadas genéticamente, como fue descrito anteriormente (**Figura 17A.**). Una vez se realizó la transducción de las células con los LV-GFP y LV-FGFb, se validó mediante microscopia de fluorescencia después de 72h, posteriormente las células fueron colectadas para expansión y análisis de expresión de las proteínas por FACS. Una vez caracterizada la transducción por citometría, estas se colectaron para realizar una nueva expansión y el primer ciclo de congelamiento, con el cual se conformó el MCB. Con las siguientes dos expansiones de las CEM se conformó el WCB. Después de 72h de transducción, por microscopia se observó transducción eficiente de las CEM-GW, ya que la fluorescencia de la proteína GFP se observó en un porcentaje significativo de las células en el campo de observación (**Figura 27A.**, panel inferior). Posteriormente, la evaluación de la transducción por citometría mostró un porcentaje de expresión para GFP de 53,9 - 54,8% y para FGFb de 29,6 – 35,6% (**Figura 27B.**), para el donante 1 y 2, respectivamente. En esta oportunidad no se observó variabilidad significativa entre donantes, así que se continuó con la expansión del cultivo de las células modificadas para la producción de las VEs.

**A.**

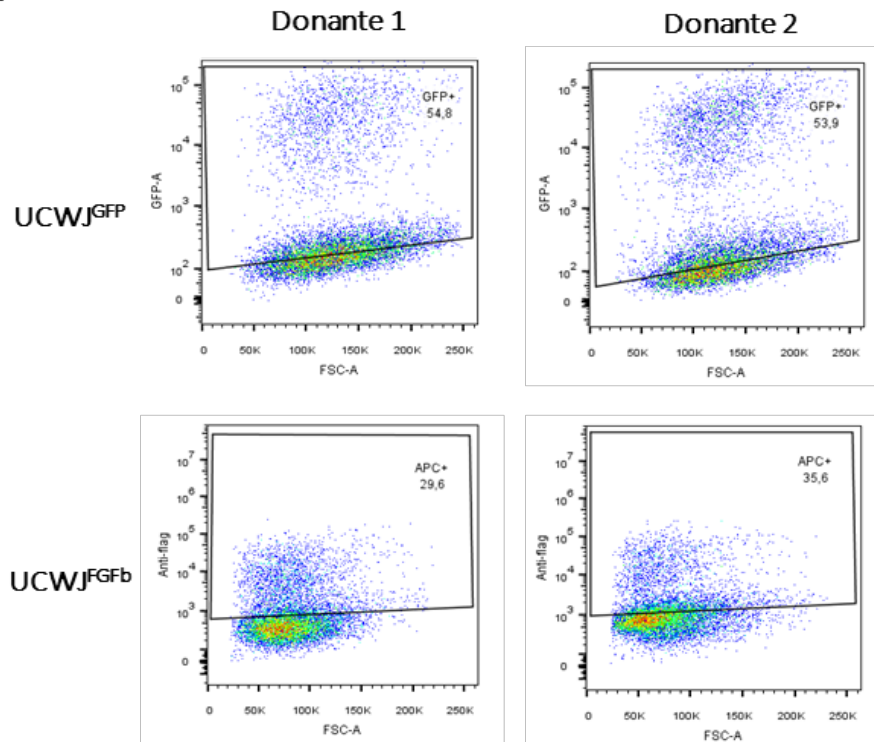
### Transducción HEK 293T



## Transducción UCWJ



B.

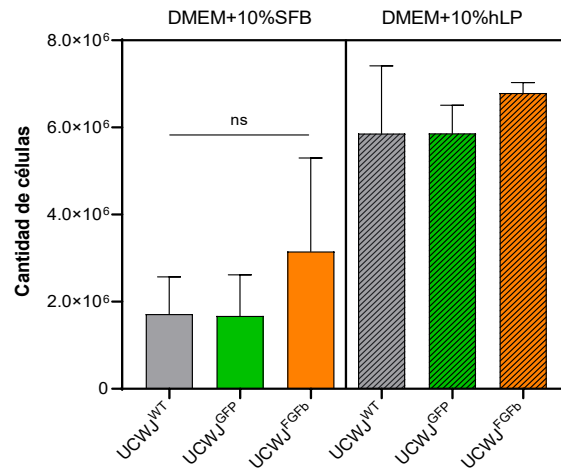


**Figura 27. Transducción de CEM-GW con las partículas LV-GFP y LV-FGFb. A.** Fotos de microscopía de fluorescencia tomadas a las células HEK293T transducidas con los LV-GFP recolectados después de 48hpt con lipofectamina. **B.** Fotos de microscopía de fluorescencia tomadas a las CEM-GW transducidas con los LV-GFP recolectados después de 48hpt con lipofectamina. **C.** Citometría de flujo de dos donantes de CEM-GW después de 72h post-transducción con los LV-GFP y LV-FGFb. CEM-GW no infectadas fueron utilizadas como control de expresión de las proteínas. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-FGFb.

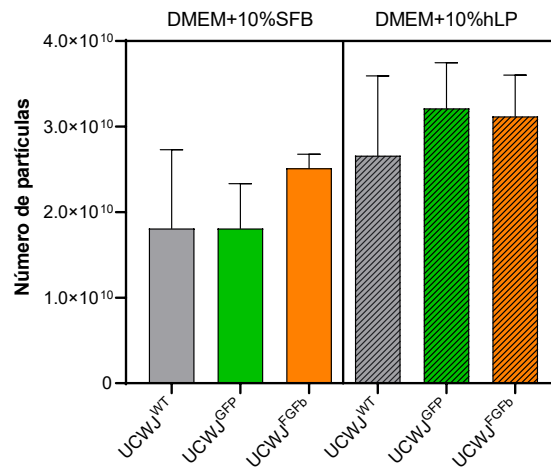
Antes de realizar el aislamiento de las VEs a partir de los sobrenadantes, se decidió evaluar el efecto de los suplementos, SFB y hLP, en el crecimiento de las células. Para este ensayo

se sembraron CEM-GW *wildtype* (UCWJ<sup>wt</sup>), modificadas con el LV-GFP (UCWJ<sup>GFP</sup>) y modificadas con el LV-FGFb (UCWJ<sup>FGFb</sup>) utilizando medio DMEM suplementado con SFB y hLP, una vez se alcanzó confluencia del 80%, el medio fue reemplazado por DMEM sin suplemento, como condición para la producción de las VEs. Después de 48h de incubación de las células con este medio de cultivo, los sobrenadantes fueron recolectados para análisis de nanopartículas con NTA y las células fueron contadas. En línea con lo observado anteriormente, con el suplemento de hLP se obtiene un conteo más alto de células en comparación con el SFB tanto para las CEM-GW no modificadas, como para las modificadas genéticamente (**Figura 28A.**). Es interesante observar un conteo ligeramente superior para las células UCWJ<sup>FGFb</sup>, el cual es más notable cuando las células se cultivan con SFB. Este resultado se asocia con los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento, en donde la sobreexpresión de la proteína FGFb tiene un impacto en la viabilidad y crecimiento de las CEM-GW. Por otro lado, los resultados muestran que el cambio de medio de cultivo (sin suplementos), para la producción de las VEs no afecta la proliferación de las CEM-GW no modificadas o modificadas. Cuando se analiza el número de nanopartículas en los sobrenadantes, se observa un ligero incremento de nanopartículas cuando las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con hLP (**Figura 28B.**) con un incremento entre los grupos celulares, de 1,2 – 1,7 veces más vesículas, al comparar con el conteo en SFB. En las dos condiciones de cultivo, SFB y hLP, se observa también un mayor conteo de nanopartículas para las células que sobreexpresan FGFb (UCWJ<sup>FGFb</sup>, **Figura 28B.**, barra color naranja) en comparación con las células no modificadas (UCWJ<sup>WT</sup>, **Figura 28B.**, barra color gris). A pesar de las pequeñas diferencias observadas, no hay significancia estadística entre los grupos experimentales. Finalmente, se generó una gráfica con los datos del conteo de partículas vs el conteo celular (**Figura 28C.**), donde se observó que la distribución de los datos muestra una baja correlación directa entre el número de células y la cantidad de nanopartículas producidas. Los datos sugieren que la modificación genética de las CEM-GW para la sobreexpresión del factor FGFb influye en el crecimiento de las células, pero no en la producción de vesículas extracelulares.

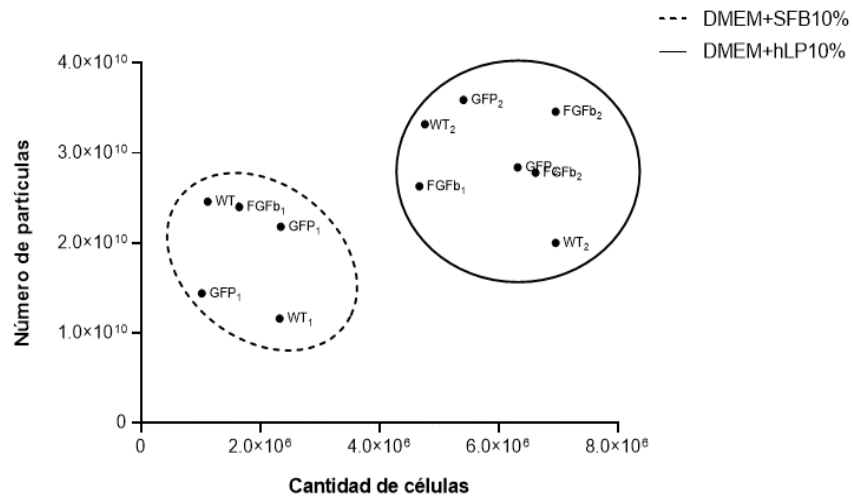
**A.**



**B.**



**C.**



**Figura 28. Análisis de la producción de VEs de las CEM-GW modificadas genéticamente. A.** Conteo de células después 48h en condición de *starvation* (DMEM sin suplemento), para las UCWJ<sup>GFP</sup> y UCWJ<sup>FGFb</sup>, en comparación con las UCWJ<sup>WT</sup>. **B.** Conteo de las nanopartículas en los sobrenadantes colectados después de 48h de incubación en condición de *starvation*, para los tres grupos de células, por NTA. Los resultados son de 2 donantes CEM-GW (n=2 por grupo). ns de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples ANOVA de una vía, Tukey. **C.** Correlación entre el número de células y la cantidad de VEs contadas, en los diferentes grupos de células. Los resultados son de dos donantes de CEM-GW (n=2 por grupo). UCWJ<sup>WT</sup>: CEM-GW *wildtype*. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-FGFb.

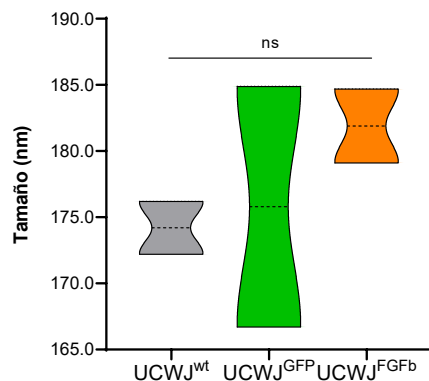
### 3.3.2.2 Caracterización biológica de las VEs derivadas de CEM-GW modificadas genéticamente con LV

Una vez se evaluó el medio de cultivo para el crecimiento de las CEM-GW y la producción de VEs, se dio paso a la caracterización biológica de las VEs. Se prepararon VEs de cultivos primarios de las células UCWJ<sup>wt</sup>, UCWJ<sup>GFP</sup> y UCWJ<sup>FGFb</sup>. Células en pasajes tempranos (P2 y P3 post-transducción) y en medio DMEM suplementado con 10% hLP, fueron utilizadas para la generación de las VEs. Una vez los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia, el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM sin el suplemento (*starvation*), para inducir la producción de las VEs. Los sobrenadantes o medios condicionados (MC), obtenidos después de 48h se utilizaron para aislar las VEs mediante ultracentrifugación. La caracterización de la fracción de vesículas obtenidas, mediante tamaño y cantidad de nanopartículas producidas, se realizó utilizando NTA. La **Figura 29A.**, muestra la distribución del tamaño de las VEs aisladas de UCWJ<sup>wt</sup>, UCWJ<sup>GFP</sup> y UCWJ<sup>FGFb</sup>. El tamaño de las nanopartículas está entre 165-190nm, rango en el cual se incluyen los exosomas, con mayor variabilidad para el grupo de UCWJ<sup>GFP</sup>. Los datos también muestran que las VEs aisladas son homogéneas sin diferencias entre CEM-GW no modificadas y modificadas. La caracterización en cuanto a la cantidad de nanopartículas (**Figura 29B.**) muestra que las UCWJ<sup>FGFb</sup>, producen una mayor cantidad de VEs, entre 1,3 – 1,6 veces más nanopartículas en comparación con UCWJ<sup>WT</sup> y UCWJ<sup>GFP</sup>; sin embargo, el análisis estadístico es no significativo. Estos resultados sugieren, y en concordancia con el experimento anterior, que la modificación genética de las CEM-GW para la sobreexpresión del factor FGFb no influye significativamente en la producción de VEs.

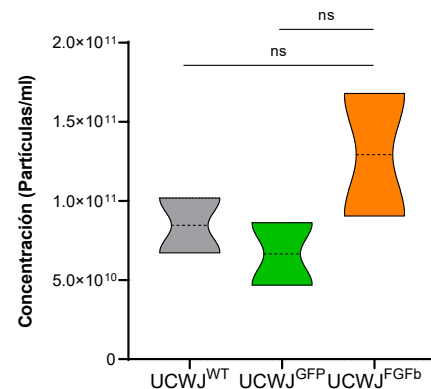
El análisis de la expresión de los marcadores de superficie característicos de las VEs, CD9, CD81 y CD63, fue realizado mediante la plataforma ExoView®. Inicialmente, se observa que la tetraspanina con mayor nivel de expresión en las nanovesículas es CD63 (**Figura**

**29C.**, color rojo), ya que el número total de vesículas que se capturan cuando el anticuerpo contra esta proteína se utiliza como sonda captura, es superior en comparación con CD9 (color azul) y CD81 (color verde, **Figura 29C.**, panel sonda de captura CD63). Por otro lado, se muestra que más del 50% de la población medida lleva un único marcador de superficie, CD63 (color rojo), CD9 (color azul) y CD81 (color verde), donde CD63 es notablemente la tetraspanina más representada (**Figura 29C.**, panel sonda de captura CD63). Para el donante 2, un bajo porcentaje de la población de vesículas muestra colocalización de dos marcadores, en las 3 combinaciones posibles de las 3 tetraspaninas (**Figura 29C.**, colores amarillo, violeta y cian), mientras que la colocalización CD9/CD81 (color cian) es mayor en el donante 1 (**Figura 29C.**, panel sonda de captura CD63). Para los dos donantes, se observa un porcentaje importante de vesículas que muestran colocalización de las 3 tetraspaninas (**Figura 29C.**, color gris). Cuando CD9 y CD81 (**Figura 29C.**, color azul y verde, respectivamente) se utilizan como sondas de captura, la distribución de las tetraspaninas como único marcador o en colocalización, es comparable entre donantes. Finalmente, y de manera muy interesante, se observó que la distribución de los marcadores de superficie no cambia significativamente en los grupos UCWJ<sup>WT</sup>, UCWJ<sup>GFP</sup> y UCWJ<sup>FGFb</sup> (para un mismo donante). De esta manera, con el empleo de esta metodología, los datos con mayor precisión muestran que la modificación genética de las CEM-GW para la sobreexpresión del factor FGFb no afecta la expresión de las tetraspaninas ubicuas en las vesículas extracelulares.

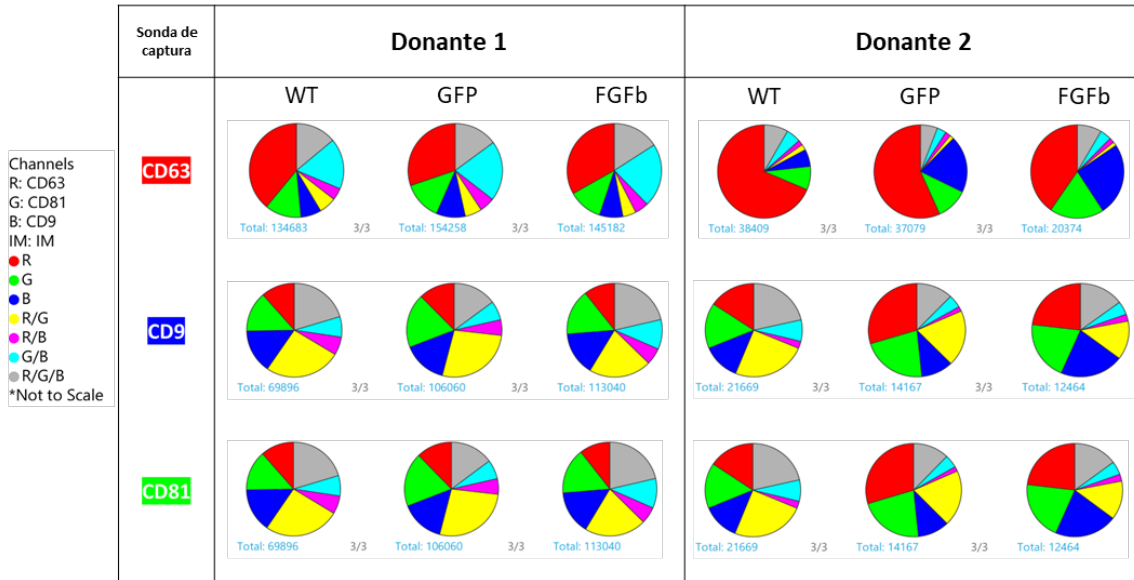
A.



B.



C.

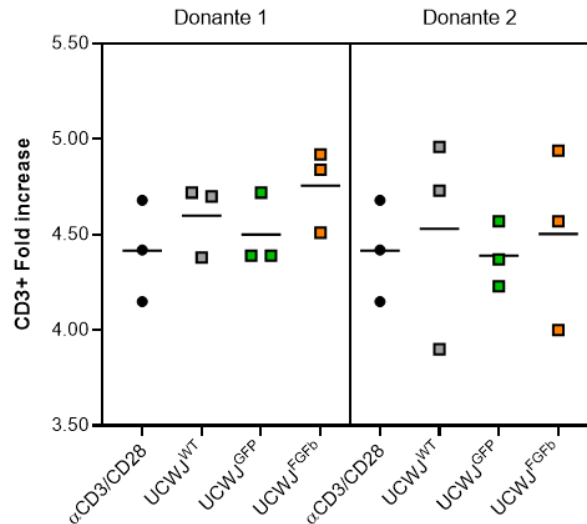


**Figura 29. Caracterización de las VEs aisladas de CEM-GW modificadas genéticamente, por NTA y por expresión de marcadores de superficie. A.** Distribución del tamaño de las nanopartículas en la fracción de Exos aislada por ultracentrifugación, a partir de los sobrenadantes obtenidos de CEM-GW modificadas genéticamente y no modificadas, cultivadas en *starvation*. **B.** Análisis de la cuantificación de nanopartículas en la fracción de Exos aislada de los sobrenadantes obtenidos de CEM-GW modificadas genéticamente y no modificadas, cultivadas en *starvation*. Los resultados son de 2 donantes CEM-GW (n=2 por grupo). Ns, no significativo, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples ANOVA de dos vías, Sidak. **C.** Análisis de la expresión de las tetraspaninas CD63, CD9 y CD81 en los sobrenadantes obtenidos después de cultivar las CEM-GW modificadas genéticamente y no modificadas, cultivadas en *starvation*, mediante la plataforma ExoView®. UCWJ<sup>WT</sup>: CEM-GW *wildtype*. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-FGFb.

### 3.3.2.3 Caracterización funcional de las VEs derivadas de CEM-GW modificadas genéticamente por LV

Finalmente, se evaluó la función biológica de la fracción enriquecida con Exos aislada de los tres grupos celulares, UCWJ<sup>WT</sup>, UCWJ<sup>GFP</sup> y UCWJ<sup>FGFb</sup>, mediante ensayos de inmunomodulación *in vitro*. En este ensayo se evaluó el efecto de los Exos producidos en condición de *starvation*, en la proliferación de linfocitos T. Se evaluó la relación PBMC: Exos de 1:1600 y la proliferación se midió por citometría de flujo utilizando marcaje directo sobre la subpoblación de linfocitos CD3. La **Figura 30** muestra los resultados obtenidos con las fracciones aisladas para los dos donantes no modificados y modificados con LV, en donde no se observa el efecto de inhibición esperado de los Exos sobre la proliferación

de los linfocitos T, el cual se vería reflejado en la disminución del parámetro calculado. Esta observación fue similar para los tres grupos celulares, UCWJ<sup>WT</sup>, UCWJ<sup>GFP</sup> y UCWJ<sup>FGFb</sup>.

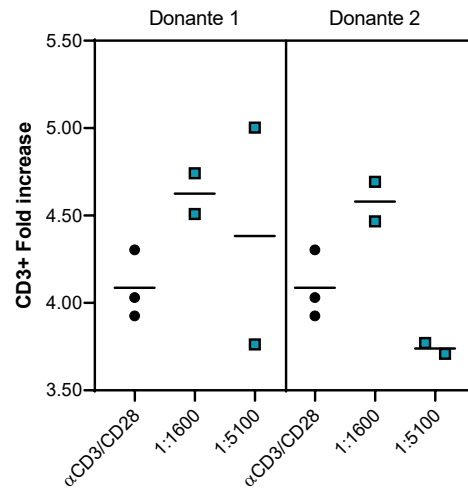


**Figura 30. Caracterización funcional de las VEs derivadas de CEM-GW *wildtype* modificadas genéticamente con LV.** Ensayos de inmunomodulación *in vitro* utilizando la fracción de exosomas aislada por ultracentrifugación a partir de los sobrenadantes obtenidos de cultivos de UCWJ<sup>GFP</sup> y UCWJ<sup>FGFb</sup>, en comparación con UCWJ<sup>WT</sup>, en condiciones de *starvation*. Se realizaron los ensayos de inmunomodulación utilizando una relación PBMCs:Exos, de 1:1600. Después de 5 días de los ensayos, las PBMCs fueron colectadas y marcadas con el anticuerpo anti-CD3, para análisis por citometría de flujo. αCD3/CD28: PBMCs activadas con las perlas de activación. UCWJ<sup>WT</sup>: CEM-GW *wildtype*. UCWJ<sup>GFP</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-GFP. UCWJ<sup>FGFb</sup>: CEM-GW infectadas con los LV-FGFb. Los resultados son de dos donantes y 3 mediciones (n=3 por grupo).

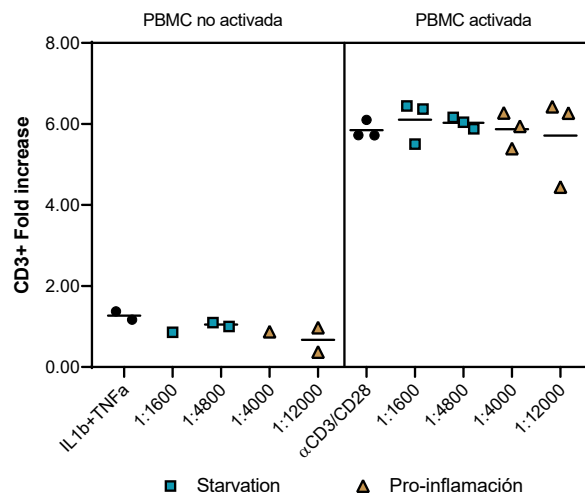
Debido a que los datos de los distintos ensayos de inmunomodulación generados en este trabajo, así como otros resultados descritos en literatura han demostrado una alta heterogeneidad y algunas veces inconsistencia sobre el efecto inmunosupresor de las VEs derivadas de las CEM-GW, a continuación, generamos un flujo de trabajo para estandarizar y validar ensayos de inmunosupresión que permitan obtener resultados confiables y reproducibles. La primera modificación experimental que se evaluó consistió en incrementar la relación PBMC:Exos, ya que el efecto inhibitorio podría presentar dosis dependencia. Se incrementó 3.2 veces el número de Exos por cada célula hPBMC, para dos donantes del grupo celular *wildtype*. Los resultados para los Exos aislados del donante 1 no mostraron efecto sobre la proliferación de los linfocitos T, ni un efecto dosis-dependiente (**Figura 31A.**). Por su parte, para la fracción de Exos del donante 2 se observó efecto sobre la proliferación de los linfocitos T cuando se incrementó la relación PBMC:Exos a 1:5100, inhibiendo en 8,5% la tasa de incremento de la población CD3<sup>+</sup>, en comparación con la población en el control positivo (PBMC activados, αCD3/CD28). En el

experimento se evidenció que el ensayo es donante-dependiente. En el siguiente ensayo, se evaluaron las siguientes modificaciones experimentales: Exos aislados después del precondicionamiento de las CEM-GW con un estímulo inflamatorio, diferentes relaciones PBMC:Exos y control del efecto de los Exos sobre las PBMCs no activadas (control). De manera interesante se observa que los Exos aislados de la condición de *starvation* (cuadros azules) o del estímulo inflamatorio (triángulos café), no activan proliferación de las hPBMCs (**Figura 31B**, panel PBMC no activada). Sin embargo, cuando las hPBMCs se activan no se observó efecto inhibitorio de las dos fracciones de exosomas sobre el índice de proliferación de las hPBMCs (**Figura 31B**, panel PBMC activada), incluso incrementando la relación Exos:hPBMCs.

### A.



### B.

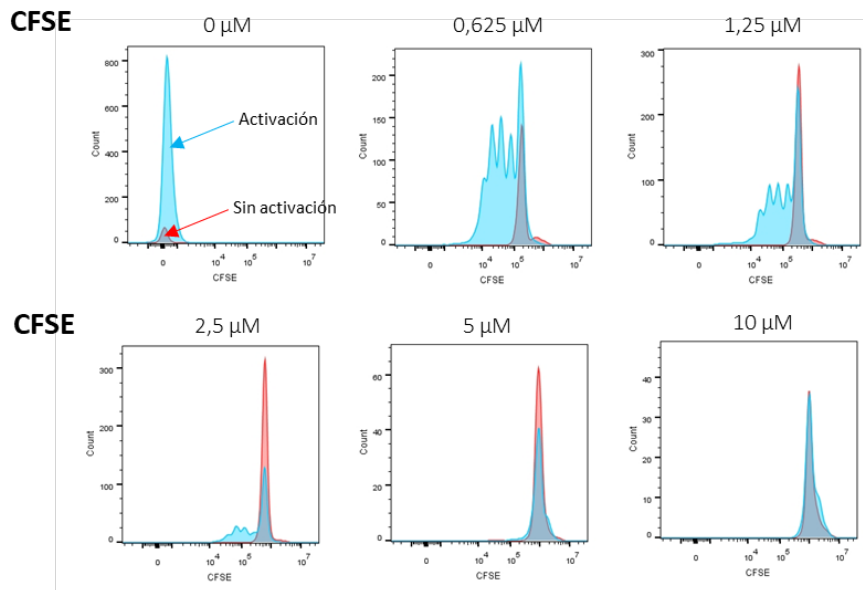


**Figura 31. Estandarización del ensayo de inmunomodulación *in vitro* utilizando la fracción de Exos aislada a partir de sobrenadantes de CEM-GW. A.** Ensayos de inmunomodulación *in vitro* utilizando la fracción de Exos aislada, a partir de los sobrenadantes obtenidos de cultivos de dos donantes de CEM-GW *wildtype* en condición de *starvation*. **B.** Ensayos de inmunomodulación *in vitro* realizado con Exos aislados de los sobrenadantes obtenidos de un cultivo de CEM-GW *wildtype* en condición de *starvation* y de pro-inflamación. Se ensayaron las relaciones PBMCs:Exos de 1:1600 y 1:4800 para la condición de *starvation*, y de 1:4000 -1:12000, para pro-inflamación. Los resultados son de 3 mediciones (n=3 por grupo).

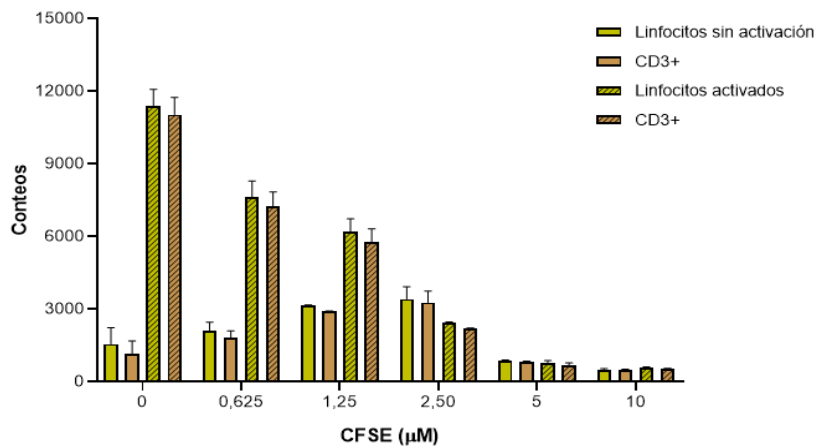
Para los próximos ensayos se decidió incluir una tinción específica y más sensible para monitorear la proliferación de las células mediante análisis por citometría de flujo, CFSE (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, for flow cytometry, Invitrogen™). El kit de proliferación celular CellTrace™ CFSE se usa para el marcaje *in vitro* e *in vivo* de células y rastreo de múltiples generaciones por citometría de flujo. El colorante CellTrace™ CFSE se une covalentemente a todas las aminas libres en la superficie y el interior de las células, con un efecto mínimo observado en la capacidad proliferativa o la biología de las células. La intensa tinción fluorescente proporcionada por el colorante CellTrace™ CFSE permite la visualización de ocho o más generaciones de células en proliferación antes de que la señal sea superada por la autofluorescencia celular intrínseca. Se realizó un ensayo para optimizar la concentración del reactivo CFSE. Una serie de diluciones del colorante desde 0 hasta 10µM se prepararon para realizar la tinción de las PBMCs, posteriormente estas se dividieron en dos grupos, no activadas y activadas con perlas. Después de 3 días en incubación las células se marcaron con el anticuerpo anti-CD3 y se leyeron en el citómetro de flujo. Finalmente, se analizó la fluorescencia verde en la población CD3+ en FlowJo. El análisis del rastreo de la proliferación de las PBMCs en las diferentes concentraciones del colorante CFSE, mostró que a concentraciones mayores de 1,25µM las PBMCs no proliferan, así que el colorante tiene un efecto tóxico en las células que afecta su capacidad de proliferación y seguramente también su biología (**Figura 32A.**, panel inferior). Las concentraciones entre 0,625 µM y 1,25µM no afectaron la biología de las PBMCs y se logró rastrear la proliferación en hasta 5 generaciones, los picos discretos en estos histogramas representan las generaciones sucesivas de células vivas, la generación parental no estimulada se indica en rojo (**Figura 32A.**, panel superior). El análisis cuantitativo de la población de linfocitos y CD3+ sin el colorante (**Figura 32B.**, 0µM, barras verde y café con rayas, respectivamente) muestra de manera clara la respuesta de activación con las perlas, la tasa de activación es de 9,5 cuando se calcula con base al número de conteos del control o PBMC sin activación (**Figura 32B.**, 0µM, barras verde y café). Cuando la concentración

del colorante es de  $0,625\mu\text{M}$  la tasa de activación disminuye 58% ( $3,98\text{ CD3}^+$  *fold increase*) el valor de referencia (células sin tinción), y con una concentración de  $1,25\mu\text{M}$  79% ( $1,99\text{ CD3}^+$  *fold increase*). El efecto sigue incrementando cuando la concentración se incrementa, hasta inhibir casi al 100% la tasa de activación de las PBMCs. Todos los resultados, sugirieron utilizar una concentración de máximo  $0,625\mu\text{M}$  del colorante CFSE para evitar afectar la capacidad de proliferación de las PBMCs. También sugieren que concentraciones menores podrían afectar menos la proliferación, sin embargo, si se diluye el colorante se disminuye el número de generaciones que podrían rastrearse.

**A.**



**B.**

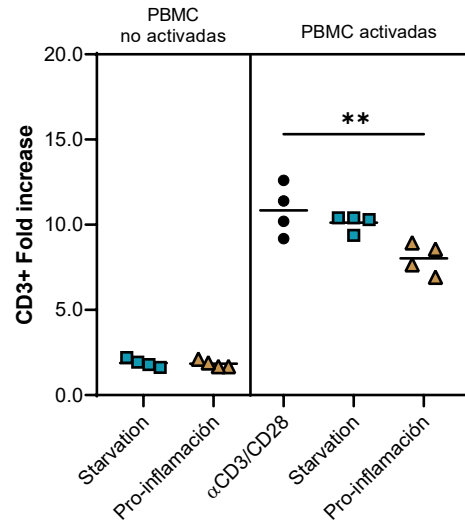


**Figura 32. Rastreo de la proliferación de linfocitos T con el colorante CellTrace™ CFSE. A.** Histogramas que reflejan el efecto de la tinción con el colorante CFSE sobre la proliferación de las PBMCs. Utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) no activadas y activadas

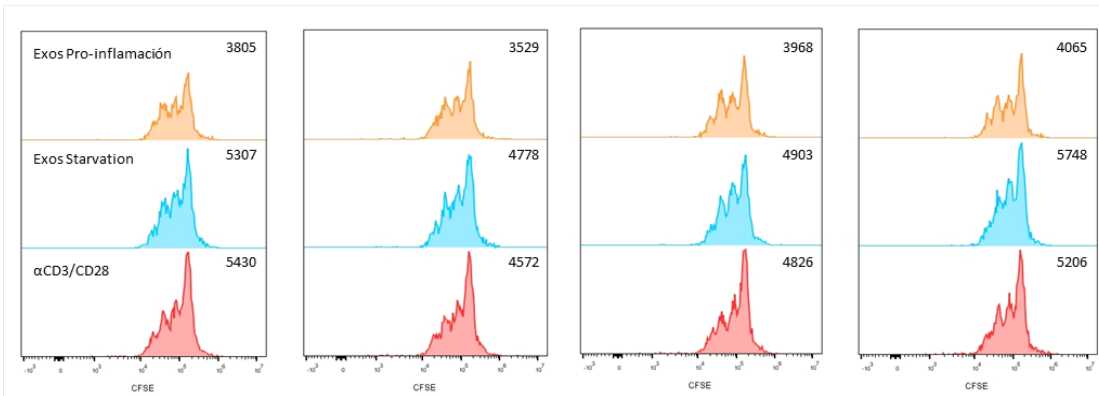
con perlas, se realizó el ensayo de proliferación utilizando diferentes concentraciones del colorante CFSE en el rango de 0,625 a 10 $\mu$ M. Después de 3 días de incubación, las PBMCs fueron colectadas y marcadas con el anticuerpo anti-CD3, para análisis por citometría de flujo. **B.** Análisis cuantitativo por conteos del efecto de la tinción sobre la población de linfocitos no activados (barras amarillas planas) y activados (barras amarillas con rayas), y sobre la subpoblación CD3+, sin activación (barras color café plano) y activada (barras color café con rayas).

Tomando todos los resultados anteriores sobre el ensayo de inmunomodulación *in vitro* con Exos, en el siguiente experimento se evaluaron las siguientes condiciones experimentales: tinción de las PBMCs con 0,5 $\mu$ M CFSE, exosomas aislados de CEM-GW *wildtype* cultivadas bajo condiciones de *starvation* y pre-acondicionamiento con citoquinas inflamatorias, relación PBMC:Exos 1:17.000 y como control efecto de los Exos sobre las PBMC no activadas. Los resultados mostraron inicialmente que no hay activación de la proliferación de la población CD3+ por la fracción de Exos en condición de *starvation* (cuadros color azul) y de pro-inflamación (triángulos color café) (**Figura 33A.**, panel izquierdo). Cuando se analiza la población de PBMCs activadas, los resultados muestran que las PBMCs tratadas con el maracador CFSE respondieron a la activación con las perlas con una tasa de activación de 10.8 en comparación con el control. Por primera vez y de manera interesante, los resultados mostraron el efecto esperado de los Exos sobre la tasa de activación de la población CD3+; los Exos en la condición en *starvation* inhibieron la proliferación de los linfocitos T, la tasa de activación disminuyó 6,7% (10,2 CD3+ *fold increase*, **Figura 33A.**, panel derecho cuadros color azul), mientras que el efecto de inhibición de los Exos en la condición de pro-inflamación fue superior, estos disminuyeron en un 20,7% la tasa de activación (8,02 CD3+ *fold increase*, **Figura 37.A.**, panel derecho triángulos color café). La **Figura 33B.**, muestra el rastreo de la proliferación con el colorante CFSE y se observa el efecto inhibitorio de la proliferación de la población CD3+, la intensidad de los picos que representan las diferentes generaciones disminuye.

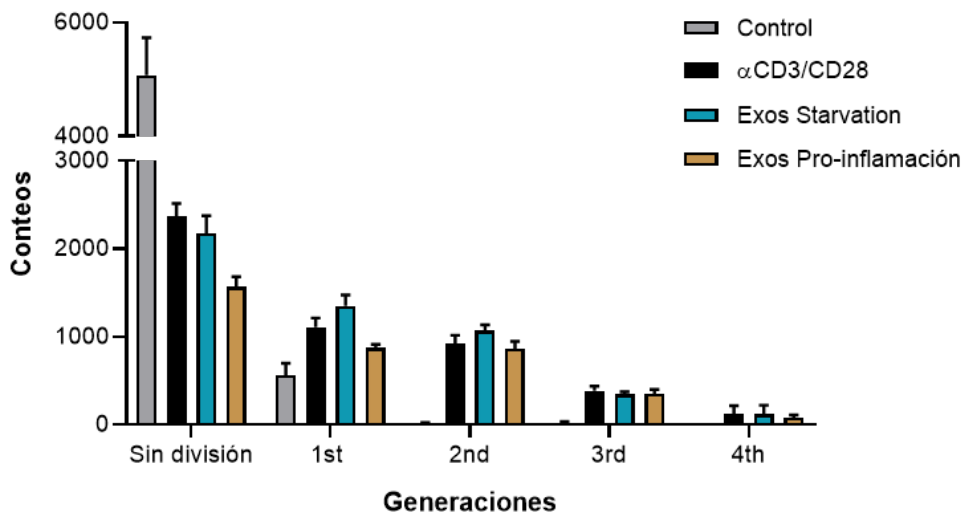
**A.**



**B.**

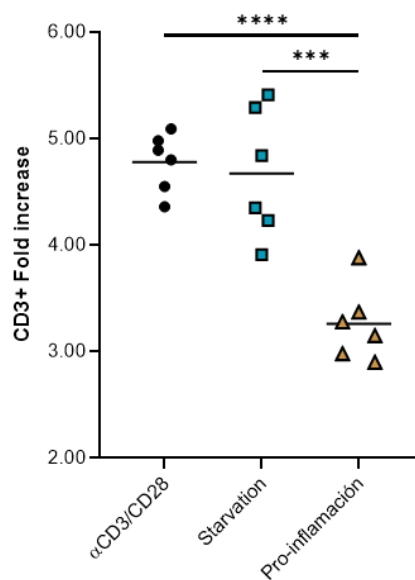


**C.**



**Figura 33. Ensayo de inmunomodulación *in vitro* de la fracción de Exos aislada a partir de sobrenadantes de CEM-GW, rastreando la proliferación de linfocitos con CFSE. A.** Ensayos de inmunomodulación *in vitro* con la fracción de exosomas aislada de los sobrenadantes obtenidos de un cultivo de CEM-GW *wildtype* en condición de *starvation* y de pro-inflamación. Utilizando hPBMCs marcadas previamente con el marcador CFSE y activadas con perlas de activación, se realizaron los ensayos de inmunomodulación utilizando las relación de PBMCs:Exos 1:17000.  $\alpha$ CD3/CD28: PBMCs activadas con las perlas de activación. Los resultados son de 4 mediciones (n=4 por grupo). \*\*  $p < 0,005$  de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples ANOVA de dos vías, Tukey. **B.** Histogramas del rastreo de la proliferación de la subpoblación CD3+ tras la activación con perlas (color rojo) y efecto de los exosomas en la condición de *starvation* (color azul) y de pro-inflamación (color naranja). Los histogramas son representativos de 4 réplicas. **C.** Análisis cuantitativo por conteos del efecto de los exosomas (*starvation* y pro-inflamación), en la proliferación de la subpoblación CD3+.

El análisis cuantitativo (**Figura 33C**) de las generaciones representadas en los histogramas muestran inicialmente que en el control (PBMCs sin activación, barras color gris) casi todas las células se encuentran en fase quiescente. Cuando las PBMCs reciben el estímulo de activación (barras color negro), las células activan la división celular y el número de conteos celulares incrementa hasta en las próximas cuatro generaciones. Posteriormente, cuando las PBMCs activadas reciben los Exos, específicamente, aquellos obtenidos de la condición de pro-inflamación (barras color café), se observa disminución en los conteos de las células que aún no iniciaron división y la primera generación (barras de color azul). Al parecer el efecto de inhibición de los Exos es muy temprano, y se sugiere pueda ser a través de mecanismos de inducción de muerte celular o secuestro del ciclo celular, o ambos. Para esto, deben plantearse aproximaciones experimentales adicionales.



**Figura 34. Ensayo de inmunomodulación *in vitro* de la fracción de Exos aislada de CEM-GW.**

Ensayos de inmunomodulación *in vitro* con la fracción de exosomas aislada de los sobrenadantes obtenidos de un cultivo de CEM-GW *wildtype* en condición de *starvation* y de pro-inflamación. Utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y activadas con perlas de activación, se realizaron los ensayos de inmunomodulación utilizando las relación de PBMCs:Exos 1:17000.  $\alpha$ CD3/CD28: PBMCs activadas con las perlas de activación. Los resultados son de 6 mediciones (n=6 por grupo). \*\*\* p=0,0001, \*\*\*\* p<0,0001 de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples ANOVA de dos vías, Tukey

A raíz del efecto del colorante CFSE en la activación de los linfocitos, se repitió el anterior experimento con las mismas condiciones experimentales sin realizar tinción de las PBMCs previo a la activación con las perlas. Las PBMCs respondieron a la activación con las perlas con una tasa de activación de 4,77 en comparación con el control (**Figura 34.**, puntos negros). Nuevamente los resultados mostraron efecto de los Exos sobre la tasa de activación de la población CD3<sup>+</sup>, sin embargo, en este experimento los Exos en la condición en *starvation* inhibieron en menor proporción la proliferación de los linfocitos T. Aquí, sólo se disminuyó en un 2,2% la tasa de activación (4,67 CD3<sup>+</sup> *fold increase*, **Figura 34.**, cuadros color azul), mientras que el efecto de inhibición de los exosomas en la condición de pro-inflamación fue superior, esto es, disminuyeron en un 30,2% la tasa de activación (3,26 CD3<sup>+</sup> *fold increase*, **Figura 34.**, triángulos color café). Las réplicas de los tratamientos evaluados mostraron reproducibilidad, y permitieron establecer una significancia estadística para el efecto de inhibición observado sobre la proliferación de los linfocitos T. Por otro lado, los resultados mostraron de manera convincente, que el efecto inhibitor de los Exos sobre esta población se potencia cuando las CEM-GW se pre-condicionan con citoquinas pro-inflamatorias.

## 4. Discusión

En este trabajo de tesis se exploraron diversas metodologías experimentales orientadas a determinar la factibilidad y utilidad de la modificación genética de las CEM y las VEs derivadas de estas, como potencial herramienta biotecnológica para el desarrollo y mejoramiento de productos medicinales derivados de estos componentes para futuros usos clínicos. En esta perspectiva, este trabajo permitió confirmar que la modificación génica de este tipo celular primario de interés clínico a partir de métodos no-virales y virales, es técnicamente factible y seguro y abre una ventana de oportunidad para el desarrollo de metodologías avanzadas para la generación de productos medicinales de terapia avanzada con alto potencial de aplicación clínica. Así mismo, el presente trabajo introduce y valida tecnologías para el aislamiento y caracterización de VEs derivadas de CEM que amplían el campo del conocimiento sobre este tipo de nanopartículas para su futura aplicación en el contexto médico.

La capacidad de las CEM como células progenitoras de diferentes linajes mesenquimales se ha utilizado en medicina regenerativa para reparar estructuralmente tejidos dañados y restaurar sus funciones perdidas, en tejidos como hueso (Kadiyala, Young, Thiede, & Bruder, 1997) y cartílago (Solchaga, Penick, & Welter, 2011). Adicionalmente, se ha encontrado que estas células ejercen efectos tróficos y otros locales que les permiten modular el sistema inmune, proteger células contiguas de procesos apoptóticos y establecer un medioambiente que promueve regeneración tisular. Por tal razón, el potencial traslacional de estas capacidades va desde el tratamiento de enfermedades autoinmunes (González, Gonzalez-Rey, Rico, Büscher, & Delgado, 2009), y otros desordenes inmunológicos como la enfermedad de injerto contra huésped (Le Blanc et al., 2004), hasta el tratamiento de eventos isquémicos (J. Chen et al., 2001; Islam et al., 2012). La utilidad de las CEM se puede ampliar en gran medida mediante la modificación genética de las células para proporcionar nuevas funciones o mejorar las existentes. Por ejemplo, cuando las CEM se modificaron genéticamente para sobreexpresar el factor 1 derivado de

células del estroma (M. Zhang et al., 2007) o Akt (Mangi et al., 2003), la función cardíaca mejoró significativamente. Existen diferentes métodos para la transfección a corto plazo de las CEM, estos incluyen métodos virales como el tratamiento con adenovirus (Studený et al., 2002), así como métodos no virales, como liposomas (J. Park et al., 2003) o electroporación (Haleem-Smith et al., 2005).

La supervivencia de las CEM después del trasplante sigue siendo un desafío, lo que afecta negativamente su eficacia terapéutica. Por otro lado, el sólido progreso en la medicina regenerativa ha creado una gran demanda de producción de CEM a escala clínica. Esto ha requerido un rendimiento máximo de las CEM sin comprometer su potencial de diferenciación múltiple, mientras se preservan sus funciones biológicas durante la expansión *in vitro*. Los mitógenos se utilizan con frecuencia en el cultivo de las CEM para mejorar su propagación. Entre ellos, la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) desempeñan diversas funciones en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación celular durante el desarrollo embrionario (Delaune et al., 2005; Reifers et al., 1998). El FGF básico (FGFb), un miembro de la familia FGF, a menudo se considera un factor de crecimiento e inductor de diferenciación dentro del campo de investigación de células madre. Por el papel funcional ampliamente descrito del FGFb en la biología de las CEM, en este estudio se propuso explorar dos estrategias basadas en tecnología de transferencia génica, nucleofección (no-viral) y lentivirus (viral) para sobreexpresar el factor de crecimiento fibroblástico básico humano (FGFb o FGF2) en células estromales mesenquimales de la gelatina de Wharton (CEM-GW), y evaluar su efecto en las propiedades biológicas de proliferación, de diferenciación, de potencial de inmunomodulación y de secreción de vesículas extracelulares (VEs). El objetivo final de este proyecto es contribuir y ampliar el conocimiento científico que existe hasta hoy, sobre la manipulación genética de las CEM, ya que la expresión o sobreexpresión de genes terapéuticos que impacten positivamente en las funciones biológicas de estas células podría ser un paso en la dirección correcta hacia una terapia exitosa basada en CEM, de muchas enfermedades.

## 4.1 Modificación genética transitoria de las CEM-GW con un vector no viral (Nucleofección)

Para la modificación genética transitoria de las CEM-GW en este proyecto se utilizó la técnica de nucleofección. La nucleofección se ha utilizado con éxito para la transfección transitoria de CEM de origen humano, bovino, de rata y porcino (Aslan et al., 2006; Colleoni et al.; McMahon et al.), pero en muy pocos estudios se ha probado en CEM humanas derivadas de la Gelatina de Wharton del cordón umbilical. En este trabajo se transfectó el vector pCMV3-FGF2-Flag por nucleofección en CEM-GW, para la expresión transitoria del gen *FGFb*. El transcrito traduce para una proteína recombinante que se encuentra en fase con el tag FLAG. Este tag fue utilizado como antígeno artificial para la validación de la sobreexpresión del factor de crecimiento FGFb después de la nucleofección de las CEM-GW. Se ensayó inicialmente un protocolo para la nucleofección de las CEM-GW, con el cual se obtuvo un 93,6% de expresión de la proteína GFP, utilizada como control para evaluar la eficiencia de la nucleofección. Por su parte, el nivel de expresión del factor FGFb-Flag fue de alrededor del 10%. Por lo tanto, abordamos de manera sistemática varios factores en el protocolo de nucleofección, incluyendo el formato de transfección, cantidad de plásmido, tiempo de medición de la sobreexpresión de la proteína post-nucleofección, tiempo de incubación con BrefeldinA, que podrían impactar en la eficiencia de la transfección y la detección de la proteína FGF2-Flag. Con las condiciones experimentales ensayadas se logró incrementar significativamente el nivel de expresión de la proteína FGF2-Flag, obteniéndose valores de 78,9-88,6%, constante hasta por 96hpn. Este porcentaje de expresión del factor significó un incremento en la concentración del factor de hasta 35 veces (2410pg/ml), en los sobrenadantes de las CEM-GW, cuando se comparó con la concentración basal de las células (67,25pg/ml). Se confirmó que la modificación genética de las CEM-GW por nucleofección tiene un carácter transitorio, ya que después de 9 días post-transfección el nivel de sobreexpresión de la proteína recombinante, disminuyó casi a cero, mientras que la concentración del factor disminuyó a su nivel basal. En conclusión, en este estudio reportamos la optimización de un método de transfección basado en nucleofección utilizando un vector no viral, para la entrega eficiente del factor FGFb a un cultivo primario de CEM-GW.

Otros estudios han mostrado también eficiente nucleofección de otras proteínas funcionales en diferentes fuentes de CEM. Fakiruddin et al., logró optimizar la

nucleofección de un plásmido que codifica para el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) en CEM derivadas de tejido adiposo (CEM-TA). Su estudio evidenció un significativo incremento en la expresión de la proteína, de 11,33 % a 39,7 %, con una ligera reducción en la viabilidad de las células (~10 %), variando diferentes factores (Fakiruddin et al., 2014). Por su parte, Mok et al., comparó la eficiencia y la viabilidad de la nucleofección con la lipofección catiónica, y utilizó el método de transfección más eficiente, la nucleofección, para entregar una construcción de expresión génica que codifica la eritropoyetina (MIDGE-EPO) en CEM derivadas de MO (CEM-MO). El estudio demostró un incremento significativo en la eficiencia de transfección utilizando nucleofección (21,8%), en comparación con la baja eficiencia de la lipofección (menos del 0,6%) (Mok, Cheong, Leong, Chua, & Ainoon, 2012). Paz de la torre et al., utilizó la nucleofección para la transfección de un plásmido que codifica para la proteína antiangiogénica endostatina en CEM de placenta humana. Bajo las condiciones experimentales evaluadas demuestra un nivel de expresión de 56.1% según FACS, con un incremento de hasta 2.37 veces de la concentración de la proteína en el medio de cultivo (de la Torre, Paris, Fernández-de la Torre, Vallet-Regí, & Flores, 2021). Scheibe et al., describe por primera vez el uso de la nucleofección en CEM-MO de ratón para la entrega del gen *epo* en un modelo *in vivo*. Los autores encuentran que la nucleofección proporciona una transfección estable y la producción biológicamente activa de EPO en las CEM tanto *in vitro* e *in vivo*. Después de la transfección de la construcción génica, encontraron que el 60% de las CEM expresaban de manera transitoria la proteína EPO-GFP hasta por 48h (Scheibe et al., 2012). Otros autores han utilizado la nucleofección para la transfección de mRNA. Wiehe et al., nucleofectaron mRNA para la sobreexpresión de la proteína CXCR4 en CEM-MO, para mejorar la migración celular y la reparación del tejido cardíaco. Los autores observan sobreexpresión de la proteína en un 93% en las CEM con una viabilidad de 62%. Demuestran funcionalidad *in vitro* de la proteína expresada, sin cambios en la migración celular, además de una fuerte quimioquinesis basal que no pudo mejorarse más mediante la sobreexpresión de CXCR4 (Wiehe et al., 2013). Finalmente, sólo encontramos una publicación en la que los autores buscan mejorar la viabilidad celular y la expresión génica en CEM-GW cuando se transfectan con nucleofección (Mellott et al.). Los autores encuentran que el tratamiento previo y posterior de CEM-GW transfectadas mediante nucleofección con el inhibidor de ROCK (Y-27632-RI) mejoró significativamente las tasas de supervivencia de CEM-GW y la expresión génica medida por la intensidad de la proteína fluorescente verde.

La búsqueda bibliográfica para comparar nuestros resultados con los hasta ahora publicados por otros grupos de investigación, nos muestra que existen pocos estudios disponibles en los que se ha estudiado la transfección por nucleofección de las células estromales mesenquimales derivadas de la Gelatina de Wharton (CEM-GW). Es así como el presente estudio se convierte en un aporte importante y significativo al conocimiento científico y aplicación de esta metodología para potenciar las características funcionales de estas células, las cuales tienen una serie de ventajas sobre otras fuentes de células, además de un gran potencial para la traslación clínica, como se ha publicado extensamente. Por otro lado, y de manera muy interesante, nuestro estudio demuestra alta eficiencia de transfección del gen en estudio, logrando un nivel de sobreexpresión del 80-90% de la proteína funcional. En resumen, nuestros datos demuestran que la nucleofección es eficiente para la entrega del gen FGFb en CEM-GW. Sin embargo, se requiere optimización de ciertas condiciones experimentales, como la concentración de plásmido y el número de células, para lograr una condición ideal de la técnica, cuya eficiencia logra ser comparable con la descrita para la transfección con virus. Por lo tanto, coincidimos con los autores que han propuesto que la nucleofección puede convertirse en una herramienta atractiva para la modificación de células madre humanas para uso clínico, ya que supera las limitaciones técnicas del uso de vectores virales o la toxicidad del procedimiento que a menudo los descalifican para las aplicaciones *in vivo* en humanos (Wiehe et al., 2013). Adicionalmente, la nucleofección representa una técnica que combina la fácil operabilidad, menor costo y seguridad, permitiendo básicamente la aplicación *in vivo* de acuerdo con directrices de buenas prácticas de manufacturación (Good manufacturing practices, GMP) requeridas para su escalamiento clínico. En este estudio encontramos que el secretoma de las CEM-GW modificadas genéticamente con nucleofección para la sobreexpresión del factor FGFb, mostró el mismo perfil de respuesta que las células control, cuando se cultivan en hLP. Ciertos factores mostraron una cinética de consumo, mientras que otros fueron producidos. Este comportamiento evidenció que las CEM-GW modificadas genéticamente son igualmente funcionales a las CEM-GW no modificadas, y por lo tanto se valida que la nucleofección, como estrategia de modificación genética presenta un perfil de seguridad adecuado para la aplicación de CEM-GW como producto medicinal. En conclusión, la nucleofección como estrategia de modificación transitoria de CEM es una estrategia interesante para traslación en aplicación clínica.

Posteriormente, evaluamos el efecto de la sobreexpresión del factor FGFb en algunas propiedades biológicas básicas de las CEM-GW, como la expresión de marcadores de superficie característicos y la proliferación. Demostramos que las CEM-GW modificadas con el vector no viral mediante nucleofección no mostraron cambio significativo en el nivel de expresión de los marcadores de superficie propios de las CEM (inmunofenotipo). Por otro lado, las células mantuvieron su potencial de autorenovación, y de manera interesante las CEM transfectadas mostraron un nivel de proliferación mayor a partir de las 72hpn, relacionado con un incremento en la concentración del factor en sobrenadantes. El incremento en la concentración del factor fue hasta de 32-50 veces y se mantuvo sin variación hasta por 120h. Adicionalmente, observamos que el incremento en el nivel de proliferación es reproducible entre diferentes donantes de CEM-GW, pero con respuestas dependientes del donante. Este comportamiento es esperado e inherente a la variabilidad que presenta el cultivo primario de las CEM. Sotiropoulou et al, describe que suplementar el medio de cultivo de las CEM con el factor FGFb aumenta en gran medida la velocidad de proliferación de las células, pero también regula el incremento de moléculas HLA-clase I e induce una baja expresión de HLA-DR (Sotiropoulou et al., 2006). Estos cambios son significativos a partir de una concentración de 5ng/ml del factor adicionado al medio de cultivo, sin embargo, en este estudio la máxima concentración medida después de la nucleofección fue de 2,7-3,0ng/ml, lo que explicaría la no detección de cambios en las moléculas de HLA clase I y II de las CEM-GW. De manera contraria a este estudio, Ramasamy et al. en su estudio demuestra que suplementar el medio de cultivo de CEM-GW con 40ng/ml del factor FGFb incrementa en gran medida la proliferación de las células sin alterar su inmunofenotipo (Ramasamy et al., 2012). Este último estudio coincide con nuestros resultados, a pesar de tener una aproximación metodológica diferente, y muestra que la respuesta al incremento del factor de crecimiento FGFb depende de la fuente de CEM. Nuestros resultados coinciden con estudios previos, en los que se ha demostrado que la tecnología de nucleofección es un método eficiente para la administración de genes en CEM y no afecta los potenciales de renovación, inmunofenotipo y diferenciación de las CEM nucleofectadas (Mok et al., 2012; Scheibe et al., 2012). Sin embargo, no hay estudios previos que evalúen el efecto de la sobreexpresión del factor FGFb en las características biológicas de las CEM-GW inducidas por transfección de un vector no viral, siendo este el primer reporte experimental a la fecha. En conclusión, el resultado de la evaluación de la proliferación evidencia que la sobreexpresión del FGFb mediante un vector no viral en CEM-GW induce un significativo incremento en la proliferación celular, sin alterar su

inmunofenotipo, que es compatible con el incremento en la viabilidad y supervivencia celular. De este modo sugerimos que el FGFb puede ser un factor crítico en el mantenimiento de altos niveles de supervivencia celular en un escenario de posible privación de señales de crecimiento (*in vivo*), potenciando sus funciones biológicas y, por tanto, su potencial terapéutico.

## **4.2 Modificación genética estable de las CEM-GW con un vector viral (Lentivirus)**

En contraste con el número de métodos de modificación transitoria, los métodos de modificación a largo plazo o estables de CEM, son más limitados. Un método podría consistir en derivar CEM a partir de ratones transgénicos (H. Wang et al., 2009). Sin embargo, existen serias limitaciones con este método, incluida su restricción a las CEM de ratón, que pueden tener propiedades diferentes a las de otras especies, como las CEM humanas (Peister et al., 2004). Un método alternativo que se ha posicionado a nivel biotecnológico es el de vectores lentivirales (LV) para la entrega del constructo de ADN manipulado. Los LV son capaces de albergar genes exógenos más grandes en comparación con los vectores plasmídicos, y son capaces de infectar células en división y no en división. En particular, la terapia génica mediada por virus todavía se enfrenta a una serie de problemas de seguridad. Los fragmentos virales insertados en el genoma del huésped a menudo se asocian con una alta inmunogenicidad. Hasta ahora pocos estudios han sido publicados sobre el uso de este método para la modificación de las CEM-GW. Por tal razón, en este proyecto se utilizó como herramienta génica la transducción viral con LV para la modificación genética estable de las CEM-GW. Diferentes desafíos experimentales se enfrentaron para optimizar la producción de las partículas LV, la transducción eficiente de las CEM-GW, y lograr la evaluación del impacto de la sobreexpresión del factor FGFb en las propiedades biológicas de las CEM-GW, en términos de inmunofenotipo, proliferación, potencial de diferenciación e inmunomodulación.

Mediante una estrategia molecular de subclonación utilizando enzimas de restricción logramos la inserción del factor FGFb-Flag, en el vector de transferencia. Los ensayos de transfección se iniciaron utilizando el método del fosfato de calcio, con el que se obtuvo baja eficiencia de transfección. Por lo tanto, abordamos de manera sistemática algunos

factores en el protocolo de producción, tales como el pH, densidad celular, cantidad de ADN plasmídico y la adición de BuNa. Sin embargo, en los sobrenadantes post-transfección recolectados no se obtuvieron partículas LV. A continuación, investigamos el método de transfección por nucleofección, evaluando de nuevo algunos factores en el protocolo de producción, que influyeron en la eficiencia de transfección, de transducción (título viral) y en la expresión transgénica. Sin embargo, la condición experimental que mostró mayor impacto en la producción de las partículas LV fue el tiempo de colección de los sobrenadantes. Cuando las condiciones experimentales se aplicaron para la producción de las partículas LV con el factor FGFb y posterior transducción de las CEM-GW, se obtuvo baja eficiencia de infección. Por tal razón, se decidió evaluar adicionalmente otros factores en el protocolo de producción, incluyendo diferentes métodos de transfección, número de pase de las HEK293 LTV y diferentes tiempos de cosecha post-transfección. Encontramos que el método de transfección más eficiente para la producción de LV fue la lipofectamina, además que se obtuvo un título viral alto en los sobrenadantes colectados, sin necesidad de concentrar los virus, generando así un protocolo menos complejo y más eficiente para la producción de las partículas.

En el abordaje sistemático para mejorar la eficiencia de transducción en las CEM-GW se tuvieron en cuenta factores como el suplemento del medio de cultivo y la concentración del sulfato de protamina. Lin et al., describe los parámetros para una eficiente transducción de CEM manteniendo la capacidad de proliferación y de diferenciación (Lin et al., 2012). Los autores descubren por primera vez que el uso de altas concentraciones de sulfato de protamina es una alternativa viable al polibreno para preservar las capacidades de proliferación y diferenciación de las CEM humanas al tiempo que mejora significativamente la transducción LV. El sulfato de protamina es un policatión relativamente económico aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) que se usa más comúnmente para neutralizar la sobredosis de heparina. Se cree que mejora la transducción al neutralizar la carga negativa entre la superficie celular y las partículas virales (Y. W. Yang & Hsieh, 2001). Cornetta y Anderson lo sugirieron por primera vez como una alternativa al polibreno en 1989 (Cornetta & Anderson, 1989). Desde entonces, los investigadores han intentado utilizar el sulfato de protamina para la transducción con LV (Chuah et al., 2000), con esfuerzos limitados porque la concentración usada siempre estuvo por debajo de 8µg/ml, sin observar efecto en la traducción de las CEM. Como consecuencia, el sulfato de protamina rara vez se usa para la transducción de

CEM humanas. En este estudio, con el cambio de las condiciones experimentales de transducción logramos en los experimentos con un MOI de 5, aumentar la eficiencia de transducción hasta un 30,3% para FGFb. De manera interesante notamos que no se requirió ultracentrifugación para concentrar el sobrenadante viral en nuestros estudios, además que el sulfato de protamina no afectó la capacidad de división de las células, lo que permitió que se usaran cantidades más bajas de virus. Nuestros resultados están de acuerdo con resultados previos en los que el aumento de la concentración de sulfato de protamina a 50 g/ml dio como resultado un aumento de 2,4 veces en la eficiencia, del 15,7 % (a 0 µg/ml) al 37,6 % (Lin et al., 2012). Para los mismos autores no hubo diferencia estadística en la proliferación celular entre las células no tratadas y las células tratadas con sulfato de protamina en cualquier concentración probada durante un período prolongado (7 días). En nuestro estudio también observamos que la transducción de las CEM-GW fue dependiente del donante. Se sabe que las CEM humanas tienen variabilidad de donante a donante, y ha habido informes de variabilidad de donante a donante con la transducción de CEM (Kallifatidis et al., 2008).

En los diferentes donantes validamos la sobreexpresión del factor FGFb en los sobrenadantes de las UCWJ<sup>FGFb</sup> en comparación con la concentración basal en los sobrenadantes de las CEM-GW control (UCWJ<sup>GFP</sup> o *wildtype*). Medimos un rango de concentración entre 80-600pg/ml para las CEM-GW que expresan FGFb (UCWJ<sup>FGFb</sup>), el cual siempre estuvo por encima de la concentración basal (60 pg/ml). Adicionalmente, observamos que el nivel de expresión del factor FGFb fue estable hasta en dos pases posteriores a la transducción de las células, validando que la transducción con partículas LV modificó genéticamente las CEM-GW para la expresión constitutiva de la proteína recombinante, FGFb-Flag. Evaluamos posteriormente el efecto de la modificación genética con lentivirus en las propiedades biológicas y funcionales de las CEM-GW, en términos de inmunofenotipo, cinética de crecimiento, perfil de secreción de factores solubles, diferenciación osteogénica y potencial inmunomodulador. En nuestro estudio encontramos que las CEM modificadas genéticamente con LV no muestran cambios en el inmunofenotipo característico de las CEM. En cuanto a la cinética de crecimiento de las CEM se describe una respuesta dependiente del donante, en la que el incremento en la concentración del factor FGFb medido en los sobrenadantes es consecuencia de la sobreexpresión del factor inducida en las CEM-GW después de la infección. En un ambiente rico en nutrientes (hLP) demostramos que una infección de hasta 30% con LV

no afecta la viabilidad de las células y estas logran mantener su potencial de proliferación celular. Adicionalmente, en este estudio encontramos que el secretoma de las CEM-GW modificadas genéticamente con LV para inducir sobreexpresión del factor FGFb, mostró un mismo perfil de consumo y secreción de factores solubles comparable entre las células control y de referencia (sin modificación), cuando se cultivan en hLP. Ciertos factores mostraron una cinética de consumo, mientras que otros fueron producidos y acumulados en el sobrenadante celular. Este comportamiento evidenció que las CEM-GW modificadas genéticamente son tan funcionales como las CEM-GW no modificadas, y por lo tanto sugerimos que la transducción con LV, como estrategia de modificación genética ofrece un perfil de seguridad adecuado para la aplicación de CEM-GW como producto terapéutico. Estos resultados son relevantes en el sentido que, si bien la transducción con LV podría implicar un riesgo derivado de procesos de mutagénesis por inserción que puede llegar a afectar la estabilidad genómica y funcional de la célula, aquí demostramos que este proceso no se vio afectado por la transducción viral.

De manera interesante, observamos que, en un medio reducido de nutrientes, la sobreexpresión del factor genera un impacto en la proliferación celular, ya que las células UCWJ<sup>FGFb</sup> crecen un 32,6% más en comparación con las células UCWJ<sup>GFP</sup>. Por otro lado, sugerimos que las CEM-GW tienen una respuesta rápida a la sobreexpresión del factor para regular la concentración de la proteína en el medio de cultivo. De estos resultados, demostramos que la sobreexpresión del factor FGFb genera un impacto positivo en la proliferación de las células. En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que una transducción de hasta 30% en las CEM-GW con LV no afecta la viabilidad de las células e incrementa ligeramente su potencial de proliferación celular, es decir, la sobrevivencia de las células en un medio desprovisto de nutrientes. Se ha descrito que el factor FGFb también aumenta la supervivencia y la proliferación *in vivo* de las CEM (Bhang, Lee, La, Kim, & Kim, 2011). En un modelo *in vivo* de isquemia, Zhang et al., observó que muchas más CEM-MO transducidas con LV para la sobreexpresión del factor hFGFb sobrevivieron al trasplante y se diferenciaron en células endoteliales vasculares (J. C. Zhang, Zheng, Wu, Ou Yang, & Li, 2014). Sobre el mecanismo por el cual el FGFb influye en la supervivencia/proliferación de las CEM se ha descrito que el factor conduce activamente a las células al ciclo celular, ya que una mayor proporción de estas permanecieron en la fase S y progresaron a la fase M. Se demostró adicionalmente, que el FGFb promueve la expresión de las proteínas ciclina D y sus quinasas para inducir a las CEM-CU a los puntos

de control transversales del ciclo celular, comprometiendo las células a la síntesis de ADN (Cárcamo-Orive et al., 2008).

Uno de los desafíos de la terapia génica basada en células es la supervivencia de las células modificadas genéticamente en el entorno del huésped. Estudios sugieren que las CEM no persisten en el organismo receptor durante períodos prolongados. Con los resultados de este estudio hipotetizamos que nuestro hallazgo podría llegar a ser una estrategia atractiva para superar este desafío, porque se podría plantear la generación de construcciones plasmídicas de genes policistrónicos en los que el factor FGFb brindaría soporte en la sobrevivencia de las CEM-GW, mientras que la otra proteína se dirigiría hacia un blanco específico. De esta manera, se amplía y mejora la utilidad de las CEM para fines terapéuticos. En su estudio, Zhang et al., sugiere que la combinación de la terapia celular y génica aceleraría la reparación de fracturas a través de una combinación de mecanismos autocrinos y paracrinos y podría ser más eficaz que los factores de crecimiento individuales administrados sistémicamente (H. Zhang, Kot, et al., 2017). Adicionalmente, se ha descrito que el trasplante de CEM mejora con mayor probabilidad la regeneración de hueso y cartílago cuando estas células fueron diseñadas para expresar factores de crecimiento como el factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1), proteínas morfogenéticas óseas (BMP) o VEGF (Granero-Moltó et al., 2011; Tai et al., 2008).

Se ha demostrado que FGFb promueve la proliferación de células madre estromales de médula ósea y la formación de cartílago y hueso (L. Wang, Huang, Pan, Jiang, & Liu, 2010; Yuan, Pan, Fu, & Bi, 2013). En nuestro estudio evidenciamos que la sobreexpresión del factor FGFb incrementa la acumulación de calcio lo que nos permite sugerir que la modificación genética de las CEM-GW con LV para la sobreexpresión del factor FGFb incrementa su potencial de diferenciación hacia osteoblastos. Pocos estudios se han publicado sobre la modificación genética de las CEM utilizando LV. Zhang et al., investigó el potencial angiogénico de combinar terapia celular y génica a través del trasplante alogénico de CEM-MO expresando el factor FGFb, inducido por LV (J. C. Zhang et al., 2014). Después de establecer un modelo de isquemia de miembros posteriores en ratas Sprague Dawley, los autores observaron que el trasplante alogénico aumentó la expresión de VEGF ( $P = 0,008$ ) y la densidad de microvasos ( $P, 0,001$ ), en otras palabras, se promovió la angiogénesis *in vivo*. Sin embargo, los autores sugieren de manera interesante que el efecto fue debido a un incremento en la supervivencia y/o proliferación de las CEM

trasplantadas, más que a un incremento de su capacidad de diferenciación en células endoteliales vasculares. En un estudio posterior, los autores evaluaron el efecto de la modificación de CEM de tejido adiposo en un modelo *in vivo* de fractura ósea (H. Zhang, Kot, et al., 2017). Los resultados del estudio describen múltiples efectos beneficiosos para el uso de ADSC<sup>bFGF</sup> en la reparación de fracturas, entre ellos, el aumento de la producción de factores tróficos, como FGFb, VEGF y PDGF que estimulan la angiogénesis, la diferenciación de osteoblastos y la formación de hueso en el lugar de la fractura; y la inducción de una rápida renovación del cartílago a través de la osificación endocondral y mejora de la resistencia ósea. Por estas observaciones, los autores proponen que las ADSC<sup>bFGF</sup> pueden servir como un posible tratamiento basado en células para la reparación de fracturas, ya que puede proporcionar un entorno rico en células madre, factores de crecimiento y proteínas de la matriz ósea durante un corto período de tiempo, lo que puede promover la regeneración ósea y reduce el tiempo requerido para la curación de la fractura (Zhang\_2017). En este sentido, este estudio aporta resultados iniciales sobre la modificación genética de CEM-GW utilizando una estrategia de ingeniería genética basada en LV, y, por tanto, amplía el conocimiento hasta ahora reportado sobre el impacto en las propiedades biológicas y funcionales de las CEM, al combinar la terapia celular y génica, para sobreexpresar el factor de crecimiento FGFb. A su vez el estudio respalda lo sugerido por algunos autores sobre el uso de las CEM como “fábricas” para producir y liberar localmente y de manera niveles bajos de factores de crecimiento durante un período controlado para la reparación de lesiones (H. Zhang, Kot, et al., 2017), ya que la exposición prolongada a mitógenos de proteínas, incluido FGFb, se asocia con un mayor riesgo de cáncer (Marek et al., 2014) e induce respuestas proinflamatorias *in vitro* (Ben Jemaa, Sallami, Ramarli, Colombatti, & Oueslati, 2013).

Debido a sus propiedades inmunosupresoras, las CEM se están probando clínicamente para tratar la EICH y otros trastornos autoinmunitarios (Le Blanc et al., 2008; Zappia et al., 2005). Sin embargo, pocos estudios hasta ahora han descrito el papel del factor FGFb en el potencial inmunosupresor de las CEM. En nuestro estudio incluimos evaluar el efecto de la sobreexpresión del factor en esta importante propiedad funcional de las CEM-GW, evidenciamos que las CEM-GW modificadas genéticamente conservaron el mismo patrón inmunosupresor de linfocitos T, que las células no modificadas. No obstante, los donantes UCWJ<sup>FGFb</sup> mostraron una mayor disminución de los conteos CD3<sup>+</sup>. De esta manera los resultados permitieron sugerir que la modificación genética de las CEM-GW con LV, no

afecta la función biológica de las CEM, en términos del potencial de inmunomodulación. De hecho, la expresión constitutiva adicional de FGFb potencia el efecto inmunosupresor sobre la proliferación de células T. Auletta et al., evaluó la actividad inmunosupresora de las CEM-MO que se expandieron con medio de crecimiento suplementado con 10ng/ml del factor FGFb. Los autores observaron que la proliferación inducida por el factor no genera pérdida de la actividad inmunosupresora (Auletta, Zale, Welter, & Solchaga, 2011). En otro estudio, Ramasamy et al., observó que cuando CEM de cordón umbilical (CEM-CU) se cocultivaron con células T humanas estimuladas con PHA, las células que crecieron en medio suplementado con FGFb o sin él, mostraron patrones similares de anti-proliferación dosis-dependientes. Los estudios han sugerido que mantener la actividad inmunosupresora es fundamental para la aplicación a enfermedades asociadas con la alorreactividad aberrante de las células T (Ramasamy et al., 2012). Hasta ahora no hay algún estudio reportado sobre el impacto de la sobreexpresión del factor FGFb en CEM mediante ingeniería genética, por lo tanto, nuestro trabajo sería el primero en describir el impacto de la sobreexpresión del factor de crecimiento FGFb inducida por la modificación genética con lentivirus en CEM-GW, en el potencial inmunosupresor sobre la proliferación de linfocitos T.

### **4.3 VEs derivadas de CEM-GW: aislamiento, caracterización y evaluación de sus propiedades después de una estrategia de modificación genética**

Una línea de evidencia de gran relevancia está relacionada con el efecto en regeneración e inmunomodulación de las vesículas extracelulares (VEs) derivadas de las CEM. A pesar de que el conocimiento sobre las propiedades de las VEs secretadas por las CEM ha aumentado, aún existen limitaciones para su aplicación clínica (Mathieu, Martin-Jaular, Lavieu, & Théry, 2019). Dada la importancia e interés de aplicación clínica de las VEs, en este estudio planteamos describir el impacto de manipular genéticamente las CEM-GW mediante ingeniería genética, sobre la producción y propiedades funcionales de sus VEs. Iniciamos evaluando algunas condiciones de cultivo, metodologías de aislamiento y de caracterización de las VEs derivadas de CEM-GW en su estado basal (*wildtype*). Se comparó la producción de VEs (número de partículas) después de cultivar las CEM-GW con dos suplementos, SFB y hLP, e inducir su producción en tres medios, suero depletado de VEs (SLEx), sin suplemento (*starvation*) y en presencia de citoquinas inflamatorias

(Pro-inflam). Observamos diferencias significativas en el conteo de VEs cuando las CEM-GW se cultivaron en los diferentes suplementos de cultivo, y no con el medio de inducción de producción de las VEs. Los resultados sugirieron que la producción de VEs responde principalmente al estado metabólico de las células, y no está directamente relacionada con el número de células. Por tal razón, en nuestro estudio seleccionamos el hLP como el suplemento de crecimiento de las CEM-GW. Notablemente, como los autores han discutido anteriormente en detalle, la identidad y potencia de las VEs como productos celulares, depende de la fuente de CEM y la condición de cultivo de estas (Witwer et al., 2019). La selección del medio basal de crecimiento y los aditivos, incluyendo los suplementos, como el lisado de plaquetas; los frascos de cultivo celular, incluyendo cultivos en 2D o 3D; y las condiciones ambientales, afectan las características del producto. Como producto medicinal, la fuente celular plantea el primer desafío importante para la producción reproducible VEs derivadas de CEM. Las CEM pueden ser aisladas de muchos tejidos utilizando diferentes protocolos, y aunque ellas comparten muchas características de identidad, se ha observado que la heterogeneidad de las CEM de diversos tejidos difiere en sus propiedades funcionales (Phinney, 2012; Phinney et al., 1999). Adicionalmente, las propiedades biológicas de las CEM también varían con diferentes donantes (Radtke, Görgens, Liu, Horn, & Giebel, 2016). Así que las VEs, como un actor importante de las funciones terapéuticas de las CEM, presumiblemente se verían afectados de manera similar. Por lo tanto, un plan estratégico a largo plazo para mitigar el impacto de las fuentes de tejido y los donantes en la reproducibilidad de la potencia terapéutica de las preparaciones de CEM-VEs será fundamental para la traducción clínica de los productos VEs basados en CEM.

Cuando se identifica la fuente celular apropiada de producción de VEs terapéuticamente activas, se debe abordar el problema de mantener consistencia en la fuente celular para todos los lotes posteriores de preparaciones de VEs. Se ha planteado adoptar la práctica de establecer bancos maestros y de trabajo de células (*master and working cell banks*), como, por ejemplo, bancos de la misma fuente de tejido y de diferentes donantes o diferentes fuentes de tejido del mismo donante. Una combinación de ambos podría garantizar que poblaciones idénticas de células estén disponibles para la producción de múltiples lotes de VEs, mitigando los desafíos de múltiples fuentes o donantes de tejidos. Dichos bancos ayudarían a normalizar las diferencias específicas de donantes o tejidos en las cualidades de las VEs. Sin embargo, tales bancos son finitos, y la replicación de estos

bancos puede no ser posible o se podría alterar la potencia de los productos de VEs. Una alternativa más práctica a los bancos de las células primarias es el uso de líneas celulares monoclonales inmortalizadas. Sin embargo, los efectos de la inmortalización deben investigarse cuidadosamente para garantizar que las células son estables y continúan produciendo VEs que son bioequivalentes a los de las células parentales no inmortalizadas (Gimona et al., 2021). Existen estudios, que muestran que la función terapéutica de las preparaciones de VEs no se ve comprometida cuando las CEM derivadas de las células madre embrionarias humanas (T. S. Chen et al.) y el cordón umbilical (T. S. Chen et al., 2013) se inmortalizan por la sobreexpresión de c-myc.

Ha descrito ampliamente que el control de las condiciones de crecimiento de las CEM con propiedades físicas, tales como variación de oxígeno o el pre-acondicionamiento de los medios con factores solubles también pueden influir en la biogénesis y la función biológica de las vesículas extracelulares (Mas-Bargues & Borrás, 2021). Así que, en este trabajo, evaluamos el efecto de un estímulo inflamatorio en la identidad y potencia de las VEs, aislando diferentes fracciones a través de una metodología clásica basada en el uso de polietilenglicol (PEG) y una nueva estrategia comercial basada en columnas de afinidad (FAB-TACS®). Los resultados del presente estudio demostraron que las VEs aisladas del medio acondicionado de CEM-GW, son heterogéneas en su tamaño, pero no en cantidad e inmunomodulación. También observamos ligeras diferencias biofísicas y funcionales según las metodologías de separación. La fracción enriquecida con MV mostró un tamaño de partícula más grande que la fracción enriquecida con Exo, como se ha descrito ampliamente. De manera interesante, nuestros resultados muestran que el estímulo pro-inflamatorio no modifica la distribución de tamaño de las fracciones de VEs, y que podría estar afectando el número de Exos, más que el número de MVs. Sin embargo, notamos que, al caracterizar las fracciones por conteo de partículas, la metodología de aislamiento puede sesgar la interpretación de los resultados. Por esta razón, sugerimos tener en cuenta las limitaciones de las metodologías de aislamiento. Con base en nuestros resultados, concluimos que las metodologías de separación de PEG y FAB-TACS® revelan ventajas y desventajas con respecto a la recuperación y pureza de la fracción enriquecida con Exos, sin embargo, los resultados indican que son métodos confiables para enriquecer las VEs a partir de un medio acondicionado derivado de un cultivo celular de CEM-GW.

Es bien sabido que, en protocolos basados en precipitación, la recuperación puede ser alta, pero con baja pureza. Básicamente, todas las partículas solubles, incluidas las VEs, se precipitan en un sedimento (Monguió-Tortajada, Gálvez-Montón, Bayes-Genis, Roura, & Borràs, 2019). Aunque el agente precipitante apenas se elimina de la preparación final, el *pellet* suele estar contaminado con agregados de proteínas rodeando las VEs (Konoshenko, Lekchnov, Vlassov, & Laktionov, 2018; Lobb et al., 2015). Estos agregados son visibles como nanopartículas en el NTA, lo que sobrestima el conteo de estas relacionado con las VEs. Más allá de las condiciones de cultivo celular, las tecnologías de enriquecimiento VEs presentan parámetros adicionales que también podrían afectar las características del producto (Gimona et al., 2021). Actualmente se sabe que, en términos de separación, las VEs derivadas de CEM no se pueden purificar homogéneamente; están parcialmente separados o altamente enriquecidos en nanopartículas dentro de un rango de tamaño dado (Monguió-Tortajada et al., 2019; Witwer et al., 2019). Sin lugar a duda, se ha demostrado que las preparaciones de VEs contienen más de un tipo de VEs que difiere en sus lípidos de membrana, carga de proteínas y ARN (Lai et al., 2016). Estas características no son exclusivas de una clase específica de vesículas. Por esta razón, ahora se está evaluando la posibilidad de que actúen como entidades biológicas distintas. Se ha sugerido que podría ser más preciso utilizar el término “preparación” para que los productos basados en VEs de CEM reflejen el estado del arte actual en la producción de VEs de CEM (Witwer et al., 2019).

La plataforma Exoview® permite una descripción más específica, sensible y amplia de la expresión de las tetraspaninas CD9, CD81 y CD63 en las VEs. Nuestros resultados mostraron la expresión de los marcadores vesiculares clásicos, CD9, CD81 y CD63. De manera interesante, encontramos que la tetraspanina CD63 presenta mayor nivel de expresión en las VEs producidas. Esta propiedad ha sido destacada como una característica importante de las vesículas de membrana en un documento de posición de la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (Lötvall et al., 2014). De esta manera, los datos experimentales generados en el presente estudio permiten concluir que el pre-condicionamiento de las CEM-GW con un estímulo inflamatorio, no afecta la expresión de las tetraspaninas ubicuas en las VEs, mientras que se incrementa la producción de estas, siendo donante-dependiente. Esta plataforma ofrece una mayor ventaja para la caracterización por tamaño, concentración y expresión de tetraspaninas de las VEs en una muestra, porque al realizar análisis de vesícula única elimina el sesgo en

la interpretación de resultados asociado con la metodología de aislamiento o asociado con otras tecnologías de caracterización, como NTA.

Hasta este punto, podemos concluir con certeza que el estudio y caracterización de VEs derivadas de CEM, no resulta ser tan intuitivo y depende de muchos factores que deben considerarse para que sea comparativo con otros estudios. De hecho, este no es un escenario nuevo, y por ello concordamos con el consenso existente derivado de los diferentes estudios basados en VEs de CEM y los desafíos inherentes que aún quedan por resolver sobre el desarrollo y translación de productos terapéuticos basados en VEs derivadas de CEM. Los ensayos clínicos de terapia celular basada en CEM han llevado a una conclusión aparente e intuitivamente lógica: las CEM que son eficaces en los ensayos clínicos producirán VEs con potencial terapéutico. Sin embargo, la premisa que respalda esta intuición es débil. Está bien documentado que la composición de las preparaciones de VEs depende en gran medida del sistema de cultivo celular y los procesos de enriquecimiento de VEs (Théry et al., 2018). Así que, es lógico plantear que las VEs secretadas de CEM trasplantadas *in vivo* probablemente tengan una composición diferente de las secretadas por las mismas células *in vitro*. Por lo tanto, las CEM que son terapéuticamente activas en los estudios de trasplante podrían no generar necesariamente una preparación de VEs con potencial terapéutico *in vitro*. Y en sentido opuesto, las CEM que no muestran beneficio en los estudios de trasplante podrían aún generar preparaciones de VEs con funcionalidad *in vitro*. Para traducir con éxito los productos de CEM-VEs en aplicaciones clínicas, es esencial que la bioactividad de los productos sea consistente y cumpla con los criterios cuantitativos predefinidos de identidad y potencia antes de que se liberen para uso clínico. Los diferentes parámetros de manufactura podrían incrementar la eficacia terapéutica de las VEs de CEM para algunas enfermedades y disminuir para otras. Todo apunta a que un producto de CEM-VEs desarrollado para un blanco terapéutico específico puede requerir diferentes parámetros de manufactura. Es imperativo optimizar la manufactura de los productos basados en VEs de CEM con las características deseadas para tratar el blanco terapéutico de la enfermedad, antes de desarrollar criterios de identidad y potencia para su liberación como productos farmacéuticos para ensayos o terapias clínicas (Gimona et al., 2021).

Usando ingeniería genética, las investigaciones han dirigido las CEM hacia funciones específicas para mejorar su eficacia terapéutica (J. S. Park et al., 2015). Böker et al.,

demostró de manera interesante que incrementar los niveles de expresión de la tetraspanina CD9 da como resultado un número significativamente mayor de VEs secretadas por diferentes líneas celulares humanas (Böker et al., 2018). Además, sus hallazgos indicaron un papel importante de CD9 para la biogénesis de los Exos y mostraron una función notable de esta tetraspanina en la transferencia de información horizontal mediada por Exos. En nuestro estudio fue de interés aplicar este enfoque, la modificación genética de las CEM-GW, y evaluar el impacto en la producción y características biofísicas de las VEs, así como su función biológica en un entorno inflamatorio. Después del establecimiento de un cultivo celular estable de CEM-GW modificadas genéticamente para expresar GFP y FGFb, con el cual logramos demostrar reproducibilidad del protocolo de producción y transducción con partículas LV de las CEM-GW, se inició la producción de las VEs. Observamos nuevamente un crecimiento mayor para las UCWJ<sup>FGFb</sup> en el medio de cultivo con menos nutrientes (SFB), confirmando los hallazgos descritos anteriormente, en cuanto al efecto del factor FGFb en la viabilidad y crecimiento de las CEM-GW en un medio desprovisto de nutrientes. Posteriormente, el cultivo de las CEM-GW modificadas genéticamente en medio suplementado con hLP, también indujo una mejor condición metabólica para la posterior producción de las nanopartículas. Sin embargo, no observamos incremento en el conteo de partículas en las CEM-GW modificadas genéticamente. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la modificación genética de las CEM-GW para la sobreexpresión del factor FGFb al parecer no genera mayor impacto en la cinética de producción de las VEs, y tampoco modifica las características biofísicas de las VEs, en cuanto al tamaño de partícula o la expresión de las tetraspaninas ubicuas.

En la última parte de este trabajo, nos planteamos evaluar la función biológica de la fracción de Exos aislada de los tres grupos celulares, UCWJ<sup>WT</sup>, UCWJ<sup>GFP</sup> y UCWJ<sup>FGFb</sup>, mediante ensayos de inmunomodulación *in vitro*. Los resultados obtenidos con las fracciones aisladas para los dos donantes no modificados y modificados por LV, no mostraron el efecto de inhibición esperado de las VEs sobre la proliferación de los linfocitos T. Por tal razón, abordamos de manera sistemática la estandarización del ensayo funcional, con el fin de reducir la variabilidad técnica que induce sesgo en la interpretación de los resultados. Se evaluaron diferentes variables experimentales, tales como la relación PBMC:Exo y pre-condicionamiento de las CEM-GW con citoquinas pro-inflamatorias. En general fue muy claro que la variable que genera más impacto en el ensayo son los diferentes donantes de

PBMCs, ya que todos muestran respuestas heterogéneas de activación del receptor de células T a partir de la exposición perlas de activación  $\alpha$ CD3/CD28.

Adicionalmente, planteamos hacer un rastreo más específico de la proliferación de los linfocitos T por tinción con el marcador CFSE. Encontramos que la tinción debe llevarse a cabo con concentraciones de máximo 0,625 $\mu$ M del marcador CFSE, para evitar afectar la capacidad de proliferación de las PBMCs; concentraciones bajas disminuye el número de generaciones que pueden rastrearse. Se logró observar el efecto de inhibición de los Exos sobre la tasa de activación de la población CD3<sup>+</sup>, el cual incrementa cuando los exosomas se obtienen después de inducir una condición de pro-inflamación en el cultivo de las CEM-GW. Por el rastreo de la proliferación sugerimos que el efecto de inhibición puede ser a través de mecanismo de inducción de muerte celular o secuestro del ciclo celular, o ambos. Para esto, deben diseñarse aproximaciones experimentales adicionales que conduzcan a desenlaces experimentales más robustos y reproducibles. Finalmente, basados en estas condiciones, se confirmó que el efecto inhibitor de los Exos sobre la proliferación de linfocitos T se potencia cuando las CEM-GW se pre-condicionan con citoquinas pro-inflamatorias. Este resultado coincide con lo que han descrito otros autores, quienes han demostrado que pre-activar las CEM humanas previo al aislamiento de las VEs aumenta las funciones inmunomoduladoras de las nanopartículas (Di Trapani et al., 2016). Por ejemplo, Ti et al. descubrió que las CEM pre-activadas con LPS liberan más Exos y contienen niveles más altos de let7b, lo que contribuía a mejorar los efectos de las CEM en la cicatrización de heridas (Ti et al., 2015). En Song et al., encontraron que la inhibición de la liberación de exosomas por el inhibidor GW4869 disminuyó los efectos inmunomoduladores mejorados de las CEM pre-tratadas con IL-1 $\beta$  ( $\beta$ MSC). Los exosomas purificados de  $\beta$ MSC fueron suficientes para su actividad inmunomoduladora tanto *in vitro* como *in vivo*. Curiosamente, los autores también demostraron que el tratamiento con IL-1 $\beta$  aumentó significativamente la expresión y el empaquetamiento de miR-146a dentro de los exosomas (Song et al., 2017). Recientemente, se demostró que las CEM-TA liberan Exos con efectos inmunosupresores medibles solo después de la activación previa con citocinas proinflamatorias, induciendo la capacidad de polarizar los macrófagos al fenotipo M2 (Domenis et al., 2018). En la misma línea, Zhang et al. mostró que el tratamiento combinado de TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  promovió de manera efectiva la transformación de células mononucleares en Tregs, dondeIDO desempeña un papel importante (Q. Zhang et al., 2018). Todos estos estudios, así como nuestros resultados sugieren que un estímulo

inflamatorio puede ser fundamental para inducir la liberación de VEs inmunoterapéuticas de las CEM, proporcionando una aproximación adicional para una mejor aplicación terapéutica de las CEM en los trastornos inflamatorios. Sin embargo, otros estudios indicaron que pre-activar las CEM no mejoró los efectos inmunomoduladores de las VEs derivados de las células. Cosenza et al., encontraron que la pre-activación de las CEM con IFN- $\gamma$  antes del aislamiento de las vesículas no influyó en la función inmunomoduladora de Exos o MP aislados (Cosenza et al., 2018). Sin embargo, se debe considerar que en estos estudios se utilizaron fuentes de CEM y tratamiento heterogéneos. Estas observaciones enfatizan la variabilidad de los resultados en el campo de las VEs.

Hasta este punto concluimos que podríamos sugerir ciertas condiciones experimentales para realizar un ensayo funcional con VEs, sin embargo, se enfatiza que la variabilidad en la respuesta de activación de las PBMCs sigue siendo un factor crítico en el ensayo, y es una condición biológica muy compleja de controlar. Podríamos sugerir caracterizar la respuesta de activación de las PBMCs con las perlas de activación, y seleccionar sólo aquellos donantes que muestren activación en cierto rango, pero nuestros datos no nos permiten hacer una relación entre la respuesta de activación y el éxito del ensayo, es decir, observar el efecto inhibitor de los Exos. De hecho, esta discusión nos llevó a pensar que hay otros factores que podrían también sesgar los resultados del ensayo, tales como: el donante de CEM-GW, el pase del donante para inducir las VEs, la concentración de las citoquinas pro-inflamatorias y el método de aislamiento de las VEs. Así que no podríamos con certeza sugerir cuáles son las condiciones experimentales para un ensayo funcional de exosomas derivados de CEM-GW basado en la proliferación de linfocitos T. En este trabajo no logramos observar el efecto de la modificación genética para la sobreexpresión del factor FGFb en la funcionalidad de las VEs derivadas de CEM-GW. Es necesario seguir trabajando en la estandarización de un ensayo funcional reproducible basado en linfocitos T o implementar otros ensayos funcionales para evaluar el efecto de la modificación genética. Sin embargo, y de acuerdo con lo dicho por otros autores, el pretratamiento de las CEM-GW con citoquinas proinflamatorias es una estrategia molecular encaminada a generar un mayor impacto en la función biológica de las VEs derivadas de las CEM-GW y está avalado por los resultados obtenidos.

Sobre la interacción de las VEs con las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune (PCI), estudios recientes han sugerido un potencial de inmunomodulación. Por

ejemplo, se ha descrito que las VEs cocultivadas con la población completa de PBMCs inhibieron la proliferación de células B y la liberación de inmunoglobulinas, pero no observaron efectos en la proliferación de células T (Conforti et al., 2014). Otros estudios también han mostrado efectos variables de las VEs en las células T y B activadas (Del Fattore et al., 2015), pero los resultados de estos no son fácilmente comparables debido a los diferentes enfoques metodológicos, relacionados con los protocolos de purificación y cuantificación de las VEs, y la lectura experimental para evaluar sus efectos inmunomoduladores en las PCI. Los ensayos inmunológicos son esenciales para identificar y medir la influencia de células o productos celulares; sin embargo, hay varias variables críticas que pueden conducir a diferentes resultados, como el uso de PCI purificadas en lugar de PBMC no fraccionadas, proporciones celulares en los sistemas de cocultivo, tipo y duración del estímulo, viabilidad celular y evaluación de la tasa de proliferación (Galipeau & Krampera, 2015). Aunque el uso de PBMC no fraccionadas, que contienen una combinación de células linfomonocíticas, representa una poderosa herramienta para estudiar el efecto inmunomodulador general, la presencia de diferentes subconjuntos de células en concentraciones variables, dependiendo de los donantes de células, genera con frecuencia datos variables y poco reproducibles. Hay algunos estudios interesantes. Blazquez et al., realizó experimentos *in vitro* para caracterizar el efecto inmunomodulador de exosomas derivados de CEM de tejido adiposo (exo-hASC) en células T estimuladas. La caracterización fenotípica de linfocitos T citotóxicos (CD8+) y cooperadores (CD4+ o *helper*) junto con ensayos funcionales (proliferación y producción de IFN- $\gamma$ ) demostraron que las exo-hASCs ejercían un efecto inhibitorio en la diferenciación y activación de linfocitos T, así como una disminución de la actividad de linfocitos T (Blazquez et al., 2014). Del Fattore et al., observó que la adición de CEM-EVs a PBMC no afectó la proliferación de la población CD3+, pero indujo la apoptosis de las subpoblaciones CD3+ y CD4+ e incrementó la proliferación y la apoptosis de las células T reguladoras. Adicionalmente, se incrementó la proporción Treg/Teff y la concentración de la citoquina inmunosupresora IL-10 en el medio de cultivo, indicando un efecto inmunosupresor neto (Del Fattore et al., 2015). Finalmente, Di Trapani et al., observó que el grado de inmunomodulación mediada por CEM-VEs parecía ser proporcional a la capacidad de cada población de células inmunológicas, para capturar VEs. Los autores notaron, al usar PBMC no fraccionadas, que las VEs liberadas por las CEM fueron incorporadas casi por completo por los monocitos, lo que redujo el efecto sobre las poblaciones de linfocitos. Adicionalmente, investigaron el impacto de pre-activar las CEM con citoquinas pro-

inflamatorias en la inmunosupresión conducida por las VEs. Aunque las CEM mostraron una tasa más baja de producción de VEs, la captura de estas fue mayor por las PCI. Además, la preactivación inflamatoria mejoró el efecto inmunosupresor de las VEs, principalmente en presencia de células B (Di Trapani et al., 2016).

Los efectos divergentes de las CEM y las CEM-VEs sobre las células T estimuladas permanecen sin esclarecer. Las CEM producen una variedad de moléculas inmunomoduladoras según el microambiente, y el efecto neto probablemente resulte de una combinación de diferentes señales, incluidas las VEs. Dado que los VEs no son células vivas completas, sino que representan productos celulares que transmiten señales paracrinas específicas, se podría esperar que estos efectos dependan menos del entorno y, por lo tanto, sean más predecibles (Di Trapani et al., 2016). Hasta ahora no hay publicaciones relacionadas con la caracterización biofísica y funcional de las VEs derivadas de CEM modificadas genéticamente para la sobreexpresión del factor FGFb, por lo tanto y aún con la limitación del ensayo funcional que se presentó en este trabajo, nuestros resultados constituyen un punto de partida importante que conducirá a sugerir si la sobreexpresión del factor FGFb por modificación genética con LV sobre las CEM-GW, es una estrategia molecular importante en el mejoramiento de las propiedades terapéuticas de las VEs derivadas de las CEM-GW, para su posterior aplicación clínica. Por ahora, nuestros resultados nos permiten afirmar que la aplicación de una estrategia de modificación genética conducente a la sobreexpresión del factor FGFb en CEM-GW no impacta la producción de VEs, y sugiere una potencial mejora de las propiedades funcionales de las VEs al brindar un mayor soporte en la supervivencia y proliferación de las CEM-GW en un ambiente desprovisto de nutrientes. Si adicionalmente las CEM-GW expresando FGFb se pre-activan con citoquinas pro-inflamatorias, el impacto en la funcionalidad terapéutica de las VEs podrá ser mayor.

## 5. Conclusiones

El abordaje sistemático de estandarización de los protocolos para la modificación genética de las CEM-GW utilizando una herramienta no viral y una viral, para la sobreexpresión del factor de crecimiento FGFb, nos permitió estudiar su efecto en las características biológicas y funcionales de las CEM-GW y sus derivados, las VEs.

Inicialmente encontramos que la modificación genética transitoria de las CEM-GW mediante nucleofección, es una estrategia de ingeniería genética no viral eficiente para la entrega de un gen de interés en las células. Utilizando esta herramienta demostramos que la sobreexpresión del factor FGFb induce un significativo incremento en la proliferación celular, sin alterar su inmunofenotipo, que es compatible con el incremento en la viabilidad y supervivencia celular. Posteriormente, encontramos que la modificación genética estable de las CEM-GW mediante transducción con partículas LV no cambia el inmunofenotipo característico de las CEM, no afecta la viabilidad y las células logran mantener su potencial de proliferación celular, en un ambiente rico en nutrientes. Mientras que, en un medio desprovisto de nutrientes, se incrementa ligeramente su potencial de proliferación celular. Funcionalmente, observamos un incremento en el potencial de diferenciación hacia osteoblastos ante la sobreexpresión del factor FGFb. Sugerimos que podría extender su potencial de diferenciación, el cual se pierde con la extensa expansión de las células *in vitro* (Digirolamo et al., 1999). Adicionalmente, la modificación genética de las CEM-GW con lentivirus, no afecta su potencial de inmunomodulación. De hecho, la expresión constitutiva adicional del factor FGFb potencia el efecto inmunosupresor sobre la proliferación de células T.

El estudio de las VEs derivadas de las CEM-GW, como uno de sus productos, permitió determinar que la producción de VEs responde principalmente al estado metabólico de las células, y no está directamente relacionado con el número celular. Además, se concluyó

que el estudio y caracterización de VEs derivadas de CEM, no es tan intuitivo y depende de muchos factores que deben considerarse para que sea comparativo con otros estudios. Con estas consideraciones, los resultados demostraron que, la modificación genética de las CEM-GW para la sobreexpresión del factor FGFb, no genera mayor impacto en la cinética de producción de las VEs, y tampoco modifica las características biofísicas de las mismas, en cuanto al tamaño de partícula o la expresión de las tetraspaninas ubicuas. No se obtuvieron resultados conclusivos sobre el efecto de la modificación genética en la funcionalidad de las VEs derivadas de CEM-GW. Sin embargo, a pesar de la variabilidad de los resultados logramos observar que las VEs inhiben la proliferación de la población de linfocitos CD3+, efecto que se incrementa cuando los exosomas se obtienen después de inducir una condición de pro-inflamación en el cultivo de las CEM-GW.

El presente estudio logra un aporte importante y significativo al conocimiento científico y aplicación clínica de metodologías de ingeniería genética, para potenciar las características funcionales de las CEM-GW. Mediante el uso de una estrategia de ingeniería genética basada en LV para sobreexpresar el factor de crecimiento FGFb, se pudo ampliar el conocimiento hasta ahora reportado sobre el impacto en las propiedades biológicas y funcionales de las CEM, al combinar la terapia celular y génica. Sugerimos que el factor FGFb puede ser un factor crítico en el mantenimiento de altos niveles de viabilidad celular en un potencial escenario *in vivo*, potenciando sus funciones biológicas y, por tanto, su actividad terapéutica. Desde el punto de vista de manufactura de las CEM-GW para aplicaciones clínicas, sería una característica interesante, ya que no limitaría su uso a pases tempranos. Es posible pensar, que con el factor se logre mantener la capacidad de diferenciación hasta pases tardíos, así como también la capacidad de proliferación e inmunomodulación.

Los resultados obtenidos también constituyen un punto de partida importante que conducirá a sugerir si la sobreexpresión del factor FGFb por modificación genética con LV sobre las CEM-GW, es una estrategia molecular relevante para el mejoramiento de las propiedades terapéuticas de las CEM-VEs. Si bien, la sobreexpresión del factor no influye en el incremento de la producción de VEs, proponemos que, como consecuencia del impacto en la supervivencia y proliferación de las CEM-GW, se podría inducir una mejor función biológica de las células, no sólo a nivel local, si no en sus mecanismos paracrinós a través de su secretoma en el cual se incluyen las VEs, en un escenario *in vivo*. Un impedimento

---

importante para la traslación de las preparaciones de CEM-VEs en productos terapéuticos, es la definición de métricas de potencia. El desafío surge en parte de la complejidad biológica de las preparaciones de CEM-VEs. Las CEM-VEs son intrínsecamente complejas y pueden influir potencialmente en diversas actividades biológicas. Esta complejidad se complica aún más por las variables asociadas con la amplia variedad de fuentes de CEM, sistemas de cultivo y procesos de enriquecimiento de VEs (Gimona et al., 2021).

Todos estos resultados nos permiten finalmente concluir que una estrategia de modificación genética viral o no viral para la sobreexpresión del factor FGFb en CEM-GW es válida y podría mejorar las propiedades funcionales de las células y la de sus derivados, las VEs, conduciendo a potenciar su aplicación clínica como terapia celular basadas en CEM-GW. Estas observaciones iniciales en modelos *in vitro* deben validarse posteriormente utilizando modelos *in vivo*, donde el microambiente ciertamente podría modular la actividad o el rendimiento de estos productos medicinales.



## Bibliografía

- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol*, *113*(1), 1-11. doi:10.1007/s11060-013-1084-8
- Alvaro-Gracia, J. M., Jover, J. A., Garcia-Vicuna, R., Carreno, L., Alonso, A., Marsal, S., . . . Diaz-Gonzalez, F. (2017). Intravenous administration of expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in refractory rheumatoid arthritis (Cx611): results of a multicentre, dose escalation, randomised, single-blind, placebo-controlled phase Ib/IIa clinical trial. *Ann Rheum Dis*, *76*(1), 196-202. doi:10.1136/annrheumdis-2015-208918
- Anzalone, R., Lo Iacono, M., Corrao, S., Magno, F., Loria, T., Cappello, F., . . . La Rocca, G. (2010). New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. *Stem Cells Dev*, *19*(4), 423-438. doi:10.1089/scd.2009.0299
- Ashton, B. A., Allen, T. D., Howlett, C. R., Eaglesom, C. C., Hattori, A., & Owen, M. (1980). Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res*(151), 294-307.
- Aslan, H., Zilberman, Y., Arbeli, V., Sheyn, D., Matan, Y., Liebergall, M., . . . Gazit, Z. (2006). Nucleofection-based ex vivo nonviral gene delivery to human stem cells as a platform for tissue regeneration. *Tissue Eng*, *12*(4), 877-889. doi:10.1089/ten.2006.12.877
- Auletta, J. J., Zale, E. A., Welter, J. F., & Solchaga, L. A. (2011). Fibroblast Growth Factor-2 Enhances Expansion of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells without Diminishing Their Immunosuppressive Potential. *Stem Cells Int*, *2011*, 235176. doi:10.4061/2011/235176
- Bab, I., Ashton, B. A., Gazit, D., Marx, G., Williamson, M. C., & Owen, M. E. (1986). Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *J Cell Sci*, *84*, 139-151.
- Baird, A., Schubert, D., Ling, N., & Guillemin, R. (1988). Receptor- and heparin-binding domains of basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(7), 2324-2328. doi:10.1073/pnas.85.7.2324
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., . . . Hoffman, R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*, *30*(1), 42-48.
- Batsali, A. K., Kastrinaki, M. C., Papadaki, H. A., & Pontikoglou, C. (2013). Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther*, *8*(2), 144-155.
- Ben Jemaa, A., Sallami, S., Ramarli, D., Colombatti, M., & Oueslati, R. (2013). The proinflammatory cytokine, IL-6, and its interference with bFGF signaling and PSMA in prostate cancer cells. *Inflammation*, *36*(3), 643-650. doi:10.1007/s10753-012-9586-7

- Bhang, S. H., Lee, T. J., La, W. G., Kim, D. I., & Kim, B. S. (2011). Delivery of fibroblast growth factor 2 enhances the viability of cord blood-derived mesenchymal stem cells transplanted to ischemic limbs. *J Biosci Bioeng*, *111*(5), 584-589. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.01.003
- Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., & Rifkin, D. B. (1997). Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*, *18*(1), 26-45. doi:10.1210/edrv.18.1.0292
- Blazquez, R., Sanchez-Margallo, F. M., de la Rosa, O., Dalemans, W., Álvarez, V., Tarazona, R., & Casado, J. G. (2014). Immunomodulatory Potential of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes on in vitro Stimulated T Cells. *Frontiers in Immunology*, *5*. doi:10.3389/fimmu.2014.00556
- Bobis-Wozowicz, S., Kmiotek, K., Kania, K., Karnas, E., Labeledz-Maslowska, A., Sekula, M., . . . Zuba-Surma, E. K. (2017). Diverse impact of xeno-free conditions on biological and regenerative properties of hUC-MSCs and their extracellular vesicles. *J Mol Med (Berl)*, *95*(2), 205-220. doi:10.1007/s00109-016-1471-7
- Bobis-Wozowicz, S., Kmiotek, K., Sekula, M., Kedracka-Krok, S., Kamycka, E., Adamiak, M., . . . Zuba-Surma, E. K. (2015). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Microvesicles Transmit RNAs and Proteins to Recipient Mature Heart Cells Modulating Cell Fate and Behavior. *Stem Cells*, *33*(9), 2748-2761. doi:10.1002/stem.2078
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., & Thery, C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, *12*(12), 1659-1668. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x
- Bouaziz, J. D., Yanaba, K., & Tedder, T. F. (2008). Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol Rev*, *224*, 201-214. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00661.x
- Brennan, F. M., & McInnes, I. B. (2008). Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, *118*(11), 3537-3545. doi:10.1172/jci36389
- Bright, J. J., Kerr, L. D., & Sriram, S. (1997). TGF-beta inhibits IL-2-induced tyrosine phosphorylation and activation of Jak-1 and Stat 5 in T lymphocytes. *J Immunol*, *159*(1), 175-183.
- Budoni, M., Fierabracci, A., Luciano, R., Petrini, S., Di Ciommo, V., & Muraca, M. (2013). The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles. *Cell Transplant*, *22*(2), 369-379. doi:10.3727/096368911x582769
- Burr, S. P., Dazzi, F., & Garden, O. A. (2013). Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance? *Immunol Cell Biol*, *91*(1), 12-18. doi:10.1038/icb.2012.60
- Böker, K. O., Lemus-Diaz, N., Rinaldi Ferreira, R., Schiller, L., Schneider, S., & Gruber, J. (2018). The Impact of the CD9 Tetraspanin on Lentivirus Infectivity and Exosome Secretion. *Molecular Therapy*, *26*(2), 634-647. doi:https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.11.008
- Campard, D., Lysy, P. A., Najimi, M., & Sokal, E. M. (2008). Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology*, *134*(3), 833-848. doi:10.1053/j.gastro.2007.12.024
- Caplan, A. I., & Correa, D. (2011). The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*, *9*(1), 11-15. doi:10.1016/j.stem.2011.06.008
- Castro-Malaspina, H., Gay, R. E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., . . . Moore, M. A. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, *56*(2), 289-301.
- Cañas-Arboleda, M., Beltrán, K., Medina, C., Camacho, B., & Salguero, G. (2020). Human Platelet Lysate Supports Efficient Expansion and Stability of Wharton's Jelly

- Mesenchymal Stromal Cells via Active Uptake and Release of Soluble Regenerative Factors. *Int J Mol Sci*, 21(17). doi:10.3390/ijms21176284
- Cha, J. M., Shin, E. K., Sung, J. H., Moon, G. J., Kim, E. H., Cho, Y. H., . . . Bang, O. Y. (2018). Efficient scalable production of therapeutic microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *Sci Rep*, 8(1), 1171. doi:10.1038/s41598-018-19211-6
- Chao, K. C., Chao, K. F., Fu, Y. S., & Liu, S. H. (2008). Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One*, 3(1), e1451. doi:10.1371/journal.pone.0001451
- Chatterjee, D., Tufa, D. M., Baehre, H., Hass, R., Schmidt, R. E., & Jacobs, R. (2014). Natural killer cells acquire CD73 expression upon exposure to mesenchymal stem cells. In *Blood* (Vol. 123, pp. 594-595). United States.
- Che, N., Li, X., Zhou, S., Liu, R., Shi, D., Lu, L., & Sun, L. (2012). Umbilical cord mesenchymal stem cells suppress B-cell proliferation and differentiation. *Cell Immunol*, 274(1-2), 46-53. doi:10.1016/j.cellimm.2012.02.004
- Chen, J., Li, Y., Wang, L., Zhang, Z., Lu, D., Lu, M., & Chopp, M. (2001). Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 32(4), 1005-1011. doi:10.1161/01.str.32.4.1005
- Chen, K., Wang, D., Du, W. T., Han, Z. B., Ren, H., Chi, Y., . . . Han, Z. C. (2010). Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin Immunol*, 135(3), 448-458. doi:10.1016/j.clim.2010.01.015
- Chen, L. B., Jiang, X. B., & Yang, L. (2004). Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*, 10(20), 3016-3020. doi:10.3748/wjg.v10.i20.3016
- Chen, M. Y., Lie, P. C., Li, Z. L., & Wei, X. (2009). Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 37(5), 629-640. doi:10.1016/j.exphem.2009.02.003
- Chen, T. S., Arslan, F., Yin, Y., Tan, S. S., Lai, R. C., Choo, A. B. H., . . . Lim, S. K. Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs.
- Chen, T. S., Yeo, R. W. Y., Arslan, F., Yin, Y., Tan, S. S., Lai, R. C., . . . Lim, S. K. (2013). Efficiency of Exosome Production Correlates Inversely with the Developmental Maturity of MSC Donor. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 3, 1-10.
- Chuah, M. K., Van Damme, A., Zwinnen, H., Goovaerts, I., Vanslembrouck, V., Collen, D., & VandenDriessche, T. (2000). Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice. *Hum Gene Ther*, 11(5), 729-738. doi:10.1089/10430340050015626
- Clayton, A., Mitchell, J. P., Court, J., Mason, M. D., & Tabi, Z. (2007). Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res*, 67(15), 7458-7466. doi:10.1158/0008-5472.can-06-3456
- Colleoni, S., Donofrio, G., Lagutina, I., Duchi, R., Galli, C., & Lazzari, G. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells.

- Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M., & Prockop, D. J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(7), 3213-3218. doi:10.1073/pnas.070034097
- Conforti, A., Scarsella, M., Starc, N., Giorda, E., Biagini, S., Proia, A., . . . Bernardo, M. E. (2014). Microvesicles derived from mesenchymal stromal cells are not as effective as their cellular counterpart in the ability to modulate immune responses in vitro. *Stem Cells Dev*, *23*(21), 2591-2599. doi:10.1089/scd.2014.0091
- Conget, P. A., & Minguell, J. J. (1999). Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*, *181*(1), 67-73. doi:10.1002/(sici)1097-4652(199910)181:1<67::aid-jcp7>3.0.co;2-c
- Consentius, C., Reinke, P., & Volk, H. D. (2015). Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: what has been seen in vitro and in vivo? *Regen Med*, *10*(3), 305-315. doi:10.2217/rme.15.14
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., . . . Uccelli, A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, *107*(1), 367-372. doi:10.1182/blood-2005-07-2657
- Cornetta, K., & Anderson, W. F. (1989). Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. *J Virol Methods*, *23*(2), 187-194. doi:10.1016/0166-0934(89)90132-8
- Cosenza, S., Toupet, K., Maumus, M., Luz-Crawford, P., Blanc-Brude, O., Jorgensen, C., & Noël, D. (2018). Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics*, *8*(5), 1399-1410. doi:10.7150/thno.21072
- Cruz-Barrera, M., Flórez-Zapata, N., Lemus-Díaz, N., Medina, C., Galindo, C. C., González-Acero, L. X., . . . Salguero, G. (2020). Integrated Analysis of Transcriptome and Secretome From Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Reveal New Mechanisms for the Modulation of Inflammation and Immune Activation. *Front Immunol*, *11*, 575488. doi:10.3389/fimmu.2020.575488
- Cárcamo-Orive, I., Tejedós, N., Delgado, J., Gaztelumendi, A., Otaegui, D., Lang, V., & Trigueros, C. (2008). ERK2 protein regulates the proliferation of human mesenchymal stem cells without affecting their mobilization and differentiation potential. *Exp Cell Res*, *314*(8), 1777-1788. doi:10.1016/j.yexcr.2008.01.020
- de Godoy, M. A., Saraiva, L. M., de Carvalho, L. R. P., Vasconcelos-Dos-Santos, A., Beiral, H. J. V., Ramos, A. B., . . . Ferreira, S. T. (2018). Mesenchymal stem cells and cell-derived extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid-beta oligomers. *J Biol Chem*, *293*(6), 1957-1975. doi:10.1074/jbc.M117.807180
- de la Torre, P., Paris, J. L., Fernández-de la Torre, M., Vallet-Regí, M., & Flores, A. I. (2021). Endostatin Genetically Engineered Placental Mesenchymal Stromal Cells Carrying Doxorubicin-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles for Combined Chemo- and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceutics*, *13*(2). doi:10.3390/pharmaceutics13020244
- Del Fattore, A., Luciano, R., Pascucci, L., Goffredo, B. M., Giorda, E., Scapaticci, M., . . . Muraca, M. (2015). Immunoregulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on T Lymphocytes. *Cell Transplant*, *24*(12), 2615-2627. doi:10.3727/096368915x687543
- Delaune, E., Lemaire, P., & Kodjabachian, L. (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development*, *132*(2), 299-310. doi:10.1242/dev.01582
- Deng, D., Zhang, P., Guo, Y., & Lim, T. O. (2017). A randomised double-blind, placebo-controlled trial of allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cell for lupus

- nephritis. *Ann Rheum Dis*, 76(8), 1436-1439. doi:10.1136/annrheumdis-2017-211073
- Deng, Y., Yi, S., Wang, G., Cheng, J., Zhang, Y., Chen, W., . . . Yang, Y. (2014). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells instruct dendritic cells to acquire tolerogenic phenotypes through the IL-6-mediated upregulation of SOCS1. *Stem Cells Dev*, 23(17), 2080-2092. doi:10.1089/scd.2013.0559
- Deuse, T., Stubbendorff, M., Tang-Quan, K., Phillips, N., Kay, M. A., Eiermann, T., . . . Schrepfer, S. (2011). Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 20(5), 655-667. doi:10.3727/096368910x536473
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., . . . Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838-3843. doi:10.1182/blood.v99.10.3838
- Di Trapani, M., Bassi, G., Midolo, M., Gatti, A., Kamga, P. T., Cassaro, A., . . . Krampera, M. (2016). Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Sci Rep*, 6, 24120. doi:10.1038/srep24120
- Digirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R., & Prockop, D. J. (1999). Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*, 107(2), 275-281. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01715.x
- Djouad, F., Fritz, V., Apparailly, F., Louis-Pence, P., Bony, C., Sany, J., . . . Noel, D. (2005). Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 52(5), 1595-1603. doi:10.1002/art.21012
- Domenis, R., Cifù, A., Quaglia, S., Pistis, C., Moretti, M., Vicario, A., . . . Curcio, F. (2018). Pro inflammatory stimuli enhance the immunosuppressive functions of adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes. *Scientific reports*, 8(1), 13325-13325. doi:10.1038/s41598-018-31707-9
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . . . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905
- Duffy, M. M., Ritter, T., Ceredig, R., & Griffin, M. D. (2011). Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*, 2(4), 34. doi:10.1186/scrt75
- Eldh, M., Ekstrom, K., Valadi, H., Sjostrand, M., Olsson, B., Jernas, M., & Lotvall, J. (2010). Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. *PLoS One*, 5(12), e15353. doi:10.1371/journal.pone.0015353
- Eming, S. A., Brachvogel, B., Odorisio, T., & Koch, M. (2007). Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem*, 42(3), 115-170. doi:10.1016/j.proghi.2007.06.001
- Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*, 6(265), 265sr266. doi:10.1126/scitranslmed.3009337
- English, K., Ryan, J. M., Tobin, L., Murphy, M. J., Barry, F. P., & Mahon, B. P. (2009). Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-

- redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*, 156(1), 149-160. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03874.x
- Fakiruddin, K. S., Baharuddin, P., Lim, M. N., Fakharuzi, N. A., Yusof, N. A., & Zakaria, Z. (2014). Nucleofection optimization and in vitro anti-tumourigenic effect of TRAIL-expressing human adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Cancer Cell Int*, 14(1), 122. doi:10.1186/s12935-014-0122-8
- Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V. E., DeChiara, T. M., & Goldfarb, M. (1995). Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science*, 267(5195), 246-249. doi:10.1126/science.7809630
- Fierabracci, A., Del Fattore, A., Luciano, R., Muraca, M., & Teti, A. (2015). Recent advances in mesenchymal stem cell immunomodulation: the role of microvesicles. *Cell Transplant*, 24(2), 133-149. doi:10.3727/096368913x675728
- Fong, C. Y., Richards, M., Manasi, N., Biswas, A., & Bongso, A. (2007). Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reprod Biomed Online*, 15(6), 708-718. doi:10.1016/s1472-6483(10)60539-1
- Forte, A., Finicelli, M., Mattia, M., Berrino, L., Rossi, F., De Feo, M., . . . Galderisi, U. (2008). Mesenchymal stem cells effectively reduce surgically induced stenosis in rat carotids. *J Cell Physiol*, 217(3), 789-799. doi:10.1002/jcp.21559
- Francois, M., Romieu-Mourez, R., Li, M., & Galipeau, J. (2012). Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther*, 20(1), 187-195. doi:10.1038/mt.2011.189
- Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Bestard, O., & Grinyo, J. M. (2012). Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Front Immunol*, 3, 212. doi:10.3389/fimmu.2012.00212
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., & Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4(5), 267-274.
- Fu, B., Tian, Z., & Wei, H. (2014). Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*, 141(4), 483-489. doi:10.1111/imm.12224
- Furuta, T., Miyaki, S., Ishitobi, H., Ogura, T., Kato, Y., Kamei, N., . . . Ochi, M. (2016). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model. *Stem Cells Transl Med*, 5(12), 1620-1630. doi:10.5966/sctm.2015-0285
- Galderisi, U., & Giordano, A. (2014). The gap between the physiological and therapeutic roles of mesenchymal stem cells. *Med Res Rev*, 34(5), 1100-1126. doi:10.1002/med.21322
- Galipeau, J., & Krampera, M. (2015). The challenge of defining mesenchymal stromal cell potency assays and their potential use as release criteria. *Cytotherapy*, 17(2), 125-127. doi:10.1016/j.jcyt.2014.12.008
- Gangi, E., Vasu, C., Cheatem, D., & Prabhakar, B. S. (2005). IL-10-producing CD4+CD25+ regulatory T cells play a critical role in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced suppression of experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol*, 174(11), 7006-7013. doi:10.4049/jimmunol.174.11.7006
- Gimona, M., Brizzi, M. F., Choo, A. B. H., Dominici, M., Davidson, S. M., Grillari, J., . . . Lim, S. K. (2021). Critical considerations for the development of potency tests for therapeutic applications of mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles. *Cytotherapy*, 23(5), 373-380. doi:10.1016/j.jcyt.2021.01.001
- González, M. A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D., & Delgado, M. (2009). Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*, 60(4), 1006-1019. doi:10.1002/art.24405
- Granero-Moltó, F., Myers, T. J., Weis, J. A., Longobardi, L., Li, T., Yan, Y., . . . Spagnoli, A. (2011). Mesenchymal Stem Cells Expressing Insulin-like Growth Factor-I (MSCIGF)

- Promote Fracture Healing and Restore New Bone Formation in Irs1 Knockout Mice: Analyses of MSCIGF Autocrine and Paracrine Regenerative Effects. *STEM CELLS*, 29.
- Gronthos, S., Simmons, P. J., Graves, S. E., & Robey, P. G. (2001). Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone*, 28(2), 174-181.
- Guo, Y., Chan, K. H., Lai, W. H., Siu, C. W., Kwan, S. C., Tse, H. F., . . . Wing-Man Ho, J. (2013). Human mesenchymal stem cells upregulate CD1dCD5(+) regulatory B cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation*, 20(5), 294-303. doi:10.1159/000351450
- Gur-Wahnon, D., Borovsky, Z., Beyth, S., Liebergall, M., & Rachmilewitz, J. (2007). Contact-dependent induction of regulatory antigen-presenting cells by human mesenchymal stem cells is mediated via STAT3 signaling. *Exp Hematol*, 35(3), 426-433. doi:10.1016/j.exphem.2006.11.001
- Gyorgy, B., Szabo, T. G., Turiak, L., Wright, M., Herczeg, P., Ledeczki, Z., . . . Buzas, E. I. (2012). Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PLoS One*, 7(11), e49726. doi:10.1371/journal.pone.0049726
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., . . . Cavazzana-Calvo, M. (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*, 118(9), 3132-3142. doi:10.1172/jci35700
- Haleem-Smith, H., Derfoul, A., Okafor, C., Tuli, R., Olsen, D., Hall, D. J., & Tuan, R. S. (2005). Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Biotechnol*, 30(1), 9-20. doi:10.1385/mb:30:1:009
- Haynesworth, S. E., Baber, M. A., & Caplan, A. I. (1992). Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 13(1), 69-80.
- Hoogduijn, M. J. (2015). Are mesenchymal stromal cells immune cells? *Arthritis Res Ther*, 17(1), 88. doi:10.1186/s13075-015-0596-3
- Horwitz, E. M., Gordon, P. L., Koo, W. K., Marx, J. C., Neel, M. D., McNall, R. Y., . . . Hofmann, T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(13), 8932-8937. doi:10.1073/pnas.132252399
- Hsieh, J. Y., Fu, Y. S., Chang, S. J., Tsuang, Y. H., & Wang, H. W. (2010). Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. *Stem Cells Dev*, 19(12), 1895-1910. doi:10.1089/scd.2009.0485
- Islam, M. N., Das, S. R., Emin, M. T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., . . . Bhattacharya, J. (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med*, 18(5), 759-765. doi:10.1038/nm.2736
- Jiang, X., Liu, C., Hao, J., Guo, D., Guo, J., Yao, J., . . . Liang, J. (2014). CD4(+)CD25(+) regulatory T cells are not required for mesenchymal stem cell function in fully MHC-mismatched mouse cardiac transplantation. *Cell Tissue Res*, 358(2), 503-514. doi:10.1007/s00441-014-1956-z

- Jiang, X. X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S. X., Wu, Y., Yu, X. D., & Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, *105*(10), 4120-4126. doi:10.1182/blood-2004-02-0586
- Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C., & Rieger, C. (1993). Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods*, *159*(1-2), 197-207. doi:10.1016/0022-1759(93)90158-4
- Kadiyala, S., Young, R. G., Thiede, M. A., & Bruder, S. P. (1997). Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*, *6*(2), 125-134. doi:10.1177/096368979700600206
- Kalinski, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*, *188*(1), 21-28. doi:10.4049/jimmunol.1101029
- Kallifatidis, G., Beckermann, B. M., Groth, A., Schubert, M., Apel, A., Khamidjanov, A., . . . Herr, I. (2008). Improved lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells for therapeutic intervention in pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther*, *15*(4), 231-240. doi:10.1038/sj.cgt.7701097
- Kalra, H., Simpson, R. J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., . . . Mathivanan, S. (2012). Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*, *10*(12), e1001450. doi:10.1371/journal.pbio.1001450
- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. O., . . . Can, A. (2007). Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*, *25*(2), 319-331. doi:10.1634/stemcells.2006-0286
- Kastrinaki, M. C., Sidiropoulos, P., Roche, S., Ringe, J., Lehmann, S., Kritikos, H., . . . Papadaki, H. A. (2008). Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, *67*(6), 741-749. doi:10.1136/ard.2007.076174
- Kohyama, J., Abe, H., Shimazaki, T., Koizumi, A., Nakashima, K., Gojo, S., . . . Umezawa, A. (2001). Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation*, *68*(4-5), 235-244.
- Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V., & Laktionov, P. P. (2018). Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International*, *2018*, 1-27. doi:10.1155/2018/8545347
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., . . . Thery, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(8), E968-977. doi:10.1073/pnas.1521230113
- Lai, R. C., Tan, S. S., Yeo, R. W. Y., Choo, A. B. H., Reiner, A. T., Su, Y., . . . Lim, S. K. (2016). MSC secretes at least 3 EV types each with a unique permutation of membrane lipid, protein and RNA. *Journal of Extracellular Vesicles*, *5*(1), 29828. doi:10.3402/jev.v5.29828
- Lazarus, H. M., Koc, O. N., Devine, S. M., Curtin, P., Maziarz, R. T., Holland, H. K., . . . Bacigalupo, A. (2005). Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant*, *11*(5), 389-398. doi:10.1016/j.bbmt.2005.02.001
- Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., . . . Ringdén, O. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, *371*(9624), 1579-1586. doi:10.1016/s0140-6736(08)60690-x

- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M., & Ringden, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, *363*(9419), 1439-1441. doi:10.1016/s0140-6736(04)16104-7
- Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., & Ringden, O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, *31*(10), 890-896.
- Lepelletier, Y., Lecourt, S., Renand, A., Arnulf, B., Vanneaux, V., Femand, J. P., . . . Larghero, J. (2010). Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells Dev*, *19*(7), 1075-1079. doi:10.1089/scd.2009.0212
- Li, Y.-P., Paczesny, S., Lauret, E., Poirault, S., Bordigoni, P., Mekhloufi, F., . . . Eljaafari, A. (2008). Human Mesenchymal Stem Cells License Adult CD34<sup>+</sup> Hemopoietic Progenitor Cells to Differentiate into Regulatory Dendritic Cells through Activation of the Notch Pathway. *The Journal of Immunology*, *180*(3), 1598-1608. doi:10.4049/jimmunol.180.3.1598
- Liang, J., Zhang, H., Hua, B., Wang, H., Lu, L., Shi, S., . . . Sun, L. (2010). Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann Rheum Dis*, *69*(8), 1423-1429. doi:10.1136/ard.2009.123463
- Lin, P., Lin, Y., Lennon, D. P., Correa, D., Schluchter, M., & Caplan, A. I. (2012). Efficient lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells that preserves proliferation and differentiation capabilities. *Stem Cells Transl Med*, *1*(12), 886-897. doi:10.5966/sctm.2012-0086
- Liu, Q., Zheng, H., Chen, X., Peng, Y., Huang, W., Li, X., . . . Xiang, A. P. (2015). Human mesenchymal stromal cells enhance the immunomodulatory function of CD8(+)/CD28(-) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol*, *12*(6), 708-718. doi:10.1038/cmi.2014.118
- Lobb, R. J., Becker, M., Wen Wen, S., Wong, C. S. F., Wiegman, A. P., Leimgruber, A., & Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, *4*(1), 27031. doi:10.3402/jev.v4.27031
- Luan, X., Sansanaphongpricha, K., Myers, I., Chen, H., Yuan, H., & Sun, D. (2017). Engineering exosomes as refined biological nanoplatfoms for drug delivery. *Acta Pharmacol Sin*, *38*(6), 754-763. doi:10.1038/aps.2017.12
- Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., . . . Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, *3*(1), 26913. doi:10.3402/jev.v3.26913
- Ma, L., Feng, X. Y., Cui, B. L., Law, F., Jiang, X. W., Yang, L. Y., . . . Huang, T. H. (2005). Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chin Med J (Engl)*, *118*(23), 1987-1993.
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., & Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*, *21*(2), 216-225. doi:10.1038/cdd.2013.158
- Mackay, A. M., Beck, S. C., Murphy, J. M., Barry, F. P., Chichester, C. O., & Pittenger, M. F. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*, *4*(4), 415-428. doi:10.1089/ten.1998.4.415

- Madrigal, M., Rao, K. S., & Riordan, N. H. (2014). A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med*, *12*, 260. doi:10.1186/s12967-014-0260-8
- Mahmood, A., Lu, D., Lu, M., & Chopp, M. (2003). Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*, *53*(3), 697-702; discussion 702-693. doi:10.1227/01.neu.0000079333.61863.aa
- Majumdar, M. K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W. B., Moorman, M. A., McIntosh, K. R., & Mosca, J. D. (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*, *10*(2), 228-241. doi:10.1007/bf02256058
- Mangi, A. A., Noiseux, N., Kong, D., He, H., Rezvani, M., Ingwall, J. S., & Dzau, V. J. (2003). Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*, *9*(9), 1195-1201. doi:10.1038/nm912
- Marek, L. A., Hinz, T. K., von Mässenhausen, A., Olszewski, K. A., Kleczko, E. K., Boehm, D., . . . Heasley, L. E. (2014). Nonamplified FGFR1 is a growth driver in malignant pleural mesothelioma. *Mol Cancer Res*, *12*(10), 1460-1469. doi:10.1158/1541-7786.mcr-14-0038
- Martin, I., Muraglia, A., Campanile, G., Cancedda, R., & Quarto, R. (1997). Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology*, *138*(10), 4456-4462. doi:10.1210/endo.138.10.5425
- Martin-Rendon, E., Sweeney, D., Lu, F., Girdlestone, J., Navarrete, C., & Watt, S. M. (2008). 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sang*, *95*(2), 137-148. doi:10.1111/j.1423-0410.2008.01076.x
- Mas-Bargues, C., & Borrás, C. (2021). Importance of stem cell culture conditions for their derived extracellular vesicles therapeutic effect. *Free Radic Biol Med*, *168*, 16-24. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.028
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*, *21*(1), 9-17. doi:10.1038/s41556-018-0250-9
- Mathivanan, S., & Simpson, R. J. (2009). ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*, *9*(21), 4997-5000. doi:10.1002/pmic.200900351
- Matsumoto, R., Omura, T., Yoshiyama, M., Hayashi, T., Inamoto, S., Koh, K. R., . . . Yoshikawa, J. (2005). Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *25*(6), 1168-1173. doi:10.1161/01.ATV.0000165696.25680.ce
- Mauri, C., & Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*, *30*, 221-241. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074934
- McMahon, J. M., Conroy, S., Lyons, M., Greiser, U., O'Shea, C., Strappe, P., . . . O'Brien, T. Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors.
- Mellott, A. J., Godsey, M. E., Shinogle, H. E., Moore, D. S., Forrest, M. L., & Detamore, M. S. Improving viability and transfection efficiency with human umbilical cord wharton's jelly cells through use of a ROCK inhibitor.
- Miranda Rodríguez, A., Galván Cabrera, J. A., & de León Delgado, J. (2015). Propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, *31*, 20-31.

- Mitchell, K. E., Weiss, M. L., Mitchell, B. M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., . . . Medicetty, S. (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*, *21*(1), 50-60. doi:10.1634/stemcells.21-1-50
- Mok, P. L., Cheong, S. K., Leong, C. F., Chua, K. H., & Ainoon, O. (2012). Extended and stable gene expression via nucleofection of MIDGE construct into adult human marrow mesenchymal stromal cells. *Cytotechnology*, *64*(2), 203-216. doi:10.1007/s10616-011-9413-2
- Mongiuió-Tortajada, M., Gálvez-Montón, C., Bayes-Genis, A., Roura, S., & Borràs, F. E. (2019). Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. *Cell Mol Life Sci*, *76*(12), 2369-2382. doi:10.1007/s00018-019-03071-y
- Mueller, S. M., & Glowacki, J. (2001). Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem*, *82*(4), 583-590.
- Najar, M., Raicevic, G., Boufker, H. I., Fayyad Kazan, H., De Bruyn, C., Meuleman, N., . . . Lagneaux, L. (2010). Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol*, *264*(2), 171-179. doi:10.1016/j.cellimm.2010.06.006
- Najar, M., Raicevic, G., Fayyad-Kazan, H., Bron, D., Toungouz, M., & Lagneaux, L. (2016). Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy*, *18*(2), 160-171. doi:10.1016/j.jcyt.2015.10.011
- Nanaev, A. K., Kohnen, G., Milovanov, A. P., Domogatsky, S. P., & Kaufmann, P. (1997). Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta*, *18*(1), 53-64. doi:10.1016/s0143-4004(97)90071-0
- Nasef, A., Chapel, A., Mazurier, C., Bouchet, S., Lopez, M., Mathieu, N., . . . Fouillard, L. (2007). Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr*, *13*(4-5), 217-226.
- Nasef, A., Mazurier, C., Bouchet, S., Francois, S., Chapel, A., Thierry, D., . . . Fouillard, L. (2008). Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol*, *253*(1-2), 16-22. doi:10.1016/j.cellimm.2008.06.002
- Nawaz, M., Fatima, F., Vallabhaneni, K. C., Penfornis, P., Valadi, H., Ekstrom, K., . . . Camussi, G. (2016). Extracellular Vesicles: Evolving Factors in Stem Cell Biology. *Stem Cells Int*, *2016*, 1073140. doi:10.1155/2016/1073140
- Nayak, S., & Herzog, R. W. (2010). Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther*, *17*(3), 295-304. doi:10.1038/gt.2009.148
- Nekanti, U., Rao, V. B., Bahirvani, A. G., Jan, M., Totey, S., & Ta, M. (2010). Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, *19*(1), 117-130. doi:10.1089/scd.2009.0177
- Nolta, J. A., Hanley, M. B., & Kohn, D. B. (1994). Sustained human hematopoiesis in immunodeficient mice by cotransplantation of marrow stroma expressing human interleukin-3: analysis of gene transduction of long-lived progenitors. *Blood*, *83*(10), 3041-3051.
- Nowwarote, N., Sawangmake, C., Pavasant, P., & Osathanon, T.
- Osathanon, T., Nowwarote, N., & Pavasant, P. (2011). Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells

- through a FGFR and PLC $\gamma$  signaling pathway. *J Cell Biochem*, 112(7), 1807-1816. doi:10.1002/jcb.23097
- Park, J., Ries, J., Gelse, K., Kloss, F., von der Mark, K., Wiltfang, J., . . . Schneider, H. (2003). Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes. *Gene Ther*, 10(13), 1089-1098. doi:10.1038/sj.gt.3301960
- Park, J. H., & Hong, J. (2014). Continuous release of bFGF from multilayer nanofilm to maintain undifferentiated human iPS cell cultures. *Integr Biol (Camb)*, 6(12), 1196-1200. doi:10.1039/c4ib00210e
- Park, J. S., Suryaprakash, S., Lao, Y. H., & Leong, K. W. (2015). Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery. *Methods*, 84, 3-16. doi:10.1016/j.ymeth.2015.03.002
- Park, M. J., Kwok, S. K., Lee, S. H., Kim, E. K., Park, S. H., & Cho, M. L. (2015). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce expansion of interleukin-10-producing regulatory B cells and ameliorate autoimmunity in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Cell Transplant*, 24(11), 2367-2377. doi:10.3727/096368914x685645
- Peister, A., Mellad, J. A., Larson, B. L., Hall, B. M., Gibson, L. F., & Prockop, D. J. (2004). Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*, 103(5), 1662-1668. doi:10.1182/blood-2003-09-3070
- Peng, Y., Chen, X., Liu, Q., Zhang, X., Huang, K., Liu, L., . . . Xiang, A. P. (2015). Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5+ regulatory B cells producing interleukin 10. *Leukemia*, 29(3), 636-646. doi:10.1038/leu.2014.225
- Perdikogianni, C., Dimitriou, H., Stiakaki, E., Martimianaki, G., & Kalmanti, M. (2008). Could cord blood be a source of mesenchymal stromal cells for clinical use? *Cytotherapy*, 10(5), 452-459. doi:10.1080/14653240701883079
- Phinney, D. G. (2012). Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *J Cell Biochem*, 113(9), 2806-2812. doi:10.1002/jcb.24166
- Phinney, D. G., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N., & Prockop, D. J. (1999). Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, 75(3), 424-436.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., . . . Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143
- Popp, F. C., Eggenhofer, E., Renner, P., Slowik, P., Lang, S. A., Kaspar, H., . . . Dahlke, M. H. (2008). Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transpl Immunol*, 20(1-2), 55-60. doi:10.1016/j.trim.2008.08.004
- Powers, C. J., McLeskey, S. W., & Wellstein, A. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*, 7(3), 165-197. doi:10.1677/erc.0.0070165
- Prevosto, C., Zancolli, M., Canevali, P., Zocchi, M. R., & Poggi, A. (2007). Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*, 92(7), 881-888. doi:10.3324/haematol.11240
- Prockop, D. J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276(5309), 71-74. doi:10.1126/science.276.5309.71
- Radtke, S., Görgens, A., Liu, B., Horn, P. A., & Giebel, B. (2016). Human mesenchymal and murine stromal cells support human lympho-myeloid progenitor expansion but

- not maintenance of multipotent haematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Cycle*, 15(4), 540-545. doi:10.1080/15384101.2015.1128591
- Ramasamy, R., Tong, C. K., Yip, W. K., Vellasamy, S., Tan, B. C., & Seow, H. F. (2012). Basic fibroblast growth factor modulates cell cycle of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cell Prolif*, 45(2), 132-139. doi:10.1111/j.1365-2184.2012.00808.x
- Reifers, F., Böhli, H., Walsh, E. C., Crossley, P. H., Stainier, D. Y., & Brand, M. (1998). Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development*, 125(13), 2381-2395. doi:10.1242/dev.125.13.2381
- Reinders, M. E., & Hoogduijn, M. J. (2014). NK Cells and MSCs: Possible Implications for MSC Therapy in Renal Transplantation. *J Stem Cell Res Ther*, 4(2), 1000166. doi:10.4172/2157-7633.1000166
- Ribeiro, A., Laranjeira, P., Mendes, S., Velada, I., Leite, C., Andrade, P., . . . Paiva, A. (2013). Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Res Ther*, 4(5), 125. doi:10.1186/scrt336
- Salguero, G., Daenthanasanmak, A., Münz, C., Raykova, A., Guzmán, C. A., Riese, P., . . . Stripecke, R. (2014). Dendritic cell-mediated immune humanization of mice: implications for allogeneic and xenogeneic stem cell transplantation. *J Immunol*, 192(10), 4636-4647. doi:10.4049/jimmunol.1302887
- Scheibe, F., Gladow, N., Mergenthaler, P., Tucker, A. H., Meisel, A., Prockop, D. J., & Priller, J. (2012). Nonviral gene delivery of erythropoietin by mesenchymal stromal cells. *Gene Ther*, 19(5), 550-560. doi:10.1038/gt.2011.139
- Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., . . . Deschaseaux, F. (2008). Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*, 26(1), 212-222. doi:10.1634/stemcells.2007-0554
- Silva-Cote, I., Cruz-Barrera, M., Canas-Arboleda, M., Correa-Araujo, L., Mendez, L., Jagielska, J., . . . Salguero, G. (2019). Strategy for the Generation of Engineered Bone Constructs Based on Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Expanded with Human Platelet Lysate. *Stem Cells Int*, 2019, 7198215. doi:10.1155/2019/7198215
- Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*, 21(4), 575-581. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.007
- Sivanathan, K. N., Gronthos, S., Rojas-Canales, D., Thierry, B., & Coates, P. T. (2014). Interferon-gamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. *Stem Cell Rev*, 10(3), 351-375. doi:10.1007/s12015-014-9495-2
- Solchaga, L. A., Penick, K., Goldberg, V. M., Caplan, A. I., & Welter, J. F. (2010). Fibroblast growth factor-2 enhances proliferation and delays loss of chondrogenic potential in human adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 16(3), 1009-1019. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0100
- Solchaga, L. A., Penick, K., Porter, J. D., Goldberg, V. M., Caplan, A. I., & Welter, J. F. (2005). FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*, 203(2), 398-409. doi:10.1002/jcp.20238

- Solchaga, L. A., Penick, K. J., & Welter, J. F. (2011). Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks. *Methods Mol Biol*, 698, 253-278. doi:10.1007/978-1-60761-999-4\_20
- Soleymaninejadian, E., Pramanik, K., & Samadian, E. (2012). Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors. *Am J Reprod Immunol*, 67(1), 1-8. doi:10.1111/j.1600-0897.2011.01069.x
- Song, Y., Dou, H., Li, X., Zhao, X., Li, Y., Liu, D., . . . Hou, Y. (2017). Exosomal miR-146a Contributes to the Enhanced Therapeutic Efficacy of Interleukin-1 $\beta$ -Primed Mesenchymal Stem Cells Against Sepsis. *Stem Cells*, 35(5), 1208-1221. doi:10.1002/stem.2564
- Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Salagianni, M., Baxevas, C. N., & Papamichail, M. (2006). Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24(2), 462-471. doi:10.1634/stemcells.2004-0331
- Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, 111(3), 1327-1333. doi:10.1182/blood-2007-02-074997
- Spaggiari, G. M., & Moretta, L. (2013). Interactions between mesenchymal stem cells and dendritic cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 130, 199-208. doi:10.1007/10\_2012\_154
- Squillaro, T., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant*, 25(5), 829-848. doi:10.3727/096368915x689622
- Studeny, M., Marini, F. C., Champlin, R. E., Zompetta, C., Fidler, I. J., & Andreeff, M. (2002). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res*, 62(13), 3603-3608.
- Tai, K., Pelled, G., Sheyn, D., Bershteyn, A., Han, L., Kallai, I., . . . Gazit, D. (2008). Nanobiomechanics of repair bone regenerated by genetically modified mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 14(10), 1709-1720. doi:10.1089/ten.tea.2007.0241
- Tang, T. T., Xu, X. L., Dai, K. R., Yu, C. F., Yue, B., & Lou, J. R. (2005). Ectopic bone formation of human bone morphogenetic protein-2 gene transfected goat bone marrow-derived mesenchymal stem cells in nude mice. *Chin J Traumatol*, 8(1), 3-7.
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., . . . Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*, 7(1), 1535750. doi:10.1080/20013078.2018.1535750
- Ti, D., Hao, H., Tong, C., Liu, J., Dong, L., Zheng, J., . . . Han, W. (2015). LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. *Journal of Translational Medicine*, 13(1). doi:10.1186/s12967-015-0642-6
- Tofino-Vian, M., Guillen, M. I., & Alcaraz, M. J. (2018). Extracellular vesicles: A new therapeutic strategy for joint conditions. *Biochem Pharmacol*, 153, 134-146. doi:10.1016/j.bcp.2018.02.004
- Troyer, D. L., & Weiss, M. L. (2008). Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*, 26(3), 591-599. doi:10.1634/stemcells.2007-0439
- Tsutsumi, S., Shimazu, A., Miyazaki, K., Pan, H., Koike, C., Yoshida, E., . . . Kato, Y. (2001). Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during

- proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun*, 288(2), 413-419. doi:10.1006/bbrc.2001.5777
- Vadasz, Z., Haj, T., Kessel, A., & Toubi, E. (2013). B-regulatory cells in autoimmunity and immune mediated inflammation. *FEBS Lett*, 587(13), 2074-2078. doi:10.1016/j.febslet.2013.05.023
- Vallier, L., Alexander, M., & Pedersen, R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, 118(19), 4495-4509. doi:10.1242/jcs.02553
- Wakitani, S., Saito, T., & Caplan, A. I. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 18(12), 1417-1426. doi:10.1002/mus.880181212
- Wang, D., Li, J., Zhang, Y., Zhang, M., Chen, J., Li, X., . . . Sun, L. (2014). Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in active and refractory systemic lupus erythematosus: a multicenter clinical study. *Arthritis Res Ther*, 16(2), R79. doi:10.1186/ar4520
- Wang, D., Zhang, H., Liang, J., Li, X., Feng, X., Wang, H., . . . Sun, L. (2013). Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years of experience. *Cell Transplant*, 22(12), 2267-2277. doi:10.3727/096368911X582769c
- Wang, H., Cao, F., De, A., Cao, Y., Contag, C., Gambhir, S. S., . . . Chen, X. (2009). Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumor-bearing mice by bioluminescence imaging. *Stem Cells*, 27(7), 1548-1558. doi:10.1002/stem.81
- Wang, H. S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., . . . Chen, C. C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 22(7), 1330-1337. doi:10.1634/stemcells.2004-0013
- Wang, J., Liao, L., & Tan, J. (2011). Mesenchymal-stem-cell-based experimental and clinical trials: current status and open questions. *Expert Opin Biol Ther*, 11(7), 893-909. doi:10.1517/14712598.2011.574119
- Wang, L., Cong, X., Liu, G., Zhou, J., Bai, B., Li, Y., . . . Liu, Y. (2013). Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: safety and efficacy. *Stem Cells Dev*, 22(24), 3192-3202. doi:10.1089/scd.2013.0023
- Wang, L., Huang, Y., Pan, K., Jiang, X., & Liu, C. (2010). Osteogenic responses to different concentrations/ratios of BMP-2 and bFGF in bone formation. *Ann Biomed Eng*, 38(1), 77-87. doi:10.1007/s10439-009-9841-8
- Wang, L., Tran, I., Seshareddy, K., Weiss, M. L., & Detamore, M. S. (2009). A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, 15(8), 2259-2266. doi:10.1089/ten.tea.2008.0393
- Wang, Y. M., & Alexander, S. I. (2009). CD8 regulatory T cells: what's old is now new. In *Immunol Cell Biol* (Vol. 87, pp. 192-193). United States.
- Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., & Betancourt, A. M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*, 5(4), e10088. doi:10.1371/journal.pone.0010088
- Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L., & Shi, Y. F. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*, 34(6), 747-754. doi:10.1038/aps.2013.50

- Weiss, M. L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K. B., Weiss, R. J., VanderWerff, I., . . . McIntosh, K. R. (2008). Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells*, 26(11), 2865-2874. doi:10.1634/stemcells.2007-1028
- Weiss, M. L., Medicetty, S., Bledsoe, A. R., Rachakatla, R. S., Choi, M., Merchav, S., . . . Troyer, D. (2006). Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells*, 24(3), 781-792. doi:10.1634/stemcells.2005-0330
- Wen, S., Dooner, M., Cheng, Y., Papa, E., Del Tatto, M., Pereira, M., . . . Quesenberry, P. (2016). Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia*, 30(11), 2221-2231. doi:10.1038/leu.2016.107
- Wiehe, J. M., Kaya, Z., Homann, J. M., Wöhrle, J., Vogt, K., Nguyen, T., . . . Zimmermann, O. (2013). GMP-adapted overexpression of CXCR4 in human mesenchymal stem cells for cardiac repair. *Int J Cardiol*, 167(5), 2073-2081. doi:10.1016/j.ijcard.2012.05.065
- Willis, G. R., Kourembanas, S., & Mitsialis, S. A. (2017). Toward Exosome-Based Therapeutics: Isolation, Heterogeneity, and Fit-for-Purpose Potency. *Front Cardiovasc Med*, 4, 63. doi:10.3389/fcvm.2017.00063
- Witwer, K. W., Van Balkom, B. W. M., Bruno, S., Choo, A., Dominici, M., Gimona, M., . . . Lim, S. K. (2019). Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications. *J Extracell Vesicles*, 8(1), 1609206. doi:10.1080/20013078.2019.1609206
- Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., & Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 61(4), 364-370. doi:10.1002/1097-4547(20000815)61:4<364::aid-jnr2>3.0.co;2-c
- Wu, L. F., Wang, N. N., Liu, Y. S., & Wei, X. (2009). Differentiation of Wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 15(10), 2865-2873. doi:10.1089/ten.TEA.2008.0579
- Xu, C., Rosler, E., Jiang, J., Lebkowski, J. S., Gold, J. D., O'Sullivan, C., . . . Carpenter, M. K. (2005). Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells*, 23(3), 315-323. doi:10.1634/stemcells.2004-0211
- Xu, J., Liao, W., Gu, D., Liang, L., Liu, M., Du, W., . . . Han, Z. (2009). Neural ganglioside GD2 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells in umbilical cord. *Cell Physiol Biochem*, 23(4-6), 415-424. doi:10.1159/000218188
- Yan, H., Wu, M., Yuan, Y., Wang, Z. Z., Jiang, H., & Chen, T. (2014). Priming of Toll-like receptor 4 pathway in mesenchymal stem cells increases expression of B cell activating factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 448(2), 212-217. doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.097
- Yang, J., Zhou, W., Zheng, W., Ma, Y., Lin, L., Tang, T., . . . Hu, J. (2007). Effects of myocardial transplantation of marrow mesenchymal stem cells transfected with vascular endothelial growth factor for the improvement of heart function and angiogenesis after myocardial infarction. *Cardiology*, 107(1), 17-29. doi:10.1159/000093609
- Yang, Y. W., & Hsieh, Y. C. (2001). Protamine sulfate enhances the transduction efficiency of recombinant adeno-associated virus-mediated gene delivery. *Pharm Res*, 18(7), 922-927. doi:10.1023/a:1010923924844

- Yuan, S., Pan, Q., Fu, C. J., & Bi, Z. (2013). Effect of growth factors (BMP-4/7 & bFGF) on proliferation & osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Indian J Med Res*, 138(1), 104-110.
- Zachar, L., Bačenková, D., & Rosocha, J. (2016). Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *J Inflamm Res*, 9, 231-240. doi:10.2147/JIR.S121994
- Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., . . . Uccelli, A. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 106(5), 1755-1761. doi:10.1182/blood-2005-04-1496
- Zhang, H., Kot, A., Lay, Y. E., Fierro, F. A., Chen, H., Lane, N. E., & Yao, W. (2017). Acceleration of Fracture Healing by Overexpression of Basic Fibroblast Growth Factor in the Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Transl Med*, 6(10), 1880-1893. doi:10.1002/sctm.17-0039
- Zhang, H., Liang, J., Tang, X., Wang, D., Feng, X., Wang, F., . . . Sun, L. (2017). Sustained benefit from combined plasmapheresis and allogeneic mesenchymal stem cells transplantation therapy in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*, 19(1), 165. doi:10.1186/s13075-017-1373-2
- Zhang, J. C., Zheng, G. F., Wu, L., Ou Yang, L. Y., & Li, W. X. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cells overexpressing human basic fibroblast growth factor increase vasculogenesis in ischemic rats. *Braz J Med Biol Res*, 47(10), 886-894. doi:10.1590/1414-431x20143765
- Zhang, M., Mal, N., Kiedrowski, M., Chacko, M., Askari, A. T., Popovic, Z. B., . . . Penn, M. S. (2007). SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *Faseb j*, 21(12), 3197-3207. doi:10.1096/fj.06-6558com
- Zhang, Q., Fu, L., Liang, Y., Guo, Z., Wang, L., Ma, C., & Wang, H. (2018). Exosomes originating from MSCs stimulated with TGF- $\beta$  and IFN- $\gamma$  promote Treg differentiation. *J Cell Physiol*, 233(9), 6832-6840. doi:10.1002/jcp.26436
- Zhang, X. S., Linkhart, T. A., Chen, S. T., Peng, H., Wergedal, J. E., Gutierrez, G. G., . . . Baylink, D. J. (2004). Local ex vivo gene therapy with bone marrow stromal cells expressing human BMP4 promotes endosteal bone formation in mice. *J Gene Med*, 6(1), 4-15. doi:10.1002/jgm.477
- Zhao, Z. G., Xu, W., Sun, L., You, Y., Li, F., Li, Q. B., & Zou, P. (2012). Immunomodulatory function of regulatory dendritic cells induced by mesenchymal stem cells. *Immunol Invest*, 41(2), 183-198. doi:10.3109/08820139.2011.607877
- Zhou, C., Yang, B., Tian, Y., Jiao, H., Zheng, W., Wang, J., & Guan, F. (2011). Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes. *Cell Immunol*, 272(1), 33-38. doi:10.1016/j.cellimm.2011.09.010
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., . . . Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13(12), 4279-4295. doi:10.1091/mbc.e02-02-0105