

Carolina Belmar López

Estudio de células troncales
mesenquimales para su empleo
como vectores en terapias
antitumorales: Visualización
mediante técnicas de imagen
molecular

Departamento
Anatomía, Embriología y Genética Animal

Director/es
Martín Duque, María Pilar

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTUDIO DE CÉLULAS TRONCALES
MESENQUIMALES PARA SU EMPLEO COMO
VECTORES EN TERAPIAS ANTITUMORALES:
VISUALIZACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE
IMAGEN MOLECULAR

Autor

Carolina Belmar López

Director/es

Martín Duque, María Pilar

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Anatomía, Embriología y Genética Animal

2013



Universidad
Zaragoza



**Instituto Aragonés de
Ciencias de la Salud**

INSTITUTO ARAGONÉS DE CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, EMBRIOLOGÍA Y GENÉTICA ANIMAL

**ESTUDIO DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES PARA
SU EMPLEO COMO VECTORES EN TERAPIAS ANTITUMORALES.
VISUALIZACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE IMAGEN MOLECULAR**

TESIS DOCTORAL

Carolina Belmar López

Zaragoza, 2012

Directora de Tesis: Dra. M^a Pilar Martín Duque

Esta Tesis Doctoral se ha realizado gracias a las concesiones de las becas otorgadas por la Fundación MMA (2009), por la DGA (2010) y un contrato IACs (2011-2012).

Dentro del desarrollo del periodo investigador, el Programa Aragonés de Medicina Regenerativa concedió dos estancias breves en centros de investigación europeos. La primera se realizó en dos centros de Londres, Reino Unido, en la Unidad de Imagen Preclínica con la Doctora Po-Wah So (Departamento de Neurociencia Clínica, Instituto de Psiquiatría de King's College) y en laboratorio del Doctor Daniel Öberg (Grupo de Oncología Molecular e Imagen en el Instituto del Cancer, Bart's & The London School of Medicine and Dentistry). La segunda estancia se desarrolló en el laboratorio del Profesor Miguel Quintanilla Ávila (Departamento de Biología del Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC, en Madrid, España). Finalmente se realizó una tercera estancia en el laboratorio del Doctor Hugo Cabedo Martí (Grupo del Control Molecular de la mielinización axonal en el Instituto de Neurociencias de Alicante, España). Durante las mismas, se llevaron a cabo parte de los experimentos de la presente memoria.

Para el desarrollo de algunas partes del presente trabajo, también se ha contado con financiación de diversas entidades:

FUNDACIÓN FIDES. Título del Proyecto: “Use of stem cells for adenoviral transport and tumour treatment.” Duración: años 2008-2009. Investigador principal: Dra. Pilar Martín Duque.

ISCHII. Título del Proyecto: “Utilización de péptidos y nanopartículas para la modificación del tropismo adenoviral. Uso en visualización in vivo y terapia génica y celular.” Duración: años 2009-2012. Investigador principal: Dra. Pilar Martín Duque.

FUNDACIÓN MMA. Título del Proyecto: “Abordajes de la virioterapia y terapia celular mediante el uso de adenovirus replicativos y células troncales (MSCs): Visualización in vivo mediante PET y tratamiento de tumores.” Duración: años 2008-2011. Investigador principal: Dra. Pilar Martín Duque.

PROGRAMA ARAGONÉS DE MEDICINA REGENERATIVA (PAMER). Título del Proyecto: “Utilización del simporter de sodio y yodo (hNIS) para la visualización de células troncales mesenquimáticas e inducidas pluripotentes (iPS) en Medicina regenerativa.” Duración: años 2008-2010. Investigador principal: Dra. Pilar Martín Duque.

DGA. Grupo de Terapia génica y celular DGA B84. Duración: años 2009-2012. Investigador principal: Dra. Pilar Martín Duque.

Partes de la presente memoria han sido objeto de las siguientes:

PUBLICACIONES

Carolina Belmar-López, Gracia Mendoza, Daniel Öberg, Jerome Burnet, Carlos Simon, Irene Cervello, Maite Iglesias, Juan Carlos Ramírez, Pilar López-Larrubia, Miguel Quintanilla and Pilar Martin-Duque. "TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS EMPLOYED AS VEHICLES FOR ANTITUMOR THERAPY EXERT DIFFERENT *IN VIVO* EFFECTS ON MIGRATION CAPACITY AND TUMOR GROWTH."

Manuscrito enviado en Agosto 2012 a BMC Medicine (MS:6870823637705046) y en revisión con modificaciones a realizar (1.10.12).

REVISIONES

Latorre-Romero C, Marin-Yaseli MR, **Belmar-Lopez C**, del Moral R, Marijuan PC, Quintanilla M and Martin-Duque P. "USING LIVING CELLS TO TRANSPORT THERAPEUTIC GENES FOR CANCER TREATMENT." Clin Transl Oncol (2011) 13(1):10-7

C. Belmar, P.-W. So, G. Vassaux, V. Moleiro-SanEmeterio and P. Martín-Duque. "NON-INVASIVE GENETIC IMAGING FOR MOLECULAR AND CELL THERAPIES OF CANCER." Clin Transl Oncol (2007) 9:703-714

COMUNICACIONES

Carolina Belmar-Lopez , Gracia Mendoza, Daniel Öberg, Jerome Burnet, Carlos Simón, Irene Cervelló, Maite Iglesias, Juan Carlos Ramirez, Pilar López-Larrubia, Miguel Quintanilla and Pilar Martin-Duque. "DIFFERENCES IN THE MIGRATORY ABILITY OF MESENCHYMAL STEM CELLS AND iPS TOWARDS TUMOURS." PO-025. Sociedad Española de Terapia Génica y Celular (SETGYC 2011). Zaragoza, España, 2011.

Belmar-Lopez C, Vassaux G, Burnet J, Ramirez JC, Quintanilla M, de la Vieja A, Ramón y Cajal S, Hernandez-Losa J and Martin-Duque P. "SIMULTANEOUS TRACKING OF MESENCHYMAL STEM CELLS ON DIFFERENT PATHOLOGIES BY NON-INVASIVE IMAGING TECHNIQUES." PO-024 y O-31. Sociedad Española de Terapia Génica y Celular (SETGYC 2011). Zaragoza, España, 2011.

Belmar-Lopez C, Vassaux G, Burnet J, Ramirez JC, Quintanilla M, de la Vieja A, Ramón y Cajal S, Hernandez-Losa J and Martin-Duque P. "SIMULTANEOUS TRACKING OF MESENCHYMAL STEM CELLS ON DIFFERENT PATHOLOGIES BY NON-INVASIVE IMAGING TECHNIQUES." EMBO-SPETSES SUMMER. Spetses, Grecia, 2010.

Belmar-Lopez C, Baril P, Paya M, Dieguez R, Ramirez JC, Latorre-Romero C, Vassaux G and Martin-Duque P. "NOVEL STRATEGY ON ADENOVIRAL INFECTION OF MESENCHYMAL STEM CELLS FOR IN VITRO AND IN VIVO IMAGING AND CANCER TREATMENT PURPOSES." HUMAN GE THERAPY 20:1048, P1. Sociedad Española de Terapia Génica y Celular (SETGYC 2009). Granada, España, 2009.

Belmar-López C, Barril P, Paya M, Overton J, Latorre-Romero C, Dieguez R, Ramirez JC, Vassaux G and Martín-Duque P. "NEW STRATEGY FOR ADENOVIRUS TROPISM MODIFICATION ON MESENCHYMAL STEM CELLS INFECTION." HUMAN GENE THERAPY 19:1117, P54. Congreso European Society for Gene and Cell Therapy (ESGCT 2008). Brugge, Belgica, 2008.

Belmar-López C, Overton J, Dieguez R, Paya M, Ramirez JC, Moleiro-San Emeteiro V, Vassaux G and Martin-Duque P. "ADENOVIRUS TROPISM MODIFICATION ON MESENCHYMAL STEM CELLS INFECTION FOR *IN VIVO* VISUALIZATION OF PATHOLOGIES AND CANCER TREATMENT." *ASGT American Society of Gene Therapy. BOSTON. USA. 2008.*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera empezar agradeciendo a todas aquellas personas que durante todos estos años me han enseñado a luchar por lo que quiero y no perder las ganas por muy difícil que pareciera.

En primer lugar, a la Dra. Pilar Martín Duque, mi profesora de fisiología, quién me dio la oportunidad de ayudarla en el laboratorio aún cuando no había terminado la carrera y después por confiar en mí para realizar mi tesis doctoral. Gracias por todo ello, por luchar por mi y por valorar tanto mis opiniones tanto a nivel científico como para ayudarte a llevar el laboratorio. Sin duda me llevo mucho de todos estos años. Gracias.

Quisiera agradecer especialmente a la Dra. Maite Iglesias quién también confió en mi para ayudar a los profesores en las practicas de la carrera, donde me encontré con Raquel Francisco, una de las personas con las que más he aprendido y que me enseñó a como hacer bien las cosas en un laboratorio. No me olvido de las doctoras Susana Martín y Ana Bonnin, con quienes tan buenos ratos he pasado en el laboratorio de la UFV y quienes siempre me han hablado con el corazón. Gracias a todas.

Posiblemente, uno de los mejores veranos lo viví en Alicante. Aunque trabajando mucho, el laboratorio 1.16 marcó un antes y un después en lo que hoy soy. Gracias al Dr. Hugo Cabedo Martí por permitirme realizar mis practicas de final de carrera en su laboratorio, por darme la oportunidad de aprender tantas cosas y por dejarme volver cuando he necesitado ayuda. Gracias a Mari por preocuparse tanto por mi, y al que ahora es un grupo de doctores, a Rodolfo, María, Annika y Jose por hacerme tan agradable mis días en el INA, por acogerme entre vosotros y por poder mantener una amistad para siempre. Gracias María por ser siempre como eres, por darme tus opiniones y consejos, por dejarme estar ahí y por invitarme ese fin de semana a Valencia. Gracias a mi maestro. Jose, no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mi, tanto en Alicante como después, cuando he necesitado ayuda y no he parado de llamarte, escribirte y preguntarte. Gracias a tus correcciones y comentarios. Nunca voy a olvidar esas tardes de cotilleo y divagaciones sobre el colesterol y ApoE, nuestros paseos sin rumbo por Alicante y aquella caótica visita al INA. Sabes que eres lo más para mi, que te valoro muchísimo como profesional y que te quiero muchísimo como mi amigo. Gracias Jose.

Quisiera no olvidarme de todas aquellas personas con las que he ido coincidiendo en los diversos laboratorios donde me han tenido que acoger para ayudar a la realización de mi trabajo. Al Dr. Miguel Quintanilla Ávila, a Jesús, a María Marta, a Gael y a Patricia, a Garci, a la Dra. Pilar López Larrubia y a Rocío, al Dr. David Olmeda, al Dr. Juan Carlos Ramírez, a Raúl y a Aida, al Dr. Daniel Öberg y a Jerome. Gracias a todos por hacerlo mucho más fácil.

Durante estos cuatro años, han pasado muchos compañeros por el laboratorio. Especialmente quiero dar las gracias a Camino, pues de algún modo sigue siendo mi compañera con la que empecé. Gracias por tan buenos momentos y por ese apoyo cuando en la distancia lo necesité. Gracias a Raquel, porque que vinieras nos hizo mucho bien, y luego te echamos mucho de menos. Gracias a Rebe por ayudarme tanto. Gracias a todos los compañeros de la UIT, los que se fueron y los que llegaron. Gracias a las nuevas compañeras, Rebeca, Mari Mar, Yulan y Julie. Especialmente quiero agradecer a Erika por escucharme siempre que lo he necesitado. Al futuro doctor Javier Gervas, porque a pesar de tus continuas historias de fin de semana y temas poco apropiados durante el trabajo, has sido un gran compañero con el que he podido contar y que se que cuando terminemos te voy a echar mucho de menos. Gracia, eres otras de las personas con las que siento que cualquier cosa que escriba no es suficiente. Te doy las gracias por ser mi compañera y mi amiga estos años. Eres una excelente profesional, muy buena persona y amiga y contigo he aprendido muchísimo. Te voy a echar un montón de menos, hablar, salir de tiendas y esas noches de copazos. Gracias.

En un apartado especial, te agradezco a ti Fer, por haber continuado durante estos años siendo el mismo que conocí ese primer día de clase, y aún con mis tantos defectos y tus numerosas burlas, se que me quieres mucho. Y muchas gracias por el Mendeley!

A mi maravillosa compañera de piso Angela, que aunque por poco tiempo, espero que estos meses hayan creado una bonita y larga amistad.

Por último, mi familia, a mi hermano, mis abuelos y a KPKA. A mis padres, quienes lo han dado todo para que yo cumpliera mis sueños y a los que siempre estaré agradecida por sus esfuerzos y su amor por mi. Os quiero mucho.

A Daniel, porque no hay muchas palabras que describan lo que siento por ti. Solo puedo decirte, que esto no hubiese sido lo mismo sin ti y que gracias a ti hoy te escribo esto aquí. De aquí a Chaclacayo cosa!

Especial agradecimiento al Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud y a los Servicios Científico Técnico IIS Aragón utilizados en el transcurso de esta tesis doctoral, entre ellos a la Unidad de Separación Celular y Citometría (Javier Godino Gomez), a la Unidad de Microscopía e Imagen (María Royo Cañas), a la Unidad de Anatomía Patológica (Alba de Martino Rodríguez), a la Unidad de Valoración Funcional (Eduardo Romanos Alfonso) y a la Unidad de Cultivos Celulares (David García Domingo).

ABREVIATURAS

A549	Células procedentes de carcinoma de pulmón humano
Ad	Adenovirus
AdCre	Adenovirus codificante para la Recombinasa Cre
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
AdfLuc	Adenovirus codificante para el enzima Luciferasa de Luciérnaga
AdGFP	Adenovirus codificante para la Proteína Verde Fluorescente
AdhNIS	Adenovirus codificante para el Simporter de yodo y sodio
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
ARNpi	Ácido Ribonucleico Pequeño de Interferencia
BMhMSCs	Células humanas troncales mesenquimales derivadas de medula ósea
CAR	Receptor de Adenovirus y Coxsackievirus
CRAd	Adenovirus Replicativo Condicionado
CCL2/ MCP-1	Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1
CCL5/RANTES	Factor de Regulacion tras la Activación Normal de los Linfocitos T
Cre	Recombinasa Cre
CXCL12/SDF-1	Factor 1 Derivado de Células Estromales
CXCR4	Receptor de Quimioquina CXC tipo 4
ECM	Matriz Extracelular
EpSC	Células Troncales Epidérmicas
ESs	Células Troncales Embrionarias
FBS	Suero Fetal Bovino
fLuc	Luciferasa de Luciérnaga
GAPDH	Gliceraldehido 3 Fostato Deshidrogenasa

hAMCs	Células humanas Troncales Mesenquimales derivadas de Placenta
hASCs	Células humanas Troncales Mesenquimales de Aspirados Grasos
hEESCs	Células humanas Troncales Mesenquimales derivadas de Epitelio de Endometrio
hiPSCs	Células humanas Troncales Inducidas Pluripotentes
HEK293	Células procedentes de tejido renal fetal humano transformado con parte del genoma de adenovirus tipo 5
HeLa	Células procedentes de adenocarcinoma de cérvix humano
hEESCs	Células humanas Troncales Mesenquimales derivadas de Estroma de Endometrio
hMSCs	Células humanas Troncales Mesenquimales
hNIS	Simporter de yodo y sodio humano
HSC	Células Troncales Hematopoyéticas
I¹²⁵	Yodo radioactivo 125
I¹³¹	Yodo radioactivo 131
iPSCs	Células Troncales Inducidas Pluripotentes
KLF4	Factor 4 similar a Krüppel
LacZ	Gen del operón lac que codifica para la β -galactosidasa
LV-GFP	Vector Lentiviral codificante para la Proteína Verde Fluorescente
mBMSCs	Células Troncales Mesenquimales Murinas de Médula Ósea
MMP2	Metaloproteinasa de Matriz 2
MOIs	Multiplicidad de Infección
MRI	Imagen por Resonancia Magnética
MSCs	Células Troncales Mesenquimales
NANOG	Factor <i>Homebox</i>
nanoSPECT/CT	Tomografía Computerizada por Emisión de Fotones Individuales
NIS	Simporter de yodo y sodio

NSC	Célula Troncal Neural
OCT4/POU5F1	Factor de transcripción de estructura Octamérica tipo 4
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEI	Derivado de Poletilenimina
PEI-RGD	Derivado de Poletilenimina conjugado con el péptido RGD
pFUs	Unidades Formadoras de Placa
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa a Tiempo Real
PGC	Células Germinales Primordiales
REX1	Proteína Dedo de Zinc 42
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Retrotranscripción Inversa
RGD	Péptido RGD (Arg-Gly-Asp)
Sca-1	Antígeno 1 de Célula Troncal
SI	Intensidad de la Señal
SOX2	Factor de Transcripción <i>Sry-related HMG box</i>
SPIO	Nanopartículas Superparamagnéticas de Oxido de Hierro
TAFs	Fibroblastos Asociados a Tumores
TAMs	Macrófagos Asociados a Tumores
Tc^{99m}	Radioisótopo Tecnecio 99 metaestable
TE671-LoxP/LacZ	Células procedentes de rhabdomiosarcoma humano transformadas con un sistema lentiviral para integrar el cassette LoxP/LacZ (ABP-RP-CLacloxE)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Cáncer.....	5
1.2.1. Terapia génica como opción de tratamiento contra el cáncer.....	7
1.2.1.1. Adenovirus.....	8
1.2.1.2. Adenovirus replicativos condicionados o CRAds.....	13
1.2.2. Combinación de terapia génica y terapia celular como opción de tratamiento contra el cáncer.....	16
1.3. Células troncales.....	17
1.3.1. Células troncales mesenquimales.....	19
1.3.1.1. Caracterización de las MSCs.....	20
1.3.1.2. Capacidad de migración de las MSCs.....	21
1.3.1.3. Efectos antitumorogénicos en el estroma tumoral.....	26
1.3.1.4. Efectos protumorogénicos en el estroma tumoral.....	27
1.3.1.5. Establecimiento de las MSCs en el microambiente tumoral.....	31
1.3.2. Células inducidas pluripotentes.....	32
1.4. Técnicas para el seguimiento de las MSCs.....	34
1.4.1. NIS como herramienta terapéutica y de visualización.....	35
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. Métodos de biología celular	45
3.1.1. Cultivos celulares.....	45
3.1.1.1. Mantenimiento de células en cultivo.....	45
3.1.1.2. Congelación y descongelación celular.....	45
3.1.1.3. Pase celular.....	45
3.1.1.4. Líneas celulares.....	46
3.1.1.4.1. Células HeLa.....	46
3.1.1.4.2. Células HEK293.....	46
3.1.1.4.3. Células A549.....	46
3.1.1.4.4. Células TE671-LoxP/LacZ.....	46
3.1.1.5. Células troncales mesenquimales murinas de médula ósea (mBMSCs).....	47

3.1.1.6. Células troncales mesenquimales humanas.....	47
3.1.1.6.1. BMhMSCs.....	47
3.1.1.6.2. hASCs.....	48
3.1.1.6.3. hE SSCs.....	48
3.1.1.6.4. hE ESCs.....	48
3.1.1.6.5. hAMCs.....	48
3.1.1.7. hiPSCS.....	49
3.1.2. Citometría de flujo.....	51
3.1.2.1. Análisis del perfil de integrinas y CAR.....	51
3.1.2.2. Análisis de la expresión de GFP.....	51
3.1.2.3. Caracterización de la expresión de marcadores de superficie de las MSCs.....	51
3.1.3. Diferenciación <i>in vitro</i>	52
3.1.3.1. Diferenciación adipogénica.....	52
3.1.3.2. Diferenciación osteogénica.....	53
3.1.4. Ensayos para determinar la viabilidad, toxicidad y proliferación celular.....	54
3.1.4.1. Ensayo mediante exclusión con azul tripán.....	54
3.1.4.2. Ensayo mediante alamarBlue®.....	54
3.1.5. Ensayo de migración celular.....	55
3.1.6. Vectores adenovirales.....	55
3.1.6.1. Infección adenoviral.....	55
3.1.6.2. Adenovirus.....	56
3.1.6.2.1. Adenovirus GFP.....	56
3.1.6.2.2. Adenovirus fLuc.....	56
3.1.6.2.3. Adenovirus Cre.....	57
3.1.6.2.4. Adenovirus hNIS.....	57
3.1.6.3. Amplificación y purificación de las partículas virales.....	59
3.1.6.3.1. Purificación empleando <i>Adeno-X Purification Kit</i>	59
3.1.6.3.2. Purificación mediante gradiente de cloruro de cesio.....	60
3.1.6.4. Determinación de las partículas adenovirales.....	61

3.1.6.5. Determinación del título adenoviral.....	61
3.1.6.5.1. Determinación del título adenoviral mediante TCID ₅₀	61
3.1.6.5.2. Determinación del título adenoviral mediante	
<i>Adeno-X Rapid Titer Kit</i>	62
3.1.6.6. Ensayo de infectividad.....	62
3.1.6.7. Ensayo captación de ¹²⁵ I.....	63
3.1.6.8. Determinación de la expresión de bioluminiscencia <i>in vitro</i>	63
3.1.7. Transferencia adenoviral.....	63
3.1.7.1. Transferencia adenoviral usando derivados de polietilenimina.....	63
3.1.7.2. Transferencia adenoviral usando Effectene.....	64
3.1.8. Transducción con vector lentiviral LV-GFP.....	65
3.1.9. Marcaje con nanopartículas superparamagnéticas de óxido	
de hierro (SPIO).....	65
3.2. Métodos biología molecular	66
3.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas.....	66
3.2.2. Análisis de muestras por <i>western-blot</i>	66
3.2.3. Extracción de ácidos nucleicos.....	69
3.2.3.1. Extracción de ADN genómico.....	69
3.2.3.2. Extracción de ARN total.....	69
3.2.4. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	69
3.2.5. Electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa	70
3.2.6. Retrotranscripción a partir de ARN total.....	70
3.2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	71
3.2.8. PCR Cuantitativa (qPCR).....	72
3.2.8.1. qPCR mediante el uso de sondas TaqMan.....	72
3.2.8.2. qPCR mediante el uso de SYBRGreen.....	74
3.3. Métodos <i>in vivo</i>	76
3.3.1. Inducción de Patologías.....	76
3.3.1.1. Diabetes tipo 1.....	76
3.3.1.2. Herida.....	77
3.3.1.3. Tumor.....	77

3.3.2. Técnicas de imagen molecular no invasiva.....	78
3.3.2.1. Anestesia.....	78
3.3.2.2. nanoSPECT/CT.....	78
3.3.2.3. MRI.....	80
3.3.2.4. BLI.....	81
3.3.3. Administración del radioisótopo I ¹³¹	82
3.4. Histología	82
3.4.1. Recogida y tratamiento de muestras.....	82
3.4.1.1. Tinción Hematoxilina-Eosina.....	82
3.4.1.2. Tinción Azul de Prusia.....	83
3.4.1.3. Tinción β-Galactosidasa.....	83
3.4.2. Análisis histológico de la tinción Azul de Prusia.....	84
3.4.3. Visualización de muestras.....	84
3.4.3.1. Microscopía en campo claro y fluorescencia.....	84
3.4.3.2. Microscopía confocal.....	85
3.5. Análisis estadístico	85
4. RESULTADOS	87
4.1. Estudio sobre la capacidad de migración de las mBMSCs hacia sitios de daño o inflamatorios utilizando diferentes patologías	89
4.1.1 Aislamiento y caracterización de las mBMSCs según criterios mínimos.....	89
4.1.2. Caracterización de la permisividad celular de las mBMSCs a la infección por vectores adenovirales.....	91
4.1.3. Infección con vectores adenovirales en mBMSCs.....	93
4.1.4. Tropicismo de las mBMSCs hacia diferentes patologías <i>in vivo</i>	96
4.1.4.1. Modelo tumoral.....	96
4.1.4.2. Modelo de diabetes.....	99
4.1.4.3. Modelo de herida.....	102
4.1.5. Efecto terapéutico <i>in vivo</i> tras la administración del radioisótopo I ¹³¹ en un modelo de tumor.....	104

4.2. Diferencias en la capacidad de migración de hMSCs derivadas de distintos tejidos mediante visualización con técnicas de imagen molecular no invasivas	107
4.2.1 Caracterización de hMSCs aisladas de diferentes tejidos.....	107
4.2.1.1. Definición de hMSCs según criterios mínimos.....	107
4.2.1.2. Efecto de la concentración de oxígeno en la viabilidad y proliferación celular.....	112
4.2.1.3. Capacidad de migración <i>in vitro</i>	114
4.2.2. Caracterización de la permisividad celular de las hMSCs a la infección por vectores adenovirales.....	118
4.2.2.1. Análisis de la expresión del receptor CAR en hMSCs.....	118
4.2.2.2. Infección con vectores adenovirales en hMSCs.....	118
4.2.3. Tropismo de las hMSCs <i>in vivo</i> en un modelo de tumor.....	120
4.2.3.1. Imagen por MRI.....	120
4.2.3.2. Imagen por nanoSPECT/CT.....	126
4.2.4. Análisis del patrón de pluripotencia en las hMSCs.....	131
4.3. Efecto generado por las hMSCs en el tumor una vez administradas de forma sistémica	133
4.3.1. Colaboración al microambiente tumoral.....	133
4.3.2. Efecto en los genes relacionados con migración.....	135
4.3.3. Establecimiento de las hMSCs en el microambiente tumoral.....	137
4.3.4. Diferenciación en los tumores tras el establecimiento de las MSCs.....	141
4.4. Aumento de la transferencia génica mediante infección con vectores adenovirales en células CAR negativas	142
4.4.1. Mejora de la transferencia génica empleando vectores adenovirales.....	143
4.4.2. Efecto de la transferencia adenoviral mediante los complejos Ad/PEI-RGD sobre el fenotipo de las mBMSCs.....	145
4.4.3. Efecto terapéutico <i>in vivo</i> tras la administración del radioisótopo I ¹³¹ mediante el uso de los complejos Ad10/PEI-RGD en un modelo de tumor.....	146

5. DISCUSIÓN	149
5.1. Características de las MSCs.....	151
5.2. Habilidad para migrar a sitios de daño o inflamatorios.....	154
5.3. Diferencias entre hMSCs aisladas de diversos tejidos para migrar e injertarse en un modelo de tumor.....	157
5.4. Efectos protumorigénicos de las MSCs.....	159
5.5. MSCs en el microambiente del tumor.....	160
5.6. Cambios en el patrón de expresión de diferentes genes relacionados con la migración.....	162
5.7. Efecto terapéutico antitumoral.....	164
5.8. Mejora de la infección adenoviral.....	165
6. CONCLUSIONES	167
7. BIBLIOGRAFÍA	171

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Números estimados de nuevos casos y muertes del año 2008 en la población mundial.....	4
Figura 2. Estructura tumoral.....	6
Figura 3. Estructura del virión de adenovirus.....	10
Figura 4. Ciclo infectivo de adenovirus.....	13
Figura 5. Modelo de actuación de adenovirus replicativos condicionados o CRAds.....	15
Figura 6. Desarrollo de las diferentes células troncales en el organismo.....	18
Figura 7. Marcadores típicos para caracterizar MSCs.....	21
Figura 8. Circuito de migración de las MSCs en el organismo.....	22
Figura 9. Migración de leucocitos.....	24
Figura 10. Estructura secundaria de hNIS.....	36
Figura 11. Esquema general del sistema <i>AdEasy</i> mediante el cual se generó el AdhNIS.....	58
Figura 12. Caracterización de las mBMSCs aisladas de la médula ósea de los fémures y tibias de ratones hembra Balb/c de seis semanas de edad siguiendo las mismas indicaciones sobre los criterios mínimos que definen actualmente a las hMSCs.....	90
Figura 13. Análisis por <i>western-blot</i> y citometría de flujo de los niveles de receptor CAR en las mBMSCs.....	92
Figura 14. Análisis por citometría de flujo de los niveles de expresión de las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ en las mBMSCs.....	93
Figura 15. Ensayos de infectividad <i>in vitro</i> de las mBMSCs con un AdfLuc a diferentes multiplicidades de infección o MOIs.....	94
Figura 16. Capacidad de acumulo de I^{125} por las mBMSCs infectadas con AdhNIS.....	95
Figura 17. Detección de GFP en tumores de animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-GFP.....	97
Figura 18. Visualización de la expresión de hNIS en los tumores de animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-hNIS mediante nanoSPECT.....	98
Figura 19. Curva de glucemia de los animales que recibieron una inyección intraperitoneal de estreptozocina.....	99
Figura 20. Detección de GFP en los páncreas de animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-GFP.....	100

Figura 21. Visualización mediante el sistema IVIS Lumina de la expresión de fLuc en los páncreas de animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-fLuc.....	101
Figura 22. Detección de GFP en la zona de piel donde se realizó la herida de los animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-GFP.....	102
Figura 23. Visualización mediante nanoSPECT de la expresión de hNIS en la zona de piel donde se realizó la herida de animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-hNIS.....	103
Figura 24. Efecto en el tamaño de los tumores de animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-hNIS y tratamiento con I ¹³¹	105
Figura 25. Caracterización de las diferentes líneas de hMSCs siguiendo las indicaciones sobre los criterios mínimos.....	108
Figura 26. Análisis del efecto de la concentración de oxígeno en la viabilidad y proliferación de las diferentes líneas de hMSCs.....	113
Figura 27. Capacidad de las hMSCs de colonizar un espacio generado en la monocapa celular.....	115
Figura 28. Análisis de la expresión de CAR por <i>western-blot</i> en cada una de las líneas de hMSCs y en hiPSCs.....	118
Figura 29. Visualización mediante microscopía de fluorescencia de las hMSCs infectadas con un AdGFP a diferentes multiplicidades de infección o MOIs.....	119
Figura 30. Secuencia temporal seguida durante los experimentos <i>in vivo</i> de nanoSPECT/CT y MRI.....	120
Figura 31. Análisis de la viabilidad y proliferación <i>in vitro</i> de cada una de las líneas de hMSCs marcadas durante un período de 10 días con las nanopartículas SPIO.....	121
Figura 32. Capacidad de retención de las nanopartículas SPIO en cada una de las líneas de hMSCs durante un período de 10 días.....	122
Figura 33. Visualización mediante MRI de los tumores de los animales control.....	123
Figura 34. Visualización mediante MRI de la presencia de nanopartículas SPIO en los tumores de los animales que recibieron una inyección intravenosa de cada una de las líneas de hMSCs-SPIO.....	124

Figura 35. Detección de las SPIO en cortes de tumores de los animales que recibieron una inyección intravenosa de hMSCs-SPIO mediante tinción con Azul de Prusia.....	125
Figura 36. Contaje del número de células positivas para la detección de SPIO en las tinciones de Azul de Prusia.....	126
Figura 37. Visualización mediante nanoSPECT/CT de los tumores en los animales control.....	128
Figura 38. Visualización mediante nanoSPECT/CT de la expresión de hNIS en los tumores de animales que recibieron una inyección intravenosa de cada una de las líneas de hMSCs-hNIS.....	129
Figura 39. Tasa de consumo entre tumor/músculo de Tc ^{99m} mediante nanoSPECT/CT.....	130
Figura 40. Detección de la expresión de hNIS mediante (RT)-PCR en los tumores de los animales que recibieron una inyección intravenosa de hMSCs-hNIS.....	131
Figura 41. Análisis de la expresión en cada una de las líneas de hMSCs de diferentes genes relacionados con pluripotencia por qPCR.....	132
Figura 42. Crecimiento de los tumores tras la administración de las hMSCs.....	134
Figura 43. Análisis de la expresión de diferentes genes relacionados con migración por qPCR.....	136
Figura 44. Detección de la expresión de LacZ <i>in vitro</i> en células TE671-LoxP/LacZ tras realizar una infección con un AdCre.....	137
Figura 45. Secuencia temporal seguida durante el experimento <i>in vivo</i> de los tumores TE671-LoxP/LacZ.....	138
Figura 46. Detección de la expresión de LacZ mediante tinción de β-galactosidasa <i>in toto</i> en los tumores TE671-LoxP/LacZ de los animales que recibieron una inyección intravenosa de BMhMSCs-Cre.....	139
Figura 47. Detección de la expresión de Cre mediante (RT)-PCR en los tumores de los animales que recibieron una inyección intravenosa de BMhMSCs-Cre.....	140
Figura 48. Detección de zonas óseas en tumores HeLa de animales que recibieron una inyección intravenosa de hAMCs, hEESCs y hiPSCs.....	141
Figura 49. Transferencia génica mediante transferencia adenoviral usando un derivado de polietilimina conjugado con el péptido RGD (PEI-RGD).....	142

Figura 50. Análisis de los niveles de expresión de GFP en las mBMSCs empleando diferentes estrategias de transferencia adenoviral.....	144
Figura 51. Efecto en el tamaño de los tumores de animales que recibieron una inyección intratumoral de mBMSCs transfectadas con AdhNIS mediante diferentes estrategias y tratamiento con I ¹³¹	147

Tabla 1. Estudios que indican diferentes efectos de las MSCs.....	30
Tabla 2. Condiciones de cultivo <i>in vitro</i> para el mantenimiento de las MSCs.....	50
Tabla 3. Anticuerpos empleados para la caracterización de MSCs.....	52
Tabla 4. Anticuerpos empleados en los análisis por <i>western-blot</i> y sus condiciones.....	67
Tabla 5. Cebadores específicos empleados en las reacciones de PCR.....	71
Tabla 6. Parámetros de los programas utilizados para las reacciones de PCR.....	72
Tabla 7. Sondas TaqMan empleadas en las reacciones de qPCR.....	73
Tabla 8. Parámetros del programa utilizado para las reacciones de qPCR con sondas TaqMan.....	73
Tabla 9. Cebadores empleados en las reacciones de qPCR.....	75
Tabla 10. Parámetros del programa utilizado para las reacciones de qPCR mediante SYBR Green.....	75
Tabla 11. Análisis de la expresión de los marcadores de superficie mediante citometría de flujo después de la transfección con el complejo AdGFP/PEI-RGD en mBMSCs.....	146

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

A nivel mundial, el cáncer permanece como la principal causa de mortalidad y morbilidad en nuestros días. Se estima que en 2008 se diagnosticaron unos 12,7 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo y se produjeron 7,6 millones de muertes, ocurriendo un 56% de ellas en países desarrollados y el restante 64% en países en vías de desarrollo (figura 1). En USA, es responsable de una de cada cuatro muertes, siendo sólo superado por las enfermedades cardiovasculares. En niños menores de 14 años, es la segunda causa de muerte tras los accidentes. El cáncer de mama en mujeres y el cáncer de pulmón en hombres, son los tipos más frecuentemente diagnosticados, y por tanto causa de muerte, en todo el mundo, seguidos por el cáncer de estómago e hígado en hombres y el de cérvix y pulmón en mujeres en países en vías de desarrollo o por el cáncer colorrectal y de pulmón en mujeres o de próstata en hombres en países desarrollados (Jemal, Bray, & Ferlay, 2011).

Cada año, los casos de cáncer se incrementan en los países desarrollados como resultado en el aumento de la esperanza de vida y en la adopción de estilos de vida poco saludables como el tabaco, la inactividad física, o malos hábitos alimenticios. Según la *Sociedad Americana de Cáncer*, alrededor de 1.638.910 casos nuevos de cáncer serán diagnosticados en USA en 2012, de los cuales, unas 577.190 personas morirán, lo que supone una cifra de 1.500 personas por día (Siegel, Naishadham, & Jemal, 2012). En Europa, según lo indicado por la *Organización Mundial de la Salud*, se estima una cifra aproximada de 3,2 millones de casos nuevos diagnosticados y una cifra de 1.283.101 muertes para este año (Malvezzi, Bertuccio, Levi, La Vecchia, & Negri, 2012).

A pesar de los avances, muchos tipos de tumores siguen sin posibilidad de un tratamiento eficaz. La estrategia seguida consiste principalmente en cirugía, radioterapia y quimioterapia, y a pesar de los avances muchos tumores no responden a la terapia convencional, o tras responder, a menudo emergen clones de células resistentes a las modalidades de tratamiento disponibles. Los esfuerzos actuales para generar una terapia contra el cáncer consisten en desarrollar estrategias dirigidas a las células tumorales y a cualquier otro elemento del estroma tumoral, en el que se combinen el uso de genes específicos antitumorales y el empleo de vehículos o vectores que se dirijan e incorporen directamente en el tumor (Dai et al., 2011).

De este modo, el diseño de nuevas estrategias mediante terapia génica ha generado un gran interés debido a la multitud de posibilidades. Estrategias como

inmunomodulación, terapia suicida mediante el empleo de prodrogas, terapias de reemplazamiento génico de supresores de tumores o de un antioncogen, oncolisis de las células tumorales o terapia génica antiangiogénica, mediante el empleo de vectores virales, se abordan para mejorar los tratamientos actuales (Raki, Rajecski, Kirn, & Hemminki, 2009). Sin embargo, los niveles en las respuestas antitumorales tras diferentes vías de administración continúan siendo limitadas (Raki et al., 2009). La necesidad de repetidas administraciones, puede resultar en una selección y expansión de células refractarias al agente o adicionalmente, la presencia de anticuerpos neutralizantes puede disminuir la dosis del vector viral terapéutico administrado (Zhang et al., 2002).

En los últimos años las células troncales mesenquimales (MSCs), han generado un gran interés biomédico, desde que se descubrió su capacidad para migrar de forma específica a zonas tumorales, (Pereboeva, Komarova, Mikheeva, Krasnykh, & Curiel, 2003; Studeny et al., 2004), constituyéndose así como una herramienta ideal para su utilización como vehículos de genes y fármacos antitumorales en una terapia génica y celular combinada (Dwyer & Kerin, 2010).

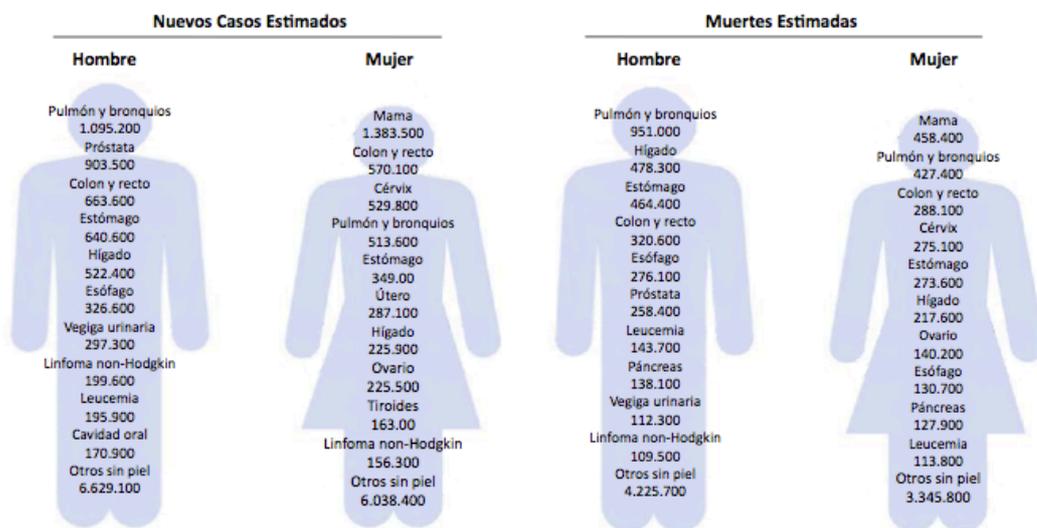


Figura 1: Números estimados de nuevos casos y muertes del año 2008 en la población mundial. Números de nuevos casos generados y muertes estimadas en todo el mundo ocurridas en el año 2008, separados en diferentes tipos de cáncer y por sexo. Fuente GLOBOCAN. (Figura adaptada de Jemal, Bray, Center, et al., 2011).

1.2. Cáncer

El cáncer resulta de la transformación inicial de una única célula normal a maligna o tumoral. Esa transformación consiste en la adquisición progresiva de una serie de cambios genéticos específicos, que afectan a distintos mecanismos como la regulación de la transducción de señales, diferenciación celular, apoptosis, reparación del ADN, progresión del ciclo celular, angiogénesis o adhesión celular, produciendo algún daño en los protooncogenes y genes supresores de tumores, y en su interacción, ya que son los encargados de regular el ciclo celular y la muerte celular programada o apoptosis, respectivamente. Además de la pérdida del control en el ciclo celular, estas células adquieren la capacidad de infiltrarse o invadir tejidos normales a través de los vasos sanguíneos, generando metástasis (Weinberg, 2007).

En el tumor, las células malignas o tumorales no se encuentran solas, sino que conviven en un complejo microambiente denominado estroma tumoral. En él, se producen de manera constante una gran cantidad de citoquinas, quimioquinas y otros mediadores inflamatorios que sirven de señales para el reclutamiento de distintos tipos celulares y de los componentes necesarios para la supervivencia del mismo, incluyendo soporte estructural, vascularización y matrices extracelulares. De este modo, los tumores han sido caracterizados como “heridas que nunca se cierran” (Albini & Sporn, 2007).

En el caso de los tumores sólidos, el estroma tumoral está compuesto por diferentes tipos celulares entre los que destacan células endoteliales, fibroblastos asociados al tumor (o TAFs), células mesoteliales, pericitos, adipocitos, células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo y de médula ósea (MSCs), células inflamatorias y del sistema inmunológico como linfocitos T, macrófagos asociados a tumores (o TAMs) e infiltrados de células mononucleares, matriz extracelular (o ECM), vasos sanguíneos y tejido conectivo. Todos estos componentes del estroma tumoral pueden ser reclutados de forma local, desde tejidos cercanos, o desde tejidos distales a través de la circulación sanguínea (Kidd et al., 2012). De esta manera, la estructura general de los tumores puede dividirse en dos compartimentos dinámicamente relacionados. El parénquima, representa al compartimento neoplásico donde se encuentran las células tumorales, y el estroma, es el tejido de células no tumorales, cuya función es la de dar soporte a las células tumorales y que se encuentra separando las células tumorales del resto de células sanas.

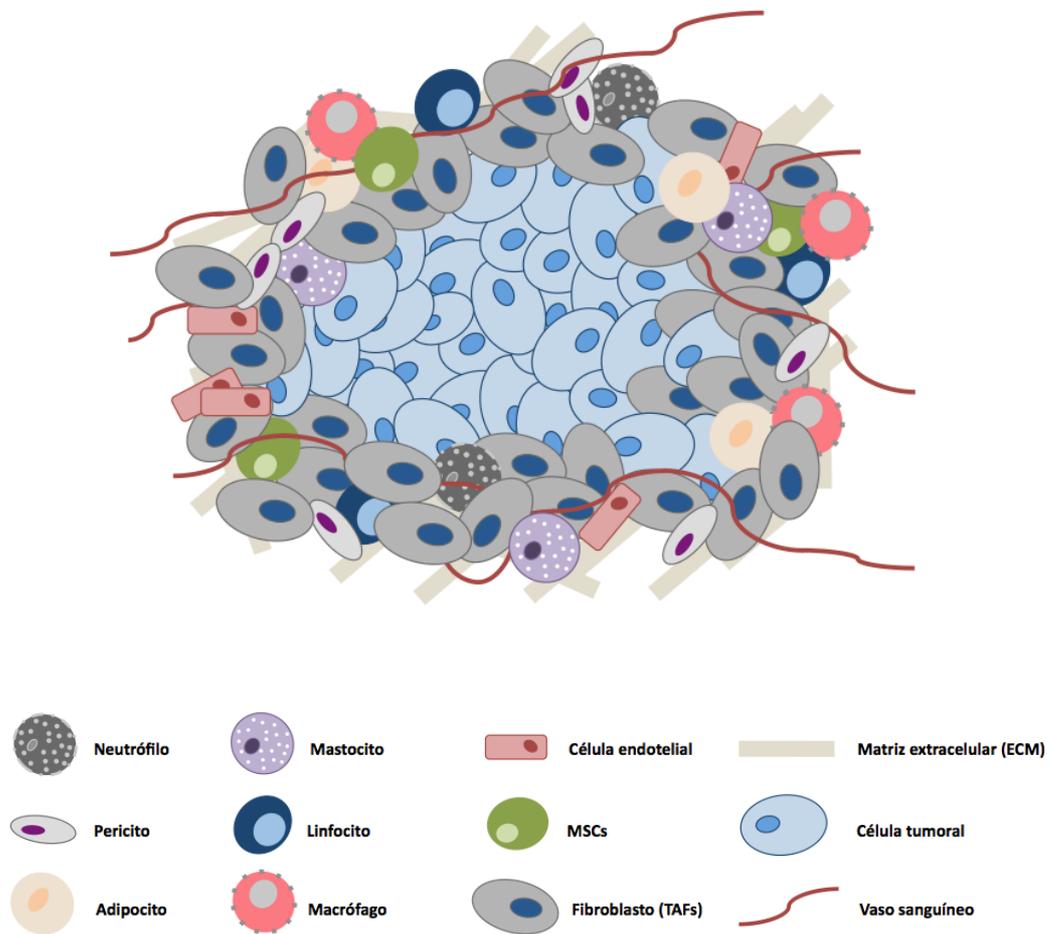


Figura 2. Estructura tumoral. La estructura general de los tumores puede dividirse en dos compartimentos dinámicamente relacionados. El parénquima, que representa al compartimento neoplásico o donde se encuentran las células tumorales, y el estroma, el tejido de células no tumorales cuya función es la de dar soporte a las células tumorales y que se encuentra separando las células tumorales del resto de células sanas. Entre los componentes del estroma encontramos células endoteliales, fibroblastos asociados a tumores (TAFs), células mesoteliales, pericitos, adipocitos, células inflamatorias y del sistema inmunológico como linfocitos T, macrófagos asociados a tumores (TAMs) e infiltrados de células mononucleares, matriz extracelular o ECM, vasos sanguíneos, MSCs y tejido conectivo.

El estroma tumoral confiere además protección para los agentes citostáticos de la quimioterapia a las células tumorales mediante interacciones entre las células y la matriz del estroma, mediante la liberación de factores solubles, como la interleuquina-6 (IL-6), que promueven la supervivencia y el crecimiento tumoral, mediante la generación de nichos específicos donde las células tumorales presentan ventajas para sobrevivir tras una exposición inicial a fármacos o mediante la conversión de las células tumorales a células iniciadoras de tumores (Castells, Thibault, Delord, & Couderc, 2012).

1.2.1. Terapia génica como opción de tratamiento contra el cáncer

La estrategia clásica seguida en el tratamiento del cáncer, incluye cirugía, radioterapia y quimioterapia, que además comprende otras más recientes como la terapia hormonal (para combatir la acción de las hormonas que provocan el crecimiento celular), la inmunoterapia (donde se emplean estimuladores de la respuesta inmune) o la terapia dirigida a moléculas específicas implicadas en el crecimiento celular. Sin embargo, a pesar de los avances en los tratamientos, muchos tumores no responden a la terapia convencional o tras responder, a menudo emergen rápidamente clones de células que llegan a ser refractarios a las modalidades de tratamiento disponibles. Tanto la radioterapia como los agentes citostáticos empleados en la quimioterapia, actúan mediante la inducción de la apoptosis tras provocar alguna alteración celular a nivel de la síntesis de ácidos nucleicos, de la división celular o de la síntesis de proteínas en las células tumorales. Esta acción también podría ejercerse sobre las células normales, sin embargo las células tumorales debido a la rapidez en su replicación celular, son más sensibles a la radiación y a los agentes y no pueden reparar el daño producido de forma tan eficiente como lo hacen las células normales y de esta manera son destruidas interfiriendo en su ciclo celular. Aún así, las células tumorales son caracterizadas por su habilidad a adaptarse al medio, por lo que a menudo se desarrollan clones resistentes a la apoptosis o se crean de forma más rápida, resistencias cruzadas durante protocolos en los que se combinan distintos tratamientos (Brad, 2009).

En las últimas décadas, el diseño de nuevas estrategias mediante terapia génica ha generado un gran interés debido a la multitud de posibilidades. Estrategias como inmunomodulación, terapia suicida mediante el empleo de prodrugs y efecto *bystander*, terapias de reemplazamiento génico de supresores de tumores o de un

antioncogen, oncolisis o terapia génica antiangiogénica han sido abordadas para mejorar los tratamientos actuales (Raki, Rajecki, Kirn, & Hemminki, 2009).

La terapia génica puede ser definida como la introducción de material genético dentro de las células para un fin preventivo o terapéutico. Existen dos tipos de modalidades; la terapia génica *ex vivo*, donde las células a tratar son obtenidas del paciente y son modificadas *in vitro* para posteriormente volver a ser introducidas al paciente, mientras que en la terapia génica *in vivo*, la modificación de las células se realiza directamente en el paciente. En el desarrollo de estrategias basadas en terapia génica, generalmente se han empleado vectores no virales como liposomas o dendrímeros, o también vectores virales defectivos en replicación, es decir, virus que son incapaces de generar progenie en las células que infectan. Estos virus pueden codificar genes terapéuticos, prodrogas, ARNs pequeños de interferencia o ARNpi (del inglés, siRNAs) o ribozimas que son liberados selectivamente en las células tumorales mediante modificaciones en el genoma viral. Aunque los transgenes terapéuticos expresados mediante estos vectores virales han mostrado una alta eficacia y buena seguridad en fases preclínicas, una vez llegados a las fases clínicas se ha demostrado que la utilidad de estos vectores podría ser limitada en caso de tumores de gran tamaño o en condiciones avanzadas de la enfermedad (Raki et al., 2009).

1.2.1.1. Adenovirus

Los vectores basados en adenovirus son los vectores más empleados a nivel mundial para la transferencia génica en aplicaciones clínicas en cáncer, y generalmente están basados en el adenovirus humano del serotipo 5. Los adenovirus son la causa más frecuente de infección en el tracto respiratorio superior, gastroenteritis y neumonía en niños. Hoy día hay identificados más de 50 serotipos diferentes. Los adenovirus han sido clasificados en seis grupos (A-F) dependiendo del tamaño del genoma, composición, homología y organización. Y dentro de los grupos, los subgrupos o serotipos se clasifican dependiendo de la homología y de la capacidad de aglutinar. De todos, el grupo más estudiado es el C, en el que se encuentran los serotipos 1, 2, 5 y 6.

Estos vectores poseen una serie de propiedades que los hacen ideales como vectores terapéuticos: *(i)* no están asociados a ninguna enfermedad grave; *(ii)* son capaces de infectar a células en división y en no-división; *(iii)* su genoma es fácilmente manipulable pudiendo incluir insertos de hasta 8,5 kb sin que el genoma viral sufra reordenamientos; *(iv)* la replicación viral es de “forma episomal”, es decir, no se integra en el genoma de la célula infectada evitando el riesgo de mutagénesis insercional, pudiendo afectar a genes vitales para la célula; *(v)* expresión transitoria que favorece situaciones en las que la expresión del transgén sólo se requiera por corto tiempo, como en terapia suicida; *(vi)* el genoma adenoviral puede ser separado en dos grupos, los genes en *cis*, que poseen la señal de empaquetamiento que deben ser llevados por el propio virus, y los genes en *trans*, que pueden ser completados y/o reemplazados por otro ADN exógeno al virus; *(vii)* pueden generarse títulos muy altos de virus pudiendo así administrar bajas dosis; *(viii)* son estables en el torrente sanguíneo, permitiendo su administración sistémica y posibilitando el tratamiento de metástasis (G. Jiang, Xin, Zheng, & Liu, 2011) (Glasgow, Hemminki, & Curiel, 2009).

Los adenovirus son virus sin envuelta, icosaédricos, de aproximadamente 60-90nm de diámetro y con un genoma lineal de doble cadena de ADN de 30-40 kb. El genoma del vector adenoviral prototipo para terapia génica es el del serotipo 5 (36 kb) debido en parte a que es uno de los serotipos más estudiados. La cápsida consiste en tres proteínas mayoritarias, hexón (II), base del pentón (III) y la fibra (IV), y cinco proteínas minoritarias, VI, VII, IX, IIIa y IVa2. El genoma tiene repeticiones terminales invertidas (ITRs) y se encuentra asociado a varias proteínas, incluyendo una proteína terminal (TP) que se encuentra en el extremo 5', la proteína básica VII y un pequeño péptido llamado mu. La proteína V, une al ADN a la cápsida a través de la proteína VI (Glasgow, Hemminki, & Curiel, 2009) (Carrasco & Almendral del Río, 2006).

El proceso de entrada a la célula en la infección adenoviral consiste en un proceso de dos pasos: *(i)* una primera interacción de la proteína de la fibra con los receptores de superficie celular. El receptor celular más común es CAR (receptor para coxsakievirus y adenovirus) o el complejo de histocompatibilidad tipo 1 (MHC 1). El receptor CAR es una proteína plasmática de membrana de 46 kDa que pertenece a la familia de las inmunoglobulinas; *(ii)* después de la interacción fibra-CAR, la proteína de la base del pentón se une a las integrinas, concretamente a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, permitiendo la internalización vía receptor por endocitosis en vesículas de clatrina. Debido a la acidificación de las vesículas endocíticas tras su fusión con lisosomas, se

produce la ruptura del pentón, que produce la disociación de la proteína IIIa y la liberación del virión al citoplasma. Mediante activación de la proteasa viral, se produce una proteólisis de la proteína VI permitiendo liberación del genoma viral de la cápsida y transporte del virión al interior del núcleo asistido por microtubulina.

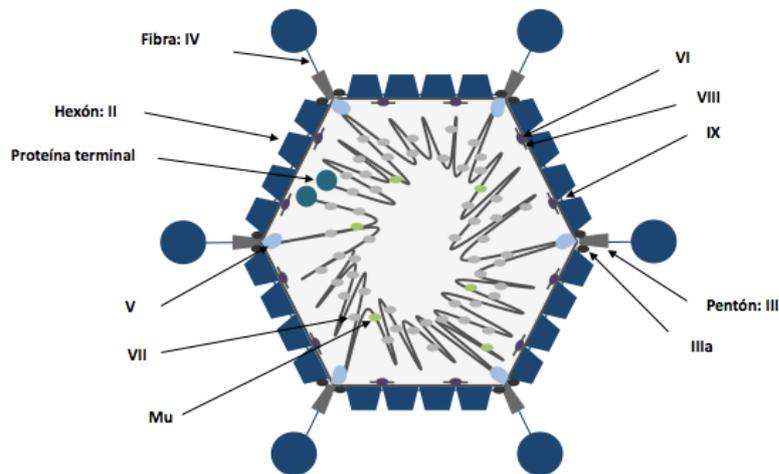


Figura 3: Estructura del virión de adenovirus. Cubierta proteica de 20 caras triangulares y 12 vértices, que encierra un núcleo que contiene el ADN compactado. La cápsida está formada por proteínas compuestas por la unión de polipéptidos a los que se asignan numerales romanos dependiendo del tamaño. La proteína mayoritaria es el hexón, que está formado por un trímero de polipéptido II. Entre los hexones se intercalan los polipéptidos VI, VIII y IX. Los vértices están formados por el pentón o base del pentón y la fibra que emerge hacia el exterior. La base del pentón esta formada por cinco copias del polipéptido III asociadas en forma de pentámero y en contacto con el polipéptido IIIa. La fibra esta formada por un trímero de polipéptido IV que se glicosila con glucosamina. La estructura del núcleo contiene cuatro proteínas: los polipéptidos V, VII y Mu, proteínas básicas ricas en arginina que se asocian de forma no covalente al ADN viral compactándolo a modo de cromatina. La proteína VII, es la proteína mayoritaria del núcleo y actúa a modo de histona alrededor de la cual se enrolla el ADN. La proteína V se asocia con el ADN y, a su vez, con la base del pentón, por lo que sirve para unir el núcleo con la cápsida. Por último, en cada uno de los extremos del ADN lineal se une covalentemente una proteína llamada proteína terminal.

Una vez en el núcleo, la transcripción y la replicación viral comienzan. La transcripción viral ocurre con la transcripción secuencial de tres grupos de genes (tempranos, intermedios y tardíos). Los productos tempranos (E1, E2, E3 y E4) son principalmente los responsables de la transcripción viral, de la replicación viral y de la inhibición de la apoptosis en la célula huésped mientras que los genes tardíos, codifican proteínas necesarias para el ensamblaje viral. El promotor de E1a es constitutivo y es el primero en expresarse (aproximadamente 1 hora después de la infección). Entre las múltiples funciones de la proteína E1A destacan la inducción de la fase S del ciclo celular y la activación del resto de unidades transcripcionales tempranas. El ensamblaje de la cápsidas empieza seguidamente a la síntesis de las proteínas tardías en el mismo citoplasma. El empaquetamiento del genoma viral ocurre en el núcleo, tras el transporte de los capsómeros, agregados de hexones, base del pentón y de la fibra, al interior del núcleo. Este proceso comienza aproximadamente 8 horas después de la infección y genera una progenie de 10^4 - 10^5 partículas por célula, que se liberan al exterior mediante lisis de la célula tras la maduración proteolítica de los viriones unas 30-40 horas después de la infección, completando así el ciclo viral (Carrasco & Almendral del Río, 2006).

Algunos tipos celulares, como las células hematopoyéticas y las células troncales, no expresan el receptor CAR, provocando que sean poco permisivas a la infección por adenovirus y sugiriendo que el reconocimiento del receptor sea uno de los factores clave en la determinación del tropismo celular. En estos tipos celulares, los niveles de transferencia génica no suele exceder el 20% incluso a altas concentraciones virales, lo que esta asociado a una importante toxicidad (Bergelson et al., 1997).

Se han llevado a cabo diferentes estrategias para aumentar los niveles de transferencia génica en las células diana. Dos abordajes empleados para solucionar este problema, cada vez más populares, son el desarrollo de vectores expresan en la superficie viral, alteraciones en la fibra para que contengan el motivo de unión a integrinas, el péptido RGD (Ad-F/RGD), y así el virus accedería al citoplasma por internalización mediada por integrinas o bien, mediante el uso de vectores de Ad5 en los que se insertan fibras de otros serotipos distintos (Mizuguchi, Sasaki, Kawabata, Sakurai, & Hayakawa, 2005; Yong et al., 2009). Desgraciadamente, estos abordajes llevan el trabajo enormemente costoso de modificar el genoma adenoviral que además podría cambiar supotencial z hacia el punto isoeléctrico de dispersión, lo que conllevaría a la agregación entre las partículas y se reduciría considerablemente la

utilidad de estos vectores, ya que alteraría su unión a las células. También ha sido empleada la utilización de los adenovirus como andamios para una gran variedad de estructuras biológicas o inorgánicas que pueden ser unidas a la cápsida (Bosch, Fouletier-Dilling, Olmsted-Davis, Davis, & Stice, 2006). De esta forma, es posible introducir diferentes secuencias de péptidos en sitios específicos de la cápsida sin modificación del genoma adenoviral aunque teniendo en cuenta distintas limitaciones como son el tamaño del péptido, impedimentos estéricos y el potencial para alterar la carga de la superficie adenoviral.

El polielectrolito polietilenimina (PEI) ha demostrado su utilidad como agente para la transferencia génica. Algunos estudios han mostrado evidencias de que la aparición de altas cantidades virales cargadas negativamente en la superficie celular, podrían reducir la eficacia de la transferencia génica, por lo que de alterar la carga entre las interacciones de los adenovirus y la superficie celular se podría mejorar la transferencia del vector viral. Por ello, la adición de los cationes poliméricos antes o durante la adsorción viral aumentaría significativamente la eficacia de la transferencia génica (Clements et al., 2006).

Existen diferentes generaciones de vectores adenovirales. En los vectores de la primera generación, las regiones E1 y E3 fueron eliminadas para inhibir la replicación viral y permitir aumentar el tamaño de los insertos. Debido a que estos virus son deficientes en replicación son generados *in vitro* en células 293 permitiendo la recombinación y generación de virus competentes en replicación conteniendo E1. La segunda generación de vectores adenovirales sumaron las deleciones en E2a, E2b o E4, reduciendo la inmunogenicidad de los vectores y permitiendo también la generación de virus competentes en replicación. La tercera generación o vectores *gutless*, en la que son eliminados todos los genes virales menos los de la señal de empaquetamiento, eliminando así cualquier problema de inmunogenicidad y aumentando el tiempo de expresión temporal y su seguridad. Estos virus son generados con la ayuda de un virus auxiliar o *helper*, que contiene todos los genes necesarios para la replicación viral, excepto los de la señal de empaquetamiento que asegura de este modo, que no se incorporen en los virus finales (Glasgow, Hemminki, & Curiel, 2009).

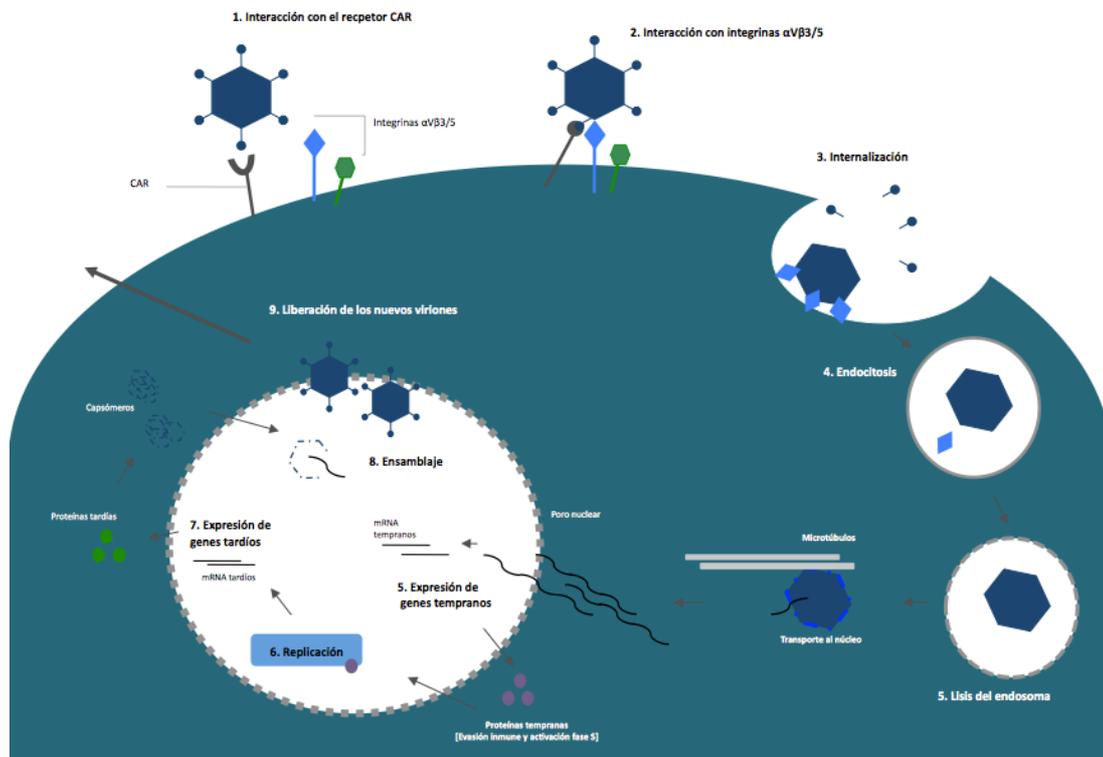


Figura 4: Ciclo infeccioso de adenovirus. El ciclo infeccioso de adenovirus se divide en dos fases: la fase temprana, que dura de 6 a 8 horas, y la tardía, de 4 a 6 horas. La fase temprana va desde la entrada del virus a la célula hasta la replicación del genoma, pasando por el transporte del virión al núcleo y la transcripción y traducción de los genes encargados de preparar la replicación del genoma viral. Estos genes tempranos están distribuidos a lo largo del genoma viral en cinco grupos (E1a, E1b, E2, E3 y E4). Con la replicación empieza la fase tardía del ciclo viral, en la cual el principal promotor tardío o MLP (del inglés, Major Late Promotor) se activa para producir las proteínas estructurales del virus. La fase tardía finaliza con el ensamblaje de la partícula viral en el núcleo celular y la liberación de partículas virales fuera de la célula.

1.2.1.2. Adenovirus replicativos condicionados o CRAds

A pesar de los avances, los tratamientos actuales basados en abordajes de terapia génica presentan una eficacia limitada y los esfuerzos consisten en encontrar formas alternativas que complementen a estos tratamientos mediante inducción de la apoptosis o superando las resistencias al empleo de diferentes drogas.

Una de las estrategias actuales consiste en el empleo de adenovirus oncolíticos o replicativos condicionados o CRAds (del inglés, *Conditionally Replicating Adenoviruses*),

que pueden replicar en las células tumorales pero no en las células normales. Una vez lisadas las células tumorales, se produce la liberación de los nuevos viriones generados y la subsiguiente infección en las células vecinas. La replicación viral permite una enorme y rápida amplificación local de la dosis inicial de virus administrada, y en teoría, el proceso oncolítico continua en el tiempo hasta que las células diana persisten, incluso puede darse la diseminación del virus desde los tumores primarios a otras lesiones metastásicas en regiones distales (Cody & Douglas, 2009), (Zeyaulah et al., 2012). Esta característica es la principal ventaja frente a los vectores adenovirales deficientes en replicación (Ad) (Qian et al., 2008). Existen tres abordajes principales para dirigir los CRAds específicamente a las células tumorales: *(i)* alterando los productos génicos virales que atenúen la replicación en las células normales pero no en las células tumorales, como las proteínas E1B 55kDa y E1A, cuya delección total o parcial promueve la replicación viral en las células tumorales deficientes en p53 o pRb (Bischoff et al., 1996) (Fueyo et al., 2000) (Heise et al., 2000); *(ii)* usando promotores específicos tumorales para controlar la expresión de los genes tempranos o específicos de un tipo de tumor (Rodríguez et al., 1997) (D. C. Yu et al., 2001); *(iii)* por modificación de las proteínas de la cápsida que funcionen en la infección de las células tumorales, como la modificación Ad5/3, que mejora la infección viral (G. Jiang et al., 2011) (Kanerva et al., 2003) (Rivera et al., 2004).

En todo momento, el efecto antitumoral es en sí generado sólo por la replicación del virus. Para potenciar el efecto antitumoral pueden emplearse virus armados con genes terapéuticos, así los CRAds no sólo se replicarían y lisarían de forma selectiva las células tumorales, si no que la expresión de un gen terapéutico aumentaría el efecto en el microambiente del tumor (G. Jiang et al., 2011).

En los últimos años se han construido CRAds armados con genes proapoptóticos, como el activador de caspasas derivado de mitocondrias o Smac (Pei et al., 2004); el ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral o TRAIL (Pan et al., 2008); el inhibidor de la metaloproteinasa 3 o TIMP3 (Lamfers et al., 2005); con un ARNpi contra el factor antiapoptótico Apollon (Chu et al., 2008); con citoquinas inmunoestimuladoras capaces de estimular la respuesta inmune antitumoral como proteínas de choque térmico (Z. Ren et al., 2008) o interleuquina 12 (IL-12) (Bortolanza et al., 2009); o con genes suicidas activadores de prodrogas como el gen de la timidina quinasa del virus herpes simplex (HSV-TK) (Bailey et al., 1996) o genes capaces de acumular radioisótopos que junto con E1A, tendrán un efecto

radiosensibilizador, como el simporter humano de yodo y sodio o hNIS (Touchefeu, Franken, & Harrington, 2012).

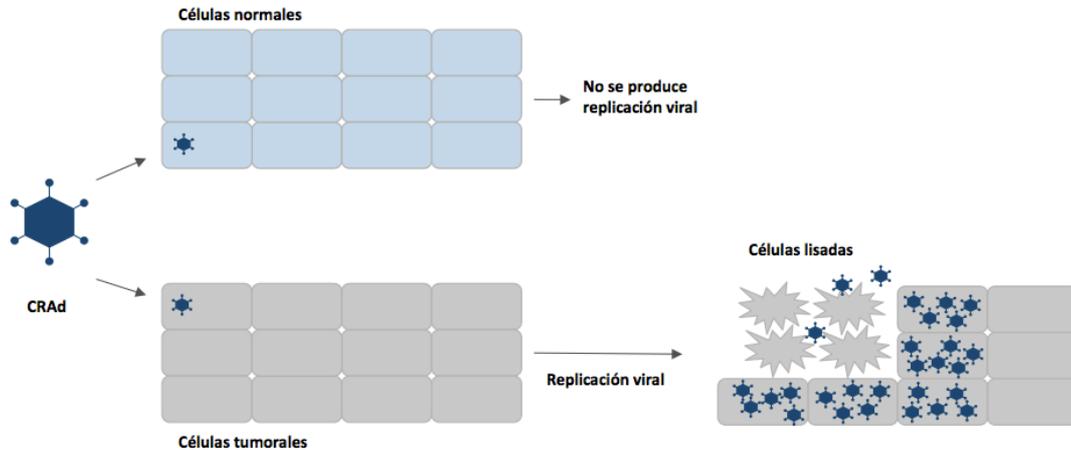


Figura 5: Modelo de actuación de adenovirus replicativos condicionados o CRAds. Dichos adenovirus están delecionados en diferentes en regiones del virus que están relacionadas con la proteína celular p53 o con la proteína del gen de retinoblastoma o pRb. El adenovirus para replicarse necesita inducir el ciclo celular y evitar la apoptosis de la célula infectada. Estas funciones recaen principalmente en el dominio de unión a pRb de E1a y en el dominio de unión a p53 de E1b-55K. En células normales, pRb detiene el ciclo celular al secuestrar el factor de transcripción E2F que es responsable de activar la síntesis de proteínas implicadas en la división celular. En el ciclo celular normal, las quinasas dependientes de ciclinas fosforilan pRb para liberar E2F. Por otro lado, la proteína p53 también controla el ciclo celular al inhibir estas quinasas dependientes de ciclinas. Otra función de la p53 consiste en inducir la apoptosis cuando el ciclo celular se ve activado de forma anómala, como en el caso de una infección adenoviral. En células infectadas por adenovirus, la proteína E1a secuestra a pRb, y E1b-55K se une e inactiva a p53. En teoría, un adenovirus que infecte células tumorales con mutaciones o inactivación de p53 o pRb, no necesita inactivar pRb y p53. De este modo, un adenovirus delecionado en el dominio de unión a pRb de E1a o en E1b-55K es capaz de propagarse efectivamente en dichas células tumorales pero no en células normales, donde no puede replicarse.

Ensayos en fases clínicas con los CRAds ONYX-015 o el H101 (CRAds deficientes en E1B 55kDa) y ensayos en fases preclínicas de otros CRAds armados han mostrado un efecto antitumoral esperanzador en conjunto con la quimioterapia y la radioterapia comparado con el empleo de los CRAds solos, ya que la proteína E1A posee un efecto radio y quimiosensibilizador (G. Jiang et al., 2011). Sin embargo, los niveles en las respuestas antitumorales tras una administración sistémica continúan siendo

limitadas. En la mayoría de los casos se observa replicación viral inicial en los tumores pero con baja eficacia, y no continuada en el tiempo, a diferencia de lo que ocurre cuando la administración es intratumoral, donde los niveles se mantienen regulares (Raki et al., 2009). La necesidad de repetidas administraciones, puede resultar en una selección y expansión de células refractarias a la infección por adenovirus (L. Zhang et al., 2002). Adicionalmente, la presencia de anticuerpos neutralizantes puede disminuir la dosis viral administrada de forma sistémica, mientras que esto no se observa mediante la administración intratumoral (Nemunaitis et al., 2000).

Muchos tumores sólidos se hacen inaccesibles a la infección viral debido a que tras la administración sistémica se han de superar las barreras físicas del estroma tumoral, como las zonas necróticas e hipóxicas. En el caso de los virus a los que se les ha modificado el tropismo mediante modificación de las cápsidas, resultan también en bajos niveles de replicación viral ya que estas modificaciones pueden interferir con la producción de la progenie y la oncolisis viral (Raki et al., 2009).

1.2.2. Combinación de terapia génica y terapia celular como opción de tratamiento contra el cáncer

Los esfuerzos actuales para generar una terapia eficaz contra el cáncer consisten en ser capaces de desarrollar una estrategia dirigida a las células tumorales y a cualquier otro elemento del estroma tumoral, en el que se combinen el uso de genes específicos antitumorales y el empleo de vehículos o vectores que se dirijan e incorporen directamente en el tumor y puedan administrarse eficazmente de forma sistémica evitando las complicaciones asociadas a las administraciones intramusculares o intratumorales.

Las células troncales mesenquimales (MSCs), han generado un gran interés biomédico desde que se descubrieron sus propiedades constituyéndolas así como una atractiva elección como agentes terapéuticos. Las MSCs son sencillas de obtener, pueden expandirse rápidamente y son fáciles de transducir, lo que permite su modificación *ex vivo*. Las MSCs representan un tipo celular inmunológicamente privilegiado debido a que expresan niveles muy bajos del complejo de histocompatibilidad tipo I (MHC I) y no expresan el tipo II (MHC II). Esto permite reducir el riesgo de rechazo en trasplantes alogénicos generando ventajas en el tratamiento de enfermedades donde existe daño o pérdida celular (Dai et al., 2011; Loebinger & Janes, 2010).

Recientemente se ha demostrado en diferentes ensayos preclínicos, el potencial que tienen las MSCs para migrar de forma específica a zonas tumorales constituyéndose así como una herramienta ideal para su utilización como vehículos de genes y fármacos antitumorales en una terapia génica y celular combinada (Dwyer & Kerin, 2010). Las condiciones que han de darse para que se de este fenómeno, son la producción de moléculas quimioatrayentes por parte del tumor y la expresión de los receptores correspondientes en las MSCs.

1.3. Células troncales

Las células troncales o células madre como popularmente han sido denominadas, son células que poseen la capacidad de autorrenovarse mediante divisiones mitóticas, permaneciendo cada célula como célula troncal, o bien, continuar la vía de diferenciación para la que está programada y, por tanto, generar células diferenciadas.

A lo largo del desarrollo ontogénico, se pueden identificar diferentes tipos de células troncales. Atendiendo a su potencial de desarrollo se clasifican como: *(i)* totipotentes, células capaces de originar cualquier tipo celular incluido las extraembrionarias y generar un organismo completo; *(ii)* pluripotentes, células que no pueden generar un organismo completo pero que son capaces de dar lugar a cualquier tipo celular de las tres capas embrionarias; *(iii)* multipotentes, células que son capaces de originar células especializadas de su misma capa embrionaria; y *(iv)* unipotentes, células que son solo capaces de originar un tipo de célula especializada (Sell, 2003).

Dependiendo de su procedencia, podemos distinguir a las células troncales en embrionarias, germinales, fetales y adultas. Las células embrionarias (ESs) aparecen como las células troncales más versátiles para aplicaciones en medicina regenerativa. Estas células proceden de la masa celular interna de embriones en estado de blastocisto, de mórula o incluso de blastómera única. Las ESs son células pluripotentes capaces de originar células especializadas o diferenciadas de las tres capas embrionarias y también células germinales. Estas células expresan marcadores de indiferenciación como OCT4, SOX2 y NANOG, que regulan un gran número de genes y mantienen a las células en estado de proliferación e indiferenciación. Las células germinales o células germinales primordiales (PGC) tienen propiedades similares a las células embrionarias, ya que son pluripotentes, se encuentran en la cresta gonadal en el embrión y son las precursoras de los gametos. Las células adultas o somáticas, son

células multipotentes, relativamente indiferenciadas que poseen capacidad de renovarse a sí mismas y originar diferentes tipos celulares más especializados de la capa embrionaria de la que provengan. Estas células se localizan en tejidos u órganos adultos. En algunos de estos tejidos, las células son unipotenciales y están capacitadas para generar un tipo celular específico. Las células fetales, son células multipotentes que se encuentran en órganos fetales como hígado y pulmón y que poseen características similares a sus homólogas en tejidos adultos (Alison et al., 2004; Körbling, Estrov, & Champlin, 2003).

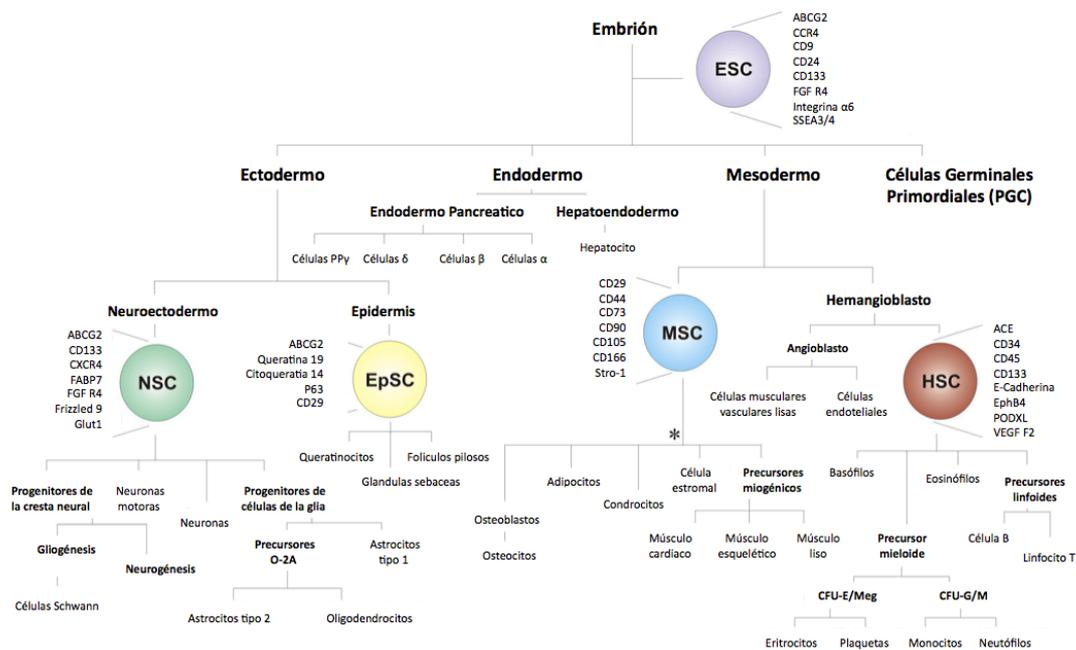


Figura 6: Desarrollo de las diferentes células troncales en el organismo. Las células troncales pueden clasificarse dependiendo de su procedencia en células troncales embrionarias (ESC), germinales (PGC), fetales y adultas. Las diferentes células troncales adultas provienen de las diferentes capas embrionarias. Del ectodermo se generan células troncales neurales (NSC) y epidérmicas (EpSC) y del mesodermo se generan las células troncales mesenquimales (MSC) y hematopoyéticas (HSC).

En otros tejidos, se localizan en un microambiente fisiológico denominado nicho (C. Li, Lee, & Simeone, 2009; Schofield, 1978) en el que permanecen en estado de

quiescencia a través de microambientes moleculares de señalización inhibitorios frente a la división y a la diferenciación celular. Sin embargo, el desarrollo de las células troncales inducidas pluripotentes o iPSCs (del inglés, *Induced Pluripotent Stem Cells*) y la caracterización de ciertas células adultas capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares y de diferentes capas embrionarias ha complicado la nomenclatura de estas células. Se ha descrito la capacidad de diferenciar células adultas derivadas del mesodermo a cardiomiocitos, neuronas y astrocitos *in vitro* (Beyer Nardi & da Silva Meirelles, 2006; Bianco & Gehron Robey, 2000; Jori et al., 2005; Pittenger et al., 1999; Tokcaer-Keskin et al., 2009). Pese a todos estos avances, aún no está completamente claro la verdadera naturaleza, identidad, origen y capacidad multitipotente de estas células.

1.3.1. Células troncales mesenquimales

Las células troncales mesenquimales o MSCs (del inglés, *Mesenchymal Stem Cells* o *Mesenchymal Stromal Cells*) son precursores celulares multipotentes no especializados originados de la capa embrionaria del mesodermo y que poseen la capacidad de autorrenovarse, de diferenciarse a células especializadas en respuesta a señales específicas y que poseen una importante función paracrina de factores de crecimiento y citoquinas. Las MSCs fueron inicialmente identificadas (S. Chen et al., 2004; Choi, Kurtz, & Stamm, 2011; Hare et al., 2009) en el compartimento estromal de la médula ósea por Friedenstein et al. en los años 60 (Friedenstein, Petrakova, Kurolesova, & Frolova, 1968; Friedenstein, Piatetzky-Shapiro, & Petrakova, 1966), consideradas por primera vez como células troncales por Caplan y posteriormente denominadas células troncales mesenquimales en 1991 (Caplan, 1991).

La distribución y localización exacta de las MSCs *in vivo* aún no está del todo claro. Se estima que las MSCs representan sólo entre el 0,01 y 0,001% del total de las células nucleadas aisladas de los aspirados de médula ósea (Pittenger et al., 1999; Short, Brouard, Occhiodoro-Scott, Ramakrishnan, & Simmons, 2003). Se han aislado células similares a las MSCs en una multitud de tejidos adultos como piel, líquido amniótico, corazón, músculo esquelético, endometrio, glándulas paratiroides, sangre, tejido adiposo, tejido sinovial y páncreas entre otros (Beyer Nardi & da Silva Meirelles, 2006; Bianco & Gehron Robey, 2000; Cervelló et al., 2010, 2011; Dubois et al., 2008; Pereira et al., 1995; Prockop, 1997; Shih, Kuo, Yang, Lee, & Lee, 2009) y de tejidos fetales como placenta, cordón umbilical, sangre, piel, hígado y pulmón (Bieback &

Klüter, 2007; Flynn, Barry, & O'Brien, 2007; Gucciardo et al., 2009) y en todos los casos siguiendo metodologías similares (Pittenger et al., 1999).

Estas MSCs, comparten un importante número de características con las de médula ósea, incluida la expresión de marcadores de superficie, la adherencia en placa, y la capacidad de diferenciarse *in vitro* bajo estímulos específicos (Dominici et al., 2006). Sin embargo, difieren en algunos aspectos de las de médula ósea, que podría ser atribuible a la variabilidad debida al tipo de tejido del que se aísla o a la variabilidad entre donantes incluso aislándolas del mismo tejido, o a la variabilidad entre los diferentes métodos para aislarlas y mantenerlas *in vitro* (Klopp, Gupta, Spaeth, Andreeff, & Marini, 2011).

Hay pocos datos disponibles sobre la existencia de nichos de MSCs *in vivo* sugiriendo una localización perivascular de las MSCs. Sin embargo, esta idea es rechazada por otros debido a la existencia de células similares a las MSCs en tejidos avasculares como en el cartílago articular. En condiciones normales, se ha descrito que existe un pequeño número de MSCs en circulación y este número de células puede aumentar en condiciones de hipoxia (Rochefort et al., 2006).

1.3.1.1. Caracterización de las MSCs

El comité de células troncales mesenquimales y de tejidos de la Sociedad Internacional de Terapia Celular o ISCT (del inglés, *International Society for Cellular Therapy*) propuso una serie de indicaciones a seguir basados en los datos actuales para la identificación de las MSCs humanas, reconociendo que las investigaciones futuras probablemente modificarán estos criterios. Estas indicaciones son una combinación de propiedades físicas, fenotípicas y funcionales: (i) adherencia a la placa de cultivo cuando son mantenidas en condiciones normales; (ii) expresión de un panel consenso de marcadores de superficie cuyos niveles han de ser $\geq 95\%$ para CD105 (endoglina), CD90 (Thy-1), y CD73 (5' ectonucleotidasa), niveles variables de expresión dependiendo del tejido de origen para los marcadores CD44, CD71 (receptor de la transferrina), gangliósido GD2 y CD271 (receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad), y niveles $\leq 2\%$ para los marcadores hematopoyéticos CD14, CD34, CD31 o PECAM-1 (molécula 1 de adhesión celular endotelial de plaqueta) CD45 (antígeno leucocitario común), CD11b, CD19, CD79 α , HLA-DR o las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y CD40; (iii) plasticidad celular o capacidad de las células a diferenciarse *in*

in vitro a osteocitos, adipocitos y condrocitos bajo estímulos específicos (Dominici et al., 2006).

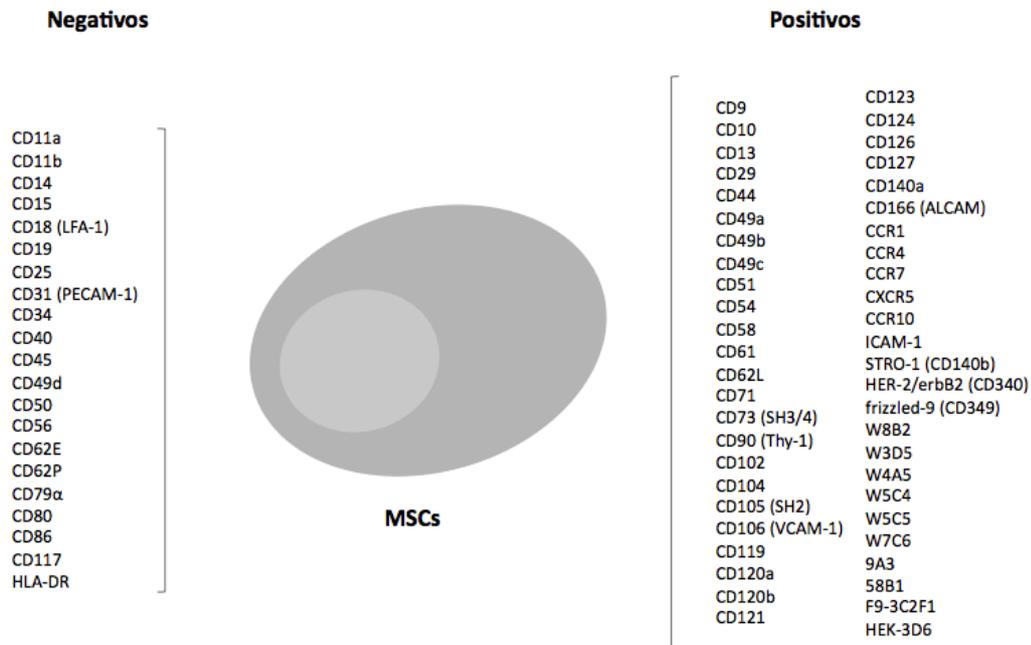


Figura 7: Marcadores típicos para caracterizar MSCs. No existe un único marcador para caracterizar las MSCs. Según las indicaciones de la Sociedad Internacional de Terapia Celular o ISCT, las MSCs han de expresar los marcadores CD73, CD90 y CD105 y simultáneamente deben tener ausencia de expresión de los marcadores CD14, CD34, CD45 y CD31. Dependiendo del origen del que provienen las MSCs, existen otros marcadores cuya expresión puede ser variable.

1.3.1.2. Capacidad de migración de las MSCs

Las MSCs han demostrado una importante capacidad de migrar de manera específica a zonas donde existe un daño una vez que son administradas de forma sistémica (Kidd et al., 2010; Mader et al., 2009; Nakamizo et al., 2005; Studeny et al., 2002, 2004; Yong et al., 2009). La migración es definida como el secuestro de las MSCs en los vasos sanguíneos de un tejido, seguido de la transmigración a través del endotelio (Karp & Leng Teo, 2009).

Las MSCs juegan diferentes papeles dependiendo de su localización anatómica. Diferentes estudios han mostrado la presencia de las MSCs en circulación y en órganos

o tejidos sanos, además de la médula ósea. Se establecen numerosas rutas de migración en el organismo (Karp & Leng Teo, 2009). Las MSCs endógenas son capaces de mantener la reparación de daños en los tejidos y la hematopoyesis, pero aún son poco entendidas muchas de las funciones naturales de las MSCs. Cuando estas se injertan en los sitios de daño, son capaces de diferenciarse a elementos del tejido conectivo, apoyar la vasculogénesis, y secretar citoquinas y factores de crecimiento que faciliten la reparación del daño (Brooke et al., 2007).

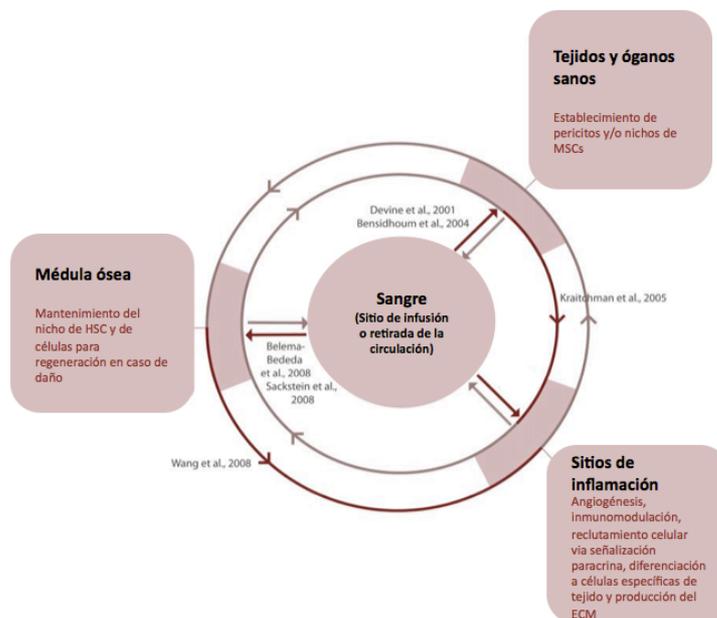


Figura 8: Circuito de migración de las MSCs en el organismo. Las MSCs poseen diferentes funciones dependiendo de su localización anatómica, y están implicadas en un circuito activo desde sus reservorios, como la médula ósea y los nichos en diferentes tejidos y órganos, hasta los sitios de daño e inflamación. (Imagen adaptada de Karp & Leng Teo, 2009).

El potencial de las MSCs para favorecer la regeneración ha sido bastante investigado en diferentes enfermedades, incluidas la isquemia cardiaca (S. Chen et al., 2004; Choi et al., 2011), daño cerebral (Chopp & Li, 2002; Qu et al., 2008; Z.-X. Zhang, Guan, Zhang, Zhang, & Dai, 2008), diabetes (Fiorina et al., 2009; D.-S. Li et al., 2009), Parkinson y Huntington (Lescaudron, Naveilhan, & Neveu, 2012), alteraciones del sistema nervioso y daño muscular (Yang et al., 2012) y enfermedades hepáticas (Dai, Li, Guan, Ritchie, & Zhou, 2009).

Al igual que en los casos anteriores, en un número creciente de estudios, se ha demostrado el tropismo de las MSCs también hacia zonas tumorales e incluso a zonas de metástasis, en un proceso similar al que ocurre en caso de daño tisular (Salem & Thiemermann, 2010). Esta capacidad de migración de las MSCs ha sido corroborada *in vivo* en múltiples líneas tumorales humanas, como en cáncer de pulmón, cáncer de mama, sarcomas de Kaposi, cáncer de páncreas (Fiorina et al., 2009; R. Jiang et al., 2011; D.-S. Li et al., 2009), melanoma y cáncer de ovario, independientemente de la vía de administración de las MSCs, del modelo animal y grado de inmunocompetencia. Chapel et al, demostraron en un modelo animal que sufría daños en múltiples órganos o tejidos, que las MSCs expresando GFP eran encontradas en diferentes zonas dependiendo de la severidad y geometría del daño (Chapel et al., 2003).

Pese a ello, el mecanismo preciso por el cual las células son capaces de migrar a sitios de daño aún no está totalmente claro, y este proceso tan complejo se ha relacionado con el de la migración de los leucocitos hacia focos inflamatorios y ha sido propuesto como paradigma o modelo (Ley, Laudanna, Cybulsky, & Nourshargh, 2007; Loebinger & Janes, 2010), aunque partiendo de algunas diferencias como la falta de expresión de CD31/PECAM-1 en las MSCs, siendo en los leucocitos responsable de la transmigración del endotelio (Chamberlain, Fox, Asthon, & Middleton, 2007). Durante el transcurso de un proceso inflamatorio, el reclutamiento de células inflamatorias requiere una secuencia coordinada de sucesos, incluido el rodamiento mediado por selectinas, la activación celular mediada por la acción de quimioquinas y citoquinas, la activación de integrinas, la adhesión firme al endotelio mediada por integrinas, la extravasación y migración transendotelial y finalmente la invasión en la matriz extracelular mediada por interacciones dependientes de integrinas y por la acción de las proteasas capaces de degradar la matriz (Imhof & Aurrand-Lions, 2004; Luster, Alon, & von Andrian, 2005). La dirección en la cual ocurre la migración de las MSCs es dependiente de un gradiente de densidad de quimioquinas y citoquinas. Este incremento de la concentración de moléculas inflamatorias en el sitio de daño, es el principal mediador del movimiento de las MSCs al sitio inflamatorio (Spring, Schüler, Arnold, Hämmerling, & Ganss, 2005). Las quimioquinas y citoquinas inflamatorias son liberadas tras ocurrir el daño y permiten la activación de las MSCs necesaria para la migración. De este modo, los tumores también son una fuente constante de producción de una amplia variedad de moléculas quimioatrayentes, como quimioquinas y

citoquinas inflamatorias, que sirven de ligandos a los receptores que expresan las MSCs facilitando la migración hacia el microambiente tumoral (Dvorak, 1986).

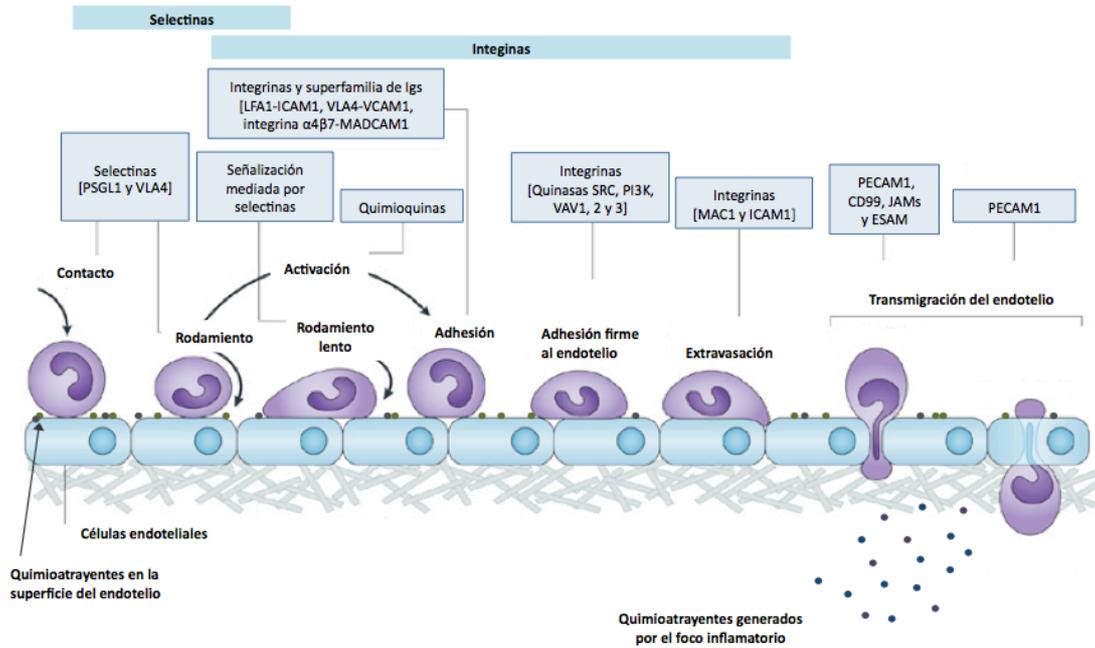


Figura 9: Migración de leucocitos. Proceso de migración de un linfocito del torrente sanguíneo hacia un sitio inflamatorio. La dirección en la cual ocurre la migración es dependiente de un gradiente de densidad de quimioquinas y citoquinas. Este incremento de la concentración de moléculas inflamatorias en el sitio inflamatorio, es el principal mediador del movimiento de los linfocitos al sitio de daño, donde se induce la activación local del endotelio, y permite que los linfocitos se activen, se adhieran y extravasen a través del endotelio.

Diferentes parejas de citoquinas/receptores han sido asociadas a este fenómeno, como SDF-1/CXCR4, SCF/c-Kit, HGF/c-Met, VEGF/VEGFR, MCP/CCR2 y HMGB1/RAGE, moléculas de adhesión como las integrinas β -1 y β -2, y L-selectina, factores de crecimiento y citoquinas angiogénicas e inflamatorias como IL-8, neutrofina-3, TGF- β , IL-1 β , TNF- α , PDGF y EGF. Muchas de estas moléculas son secretadas por las propias células del tumor o por otros elementos del estroma

tumoral, provocando un gradiente de densidad de quimioquinas. Las MSCs expresan de forma funcional distintos receptores de quimioquinas como CCR (1, 4, 7, 9, 10), CXCR (4, 5, 6), CX3CR1 y c-Met (Imitola et al., 2004; Motaln, Schichor, & Lah, 2010; Nakamizo et al., 2005; Schmidt et al., 2005; Son et al., 2006; Von Lüttichau et al., 2005).

La eficacia en el proceso migración de las MSCs es influido por las variaciones en los protocolos usados para aislarlas y expandirlas *in vitro*. El fenotipo y la capacidad de migración puede ser alterado fácilmente por el mantenimiento *in vitro* durante largos periodos de tiempo, que suele estar asociado con un descenso en la expresión de moléculas de adhesión, la pérdida de expresión de receptores de quimioquinas como CXCR4, y resultando en una falta de respuesta quimiotáctica (Honczarenko et al., 2006; Kemp, Hows, & Donaldson, 2005; Son et al., 2006). Mantener los cultivos en un grado de confluencia del 100% también afecta de forma importante a la capacidad migratoria de las células. El nivel de confluencia es directamente proporcional a la producción del inhibidor de la metaloproteínasa-3 (TIMP-3) que es el responsable de inhibir la migración transendotelial (De Becker et al., 2007).

Aunque es indiscutible, que las MSCs migran y se integran en el microambiente tumoral, su destino y función en el tumor es aún desconocida y paradójica manteniéndose como un arma de doble filo. En dos experimentos realizados en paralelo y en las mismas condiciones por Luetzkendorf et al, se demuestra la capacidad de las MSCs de emplearse como vectores de terapias antitumorales. A un grupo de animales de un modelo de carcinoma colorrectal, se les administró las MSCs modificadas previamente con un lentivirus armado con el gen terapéutico TRAIL, mientras que a otro grupo de animales del mismo modelo tumoral, se les administró las MSCs sin modificar. En el primer grupo de animales fue claro el efecto antitumoral reduciendo prácticamente la totalidad del volumen del tumor, mientras que en el segundo grupo de animales a los que se les administró las MSCs sin modificar, los tumores aumentaron su tamaño (Luetzkendorf et al., 2010).

Las MSCs interaccionan con las células del tumor y con las células no tumorales residentes del estroma, como las células del sistema inmune y las células endoteliales, de una multitud de formas, mostrando diferentes habilidades tanto para colaborar como para inhibir el crecimiento tumoral. A pesar de todos los trabajos de los últimos años, el impacto de las MSCs sin modificar en la progresión del tumor aún no esta claro. Muchos estudios han mostrado que las MSCs promueven el crecimiento tumoral y la

metástasis mientras que otros indican que las MSCs suprimen el crecimiento del tumor (Dai et al., 2011).

La razón de estas discrepancias es desconocida, pero podría ser atribuible a diferencias en los modelos de tumor utilizados, en la heterogeneidad de las MSCs, el modelo animal, la dosis tanto de células tumorales como de MSCs empleada, la utilización de matrices o gelatinas que podrían minimizar el contacto directo de las MSCs durante la iniciación del tumor y el ritmo, la frecuencia o vía de administración de las MSCs, o posiblemente cualquier otro factor que todavía es desconocido. Es necesario determinar bajo qué condiciones las MSCs son capaces de promover el crecimiento del tumor y la metástasis para el desarrollo de aplicaciones terapéuticas y entender el papel del estroma tumoral en la tumorigénesis.

1.3.1.3. Efectos antitumorogénicos en el estroma tumoral

Distintos trabajos indican la capacidad de las MSCs para suprimir o inhibir el crecimiento tumoral (Tabla 1A). La inhibición tanto del crecimiento tumoral y del establecimiento de las metástasis mediado por la administración de las MSCs ha sido demostrado en diferentes modelos animales mediante la coinyección de las MSCs junto con las células tumorales. En un modelo de carcinoma de colon en rata, las MSCs inhibieron el crecimiento de los tumores cuando se coinyectaron con MSCs (Ohlsson, Varas, Kjellman, Edvardsen, & Lindvall, 2003). Los infiltrados de macrófagos y granulocitos encontrados fueron mucho mayores en los tumores inyectados con MSCs que en los controles, sugiriendo un efecto proinflamatorio en este modelo.

A pesar del distinto origen de las MSCs y de las células tumorales, ambas comparten características biológicas similares (Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001). La ruta de señalización de Wnt tiene un papel importante en la autorrenovación y diferenciación de las células troncales, relacionando también diferentes activaciones aberrantes en las rutas de Wnt y Akt con la progresión en el crecimiento tumoral en una amplia variedad de tumores (G. Chen et al., 2004; Moon, Kohn, De Ferrari, & Kaykas, 2004). La inhibición de la ruta de Wnt mediada por las MSCs fue demostrado por Qiao et al en un modelo de hepatoma. Los animales mostraron una fase de latencia en el inicio del tumor más prolongada y tumores más pequeños cuando se coinyectaban las células tumorales H7420 junto con las MSCs comparado con los animales a los que no se les inyectó las MSCs. Además, cuando se cocultivaban ambos tipos *celulares in vitro*, la proliferación de las células H7420 descendió, así como la

expresión de los genes típicos de la ruta de Wnt (Bcl-2, c-Myc, PCNA y survivina), en cambio, el número de células que sufrieron apoptosis aumentó. La secreción de proteínas dickkopf (DKK-1) por parte de las MSCs parece ser la causa de la desregulación en la ruta de Wnt y la reducción de la proliferación (Qiao et al., 2008).

A diferencia de lo que ocurre en el modelo de hepatoma, donde la desregulación de la ruta de Wnt se debe a la secreción de moléculas derivadas de las MSCs, la desregulación en la ruta de señalización Akt en un modelo de sarcoma de Kaposi, es debida a la interacción directa de las células tumorales con las MSCs. Khakoo et al., demostraron en un modelo *in vivo* de sarcoma de Kaposi la desregulación de la ruta Akt en las zonas adyacentes a la infiltración de las MSCs en los tumores (Khakoo et al., 2006; Z. Li, Tan, Liewehr, Steinberg, & Thiele, 2010). Estas observaciones sugirieron que las MSCs poseen propiedades antineoplásicas intrínsecas.

1.3.1.4. Efectos protumorigénicos en el estroma tumoral

Por el contrario, muchos otros trabajos indican que las MSCs pueden promover el crecimiento tumoral y las metástasis (Tabla 1B). Los fibroblastos, son el principal componente celular del estroma tumoral. Se ha propuesto, que las MSCs son capaces de diferenciarse y adquirir fenotipo de TAFs tras la exposición al microambiente tumoral al expresar marcadores como α -sma, vimentina, proteína específica de fibroblastos y SDF-1 tanto *in vivo* como *in vitro*. Esto es una evidencia directa de los efectos protumorigénicos de las MSCs (Mishra et al., 2008; E. L. Spaeth et al., 2009). La población de TAFs en el estroma tumoral deriva de las MSCs reclutadas de zonas locales y de zonas circulantes (Mishra et al., 2008; E. Spaeth, Klopp, Dembinski, Andreeff, & Marini, 2008). La importancia de los TAFs en la tumorigénesis ha sido bien caracterizada en distintos modelos tumorales y parecen estar relacionados con múltiples procesos como la inhibición de la apoptosis en las células tumorales, incremento de la proliferación de las células tumorales y angiogénesis (Ostman & Augsten, 2009). Un trabajo reciente del doctor Peinado, en un modelo de melanoma, muestra la relación entre la liberación de exosomas por parte de las células tumorales, con la progresión del tumor y la formación de un nicho metastático por medio de la educación y movilización de las MSCs de la médula, promoviendo la angiogénesis, la invasión y la metástasis (Peinado et al., 2012).

En el microambiente tumoral, la angiogénesis es un proceso clave para el mantenimiento y crecimiento de los tumores y para el progreso de la metástasis. Las

MSCs exhiben un potente efecto en la neovascularización de los tumores por medio de la expresión de distintos factores proangiogénicos incluidos la angiopoyetina-1 (Ang1), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento plaquetario (PDGF), los factores de crecimiento fibroblásticos FGF-2 y FGF-7, la IL-8 y SDF-1, y en el mantenimiento de la vasculatura por diferenciación a pericitos y quizás a células endoteliales (Honczarenko et al., 2006; Kinnaird et al., 2004). Todas estas moléculas actúan de forma sinérgica en las células endoteliales para promover la vasculogénesis y angiogénesis, y en el reclutamiento de progenitores endoteliales.

Studený et al., mostró mediante ensayos de incorporación de BrdUrd *in vivo*, que las MSCs administradas en animales sanos, sin tumores preestablecidos o sin coinyección con células tumorales, no fueron capaces de proliferar (Studený et al., 2002). De este modo, el crecimiento de la masa tumoral observada podría ser relacionado con (i) incremento del número de células tumorales; (ii) incremento de la proliferación de las MSCs en el área del tumor; (iii) combinación de ambas; (iv) incremento de otros elementos del estroma. Como la proporción relativa de células del estroma tumoral nunca ha sido determinado, la observación en el aumento del tamaño del tumor continua siendo de interpretación complicada.

Diferentes estudios han mostrado la capacidad de las MSCs de ejercer un efecto inmunosupresor mediante modulación tanto de la inmunidad innata como de la celular. Las MSCs incorporadas al microambiente del tumor requieren de una activación previa para actuar como inmunosupresoras (Ghannam, Bouffi, Djouad, Jorgensen, & Noël, 2010; Shi et al., 2010). Estas pueden ser activadas por las células del sistema inmune a través del IFN- γ , solo o combinado con TNF- α , IL-1 α o IL-1 β (G. Ren et al., 2008). Una vez activadas, las MSCs son capaces de inhibir la proliferación de los linfocitos y suprimir la función de los linfocitos T efectores o colaboradores CD4⁺, linfocitos T citotóxicos CD8⁺, linfocitos B y células NK (del inglés, *natural killer*) (D.-S. Li et al., 2009; Noël, Djouad, Bouffi, Mrugala, & Jorgensen, 2007). Los mecanismos por los cuales las MSCs median la inmunosupresión es un proceso complejo debido a las interacciones entre las MSCs y los linfocitos en el microambiente del tumor y por la amplia variedad de factores solubles liberados.

Las MSCs suprimen la proliferación de los linfocitos T a través de múltiples mecanismos. Una de las posibles causas podría ser consecuencia de una parada de la división celular mediada por la acumulación de células en fase G₀, deteniendo así el ciclo celular (Glennie, Soeiro, Dyson, Lam, & Dazzi, 2005).

Por otra parte, la activación de los linfocitos T reguladores es mediada por mecanismos relacionados con los contactos célula-célula o por la secreción de factores como IL-10 y TGF- β (Aggarwal & Pittenger, 2005).

La señalización mediada por receptores tipo Toll o TLR (del inglés, *toll-like receptor*) ha mostrado propiedades inmunomoduladoras en las MSCs. Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos y a daño, desencadenando una amplia variedad de respuestas inflamatorias. Las MSCs expresan TLR y la activación de estos receptores puede polarizar a las MSCs a cambiar de un fenotipo típico inmunosupresor a un fenotipo proinflamatorio (Waterman, Tomchuck, Henkle, & Betancourt, 2010).

Es posible que las discrepancias en la literatura sean debidas a la activación de diferentes TLR como consecuencia en la variabilidad de la expresión de quimioquinas, citoquinas y factores en el microambiente tumoral. Las condiciones de cultivo de las MSCs, el uso de altas concentraciones de suero o factores de crecimiento en el medio, realizar un número alto de pases, y el mantenimiento de las células en confluencia, podrían resultar ser factores determinantes en el mantenimiento de su fenotipo típico y su función. Otro problema añadido es el desconocimiento en la proporción de líneas de MSCs que pudieran encontrarse contaminadas con células tumorales, como las contaminaciones reportadas de osteosarcoma y células de glioma usadas en diferentes laboratorios (Torsvik et al., 2010).

La inmunidad tumoral, la hipoxia, la angiogénesis y la secreción de quimioquinas y citoquinas es bastante variable entre los diferentes modelos utilizados. Además, en experimentos usando como modelos de tumor células MCF-7 de cáncer de mama y células B16 de melanoma, las MSCs han mostrado en resultados obtenidos por diferentes laboratorios, efectos contrarios en el crecimiento del tumor una vez administradas, sugiriendo que el modelo de tumor no es el único factor discrepante en los resultados (Klopp et al., 2011).

A

Autor	MSCs	Modelo de tumor	Resultado
Ohlsson et al.	BMhMSCs	Carcinoma de colon de rata (H1D1)	Reducción del tamaño
Khakoo et al.	BMhMSCs	Sarcoma de Kaposi	Reducción del tamaño
Qiao et al.	hMSCs fetal de piel	Hepatoma humano (H7402, HepG2)	Reducción del tamaño
Qiao et al.	hMSCs fetal de piel	Cáncer de mama (MCF-7)	Incremento de latencia, reducción del tamaño
Zhu et al.	hASCs	Leucemia humana (K562)	Inhibición de la proliferación
Otsu et al.	mBMSCs	Melanoma de ratón (B16F10)	Reducción del tamaño
Cousin et al.	hASCs	Cáncer de páncreas	Reducción del tamaño
Maestroni et al.	BMhMSCs	Cáncer de pulmón y melanoma (B16)	Reducción del tamaño y de la metástasis
Lu et al.	mBMSCs	Hepatoma (H22) y linfoma (Tac-1 y EL-4)	Reducción de la formación de ascitis
Dasari et al.	hMSCs de cordón umbilical	Glioma (SNB19, U251, 4910 y 5310)	Reducción del tamaño
Secchiero et al.	BMhMSCs	Linfoma Non-Hodgkins (SKW6.4 y BJAB)	Reducción del tamaño e incremento de la supervivencia

B

Autor	MSCs	Modelo de tumor	Resultado
Karnoub et al.	BMhMSCs	Cáncer de mama (MDA-231,435 y HMLER)	Incremento del tamaño y de la metástasis
Zhu et al.	BMhMSCs	Cáncer de colon (SW480 y F6)	Incremento incidencia
Djouad et al.	mBMSCs	Melanoma (B16)	Incremento incidencia
Muehlberg et al.	hASCs	Cáncer de mama (4T1 y MDA231)	Incremento tamaño
Yu et al.	hASCs	Cáncer de pulmón y glioma (H460 y U87MG)	Incremento tamaño
Galie et al.	mASCs	Cáncer de mama (BB1)	Incremento incidencia y tamaño
Lin et al.	hASCs	Cáncer de próstata (PC3)	Incremento incidencia y tamaño
Kucerova et al.	hASCs	Melanoma (A375 y M4Beu) y glioblastoma (8MGBA)	Descenso de latencia e incremento del tamaño
Prantl et al.	hASCs	Cáncer de próstata (PC3)	Incremento tamaño
Shinagawa et al.	hMSCs	Cáncer de colon (KM12SM)	Incremento tamaño y metástasis

Tabla 1: Estudios que indican diferentes efectos de las MSCs. [A] Efectos antitumorogénicos tras la administración de las MSCs. [B] Efectos protumorogénicos tras la administración de las MSCs. (Tablas adaptadas de Klopp et al., 2011).

1.3.1.5. Establecimiento de las MSCs en el microambiente tumoral

La plasticidad celular rompe con la idea de un programa genético rígido dando paso a un concepto más flexible de diferenciación de las MSCs en respuesta a un determinado microambiente *in vivo* o condiciones *in vitro*. Sin embargo, el potencial de diferenciación *in vitro* de las MSCs, no necesariamente predice o se correlaciona con su potencial *in vivo* (Strioga, Viswanathan, Darinskas, Slaby, & Michalek, 2012). Se han propuesto dos alternativas:

La primera hipótesis fue la transdiferenciación, descrita como la conversión de una célula que pertenece a un cierto linaje celular a otra célula de un linaje totalmente distinto. Las MSCs pueden migrar en respuesta a diferentes señales hacia sitios de daño, a un nuevo microambiente donde podrían sufrir una transdiferenciación en algún tipo celular de ese tejido al que las células migraron. Sin embargo, algunos grupos son escépticos a esta interpretación de los resultados. El desarrollo del cerebro se produce durante el periodo neonatal. Después, en la edad adulta, los niveles de factores de crecimiento, neurotrofinas y otros elementos necesarios para la correcta diferenciación de las neuronas no están presentes, a excepción de dos regiones neuroregenerativas: la zona subventricular y el hipocampo (Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, 2002; Seri, García-Verdugo, McEwen, & Alvarez-Buylla, 2001). La aparente transdiferenciación de MSCs transplantadas en el cerebro fue observada fuera de estas dos zonas, sugiriendo una explicación alternativa como la fusión celular. Esta hipótesis propone que las MSCs pueden fusionarse con otros tipos celulares, transfiriendo su material y mezclando sus citoplasmas. El híbrido formado adquiriría un nuevo fenotipo, modificando su programa genético y en consecuencia su potencial de diferenciación.

La fusión celular no fue mencionada como una alternativa a la transdiferenciación, hasta que dos grupos independientes publicaron eventos de fusión *in vitro* en BMhMSCs y en células troncales neuronales (Terada et al., 2002; Ying, Nichols, Evans, & Smith, 2002). Sin embargo, otros trabajos mostraron que la fusión celular contribuye en la reparación tisular (Ferrari et al., 1998; Gibson et al., 1995; E Gussoni et al., 1999; Emanuela Gussoni et al., 2002).

Aún así, es importante mencionar que la fusión celular y la transdiferenciación son procesos no excluyentes y que podrían ocurrir de forma independiente o como una sucesión de eventos. De este modo, las MSCs podrían fusionarse con otros tipos celulares residentes del microambiente tumoral, reprogramar su genoma, adquirir un

nuevo fenotipo y conferirle la habilidad para transdiferenciarse. Esto ocurre tras la fusión de cardiomiocitos y BMhMSCs *in vitro*, en las que las células adquieren un fenotipo de cardiomiocitos y una nueva habilidad proliferativa (Strioga et al., 2012). Aunque aún no existen evidencias directas de fusión celular o transdiferenciación bajo condiciones normales (Alvarez-Dolado et al., 2003), ninguna de estas hipótesis puede descartarse como mecanismos que afectan a la plasticidad celular *in vivo*.

1.3.2. Células troncales inducidas pluripotentes

La manipulación del destino celular mediante la reprogramación ha cambiado las ideas sobre la estabilidad de la identidad celular, estimulando nuevas direcciones en la investigación en enfermedades humanas, diferenciación *in vitro* y transdiferenciación. En el año 2006, los profesores Takahashi y Yamanaka, este último recientemente galardonado con el Premio Nobel de medicina 2012, mostraron como el destino celular puede ser alterado mediante la coexpresión de diferentes factores de transcripción de forma ectópica (Takahashi & Yamanaka, 2006).

En la búsqueda de una fuente alternativa de células troncales específicas de pacientes, realizaron un análisis de 24 genes candidatos relacionados con la pluripotencia de las ESs en oocitos murinos. Encontraron 4 factores que fueron suficientes para reprogramar fibroblastos murinos. Estos genes fueron: *OCT4*, también conocido como *POU5F1*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC*. Las células reprogramadas, denominadas como células troncales inducidas pluripotentes, son células de cualquier origen adultas o somáticas que han sido reprogramadas a un estado pluripotente, similar al de las ES (Nishikawa, Goldstein, & Nierras, 2008). En 2007, se publicó la reprogramación de iPSCs humanas a partir de fibroblastos adultos humanos. Los resultados se obtuvieron por dos equipos de investigación independientes. El equipo dirigido por el profesor Yamanaka en Japón reprogramó fibroblastos humanos utilizando los genes: *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, y *c-MYC*, mediante el empleo de retrovirus (Takahashi et al., 2007), mientras que el equipo dirigido por el profesor Thomson en USA usó los genes *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y *LIN28* mediante el empleo de lentivirus (J. Yu et al., 2007).

Tras el éxito de la reprogramación en fibroblastos humanos, se reprogramaron células β pancreáticas (Stadtfeld, Brennand, & Hochedlinger, 2008), células troncales neurales (Eminli, Utikal, Arnold, Jaenisch, & Hochedlinger, 2008; Kim et al., 2008), células B (Hanna et al., 2008), células hepáticas y del estómago (Aoi et al., 2008), melanocitos (Utikal, Maherali, Kulalert, & Hochedlinger, 2009), células troncales

adiposas (Sun et al., 2009) y queratinocitos (Aasen et al., 2008; Maherali et al., 2008), mostrando que la capacidad para alterar la identidad celular parecía universal.

Las primeras generaciones de iPSCs fueron reprogramadas mediante el empleo de vectores retrovirales (Huangfu et al., 2008; Lowry et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Takahashi & Yamanaka, 2006) y lentivirales (Anokye-Danso et al., 2011; Sommer et al., 2009; Stadtfeld, Brennand, et al., 2008; J. Yu et al., 2007). Posteriormente se generaron iPSCs mediante el uso de vectores lentivirales inducibles (Maherali et al., 2008; Stadtfeld, Maherali, Breault, & Hochedlinger, 2008), los cuales permiten el control temporal sobre la expresión de los diferentes factores. Sin embargo, estos sistemas virales han sido criticados por su permanente integración en el genoma. De este modo, se han usado otras estrategias no integrativas mediante el empleo de vectores adenovirales (Stadtfeld, Nagaya, Utikal, Weir, & Hochedlinger, 2008), transposones *piggyBac* (Woltjen et al., 2009), el empleo de plásmidos de expresión conteniendo el ADNc de los diferentes factores (Okita, Nakagawa, Hyenjong, Ichisaka, & Yamanaka, 2008) o microARNs (Miyoshi et al., 2011).

En los últimos años, la equivalencia funcional con las ESs ha sido totalmente aceptada (Maherali & Hochedlinger, 2008). Las iPSCs expresan un conjunto de genes relacionados con pluripotencia, incluidos *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*, en niveles comparables con las ESs, y ellos reactivan la expresión del gen de la telomerasa, disminuyen la expresión de *THY1*, sobreexpresan *SSEA1* y expresan los antígenos embrionarios SSEA3, TRA-1-60, TRA-1-81, ADN metiltransferasa 3 β (DNMT3 β) y REX1, reactivación del cromosoma X silenciado, el patrón de metilación del ADN (Chan et al., 2009; Maherali et al., 2007; Payer, Lee, & Namekawa, 2011; Stadtfeld, Maherali, et al., 2008) entre otras características. A pesar de la multitud de ensayos utilizados para evaluar la pluripotencia de las células generadas, existen todavía algunas diferencias entre ambos tipos celulares. Las primeras diferencias fueron observadas en la capacidad de diferenciación tanto en ensayos *in vitro* como en ensayos *in vivo* para la formación de teratomas. Algunas líneas de iPSCs murinas muestran menor capacidad en la generación de teratomas que las ESs murinas, mientras que algunas líneas de iPSCs humanas muestran menor tendencia a diferenciarse a los linajes hematopoyético, neuroepitelial y neuronal, que las células ESs humanas (Feng et al., 2010; Hu et al., 2010; Miura et al., 2009).

Algunos investigadores han interpretado estos datos como que las iPSCs poseen una menor capacidad intrínseca para diferenciarse, comparadas con las ESs mientras

que otros grupos han propuesto diferentes explicaciones, indicando la posibilidad de que el origen de la célula que es reprogramada, la célula parental de la que proviene, podría tener un efecto específico en la capacidad de diferenciación (Feng et al., 2010).

Ante la pregunta de si las iPSCs y las ESs son células similares, existe una creciente idea de que las ESs y las iPSCs no son poblaciones ni idénticas ni definidas, pero con características que se solapan, mostrando una gran variabilidad inherente entre las diferentes poblaciones de iPSCs algo mayor que cuando comparamos en conjunto a iPSCs y ESs. Las diferencias entre iPSCs y ESs, y entre todas las diferentes iPSCs, claramente afectan a la utilidad de estas células en investigación. Sin embargo, las diferencias no disminuyen el potencial de las iPSCs debido a las considerables ventajas que tienen frente al uso de las ESs en investigación, pudiendo llegar a ser ambas complementarias entre sí en diferentes protocolos (Robinton & Daley, 2012).

1.4. Técnicas para el seguimiento de las MSCs

Las técnicas de imagen molecular no invasivas empleadas para la visualización y detección de células, han permitido un mejor conocimiento del papel del estroma en la progresión de los tumores y en la mejora de los métodos terapéuticos y diagnósticos. La investigación en terapias basadas en el empleo de MSCs como vehículos terapéuticos, requiere de metodologías y sistemas que puedan ser aplicados fácilmente en clínica para controlar el proceso de migración de las MSCs y poder seguir a las células desde donde se administran hasta las zonas de los tumores, incluyendo la migración a otras zonas metastásicas y así seguir los posibles cambios de fenotipo que puedan sufrir las células.

Actualmente se emplean diferentes tipos de técnicas en el seguimiento de las MSCs en modelos animales (Reagan & Kaplan, 2011). Las técnicas basadas en métodos no ópticos que se emplean de forma rutinaria en clínica y que podrían adaptarse para el seguimiento de las MSCs en terapias personalizadas son: *(i)* imagen por resonancia magnética o MRI, es una técnica no nuclear que usa campos magnéticos y ondas de radiofrecuencia y que puede ser empleada para seguir la migración de las células marcadas de forma directa con nanopartículas de óxido de hierro (SPIO) o de forma indirecta, mediante la expresión de enzimas o proteínas como metaloproteína, que permitan la acumulación en el interior celular de hierro. Debido a su alta resolución, alrededor de 10-100 μ m, pueden detectarse pequeños grupos de células de hasta menos de 1.000 células; *(ii)* tomografía por emisión de positrones o PET, es una técnica

nuclear que posee mayor sensibilidad que la MRI pero posee menor resolución, alrededor de 1-2mm. Es comúnmente usada en clínica para detectar tumores, por lo que sería sencillo su escalado para el seguimiento de las MSCs mediante sondas marcadas con radioisótopos emisores de positrones, como cobalto, potasio, yodo o cobre, o mediante la expresión de diferentes genes en las MSCs, como el receptor de dopamina o del simporte de yodo y sodio (NIS), y la administración de radioisótopos para detectar las células; *(iii)* tomografía computerizada de emisión de fotones individuales o SPECT, también es una técnica nuclear empleada en clínica, con valores similares de resolución aunque de algo menor sensibilidad que el PET. Se emplean radioisótopos emisores de fotones como I^{123} o Tc^{99m} para visualización mediante la expresión de genes como NIS (Belmar, So, Vassaux, Moleiro-SanEmeterio, & Martín-Duque, 2007).

Otras técnicas basadas en métodos ópticos, como el empleo de sondas fluorescentes, imagen por bioluminiscencia, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, hibridación fluorescente *in situ* o FISH o incluso citometría de flujo, son técnicas con una altísima sensibilidad pero que son imposibles de trasladar a la clínica debido a la baja penetración de la luz en el cuerpo (Reagan & Kaplan, 2011).

1.4.1. NIS como herramienta terapéutica y de visualización

El éxito de una terapia génica antitumoral depende de múltiples factores como la efectividad en la liberación del vector, en una adecuada expresión del gen terapéutico, en una buena interacción del producto génico expresado con las células diana y en el efecto sinérgico con el empleo de otras terapias como la radioterapia o quimioterapia. Todo ello radicará en la calidad del efecto colateral o *bystander* que se genere y en la capacidad para eliminar las células del tumor.

NIS o simporter de I/Na, es un miembro de la familia de simporters de sodio que son capaces de transportar de forma activa aniones al interior de las células mediante un gradiente electroquímico de Na^+/K^+ generado por la acción de ATPasas (Jung, 2002). El gen NIS humano o hNIS esta localizado en el cromosoma 19p12-13.2 con 1929 nucleótidos. La región codificante consta de 15 exones interrumpidos por 14 intrones que codifica para un ARNm de 3,9kb y genera una glicoproteína de 643 aminoácidos con un tamaño molecular alrededor de 70-90kDa dependiendo del grado de glicosilación. La estructura secundaria consiste en 13 segmentos transmembrana cuyo extremo amino terminal se localiza extracelularmente y el extremo carboxilo terminal

intracelularmente. Tres residuos de ácido aspártico o Asp (posiciones 225, 485 y 497) están glicosilados, pero la glicosilación no es esencial para su función, estabilidad y movimiento a la membrana celular. NIS media el flujo de aniones I^- en el tiroides, a través de la membrana basolateral de las células foliculares del tiroides siendo el primer paso para la producción de las hormonas tiroideas T3 y T4.

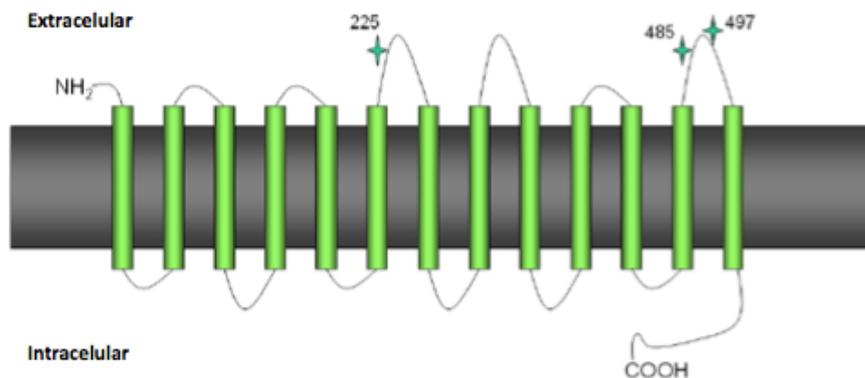


Figura 10: Estructura secundaria de hNIS. La estructura secundaria consiste en 13 segmentos transmembrana cuyo extremo amino terminal se localiza extracelularmente y el extremo carboxilo terminal intracelularmente. Tres residuos de ácido aspártico o Asp están glicosilados y se localizan en las posiciones 225, 485 y 497. (Imagen adaptada de Dohán et al., 2003; Spitzweg, Harrington, Pinke, Vile, & Morris, 2001).

NIS, como proteína transportadora, puede ser usada para concentrar radioisótopos en el interior celular, mediante transporte activo. Así, la combinación de NIS y el uso de radioisótopos tiene la ventaja de poder emplearse (i) para técnicas de visualización como SPECT o PET mediante el empleo de radioisótopos tales como el I^{123} , I^{124} , I^{125} o Tc^{99m} , o (ii) para aplicaciones terapéuticas en las que se pueden eliminar células que expresan NIS y las células vecinas que las rodean y que no expresan NIS, mediante efecto *bystander*. Isótopos como ^{131}I , Re-perrenato¹⁸⁸ y At²¹¹, son capaces de eliminar a las células mediante la emisión de partículas- β (electrones) generadas por los radioisótopos (Toucheffeu et al., 2012).

NIS también se expresa en otros tejidos extratiroideos como mucosa gástrica, glándulas salivares, tracto digestivo y glándulas mamarias (Kogai, Taki, & Brent, 2006; Vayre et al., 1999). Además, estudios de RT-PCR han mostrado expresión de NIS en glándula pituitaria, páncreas, timo, pulmón, próstata, testículos, ovario, riñón y glándula adrenal, pero sin embargo, la expresión de NIS en estos órganos es mucho menor que en tiroides siendo desconocido aún el significado funcional de tal expresión. (Spitzweg, Dutton, et al., 2001; Spitzweg, Joba, Eisenmenger, & Heufelder, 1998).

La distribución de NIS en el cuerpo es un punto importante que puede explicar los efectos adversos potenciales de la radioterapia en el tratamiento de cáncer de tiroides con I^{131} (Ross, 2011). En el caso de terapias antitumorales en que se utilice NIS como gen terapéutico, será necesario inhibir el flujo en aniones I^- en tiroides mediante saturación previa del sistema con aniones I^- no radiactivos y así evitar un posible daño del tiroides.

Al ser expresado de forma endógena, por naturaleza NIS no es inmunogénico por lo que constituye una eficaz herramienta en terapia génica antitumoral combinada con el uso de MSCs, ya que puede servir tanto para visualización y seguimiento de las células que expresan NIS, como actuar de gen terapéutico mediante el uso de vectores virales armados con NIS y potenciar su efecto antitumoral.

2. OBJETIVOS

Con estos antecedentes establecidos, la presente tesis doctoral tiene como objetivo principal la caracterización y el estudio de la capacidad de migración de las MSCs en diversas patologías, así como las diferencias y colaboración en el estroma tumoral de las MSCs de distintos orígenes para su utilización como vehículos de una posible terapia antitumoral. Se analizará la utilidad del empleo del simporter de yodo y sodio (NIS) como herramienta de visualización y como herramienta terapéutica y las estrategias de mejora en la transferencia génica a las MSCs.

Para la consecución de estos objetivos principales, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis de la capacidad de migración de las MSCs de forma simultánea, aisladas de un mismo conjunto de animales, a sitios de daños o inflamatorios establecidos en diferentes modelos de patologías.
2. Evaluación del potencial multipotente de cinco líneas de MSCs aisladas de diferentes tejidos (médula ósea, tejido adiposo, epitelio y estroma de endometrio y placenta) bajo los criterios de adherencia a la placa, expresión de un patrón de marcadores y capacidad para diferenciarse *in vitro* bajo condiciones específicas.
3. Estudiar las diferencias en la capacidad de migración entre las líneas de MSCs en un modelo de tumor mediante visualización con dos técnicas de imagen molecular no invasivas: (i) nanoSPECT/CT; y (ii) MRI. Incluyendo por primera vez MSCs aisladas tanto de epitelio como de estroma de endometrio.
4. Estudiar el efecto generado el microambiente tumoral tras la migración y el injerto de las MSCs, mediante la monitorización del tamaño, análisis histológico de los tumores, efecto en un patrón de genes relacionados con migración y análisis del destino de las MSCs en el microambiente tumoral.
5. Comparación de la capacidad migratoria de las líneas de MSCs con hiPSCs y análisis de los genes típicos de pluripotencia.
6. Ensayar el potencial terapéutico en la reducción del tamaño de los tumores mediante el empleo de MSCs expresando NIS en un protocolo de I¹³¹.

7. Evaluar el aumento en los niveles de la transferencia génica mediada por infección adenoviral en las MSCs mediante el empleo de un compuesto derivado de polietilimina conjugado con el péptido RGD (PEI-RGD).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Métodos de biología celular

3.1.1. Cultivos celulares

3.1.1.1. Mantenimiento de células en cultivo

Las células fueron sembradas de manera rutinaria en diferentes placas de cultivo de 60 o 100 mm o en frascos de cultivos T75 o T175. Los cultivos se mantuvieron en un incubador al 5% de CO₂, a 37°C y al 20% o 2-3% de O₂ dependiendo del tipo celular.

3.1.1.2. Congelación y descongelación de células

Las células previamente tripsinizadas se centrifugaron a 1400rpm y el sedimento celular resultante se resuspendió en una mezcla de 10% de dimetilsulfoxido o DMSO (Sigma-Aldrich) y 90% de suero fetal bovino o FBS (Lonza o Gibco), que se añadió a un criotubo. La congelación se realizó de manera escalonada mediante el uso de un contenedor de congelación (Mr. Frosty™ Cryo 1°C, Nalgene) que se depositó a -80°C. Tras 24 horas, los criotubos se transfirieron a un contenedor de nitrógeno líquido, donde se almacenaron hasta su uso. Para la descongelación, los criotubos se extrajeron del nitrógeno líquido y se introdujeron rápidamente en un baño a 37°C. Una vez descongelada la solución, esta se diluyó en medio completo y se centrifugó a 1400rpm. El sedimento celular se resuspendió en medio completo y las células se sembraron en una placa o frasco de cultivo, cambiándole el medio tras 24 horas.

3.1.1.3. Pase celular

Con el objetivo de retirar todos los restos de suero presente en el medio que pudieran inhibir la acción de la tripsina, se realizó un lavado con DPBS (Gibco). Posteriormente, se añadió una solución 1x de tripsina al 0,05% en PBS (PAA Laboratories GmbH) a las células, y se dejó actuar durante 2-4 minutos a 37°C. Se añadió medio completo para inactivar la tripsina cuando las células empezaron a despegarse. Para conocer la densidad celular, se apartaron 10 µl de suspensión celular y se hizo un recuento del número de células existentes en una cámara de Neubauer. Una vez estimado el número de células se sembraron a la densidad deseada.

3.1.1.4. Líneas Celulares

Las células de este apartado fueron mantenidas en DMEM con 4,5 g/l de glucosa (Lonza) suplementado con 10% de FBS (Gibco), una solución de 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin a (Lonza), 200mM de L-glutamina (Lonza) y 250µg/ml de anfotericina B (Lonza) a 37°C, 5% de CO₂ y en condiciones de normoxia (20% de O₂).

3.1.1.4.1. Células HeLa

Línea celular HeLa es de morfología epitelial originada a partir de cultivos procedentes de adenocarcinoma de cervix humano, en la que la expresión de la proteína p53 es bloqueada por la expresión del gen E6 del virus del papiloma humano. Las células fueron obtenidas de los servicios de cultivos celulares del Cancer Research UK (Londres, UK).

3.1.1.4.2. Células HEK293

La línea celular HEK293 es de morfología fibroblástica originada a partir de cultivos procedentes de tejido renal fetal humano transformado con parte del genoma de adenovirus tipo 5. Estas células son denominadas empaquetadoras ya que son capaces de expresar en *trans* el gen E1 adenoviral, permitiendo la producción de partículas infecciosas cuando se infectan con adenovirus defectivos en replicación (E1 delecionado). Estas células fueron obtenidas de la compañía CLS (Cell Lines Services).

3.1.1.4.3. Células A549

La línea celular A549 es de morfología epitelial originada a partir de cultivos procedentes de carcinoma de pulmón humano. Estas células fueron obtenidas de la compañía CLS.

3.1.1.4.4 Células TE671-LoxP/LacZ

La línea celular TE671 es de morfología epitelial originada a partir de cultivos de rhabdomiosarcoma humano y que fueron transformadas con un sistema lentiviral para integrar el cassette LoxP/LacZ (ABP-RP-CLacloxE) generando una línea estable. Estas células fueron obtenidas de la compañía Allele.

3.1.1.5. Células Troncales Mesenquimales Murinas de Médula Ósea (mBMSCs)

Las células fueron mantenidas, tripsinizadas, congeladas y descongeladas según lo anteriormente descrito en el apartado 3.1.1.2. aunque con algunas diferencias. Se realizaron dos lavados con DPBS previos a la tripsinización. Debido a la alta adherencia de estas células la tripsina empleada fue una solución comercial 1x TrypLex (Gibco) para minimizar las alteración celulares. Las células fueron mantenidas a 37°C, 5% de CO₂ y en condiciones de hipoxia (2-3% de O₂).

La extracción de células troncales mesenquimales de medula ósea o mBMSCs (*Bone Marrow-derived murine Mesenchymal Stem Cells*) se realizó utilizando ratones hembras Balb/c de 6 semanas de edad (Harlan Iberica). Las medulas óseas de los fémures y tibias fueron extraídas mediante el paso de DMEM a través del canal óseo. Las células recogidas fueron centrifugadas (a 1500 rpm durante 15 minutos a 4°C), resuspendidas en MesenCult completo [MesenCult™ basal media (StemCell Technologies Inc), Murine Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements (StemCell Technologies Inc), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 200mM de L-glutamina], mantenidas a 37°C, 5% CO₂ y condiciones de hipoxia (2-3% O₂) y sembradas a una densidad de 1x10⁶ células/cm². Tres días después de la extracción, las células fueron lavadas dos veces con DPBS para eliminar las células no adheridas a la placa y el resto fueron mantenidas en cultivo. Cuando las células alcanzaron la confluencia, fueron tripsinizadas y sembradas a una densidad de 5-6x10³ células/cm². Para la realización de los distintos experimentos, fueron utilizadas células a partir del pase 3 o 4 hasta un máximo de pase 10.

3.1.1.6. Células Troncales Mesenquimales Humanas

Las células fueron tripsinizadas, congeladas y descongeladas de forma similar que las BMmMSCs pero con diferencias en su mantenimiento (tabla 2).

3.1.1.6.1. BMhMSCs

Las células humanas troncales mesenquimales derivadas de medula ósea fueron obtenidas de Lonza y mantenidas en DMEM con bajo contenido en glucosa (1,0 g/l) suplementado con 10% de FBS (Lonza, Lot.7SB00015), una solución de 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina y 200mM de L-glutamina, a 37°C, 5% CO₂ y

condiciones de hipoxia (2-3% O₂).

3.1.1.6.2. hASCs

Las células humanas troncales mesenquimales de aspirados grasos fueron obtenidas de Invitrogen (Life Technologies) y mantenidas en MesenPro RS Basal Medium y MesenPro RS Growth Supplement (Gibco), una solución de 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin y 200mM de L-glutamina, a 37°C y 5% CO₂.

3.1.1.6.3. hESSCs

La línea de células humanas troncales mesenquimales derivadas de estroma de endometrio (hESSCs o ICEs) fueron cedidas por el Dr. Carlos Simón del IVI Valencia. Las células fueron mantenidas en DMEM F-12 suplementado con 10% de FBS (Gibco, Lot.41Q1100K), una solución de 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin y 200mM de L-glutamina, a 37°C, 5% CO₂ y condiciones de hipoxia (2-3% O₂). Las placas de cultivo fueron tratadas previamente con gelatina (Sigma) al 0,1% en PBS.

3.1.1.6.4. hEESCs

Las células humanas troncales mesenquimales derivadas de epitelio de endometrio (hEESCs o ICEp) fueron igualmente cedidas por el Dr. Carlos Simón del IVI Valencia y mantenidas de idéntica forma que las hESSCs, como previamente se describió en el apartado anterior.

3.1.1.6.5. hAMCs

Las células humanas troncales mesenquimales derivadas de placenta fueron obtenidas de la compañía CET (Cellular Engineering Technologies) y mantenidas en DMEM con alto contenido en glucosa (4,5g/l) suplementado con 10% de FBS (Lonza, Lot.7SB00015), 10ng/ml de hFGFb (Gibco), una solución de 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin y 200mM de L-glutamina, a 37°C y 5% CO₂.

3.1.1.7. Células Humanas Inducidas Pluripotentes

Las células humanas troncales inducidas pluripotentes o hiPSCs (del inglés, human induced pluripotent stem cells) fueron cedidas por Austin Smith (University of Cambridge, UK). La generación de las hiPSCs fue realizada mediante el uso de retrovirus, los cuales fueron producidos mediante transfección de células HEK293T con cuatro vectores pMXs conteniendo los genes humanos OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC (plásmidos 17217, 17218, 17219, 17220 obtenidos de Addgene) en combinación con el vector pUMVC, que contiene la región gag-pol "MuLV" (plásmido 8449 obtenido de Addgene) y el vector pCMV-VSV-G con la región env "VSV" (plásmido 8454 obtenido de Addgene). Las transfecciones se realizaron en medio DMEM suplementado con FBS al 10%. Después de 48-72 horas, se recogieron los sobrenadantes y se pasaron a través de un filtro de 0,45µm y se concentraron mediante el uso de una columna (Millipore), que posteriormente se utilizaron para infectar $1,5 \times 10^5$ fibroblastos humanos en presencia de 8µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich). Después de 6 días, las células fueron sembradas sobre una monocapa de fibroblastos PN3 inactivados (5×10^4 células en placa de 100mm) y mantenidas durante 4 semanas en medio de células embrionarias humanas (Gibco). Transcurrido ese tiempo, se picaron manualmente las colonias de hiPSCs. Los fibroblastos PN3 inactivados son necesarios para el crecimiento y mantenimiento de las hiPSCs. Para inactivar los fibroblastos PN3, estos fueron tratados con 10 µg/ml de mitomicina C (Sigma). Después de 24 horas, los fibroblastos inactivados se lavaron con PBS.

De manera rutinaria, las hiPSCs fueron mantenidas en DMEM knockout, 15% de suero knockout (GIBCO), una solución de 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, 200mM de L-glutamina, 1X NEAA (aminoácidos no esenciales), 0,1 mM de β-mercaptoetanol, 10 ng/ml de hFGFb (factor de crecimiento básico de fibroblastos humano) a 37°C, 5% CO₂. Tanto el DMEM knockout como el suero knockout presentan formulaciones definidas para el mantenimiento de las células en condiciones ideales sin la presencia de factores que puedan promover la diferenciación de las mismas.

TIPO MSCS				CONDICIONES MEDIO				CONDICIONES INCUBADOR	
Nombre	Especie	Origen	Tratamiento Placa	Medio Básico	Suplementos	FBS (10%)	Otros	Tª(°C)/CO ₂ (%)	O ₂
BMhMSCs	Humano	Lonza y Gibco	-	DMEM bajo en glucosa (1,0gr/l)	pen/strep 1% AmphB 1% L-glu 200mM	FBS LONZA Lot#7SB0015	-	37/5	Hipoxia (2-3%)
hASCs	Humano	Gibco	-	MesenPro RST™ Basal Medium (Gibco)	pen/strep 1% AmphB 1% L-glu 200mM	MesenPro RST™ Growth Supplement (Gibco)	-	37/5	Normoxia (20%)
hEESCs	Humano	IVI Valencia (Dr. Carlos Simón)	Gelatina 0,1%	DMEM F-12	pen/strep 1% AmphB 1% L-glu 200mM	FBS Gibco Lot#41Q1100K	-	37/5	Hipoxia (2-3%)
hESSCs	Humano	IVI Valencia (Dr. Carlos Simón)	Gelatina 0,1%	DMEM F-12	pen/strep 1% AmphB 1% L-glu 200mM	FBS Gibco Lot#41Q1100K	-	37/5	Hipoxia (2-3%)
hAMCs	Humano	CET (Cellular Engineering Technologies)	-	DMEM alto en glucosa (4,5gr/l)	pen/strep 1% AmphB 1% L-glu 200mM	FBS LONZA Lot#7SB0015	hFGF-b 10ng/ml	37/5	Normoxia (20%)
mBM-MSCs	Ratón	Ratones hembras Balb/c de 6 semanas de edad	-	MesenCult® MSC Basal Medium (Stem Cell Technologies)	pen/strep 1% AmphB 1% L-glu 200mM	MSC Stimulatory Supplements (Stem Cell Technologies)	-	37/5	Hipoxia (2-3%)

Tabla 2: Condiciones de cultivo *in vitro* para el mantenimiento de las MSCs.

3.1.2. Citometría de flujo

De forma general y para cada uno de los estudios realizados por citometría de flujo, las células a analizar fueron divididas en grupos de 10^5 células incluyendo los controles de isotipo. Para ello fue utilizado un FACS Aria y el programa FACSDIVA 5.0.1 (BD Biosciences). Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario durante 20 minutos a 4°C. Trascurrido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario no unido y en caso de marcaje indirecto, se incubaron durante otros 20 minutos a 4°C y en oscuridad con el anticuerpo secundario. Después se realizaron dos lavados para eliminar el exceso de anticuerpo secundario no unido y las células se resuspendieron en 300 μ l de PBS. Los anticuerpos secundarios se utilizaron conjugados con ficoeritrina o PE (BD Pharmingen), isocianato de fluoresceína o FITC (BD Pharmingen), rodamina o TRITC (Molecular Probes) y AlexaFluor®488 (Chemicon) y preparados a una solución de trabajo de 0,1 μ g/ μ l.

3.1.2.1. Análisis del perfil de integrinas y CAR

Los niveles de expresión de los receptores CAR en las células fue evaluado utilizando el anticuerpo anti-CAR (H-300) de Millipore. Para la caracterización del perfil de integrinas se usó el anticuerpo anti-integrina $\alpha\beta 3$, clon LM609 (Chemicon) y el anti-integrina $\alpha\beta 5$, clon P1F6 (Chemicon).

3.1.2.2. Análisis de la expresión de GFP

Para evaluar los niveles de expresión de GFP de las diferentes muestras, las células fueron fijadas en formaldehído al 1% (Sigma-Aldrich). El equipo empleado para el análisis fue un FACSCalibur (BD Biosciences) y los datos fueron analizados con el programa CellQuestPro (BD Biosciences).

3.1.2.3. Caracterización de la expresión de marcadores de superficie de las MSCs

Las MSCs fueron caracterizadas analizando la expresión de una combinación de marcadores de superficie. Los marcadores positivos analizados fueron CD90, CD73, CD105, Stro-1, CD9, CD13 y Sca-1 y los negativos fueron CD45, CD31 y HLA-DR.

Marcador	Especie	Casa Comercial	Fluorocromo Conjugado
Sca-1	Ratón	BD Pharmigen	-
CD73	Ratón	EBioscience	-
CD45	Ratón	BD Pharmigen	-
CD31	Ratón	BD Pharmigen	-
CD105	Ratón	Santa Cruz Biotechnology Inc.	-
CD13	Humano	Immunostep	FITC
CD34	Humano	BD Biosciences	PerCP/Cy5.5
CD9	Humano	Millipore	PE
CD45	Humano	BD Biosciences	PerCP/Cy5.5
CD73	Humano	BD Biosciences	PE
CD90	Humano	BD Biosciences	PE
CD105	Humano	R&D Systems	FITC
HLA-DR	Humano	Immunostep	APC
Stro-1	Humano	BioLegend	AlexaFluor® 647

Tabla 3: Anticuerpos empleados para la caracterización de MSCs. Para la caracterización de MSCs murinas se empleó marcaje indirecto. Para la caracterización de MSCs humanas se empleó marcaje directo. Los fluorocromos conjugados utilizados fueron: FITC o isocianato de fluoresceína (490-525nm), PE o ficoeritrina (490;565-578nm), AlexaFluor® 647 (650-665nm), APC o Aloficocianina (650-661nm), PerCP o complejo de peridinina-clorofila (490-675nm) y Cy5.5 (649-670nm).

3.1.3. Diferenciación *in vitro*

Para comprobar el estado multipotente de cada una de las líneas de MSCs y continuar con la caracterización de las mismas, se evaluó su habilidad *in vitro* de diferenciación tanto adipogénica como osteogénica.

3.1.3.1. Diferenciación adipogénica

Para inducir la adipogenesis, las MSCs fueron sembradas a una densidad de 2.1×10^4 células/cm² y mantenidas con cada uno de sus medios de cultivo y condiciones de crecimiento. Una vez alcanzada una confluencia mayor al 80%, los medios fueron

sustituidos por el medio inductor de adipogenesis y las células fueron mantenidas a 37°C, 5% CO₂ y en condiciones de normoxia durante 21 días. En caso de MSCs murinas, como medio inductor de la adipogénesis se utilizó medio MesenCult® murino junto con suplementos murinos estimuladores de adipogénesis (Stem Cell Technologies). En caso de MSCs humanas, como medio inductor se empleó el kit de diferenciación adipogénica STEMPRO® (Gibco). Los controles de la diferenciación fueron mantenidos en cada uno de sus medios de cultivo. La formación de vesículas características de la diferenciación adipogénica fue evaluada mediante tinción con Oil Red O (Sigma-Aldrich). Para ello, una vez finalizada la diferenciación, se realizaron dos lavados de las células con DPBS y se fijaron con formalina al 10% en PBS durante una 30 minutos a temperatura ambiente (rt). Trascurrido ese tiempo, las células se lavaron dos veces con H₂O, se incubaron con isopropanol al 60% durante 3 minutos y posteriormente con la solución de trabajo Oil Red O [Solución de trabajo Oil Red O: 3 partes de la solución stock Oil Red O (0,3% en isopropanol al 99%) y 2 partes de H₂O] durante 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, las células se lavaron cuatro veces con H₂O y se dejaron secar.

3.1.3.2. Diferenciación osteogénica

Para inducir diferenciación osteogénica, las MSCs fueron sembradas a una densidad de 3.1×10^3 células/cm² y mantenidas con cada uno de sus medios de cultivo y condiciones de crecimiento. Después de 24 horas, los medios fueron reemplazados por el medio de inducción osteogénico (DMEM, 10% FBS, 100 U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomina, 200mM de L-glutamina, 50µg/ml de ácido ascórbico [Stem Cell Technologies], 100nM de dexametasona, y 10mM de beta-glicerofosfato disódico hidratado [Sigma-Aldrich]) y mantenidos a 37°C, 5% CO₂ y condiciones de normoxia. La diferenciación fue inducida durante un periodo de dos semanas. Los controles de la diferenciación fueron mantenidos en cada uno de sus medios de cultivo. La acumulación de fosfato cálcico mineralizado en las células y por consiguiente, la formación de osteocitos, fue evaluada por tinción con Alizarin Red S (Sigma-Aldrich). Para ello, una vez finalizada la diferenciación, se realizaron dos lavados de las células con DPBS y se fijaron con formalina al 10%. Después, se incubaron con una solución al 2% de Alizarin Red S (pH4) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar, las células se lavaron con H₂O y se dejaron secar.

3.1.4. Ensayos para determinar la viabilidad, toxicidad y proliferación celular

Para determinar la viabilidad celular, una vez establecidas las condiciones *in vitro* de las células a ensayar, se realizaron diferentes ensayos.

3.1.4.1. Ensayo mediante exclusión con azul tripán

El azul tripán es un colorante soluble en agua, altamente tóxico, que posee grupos cargados amino y sulfato, capaz de teñir de color azul solamente las células muertas o aquellas en las que la membrana celular ha sido dañada o fragmentada. Sin embargo, las células vivas son capaces de excluir activamente este colorante y, por tanto, mantienen su color original. Para llevar a cabo el ensayo, las células se tripsinizaron, centrifugaron y el precipitado celular se resuspendió en una pequeña cantidad de medio (doble del volumen del precipitado celular). A un volumen de la suspensión celular se añadió una relación 1:1 de solución de azul tripán al 0,4% (Sigma-Aldrich) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se realizó un recuento celular. Para el cálculo del porcentaje de células vivas se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = [\text{Total células viables} / (\text{Total células (viables y muertas)})] \times 100$$

3.1.4.2. Ensayo mediante alamarBlue®

El método del alamarBlue®, cuyo principal componente es la resazurina (Invitrogen, Life Technologies) funciona como indicador de la viabilidad utilizando la actividad redox que tiene lugar en el citosol celular. La resazurina es un componente no tóxico, permeable y de color azul sin actividad fluorescente. En el interior celular, la resazurina es transformada en resofurina, compuesto de color rojo y con actividad fluorescente que emite a 590nm. De forma breve, se sembraron 10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocilos. Se añadió un volumen de alamarBlue® en relación 1:10 en el medio total del pocillo y las células se incubaron durante 4 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo, la placa fue analizada a una absorbancia de 590nm.

3.1.5. Ensayo de migración celular

Este método está basado en la observación, tras la generación de un espacio en una monocapa confluyente de células, de la capacidad de las células de colonizar el espacio generado (Assay & Cory, 2011; Liang, Park, & Guan, 2007). Para ello, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y dejadas llegar hasta aproximadamente el 80% de confluencia. Mediante una punta de pipeta p200, se realizaron hendiduras de aproximadamente 1mm de grosor en la monocapa celular. Las células fueron lavadas con DPBS para eliminar los restos celulares. En los pocillos control, las células se mantuvieron con su medio de cultivo normal. En los pocillos a ensayar, las células se mantuvieron con medio condicionado tumoral proveniente de células A549. Este fue preparado manteniendo durante 24 horas células A549 en medio de cultivo de cada célula a ensayar y posteriormente filtrado con filtros de 0,22µm. La velocidad de colonización celular del espacio libre formado fue evaluado a través de la toma de imágenes a diferentes intervalos de tiempo y analizado con el programa Imaging Plus 2.0.23 (Motic).

3.1.6. Vectores Adenovirales

3.1.6.1. Infección adenoviral

Para la realización de una infección con adenovirus a una determinada multiplicidad de infección o MOI, primero se sembraron las células a la densidad celular deseada (80% de confluencia) y se mantuvieron en su medio de cultivo durante 16-24 horas o hasta que las células se adhirieron a la superficie de la placa. Posteriormente, el volumen de adenovirus a emplear se diluyó en medio libre de FBS y se añadió a las células agitando suavemente para repartirlo por toda la placa. El volumen de este medio de infección a utilizar, fue 1/4 del volumen final total en el que se incubaba finalmente la placa. Las células se incubaron a 37°C durante 30-45 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añadió medio fresco hasta completar el volumen final total y se incubaron a 37°C hasta que las células fueron utilizadas. Para calcular el volumen de adenovirus empleado en la infección se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen virus } (\mu\text{l}) = ([A \text{ pFUs/célula}] \times [n^\circ \text{ células sembradas}] \times [1000\mu\text{l}]) / B \text{ pFUs}$$

donde [A pFUs/célula] corresponde a multiplicidad de infección viral o cantidad de partículas infecciosas por célula (MOI) a la que hicimos la infección y [B pFUs] que corresponde al título del adenovirus que empleamos.

3.1.6.2. Adenovirus

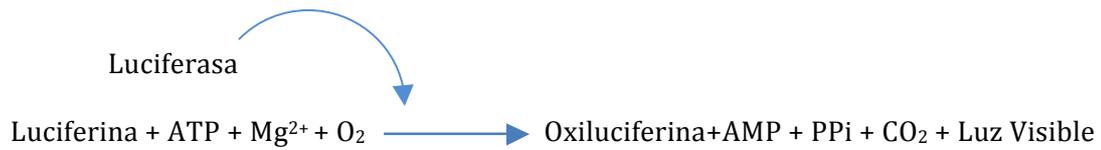
Todos los adenovirus recombinantes empleados pertenecen al serotipo 5 y son deficientes en replicación debido a la delección en los genes E1 y E3 (dE1/E3). El gen E1 es esencial para el ensamblaje de los viriones y es complementado *in vivo* por líneas de células empaquetadoras, como por ejemplo la línea HEK293. El gen E3 codifica para proteínas relacionadas con la evasión de la respuesta inmune siendo un gen dispensable. Estas delecciones no solo los hace incapaces de replicarse por sí mismos, si no que también crea un espacio en el genoma adenoviral de 7,5 kb para incluir ADN foráneo y generar así nuevos adenovirus recombinantes.

3.1.6.2.1. Adenovirus GFP

El adenovirus GFP (AdGFP) que codifica para la proteína verde fluorescente GFP (del inglés, *Green Fluorescence Protein*) y cuya expresión se encuentra bajo el control del promotor de CMV (citomegalovirus) fue inicialmente obtenido de Vector BioLabs con un título viral de 10^{10} pFUs/ml. La expresión de GFP muestra un espectro de excitación a 395-475nm y de emisión a 509nm.

3.1.6.2.2. Adenovirus fLuc

El adenovirus fLuc (AdfLuc) codifica para el enzima luciferasa de luciérnaga (del inglés, *firefly luciferase*) y su expresión se encuentra bajo el control del promotor de CMV (Vector BioLabs). Los títulos virales empleados durante todo el trabajo fueron: (i) 10^{10} pFUs/ml; (ii) $3,8 \cdot 10^{10}$ pFUs/ml; y (iii) $5,8 \cdot 10^{10}$ pFUs/ml. Las reacciones de bioluminiscencia generadas por las diversas luciferasas consisten en la capacidad de estas por oxidar un sustrato, la luciferina (Promega), con el oxígeno molecular, formando un peróxido intermediario que se excinde casi de inmediato, lo que genera una molécula en estado excitado o de alta energía (oxiluciferina). Cuando esta molécula regresa al estado fundamental, emite un fotón (luz visible) que podemos detectar.



3.1.6.2.3. Adenovirus Cre

El adenovirus Cre (AdCre) codifica para la recombinasa Cre cuya expresión se encuentra bajo el control del promotor de CMV (Vector BioLabs). Los títulos virales empleados durante todo el trabajo fueron: (i) $4,5 \cdot 10^{10}$ pFUs/ml; (ii) $3,6 \cdot 10^{10}$ pFUs/ml; y (iii) $4,28 \cdot 10^{10}$ pFUs/ml. La recombinasa Cre es una topoisomerasa de tipo I originalmente aislada del bacteriófago P1 que forma parte del sistema Cre/LoxP de "recombinación específica de sitio". Cre cataliza la reacción de recombinación entre dos sitios loxP, que tiene como consecuencia la eliminación del ADN comprendido entre ambos sitios. LoxP es una secuencia de ADN de 34 bp que confiere direccionalidad. La recombinasa Cre es usada como una herramienta de ingeniería genética para modificar genes, como por ejemplo la eliminación de un segmento de ADN que se encuentre flanqueado por dos sitios LoxP en células o animales experimentales.

3.1.6.2.4. Adenovirus hNIS

El adenovirus hNIS (AdhNIS o Ad10) fue generado mediante el sistema AdEasy (He, 1997), el cual emplea la eficaz maquinaria de recombinación homóloga de *E. coli* y evita la manipulación del genoma adenoviral. Para ello se emplean dos vectores o plásmidos, un primer vector de transferencia o *shuttle* (pShuttle) donde se introducen los elementos deseados, en este caso el ADNc correspondiente al hNIS, y un segundo vector (pAdEasy-1) en el que se encuentra el genoma adenoviral con los genes E1 y E3 delecionados. Y mediante un evento de doble recombinación contranfectando con ambos vectores, generamos un vector adenoviral deficiente en replicación que transfectándolo en una línea de células empaquetadoras se generan los adenovirus recombinantes. Concretamente fue utilizado el *AdEasy™ Adenoviral Vector System* (Qiagen). Este adenovirus fue diseñado y amablemente cedido por el Dr. George Vassaux (INSERM, Niza).

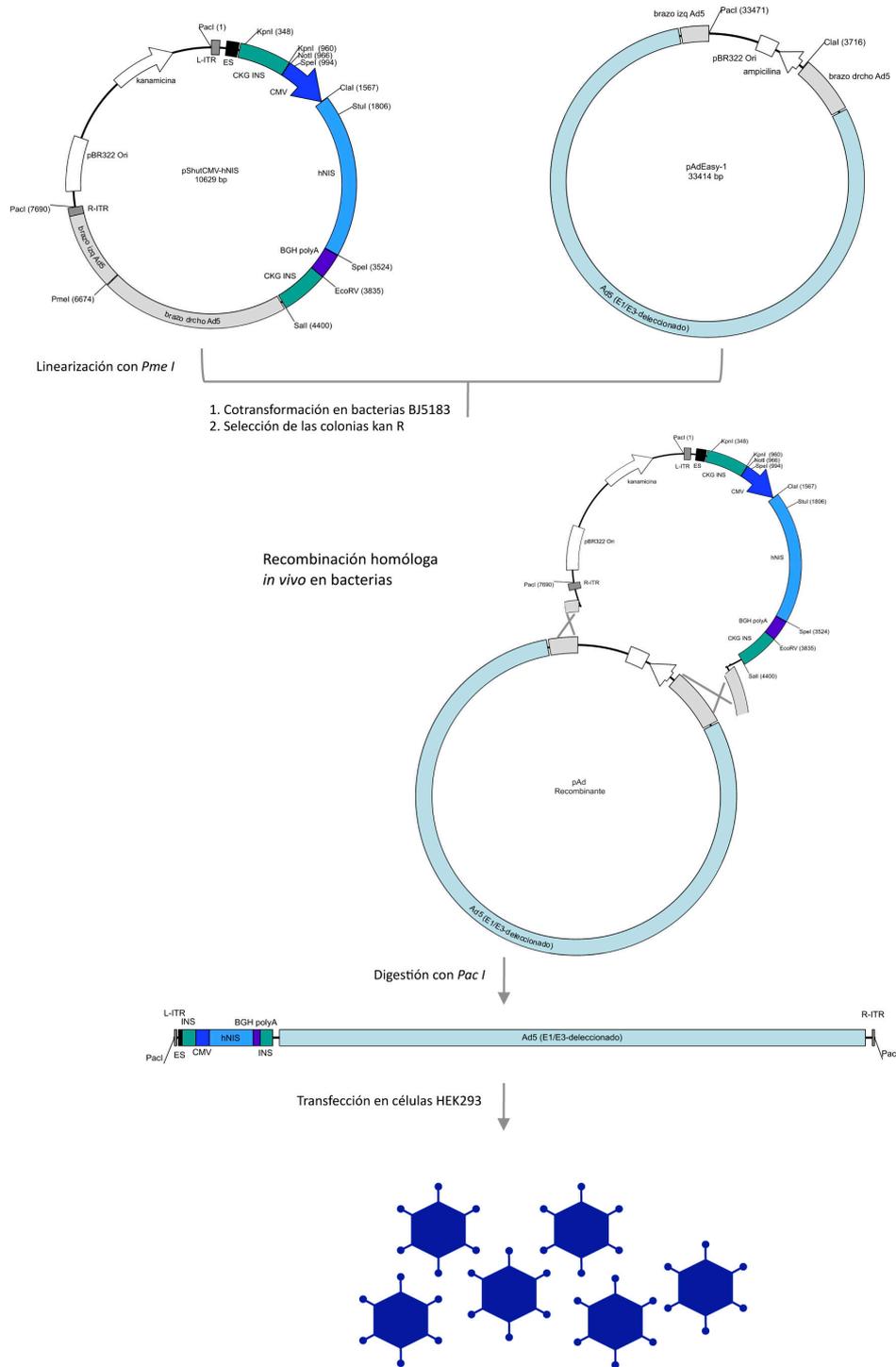


Figura 11: Esquema general del sistema AdEasy mediante el cual se generó el AdhNIS.

3.1.6.3. Amplificación y purificación de las partículas virales

Inicialmente las células HEK293 fueron sembradas en una placa de 60mm al 60% de confluencia e infectadas con el adenovirus a una multiplicidad de infección (MOI) adecuada. Las células infectadas fueron mantenidas durante 2-5 días hasta que se observó efecto citopático completo. Después se recogieron las células y se sometieron a tres rondas de congelación en nitrógeno líquido/descongelación a 37°C y posterior centrifugación. Para continuar con la amplificación del adenovirus, el procedimiento se realizó de forma secuencial. El sobrenadante resultante de la infección de la placa de 60mm se utilizó primero para infectar una placa de 100mm de células HEK293 sembradas al 80% de confluencia. Los siguientes pases fueron realizados en frascos de 75cm², en frascos de 175cm² y por último en un *hyperflask*[®] (Corning) cuya área de crecimiento celular corresponde a 1720cm². El *hyperflask* fue incubado durante 48-72h hasta que se observó efecto citopático completo. Las células fueron recogidas y centrifugadas durante 10 minutos a 1.500rpm. La purificación fue realizada utilizando dos métodos distintos, mediante (i) kit comercial *Adeno-X Maxi Purification*[®] (Clontech Laboratories, Inc.) y (ii) gradiente de cloruro de cesio, que son descritos a continuación.

3.1.6.3.1. Purificación empleando *Adeno-X Purification Kit*[®]

El sedimento celular obtenido fue resuspendido en 5ml de medio DMEM y posteriormente sometido a tres rondas de congelación en nitrógeno líquido/descongelación a 37°C y centrifugado durante 15 minutos a 3.000rpm. Para reducir la viscosidad del lisado, al sobrenadante resultante fue añadido 5µl de nucleasa Benzonase[®] e incubado durante 30 minutos a 37°C. Después se añadió al lisado el mismo volumen (5ml aproximadamente) de 1X tampón de dilución y se hizo pasar por un filtro de 0,45µm. Para iniciar la purificación, el primer paso fue equilibrar la columna de purificación con 5ml de 1X tampón de equilibrio a un flujo de 3ml/min (1 gota/seg). La columna de purificación consta de una jeringuilla de 20ml, un filtro *Adeno-X Purification*[®] y un tubo de entrada. Una vez equilibrada la columna, se hizo pasar por ella el lisado filtrado a un flujo aproximadamente de 3ml/min para permitir que el adenovirus se uniera a la membrana del filtro *Adeno-X Purification*[®]. Una vez unido, primero se hizo pasar por la columna 20ml de 1X tampón de lavado para lavar la membrana donde el adenovirus estaba unido y después 3ml de tampón TSG

reteniendolo en el filtro *Adeno-X Purification*[®] durante 5 minutos a 37°C y para finalmente eluir el adenovirus. El eluido se alicuotó y fue mantenido a -80°C.

3.1.6.3.2. Purificación mediante gradiente de cloruro de cesio

El sedimento celular obtenido tras realizar la última centrifugación, fue resuspendido en 28ml de tampón Tris 0,1M a pH 8,0 y posteriormente sometido a tres rondas de congelación en nitrógeno líquido/descongelación a 37°C y centrifugado durante 15 minutos a 4.500rpm. Al finalizar, se desechó el pellet, se guardó el sobrenadante y se prepararon los gradientes de cloruro de cesio (CsCl) en tampón TD. Para ello, se utilizaron tubos Beckman Ultraclear[®] de 30ml. Se añadió primero 11,4ml de CsCl a 1,25g/ml. Después se añadió por debajo de la capa de 1,25g/ml, 7,6ml de CsCl a 1,4g/ml. De esta forma se creó una interfase entre las dos capas de diferente concentración. Después se añadió el sobrenadante adenoviral (14ml por tubo) encima de la doble capa de CsCl. Para equilibrar los tubos fue utilizado tampón Tris 0,1M a pH 8,0. Los tubos se centrifugaron a 25.000rpm y a 15°C durante 2 horas. Al finalizar la centrifugación en los tubos podía observarse 3 bandas: (i) la banda inferior, que corresponde al adenovirus; (ii) una suave banda intermedia, que corresponde a los viriones vacíos; y (iii) la banda superior, que corresponde a restos celulares. Con una jeringuilla de 5ml y una aguja de calibre 21G (0,8 x 25mm), se pinchó el tubo por debajo de la banda superior, la correspondiente al adenovirus, y se aspiró. Se obtuvieron 4-5ml de volumen. El total de volumen obtenido de cada tubo, se dividió y añadió a dos nuevos tubos Beckman Ultraclear[®] de 5ml. A los que después se les añadió CsCl a 1,35g/ml hasta medio centímetro al borde del tubo. Para equilibrar los tubos fue utilizado de nuevo tampón Tris 0,1M a pH 8,0. Los tubos se centrifugaron a 40.000rpm y a 15°C durante 18 horas. Al finalizar esta segunda centrifugación, en los tubos solo pudo observarse una banda que correspondía al adenovirus (3-4 ml), la cual se aspiró, se le añadió 2 veces su volumen de tampón TSG y se inyectó en un cassette de diálisis (Thermo) y se incubó a 4°C, con 2 litros de tampón de diálisis en agitación suave durante 24 horas. Se aspiró el adenovirus del cassette de diálisis y el volumen se alicuotó y se almacenó a -80°C.

Soluciones:

· **Tampón de diálisis (pH 7,4):** 10mM de Tris pH 7,4, 1mM de MgCl₂, 150mM de NaCl y 10% de glicerol.

- **Tampón TSG:** 90ml de solución A + 450µl de solución B + 38,5ml de glicerol.
 - Solución A (pH 7,4): 150mM de NaCl, 1mM Na₂HPO₄, 5mM de KCl, 30mM de Tris, H₂O.
 - Solución B: 200mM MgCl, 180mM de CaCl₂ y H₂O.
- **Tampón TD:** 14mM de NaCl, 0,7mM Na₂HPO₄, 5mM de KCl, 25mM de Tris, H₂O

3.1.6.4. Determinación de las partículas adenovirales

Para determinar la concentración de partículas adenovirales, se realizaron diluciones 1:10, 1:25 y 1:50 de la solución adenoviral en PBS con SDS al 5%. Las diluciones fueron incubadas 10 minutos a 56°C con agitación. Durante esta incubación, los viriones son lisados liberando el ADN y las proteínas. Trascorrido ese tiempo, fue medida la absorbancia a 260 nm. Para determinar la concentración de las partículas adenovirales o pv, fue empleada la siguiente fórmula:

$$pv/ml = DO\ 260nm \cdot dilución\ viral \cdot 1,1 \cdot 10^{12}\text{ partículas adenovirales/ml}$$

3.1.6.5. Determinación del título adenoviral

3.1.6.5.1. Determinación del título viral mediante TCID₅₀

El método de la dosis infectiva 50 en cultivo celular o TCID₅₀ (del inglés, *Tissue Culture Infectious Dose 50 Method*) determina la dilución más alta que provoca el 50% de efecto citopático en el cultivo infectado. Para determinar el título adenoviral mediante este método, se sembraron células HEK293 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10⁴ células/pocillo. Después de 24 horas, se realizaron infecciones mediante diluciones seriadas desde 10⁻¹ a 10⁻¹² de la solución adenoviral, 10 pocillos por dilución e incubadas a 37°C durante 10 días. La presencia de efecto citopático por dilución fue evaluado y establecido como ratios de 1. El valor de TCID₅₀ fue calculado usando la fórmula del método estadístico de Karber:

$$T = 10^{[1+1(\text{Suma de los ratios} - 0,5)]+1} = TCID_{50}/ml$$

Y convertido a pFUs/ml mediante la siguiente fórmula:

$$\text{pFUs/ml} = (\text{TCID}_{50}/\text{ml})/10^{0,7}$$

3.1.6.5.2. Determinación del título adenoviral mediante *Adeno-X Rapid Titer Kit*[®]

Un segundo método empleado para determinar el título adenoviral fue el kit comercial *Adeno-X Rapid Titer Kit*[®] (*Clontech Laboratories, Inc*) mediante la detección de la proteína del hexon producida en las células infectadas. Para ello, se sembraron células HEK293 en una placa de 24 pocillos a una densidad de $2,5 \cdot 10^5$ células/pocillo. Se realizaron infecciones mediante diluciones seriadas desde 10^{-2} a 10^{-10} de la solución adenoviral por duplicado y fueron incubadas a 37°C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, las células fueron fijadas con metanol frío al 100% y mantenidas durante 10 minutos a -20°C. Se realizaron tres lavados con una solución de PBS con BSA al 1% y se incubaron con el anticuerpo primario *Mouse Anti-Hexon Antibody* durante 1 hora a 37°C. Después se realizaron otros tres lavados con la solución de PBS con BSA al 1% y las células se incubaron con el anticuerpo secundario *Rat Anti-Mouse HRP* conjugado con peroxidasa de rábano picante (*HRP; del inglés, horseradish peroxidase*), durante 1 hora a 37°C. Por último, una vez terminada la incubación con el anticuerpo secundario, las células se lavaron tres veces con la solución de PBS con BSA al 1% y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución del sustrato (DAB; 3,3'-diaminobenzidina), originándose coloración marrón debida a la oxidación del sustrato en las células donde se está produciendo proteína del hexon y por tanto, replicación adenoviral. El valor del título adenoviral (pFUs/ml) de cada pocillo fue calculado usando la fórmula la siguiente fórmula:

$$\text{pFUs/ml} = (\text{células infectadas/campo}) \times (\text{campo/pocillo}) / (\text{volumen Ad [ml]}) \times \text{factor dilución}$$

siendo 313 el valor del campo para una placa de 24 pocillos (área del pocillo de 2,0 cm²) utilizando un objetivo de 20x.

3.1.6.6. Ensayo de infectividad

Para la realización del ensayo de infectividad, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de $5 \cdot 10^4$ células/pocillo. La eficiencia a distintas multiplicidades de infección (10, 100, 500 y 1000 MOIs) fue evaluada a 24, 48 y/o 72 horas tras la infección de las células con cada uno de los adenovirus. Cada infección se realizó por triplicado.

3.1.6.7. Ensayo de captación de I^{125}

Para la realización del ensayo de captación de I^{125} , las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 2×10^4 células/pocillo e infectadas con el Ad10 a distintas multiplicidades de infección y por triplicado. Tras 72 horas, cada pocillo fue expuesto a una solución de PBS suplementada con 140mM de NaCl, 20 μ M de IK y 10 μ Ci/ μ mol de I^{125} . Los pocillos control fueron expuestos a una solución de 100 μ M de NaClO₄ para inhibir el flujo de yodo mediado por hNIS. Las células fueron incubadas durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se realizaron varios lavados rápidos con PBS frío y se incubó durante 20 minutos con 0,3ml de etanol absoluto frío a 4°C. Los sobrenadantes se añadieron en tubos de 0,5ml y se analizaron en un contador de centelleo gamma (*γ -counter*). Los resultados fueron expresados como acumulación de I^- (pmoles/ μ g ADN). Para poder normalizar los resultados obtenidos del ensayo de captación de I^{125} se realizó una curva patrón de ADN y se sembraron 2×10^4 células/pocillo de las células empleadas en el ensayo. El ADN se precipitó añadiendo 0,5ml de ácido tricloroacético o TCA al 5% durante 1 hora a 4°C. Después se aspiró el TCA y se añadió a cada pocillo y a la curva patrón la solución de DPA [20ml DPA (490ml ácido acético, 10ml ácido sulfúrico, 5g de difenilamina), 8ml agua, 100 μ l acetaldehído al 1% en agua]. Un volumen de 250 μ l de cada muestra fueron transferidos a una paca de 96 pocillos y medido a 595nm.

3.1.6.8. Determinación de la expresión de bioluminiscencia *in vitro*

Para la realización del ensayo, las células fueron sembradas en placas de 48 pocillos a una densidad de $2 \cdot 10^4$ células/pocillo e infectadas con el AdfLuc a distintas multiplicidades de infección (200, 500 y 1000 MOIs) y por triplicado. Tras 48 horas, 100 μ l de luciferina (Promega) a una concentración final de 150 μ g/ml fue añadida a cada pocillo, la cual generó una reacción de bioluminiscencia. Los niveles de expresión

de luciferasa fueron evaluados mediante el uso del escaner IVIS Lumina y analizadas mediante el software Living Image 4.0 (Xenogen, Caliper).

3.1.7. Transferencia adenoviral

3.1.7.1. Transferencia adenoviral usando derivados de polietilenimina

Las transferencias o “transfecciones” adenovirales mediante el uso de derivados de polietilenimina (PEI) y mediante derivados de polietilenimina conjugados con el péptido RGD (PEI-RGD), ambas formulaciones no lipídicas, se realizaron siguiendo las indicaciones del producto (Polyplus transfection™, France). Entre 16-24 horas previas a la transfección, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad celular de 10^5 células/pocillo. La preparación de los complejos adenovirales a transfectar, Ad/PEI y Ad/PEI-RGD, fueron realizadas en dos pasos. En el primer paso se prepararon diferentes soluciones: (*solución 1*) en la que se diluyó el derivado de polietilenimina (PEI o PEI-RGD) en una solución de NaCl a 150mM en un volumen final de 100 μ l; (*solución 2*) en la cual, el volumen de adenovirus correspondiente a una determinada MOI, fue diluido en una solución de NaCl a 150mM en un volumen final de 100 μ l. Las cantidades de adenovirus y PEI o PEI-RGD para la formación de los complejos añadidas a las soluciones 1 y 2 anteriormente descritas, fueron calculadas con la siguiente fórmula: $\text{ml de PEI-RGD} = [(\text{mg del ADN adenoviral} \times 3) \times \text{N/P ratio}] / 7,5$; siendo el ratio N/P = 5, el valor idóneo del balance iónico entre los complejos, según las indicaciones del producto. La cuantificación del ADN del adenovirus empleado para la formación de los complejos, fue realizada mediante lectura espectrofotométrica a 260 nm, según lo descrito anteriormente en el apartado 3.1.6.4.

En el segundo paso, la solución 1 fue añadida a la solución 2 (nunca en el orden inverso) obteniendo un volumen total de 200 μ l. La mezcla fue agitada rápidamente con el vortex e incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, los complejos formados fueron añadidos a las células en una relación 1:10 respecto al volumen total de medio del pocillo y mantenidas a 37°C y 5% de CO₂.

3.1.7.2. Transferencia adenoviral usando Effectene®

La transferencia adenoviral mediante el reactivo de transfección Effectene® (QIAGEN, UK) de composición lipídica, fue llevada a cabo según las indicaciones del producto. Entre 16-24 horas previas a la transfección, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad celular de 10^5 células/pocillo. Para la preparación de los completos Ad-Effectene, el volumen de adenovirus correspondiente a una determinada MOI fue diluido en tampón de condensación (*EC buffer*) hasta un volumen final de 150 μ l. Después se añadió a la mezcla el volumen correspondiente de la solución intensificadora (manteniendo una relación de 64 μ l de intensificador por cada 8 μ l de ADN adenoviral). La mezcla fue agitada rápidamente en el vortex e incubada durante 3 minutos a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 4 μ l del reactivo Effectene® a la mezcla, agitada por pipeteo e incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez formados los complejos a transfectar, se añadieron a las células con un volumen final de 2ml por pocillo y mantenidas a 37°C y 5% de CO₂.

3.1.8. Transducción con vector lentiviral LV-GFP

El vector lentiviral LV-GFP fue cedido amablemente por el Dr. Tuan Hay Nguyen (Nantes, Francia) (Dariel et al., 2009). El título del vector lentiviral fue calculado mediante análisis por qPCR de células HeLa transducidas, obteniendo un título de 5×10^9 TU/ml. Las células se sembraron a la densidad celular deseada (80% de confluencia) y se mantuvieron en su medio de cultivo durante 16-24 horas o hasta que las células se adhirieron a la superficie de la placa. La transducción mediante el vector lentiviral LV-GFP fue realizada a 5 MOIs en presencia de 8 μ g/ml de polibreno (Sigma-Aldrich). Seis horas después de la transducción, el medio conteniendo el virus fue eliminado y sustituido por medio completo. Para calcular el volumen de lentivirus empleado en la transducción, se utilizó la misma fórmula descrita en el apartado 3.1.6.1.

3.1.9. Marcaje con nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIO)

El marcaje *in vitro* de células con nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro o SPIO se realizó como previamente describió el doctor Tobias D. Henning et

al. El SPIO utilizado fue Endorem, que consiste en una solución de nanopartículas con un contenido total de hierro de 0,2M (11,16mg Fe/ml). El procedimiento fue el siguiente: Las células se sembraron a una confluencia aproximada del 80%. 24 horas después, se preparó el medio de marcaje (100µg Fe/ml medio sin FBS) y las células se lavaron con PBS y se incubaron con el medio de marcaje durante 2 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se añadió FBS a concentración final del 20% para evitar la diferenciación de las células y se dejaron durante 18 horas (o/n) a 37°C. Por último, las células se lavaron con PBS para eliminar los residuos del marcaje (Henning, Boddington, & Daldrup-Link, 2008).

3.2. Métodos de biología molecular

3.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas las muestras fueron homogeneizadas en tampón RIPA (Sigma) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Protease Inhibitors*) y de fosfatasa (*PhosSTOP phosphatase Inhibitors*) de Roche. Cuando las muestras fueron células, se realizó un lavado previo con PBS y se resuspendieron directamente en 100-150 µl de tampón RIPA en placas de 6 pocillos. En el caso de tejidos, la relación fue de 5ml de tampón RIPA por cada gramo de tejido y se empleó un homogenizador mecánico. En ambos casos, el homogeneizado final se centrifugó durante 10 minutos a 10.000rpm y a 4°C. La cantidad de proteína total del sobrenadante fue cuantificada mediante el método basado en el ácido bicinconicínico o BCA (Pierce). Para ello se construyó una curva de calibrado empleando patrones en un rango de 1 a 20 µg de seroalbúmina bovina (BSA). Las muestras se determinaron por triplicado. Tanto las muestras, la curva y los blancos se añadieron a 200 µl del reactivo concentrado en una placa de 96 pocillos. La placa se incubó durante 30 minutos a 37°C y se procedió a realizar una lectura de absorbancia a 570 nm mediante el equipo Synergy HT (BioTek).

Con los patrones de la curva, se construyó una recta de calibrado. Con la ecuación de esta recta de calibrado, se relacionó la absorbancia de las muestras con la concentración de proteína.

3.2.2. Análisis de muestras por *western-blot*

Esta técnica se empleó con el objetivo de evaluar la expresión de distintas proteínas de interés. Esta metodología consta de dos partes: la separación de las proteínas en función de su peso molecular en un gel SDS-PAGE y la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa, donde finalmente se realiza la inmunodetección con los anticuerpos adecuados. Las muestras en tampón de carga Laemmli fueron hervidas durante 5 minutos a 95°C para la desnaturalización de las proteínas, paso previo necesario para hacer efectiva la separación. Entre 20 y 40µg de extractos de proteínas fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 10%. Los marcadores de pesos moleculares empleados fueron *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas) y *Precision Plus Protein™ Standards* (BIO-RAD). El gel superior o de apilamiento contiene un bajo porcentaje de acrilamida, constante para cada gel y un pH de 6,8, mientras que el gel inferior o de separación tiene un porcentaje de acrilamida mayor, que dependerá del peso de la proteína que se quiera resolver, y un pH de 8,8. Se utilizó el sistema minigel vertical Mini- protean 3 (Bio-Rad). La electroforesis se corrió a 160-180 V, dejando que las muestras migraran hasta que el frente de azul de bromofenol (presente en el tampón de carga Laemmli) saliera del gel. Tras finalizar la electroforesis, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore). La transferencia se realizó a 300 mA durante 2,5 horas en tampón de transferencia. Posteriormente, la membrana se bloqueó durante 1 hora en solución de bloqueo (tampón TBS con 10% de leche desnatada en polvo). Una vez bloqueada la membrana, se incubó con una dilución óptima del anticuerpo primario en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se lavó la membrana con tampón TTBS, tres veces durante 15 minutos, y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP de *horseradish peroxidase*), durante 1 hora a temperatura ambiente, en solución de bloqueo. Finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, se hicieron tres lavados de 15 minutos con tampón TTBS, y por último se reveló la membrana con el sistema basado en quimioluminiscencia ECL plus (Amersham Biosciences). El sistema de captación de imagen utilizado fue el equipo de documentación de geles G-Box Syngene y revelado tradicional con radiografías.

Después de la detección, y cuando fue necesario, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con solución de eliminación 1x (Millipore) durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Transcurrido ese tiempo, las membranas

se incubaron en solución de bloqueo durante 1 hora y se continuó de forma similar a lo anteriormente descrito.

A

Anticuerpo Primario	Peso Molecular	Especie	Concentración	Casa Comercial
Anti-CAR (H-300)	46 kDa	Conejo	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GFP	34 kDa	Ratón	1:3000	Clontech
Anti-GAPDH	30 kDa	Conejo	1:2000	Thermo Scientific
Anti- β -actina	42 kDa	Conejo	1:2000	NeoMarkers
Anti- β -tubulina	55 kDa	Ratón	1:1000	Sigma-Aldrich

B

Anticuerpo Secundario	Molécula Conjugada	Concentración	Casa Comercial
Anti-conejo	HRP	1:2000	Sigma-Aldrich
Anti-ratón	HRP	1:2000	Sigma-Aldrich

Tabla 4: Anticuerpos empleados en los análisis por *western-blot* y sus condiciones. [A] Anticuerpos primarios. [B] Anticuerpos secundarios conjugados con HRP.

Soluciones:

- **Gel apilador o *stacking* (4% Acrilamida):** 130mM Tris-Cl (pH 6,8), 4% de solución comercial de Acrilamida (30% acrilamida/0,8% bis-acrilamida) (Bio-Rad), 0,1% de SDS, 1:50 Solución Persulfato de Amonio (Sigma-Aldrich) en H₂O al 10%, 1:500 solución comercial TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina) (Sigma-Aldrich).

- **Gel separador (7,5% Acrilamida):** 375mM Tris-Cl (pH 8,8), 7,5% de solución comercial de Acrilamida (30% acrilamida/0,8 % bis-acrilamida), 0,1% de SDS, 1:50 Solución Persulfato de Amonio en H₂O al 10%, 1:500 solución comercial TEMED.

- **Tampón de carga Laemmli 2x (Sigma-Aldrich):** 50mM Tris-Cl (pH 6,8), 4% de SDS, 10% de glicerol, 4% de 2-β-mercaptoetanol, 0,001% de azul de bromofenol.
- **Tampón de electroforesis (Bio-Rad):** 25mM Tris-base, 192mM Glicina, 1 % de SDS.
- **Tampón de transferencia (Bio-Rad):** 25mM Tris-base, 192mM Glicina.
- **Tampón salino TBS (Bio-Rad):** 20mM Tris-base, 137mM NaCl, pH 7,6.
- **TTBS:** TBS, 1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich).
- **Solución de bloqueo:** TBS, 10% de leche desnatada en polvo.

3.2.3. Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía de adsorción en presencia de sales caotrópicas, permitiendo a los ácidos nucleicos unirse perfectamente a la membrana de sílica de las columnas, y así, proteínas, metabolitos y otros contaminantes que no se unen, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado. Finalmente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílica mediante tampones de elución con baja concentración de sales (ligeramente alcalinos) o simplemente agua.

3.2.3.1. Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico de tejidos, 25mg de cada una de las muestras fueron sometidas a homogenización mecánica en 180 µl tampón de lisis (*T1*) y posterior adición de 35 µl proteinasa K (23µg/µl). Las muestras se incubaron a 56°C durante 3 horas. Una vez obtenido el lisado, se procedió a continuar el protocolo de extracción con el kit comercial *NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel)* según las indicaciones del mismo.

3.2.3.2. Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total fue empleado el kit comercial *NucleoSpin®RNA II (Macherey-Nagel)* siguiendo las indicaciones del mismo. La cantidad de muestra utilizada fue de 2-3x10⁶ células o 10-15mg de tejido. Cuando las muestras fueron células, se centrifugaron y se resuspendieron directamente en 350µl de tampón de lisis

(RA1) y 3,5µl de β-mercaptoetanol (Sigma). En el caso de tejidos, la homogenización mecánica se realizó en el mismo volumen anterior de tampon de lisis y de β-mercaptoetanol inactivando así las ARNasas y propiciando las condiciones para la adsorción del ARN a la membrana de sílica. El ADN contaminante unido también a la membrana fue eliminado mediante el empleo de una solución de ADNasa recombinante para finalmente eluir solo el ARN.

3.2.4. Cuantificación de ácidos nucleicos

Para determinar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos obtenidos en las extracciones, se realizó la lectura espectrofotométrica, a las longitudes de onda 260 y 280 nm. La relación de las absorbancias obtenidas a 260 nm y a 280 nm (A260/A280) da idea del grado de pureza de la preparación. Con las relaciones A260/A280 ≈ 1,8 para ARN y A260/A280 ≈ 2,0 para ADN, se tiene una buena pureza. Las medidas fueron realizadas con el NanoDrop 2000c Spectrophotometer de Thermo cuyos valores se dirieron en ng/µl.

3.2.5. Electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa

La electroforesis se realizó sobre un soporte sólido de agarosa en tampón TAE (Bio-Rad). A pH neutro, el ADN presenta una carga neta negativa, de manera que, al ser sometido a un campo eléctrico, migra hacia el ánodo. La matriz de agarosa usada nos permite además, separar el ADN en función de su peso molecular. En todos los casos, se prepararon geles 1% (p/v) de Agarosa (Lonza) en tampón TAE 1x con una solución 0,1µg/ml de bromuro de etidio. El bromuro de etidio se intercala en las bases del ADN y permite su visualización al emitir fluorescencia cuando se hace incidir luz ultravioleta (UV). Las muestras de ADN se cargaron en los pocillos del gel mezcladas con tampón de carga (10x). Como marcador de pesos moleculares se utilizaron el marcadores de ADN de 1Kbp y de 100bp (MBiotech). La electroforesis se desarrolló aplicando un voltaje de entre 80 y 100 V. Al finalizar la electroforesis, los geles fueron colocados en un transiluminador UV. La visualización de las bandas de ADN y la adquisición fotográfica se llevó con el sistema G-Box Syngene

3.2.6. Retrotranscripción a partir de ARN total

El ARN total fue extraído de las muestras según como se explica en el apartado 3.2.3.2. Para asegurarse que no hubiese contaminación de ADN genómico y partiendo de 2 µg de ARN, se añadió una solución de 2U (1U/µl) de ADNasa I (Fermentas) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Trascurrido ese tiempo y para inactivar la ADNasa I, se añadieron 2µl de EDTA 25mM a la solución y se incubó durante 10 minutos a 65°C. Se utilizó la transcriptasa reversa *SuperScript II* (Life Technologies) para retrotranscribir el ARN a ADNc. Para ello, el procedimiento a seguir fue (i) a 10 µl de la solución anterior de ARN/ADNasaI se añadieron 3µg de cebadores aleatorios (Life Technologies) y 1 µl de 10mM dNTP's (Life Technologies) y se incubó durante 5 minutos a 56°C, al finalizar la mezcla se mantuvo a 4°C; (ii) a la solución anterior se añadieron 5 µl de una solución de inhibidor de ribonucleasas (40U) o RNasaOUT (Life Technologies) y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente; (iii) de nuevo, a la solución se añadieron 3 µl de una solución de transcriptasa reversa (200U) y la solución se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. El control de la reacción se hizo en paralelo sin añadir la transcriptasa reversa (llamado FRT; falsa retrotranscripción). Por último, la mezcla se incubó 1 hora a 42°C y después durante 15 minutos a 70°C. La solución de ADNc resultante (50ng/µl) se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

3.2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de fragmentos de ADN por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) se utilizaron como molde tanto ADN genómico como ADNc. Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando una mezcla comercial optimizada o *PCR Master Mix*[®] (Promega). Cada mezcla de reacción contenía: 1X *PCR Master Mix* (ADN Taq polimerasa a 50U/ml, dATP a 400µM, dGTP a 400µM, dCTP a 400µM, dTTP a 400µM y MgCl₂ a 3mM y a pH 8,5), 400mM de cebador sentido, 400mM de cebador antisentido, 50-100ng de ADN genómico o ADNc y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 25 µl. En todas las reacciones, se añadió un control negativo, en los cuales la muestra se sustituyó por agua. El equipo empleado para llevar a cabo las reacciones de PCR fue *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycle System* (Life Technologies).

Los cebadores específicos empleados en estas reacciones se detallan en la tabla 5. Los parámetros de los programas de PCR utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN se indican en la tabla 6.

Cebador		Secuencia (5' → 3')	Tamaño del amplicon
GFP	Sentido	TGAGCAAGGGCGAGGAGC	≈700pb
	Antisentido	GGAATTCATATTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	
hNIS	Sentido	CCCATCGATGGAGGCCGTGGAGACCGG	≈1900pb
	Antisentido	CCCATCGATGTCAGAGGTTGTCTCCTGC	
GAPDH	Sentido	TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC	≈1000pb
	Antisentido	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	
GAPDH	Sentido	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT	≈120bp
	Antisentido	CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC	
Cre	Sentido	ATTGCTGTCACTTGGTCGTGGC	≈100bp
	Antisentido	GAAAATGCTTCTGTCCGTTTGC	

Tabla 5: Cebadores específicos empleados en las reacciones de PCR. Los cebadores fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

	Programa PCR	#1	#2	#3
40 ciclos	Desnaturalización previa:	5' a 94°C	2' a 95°C	5' a 94°C
	Desnaturalización:	1' a 94°C	45" a 95°C	1' a 94°C
	Hibridación:	1' a 55°C	45" a 59°C	1' a 58°C
	Extensión:	2' a 72°C	1' a 72°C	1' a 72°C
	Final de la reacción:	10' a 72°C	5' a 72°C	7' a 72°C
	Mantenimiento:	∞ a 4°C	∞ a 4°C	∞ a 4°C

Tabla 6: Parámetros de los programas utilizados para las reacciones de PCR. Programa #1: utilizado para amplificar GFP y hNIS; programa #2 para amplificar GAPDH; y programa #3 para amplificar Cre.

3.2.8. PCR Cuantitativa (qPCR)

Las reacciones de PCR cuantitativas a tiempo real o qPCR miden la cantidad de producto después de cada ciclo de PCR. El cambio en la concentración del ADN de partida es detectado usando moléculas fluorescentes que interaccionan con el ADN. Estos pueden ser fluoróforos que se intercalan en cadenas de ADN de doble hebra o sondas en las que la intensidad cambia como resultado de la amplificación del ADN.

3.2.8.1. qPCR mediante el uso de sondas TaqMan

Todas las sondas TaqMan utilizadas para la amplificación fueron prediseñadas por Applied Biosystems (Life Technologies). Las reacciones fueron realizadas con el equipo *Applied Biosystems 7900 Fast-Real Time PCR System* (Life Technologies) y analizadas con el programa *SDS Software Applied Biosystem 2.2.2*.

Gen	ID del ensayo	Tamaño del amplicon	Fluoróforo
NANOG	Hs02387400_g1	109	FAM
SOX2	Hs01053049_s1	91	FAM
OCT4	Hs00742896_s1	65	FAM
KLF4	Hs00358836_m1	110	FAM
REX1	Hs00358836_m1	102	FAM
18S	4352930E	187	FAM/MGB

Tabla 7: Sondas TaqMan empleadas en las reacciones de qPCR. Las sondas fueron obtenidas de Applied Biosystems (Life Technologies).

La mezcla comercial empleada fue *Taqman Universal Master Mix II no UNG®* (Life Technologies). Cada mezcla de reacción contenía: 1X *Taqman Universal Master Mix II no UNG®* (ADN polimerasa *AmpliTaq Go!®DNA Polymerase Ultra Pure*, dNTPs, fluoróforo de referencia pasiva para normalizar las variaciones en la señal fluorescente y elementos optimizados del tampón de reacción), 2X de sondas TaqMan, 5ng de

ADNc y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 10µl. Los parametros del programa utilizado para la amplificación se detalla en la tabla 8.

	Paso 1:	Incubación UNG	-
	Paso 2:	Desnaturalización previa	10' a 95°C
40 ciclos	Paso 3:	Desnaturalización	15'' a 95°C
		Hibridación-Elongación*	1' a 60°C
			-
	Paso 4:	Curva de disociación	-
			-
			-

Tabla 8: Parámetros del programa utilizado para las reacciones de qPCR con sondas TaqMan.

La detección de la señal se realizó al finalizar el paso de hibridación-elongación de la reacción. Para la cuantificación relativa de los niveles de expresión fue empleado el método de $\Delta\Delta Cq$ (delta-delta-Cq). Los valores Cq, que representan el numero de ciclos necesarios para alcanzar el nivel umbral de señal, fueron normalizados con los valores del gen de referencia 18S. Para ello, primero se calcularon los valores de ΔCq para las muestras y para el control o calibrador:

$$\Delta Cq_{muestra} = Cq_{muestra_{tratada}} - Cq_{referencia_{tratada}}$$

$$\Delta Cq_{calibrador} = Cq_{muestra_{calibrador}} - Cq_{referencia_{calibrador}}$$

Luego se calculó el valor $\Delta\Delta Cq$ para cada muestra, siendo:

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{muestra} - \Delta Cq_{calibrador}$$

Finalmente, los resultados fueron expresados como $2^{-\Delta\Delta Cq}$ o cantidad relativa (RQ) indicando así el cambio en los niveles de expresión entre la muestra y el calibrador.

3.2.8.2. qPCR mediante el uso de SYBRGreen

Para las reacciones fue empleada la mezcla comercial *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Life Technologies). Para evitar amplificación genómica, los cebadores que se indican en la tabla 9, se diseñaron para que compartieran a dos exones separados que flanquean a un intron (Sigma-Aldrich).

Partiendo de una concentración de 50ng/μl de ADNc, se realizaron tres diluciones diferentes de la muestra (1/8, 1/16 y 1/32) por duplicado. Cada mezcla de reacción contenía: 1X *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Fluoróforo *SYBR®Green I*, 60U/ml de ADN polimerasa *Platinum®Taq DNA Polymerase*, 40U/ml de UDG, dNTPs con dUTP en lugar de dTTP, ROX como fluoróforo de referencia pasiva para normalizar las variaciones en la señal fluorescente y elementos optimizados del tampón de reacción), 400mM del cebador sentido, 400nM del cebador antisentido, 2μl de dilución correspondiente de ADNc y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 20μl. Las reacciones fueron realizadas con el equipo *Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System* (Life Technologies) y analizadas con el programa *SDS Software Applied Biosystem v1.4*. Los parámetros del programa utilizado para la amplificación se muestran en la tabla 10.

Cebador	Acceso a GenBank		Secuencia (5' → 3')
CXCR4	NM_003467	Sentido	TGGCCGACCTCCTCTTTGT
		Antisentido	AGTTTGCCACGGCATCAACT
SDF-1 (CXCL12)	NM_000609	Sentido	CCAAGTCAAGCATCTCAAATT
		Antisentido	AGCCGGGCTCAATCTGAAG
RANTES (CCL5)	NM_002985	Sentido	TGCCACATCAAGGAGTATTTCTA
		Antisentido	GCACACACTGGCGGTTCT
MDC (CCL22)	NM_002990	Sentido	GCGTGGTGTGCTAACCTTCA
		Antisentido	GGCTCTTCATTGGCTCAGCTT
MMP-2	NM_004530	Sentido	TTTTGATGACGATGAGCTATGGA
		Antisentido	CCATCGGCGTTCCATACT
18S	NR_003286	Sentido	CGGCTACCACATCCAAGGAA
		Antisentido	GCTGGAATTACCGCGGCT

Tabla 9: Cebadores empleados en las reacciones de qPCR. Los cebadores fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

	Paso 1:	Incubación UDG	5' a 50°C
	Paso 2:	Desnaturalización previa	5' a 95°C
40 ciclos	Paso 3:	Desnaturalización	30" a 95°C
		Hibridación	32" a 61°C
		Elongación*	32" a 72°C
	Paso 4:	Curva de disociación	15" a 95°C
1' a 60°C			
15" a 95°C			
15" a 60°C			

Tabla 10: Parámetros del programa utilizado para las reacciones de qPCR mediante SYBR Green.

La detección de la señal se realizó al finalizar el paso de elongación de la reacción. La cuantificación relativa de los niveles de expresión fue realizada por el método de $\Delta\Delta Cq$ indicado previamente en el apartado 3.2.8.1. Los valores Cq fueron normalizados con los valores del gen de referencia 18S y los resultados expresados como $-\Delta\Delta Cq$ o $\text{Log}_2 (RQ)$, indicando así el cambio en los niveles de expresión entre la muestra y el calibrador en forma de incrementos.

3.3. Métodos *in vivo*

3.3.1. Inducción de Patologías

Para todo el trabajo fueron empleados ratones hembra atímicos BALB/c nu/nu de entre 6 y 8 semanas de edad y obtenidas de Harlan Iberica y UK. El cuidado y manejo experimental de los animales fue aprobado por el Comité Ético de experimentación animal de la Universidad de Zaragoza. El cuidado y manejo de los animales fue realizado conforme con la Política Española de Protección Animal RD1201/05.

Los animales fueron estabulados y mantenidos en condiciones estériles en jaulas individualmente ventiladas (IVC; *individually ventilated cages*) con comida y agua estéril. Desde su recepción fueron mantenidos durante una semana para aclimatarse antes de iniciar los procedimientos experimentales.

3.3.1.1 Diabetes

La inducción de la diabetes tipo 1 en los animales fue realizada mediante la inyección intraperitoneal (i.p.) de 150mg/kg de estreptozocina o STZ (Sigma). La STZ es un compuesto de glucosamino-nitrosourea y agente alquilante de ADN que entra exclusivamente en las células vía el transportador de glucosa GLUT2, actuando como donador de óxido nítrico en los islotes pancreáticos y por tanto, tóxico para las células β secretoras de insulina e induciendo de forma rápida e irreversible su necrosis. Actualmente es empleado para el tratamiento en tumores neuroendocrinos que expresan el transportador de glucosa GLUT2.

Los animales fueron pesados y así se calculó el volumen a inyectar de una solución de trabajo de 30mg/ml de estreptozocina en tampón citrato al 0,1 mol/l (pH 4.5). Trascorridos 10 días y para confirmar el estado de los animales se procedió a realizar una curva de glucemia, mediante la cual se mide la glucosa plasmática en ayuno y a intervalos regulares tras una sobrecarga de glucosa. Para ello, los animales se pesaron y se calculó la cantidad del consumo diario de alimento para cada animal:

$$\text{Consumo Diario Animal (gr)} = \text{Peso animal (gr)} \times 0,18 \text{ (gr alimento/gr peso animal)}$$

Del total del consumo diario por animal, el 80% corresponde al consumo diurno (12h) y el 20% al consumo nocturno (12h) determinando así la cantidad de alimento para 12,5 horas de ayuno (5,5 horas de ayuno nocturno y 7 horas de ayuno diurno). Una vez finalizado el ayuno, se procedió a realizar el ensayo de glucemia. Las muestras se tomaron de la vena lateral de la cola. Una primera muestra se tomó para determinar la glucosa basal. Posteriormente se administró 2gr/kg de glucosa via intraperitoneal por animal y se tomaron cuatro muestras cada 15 minutos y una última una hora después. Para ello se utilizó un glucómetro *Glucocard Gmeter*[®] (A. Menarini diagnostics International).

3.3.1.2. Herida

Para la inducción del modelo de herida, los animales fueron anestesiados mediante inhalación con isoflurano (ISOVET) inicialmente al 4-5% y mantenidos al 1-1,5%. A los animales se les aplicó de forma local sobre la piel del costado inferior izquierdo, pomada anestésica de lidocaína y prilocaína. Se realizó una incisión

quirurgica de aproximadamente un centimetro sobre la piel de cada animal donde previamente se había aplicado la pomada anestésica.

3.3.1.3. Tumor

Para la generación del modelo de tumor los animales fueron anestesiados mediante inhalación con isofluorano inicialmente al 5% y mantenidos al 2%. Una vez anestesiados, se desinfectó la piel de la zona del costado inferior izquierdo y se inyectaron subcutáneamente (s.c) $2 \cdot 10^6$ de células HeLa o TE671-LoxP/LacZ resuspendidas en 200 μ l de PBS a cada animal con una jeringuilla de 1 ml y una aguja de 25G (0,5x 16mm).

Se midió el crecimiento del tumor con un calibre cada 2 días. Para calcular el tamaño de los tumores se midieron el ancho y el largo de cada tumor y se emplearon las siguientes fórmulas:

$$\text{Área del tumor (cm}^2\text{)} = L \times A$$

$$\text{Volumen del tumor (mm}^3\text{)} = \frac{1}{2} L \times A^2$$

donde L es el lado largo y A es el lado ancho del tumor.

3.3.2. Técnicas de imagen molecular no invasivas

Durante la realización de este trabajo, fueron empleadas diversas técnicas de visualización no invasiva, como nanoSPECT/CT (imagen nuclear mediante radiaciones), imagen por bioluminiscencia (BLI) y MRI (imagen no nuclear) para el seguimiento y localización de la expresión génica de los transgenes hNIS y fLuc; y de moléculas de contraste, concretamente de nanopartículas de hierro (SPIO).

3.3.2.1. Anestesia

Durante los escaneos, la anestesia empleada fue inhalatoria. Para la inducción de la misma, los animales fueron introducidos en una caja de inducción conteniendo una mezcla de oxígeno (1L/minuto) e isofluorano al 4-5% (ISOVET). Después de aproximadamente 4 minutos, cuando los animales estuvieron completamente

anestesiados, fueron trasladados al interior de los escaneres en los cuales la anestesia fue mantenida al 1-1,5 %.

3.3.2.2. nanoSPECT/CT

La tecnología nanoSPECT/CT consiste en un equipo que integra dos sistemas de imagen molecular no invasiva, SPECT y CT, permitiendo la adquisición de cada modalidad en un mismo estudio, en este caso, empleado para animales pequeños. Este sistema dual de Tomografía Computerizada por Emisión de Fotones Individuales o SPECT (del inglés, *single photon emission computed tomography*) acoplada a una Tomografía Computerizada o CT (del inglés, *computed tomography*), usa una cámara de rayos gamma para generar imágenes funcionales tridimensionales (3D) de la biodistribución del radioisótopo emisor de fotones (emisiones gamma) administrado, mientras que una fuente externa de rayos X genera las imágenes anatómicas en 3D. El desarrollo de un estudio de SPECT está dividido en dos fases: (i) adquisición de múltiples imágenes bidimensionales (2D) o proyecciones en sus planos sagital, coronal y transaxial, debido a la rotación de la cámara, permitiendo rotaciones desde 90° a 360° alrededor del animal tras la administración del radioisótopo; (ii) procesamiento de imágenes mediante algoritmos matemáticos, donde las proyecciones en 2D son reconstruidas formando imágenes en 3D, que son fusionadas a las imágenes de CT, mejorando así la resolución espacial del estudio y resolviendo rangos de mm con alta sensibilidad (1000 cps/MBq).

El empleo de hNIS como herramienta de visualización y un radioisótopo emisor de fotones como el Tc^{99m} (m de 'meta-estable'), permite de forma no invasiva la cuantificación dinámica de las variaciones en los niveles de expresión *in vivo* de hNIS (Groot-Wassink, Aboagye, Glaser, Lemoine, & Vassaux, 2002; Merron et al., 2007). En todos los experimentos con nanoSPECT/CT, los animales recibieron una inyección intravenosa de 18,5 MBq de Tc^{99m} en 200µl de PBS. Después de 5 minutos los animales fueron anestesiados e introducidos al interior del escáner nanoSPECT/CT (*BIOSCAN, Washington DC, USA*) colocados sobre una cama térmica para mantener la temperatura corporal aproximadamente sobre 37°C y les fue colocada una sonda para monitorizar la temperatura.

El procedimiento seguido para cada uno de los escaneos fue el siguiente: (i) Se realizó una primera adquisición de CT que fue tomada del animal entero para

determinar los límites topográficos del escaneo y localizar la sección del tumor. (ii) Una segunda adquisición CT fue realizada con los límites ajustados. El tiempo de adquisición de CT depende del tamaño de la región a escanear (determinado previamente por los límites topográficos). Normalmente la duración es de aproximadamente 5 minutos para pequeñas secciones del animal, y hasta 10-12 minutos para un CT de cuerpo entero. Para realizar la CT, la fuente de rayos X utilizada fue de 90kVp, 18mA (tubo de 18 μ m). El detector de rayos X fue empleado con una matriz de 1024x2048 con píxeles de 48 μ m (49.2x98.6mm²). (iii) Después se realizó la adquisición de SPECT de la sección seleccionada con el escaneo de CT. El tiempo de adquisición para los SPECT fue de 100.000 cuentas por proyección, normalizando de ese modo todos los animales escaneados. Los escaneos fueron realizados usando un total de 16 proyecciones (4-pinhole). El tiempo de adquisición de los SPECT depende de la actividad total del radioisótopo administrado y del tamaño de la región a escanear (determinado por los límites topográficos). De forma general, un SPECT de cuerpo entero dura aproximadamente unos 20 minutos, mientras que un SPECT de una pequeña sección del animal dura unos 8-12 minutos. Generalmente, los tiempos de escaneos para animales pequeños son cortos para minimizar el tiempo en el que el animal permanece anestesiado. (iv) Por último y finalizadas las adquisiciones de CT y SPECT, se realizó una adquisición de SPECT de un blanco, es decir, una sección basal del animal donde no haya señal emitida por el radioisótopo. (v) Terminado el último SPECT, el animal fue sacado del escaner y mantenido a 37° y en oscuridad para permitir recuperarse de la anestesia.

Las imágenes de SPECT y de CT se reconstruyeron y fusionaron mediante los softwares Mediso (*Medical Imaging Systems*) y PMOD (*PMOD Technologies*) respectivamente, manteniendo los parámetros por defecto y siguiendo las indicaciones de la compañía comercial (*Bioscan*). Para cuantificar la acumulación del radioisótopo se utilizó el software InVivoScope (*Medical Imaging Systems*). Para ello, se trazó y delimitó el volumen de interés o VOI (del inglés, *voxel-guided specific volumes of interest*) en las imágenes fusionadas de SPECT/CT para cuantificar la actividad total de radioactividad del radioisótopo (MBq) asociada al volumen del tumor (mm³). La cuantificación de la acumulación del Tc^{99m} fue expresada como relación entre el consumo del tumor y el consumo del músculo.

3.3.2.3. Imagen por Resonancia Magnética

La imagen por resonancia magnética o MRI (del inglés, *Magnetic Resonance Imaging*) es una técnica de imagen molecular no invasiva que emplea campos de radiofrecuencia que generan información sobre la estructura y composición de los tejidos posibilitando diferenciar aquellos con patología. El elemento principal del equipo es un imán capaz de generar un campo magnético constante de gran intensidad que se encarga de alinear los momentos magnéticos de los átomos (principalmente átomos de H⁺ en los tejidos) en la dirección de ese campo. Una vez alineados, el equipo aplica una secuencia de impulsos de radiofrecuencia, generando el fenómeno de resonancia. Cada tejido resonará de forma diferente debido a las diferencias de densidades de H⁺. Una vez logrado esto, se interrumpe el impulso de radiofrecuencia, y continúa la relajación, que es un proceso de recuperación en el que los átomos regresan a su posición original (la posición artificial creada por el campo magnético externo). Ese exceso de energético será liberado en forma de emisión de radiofrecuencia y recogido por una antena para generar las imágenes. Esa emisión recibida es en forma de onda con comportamiento vectorial y que puede caracterizarse con dos constantes de tiempo, (1) el componente vertical (tiempo de relajación longitudinal o T1) y (2) el componente perpendicular (tiempo de relajación transversal o T2).

En todos los experimentos de MRI, los animales previamente anestesiados, fueron introducidos al interior del escáner colocados sobre una cama térmica para mantener la temperatura corporal aproximadamente sobre 37°C y les fue colocada una sonda para monitorizar la temperatura mediante un monitor Biotrig (Bruker Medical GmbH, Germany). El equipo utilizado fue un Bruker Pharmascan (Bruker) con un imán superconductor en posición horizontal de 7.0-T equipado con una bobina selectiva de ¹H y un inserto de gradientes Bruker de 90mm de diámetro interno (intensidad máxima de 360 mT/m).

Se realizaron imágenes T2-W o T2 ponderadas (*del inglés*, T2-weighted) en secuencias eco de espín o SE con una adquisición rápida con realce de la relajación o RARE (rapid acquisition with relaxation enhancement) de la sección del tumor del animal. La secuencia fue realizada en dos orientaciones, en axial (número de franjas = 12) y en sagital (numero de franjas = 8) y con los siguientes parámetros: Tiempo de repetición o TR = 3000 ms, tiempo eco o TE = 60 ms, Factor RARE = 8, Av = 3, FOV = 3.0 x 3.0 cm, matriz de adquisición = 256x256 lo que corresponde a una resolución en

plano de 117 x 117 μm^2 y un grosor de la franja de 1.00 mm. Finalizada la adquisición, el animal fue sacado del escaner y mantenido a 37° y a oscuras para permitir la recuperación de la anestesia. Los datos fueron adquiridos usando un equipo Hewlett-Packard con el software Paravision operado con la plataforma Linux.

3.3.2.4. Imagen por bioluminiscencia

Para realizar la imagen por bioluminiscencia o BLI (del inglés, *Bioluminescence Imaging*), a los animales les fue administrada por vía intraperitoneal 300 μl de una solución de D-luciferina (Promega) en PBS a 15mg/ml (dosis de 150mg/kg) usando una aguja de 30G (0,3x 13mm). Tras 10 minutos, los animales fueron anestesiados e introducidos al interior del escaner IVIS Lumina (Xenogen, Calipers, USA) previamente precalentado a 37°C y colocados sobre las mascarillas individuales para mantener la anestesia. Se realizó una primera fotografía para determinar los límites topográficos del escaneo y ajustar la imagen del animal. Después se continuó con las adquisiciones de bioluminiscencia que se tomaron sobre la imagen fotográfica del animal.

Las adquisiciones se realizaron con un tiempo de exposición mínimo de 5 segundos (en los animales con alta actividad bioluminiscente) y con un tiempo de exposición máximo de 2 minutos (para los animales con baja actividad bioluminiscente). Finalizadas las adquisiciones, los animales fueron sacados del escaner y mantenido a 37° y a oscuras para permitir recuperarse de la anestesia. Los datos fueron adquiridos y analizados con el software Living Image 4.0 (Xenogen). La cuantificación de la señal de bioluminiscencia fue calculada delimitando la región de interés o ROI (del inglés, *Region Of Interest*) de cada animal durante cada uno de los escaneos.

3.3.3. Administración del radioisótopo I¹³¹

En todos los experimentos en los cuales fue necesaria la administración del radioisótopo, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 2mCi de (I¹³¹)NaI en 200-300 μl de PBS. Previa a la administración del mismo, entre 4-7 días, los animales recibieron tratamiento con L-tirosina (T4) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5mg/l en el agua, para minimizar el daño tiroideo debido a la administración del radioisótopo.

3.4. Histología

3.4.1. Recogida y tratamiento de muestras

Al finalizar los experimentos *in vivo*, todos órganos y tejidos fueron extraídos de los animales, sacrificados previamente por inhalación de CO₂. Las muestras recogidas de cada animal fueron procesadas de diferentes formas dependiendo de su posterior utilización: (i) fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS durante 24 horas y posterior transferencia a una solución de alcohol al 70%, o (ii) congeladas a -80°C. Estas muestras fueron talladas para la obtención de secciones representativas y procesadas en el procesador Sakura X-press X50 hasta su inclusión en parafina, tras lo cual se confeccionaron bloques de parafina en la estación de confección de bloques Leica EG1150 que fueron posteriormente enfriados en la placa fría Leica EH1150. De estos bloques se obtuvieron secciones a 3 μm con el microtomo Leica RM2255 para las posteriores tinciones.

3.4.1.1. Tinción Hematoxilina-Eosina

La tinción de hematoxilina-eosina fue realizada por medio de un teñidor y montador automático Leica ST5020 y CV5030 para su valoración histológica. Para ello, las preparaciones se hicieron pasar por soluciones sucesivas de xileno, alcoholes en gradación decreciente (100, 96 y 70%) hasta su hidratación, hematoxilina de Carazzi, agua corriente, eosina Y al 1%, soluciones crecientes de alcohol hasta su completa deshidratación (70, 96 y 100%) para finalizar con el aclarado en dos baños de xileno y montaje con medio permanente (Sigma-Aldrich).

3.4.1.2. Tinción de Azul de Prusia

La tinción de hierro fue realizada utilizando el kit comercial Accustain® de Sigma-Aldrich. El método se basa en la reacción de Azul de Prusia, en la que el hierro iónico reacciona con el ferrocianuro ácido, produciendo un color azul brillante en la muestra.

Para la tinción de células directamente en placa, se lavaron las células con PBS y células se fijaron con formalina al 10% durante 20 minutos. Posteriormente, se incubaron con la solución de trabajo para tinción de hierro durante 10 minutos y con la solución de trabajo de pararosanilina durante 5 minutos, con lavados intermedios de 10 minutos con H₂O.

Para la tinción en secciones de tejidos se desparafinó e hidrató la muestra. Después las secciones se incubaron con la solución de trabajo para tinción de hierro durante 10 minutos y con la solución de trabajo de pararosanilina durante 5 minutos, con lavados intermedios de 10 minutos con H₂O_d. Por último, la muestra se deshidrató y se montó con un cubre en medio acuoso DPX en base de tolueno.

3.4.1.3. Tinción de β -Galactosidasa

En la tinción de β -galactosidasa (gen LacZ del operón lac) fue empleado el kit comercial GALS de Sigma-Aldrich. La tinción se basa en la reacción de hidrólisis del X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido o BCIG) por la β -galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Este último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, generando un compuesto azul insoluble.

Para la tinción de células directamente en placa, las células se fijaron con solución de fijación 1X (2% de formaldehído, 0,2% de glutaraldehído en PBS 1X) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavarón con PBS. Posteriormente, se incubaron con la solución de tinción X-Gal (MgCl₂ a 2mM, ferricianuro de potasio a 4 mM, ferrocianuro de potasio a 4 mM y X-Gal a 1 mg/ml [en dimetilformamida o DMF] en PBS 1X) a 37°C durante 2 horas o más tiempo hasta que se observó coloración azul.

Para la tinción *in toto* de tejidos las muestras se lavaron en PBS a 4°C e inmediatamente se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 3 horas a 4°C. Transcurrido ese tiempo, se realizaron 3 lavados de 30 minutos cada uno con solución de lavado (fosfato sódico a 100mM a pH 7,3, MgCl₂ a 2 mM, deoxicolato de sodio al 0,01% y NP-40 al 0,02%) y se añadió a las muestras la solución de tinción X-Gal (ferricianuro de potasio a 5 mM, ferrocianuro de potasio a 5 mM y X-Gal a 1 mg/ml [en DMF] en solución de lavado) incubando las muestras durante 16 horas. Por último, se fijaron en paraformaldehído al 4% a 4°C durante 16 horas y se pasaron a etanol al 70% antes de ser procesadas.

3.4.2. Análisis histológico de la tinción Azul de Prusia

Las células positivas a la tinción Azul de Prusia, fueron calculadas contando el número de células positivas en campos de alta magnificación o HPF (del inglés, *High Powered Field*) en las secciones obtenidas de los tejidos de cada grupo de animales.

Para el cálculo se contaron en 5 HPF por sección en 5 secciones de cada tejido.

3.4.3. Visualización de muestras

Para la visualización de células y cortes de tejidos se utilizarón diferentes técnicas de microscopia.

3.4.3.1. Microscopía en campo claro, contraste de fases y fluorescencia

La adquisición de imágenes en campo claro, contraste de fases y fluorescencia fueron realizadas mediante el uso de distintos equipos. (1) Un microscopio invertido de fluorescencia monitorizado modelo IX81 de Olympus con una cámara digital a color refrigerada modelo Olympus XC50. Con las siguientes especificaciones de las lentes: 10x (UPFLN 10X PH / NA 0.3 WD 10,0 mm), 20x (LUCPLFL 20X PH / NA 0.45 WD variable de 6,4 a 7,6 mm) y 40x (LUCPLFL 40X PH / NA 0.60 WD variable de 2,7 a 4,0 mm). El programa de adquisición de imágenes Cell[^]D (Olympus) de la Unidad de Microscopía e Imagen del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud / Instituto de Investigación Sanitaria Aragón. (2) Un microscopio invertido Motic modelo AE3 con la cámara Moticom 2500 y el programa de adquisición de imágenes Motic Imaging Plus 2.0.23 (Motic).

3.4.3.2. Microscopía Confocal

La adquisición de imágenes mediante microscopía confocal se llevó a cabo usando el microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS. Las imágenes fueron tomadas utilizando el microscopio en modo secuencial, objetivos de inmersión en aceite 40x y/o 63x (especificación de las lentes: HCXPLAPO NA 1.25 y HCXPLAPO NA 1.40 respectivamente), un número de 16 pasadas por línea y un formato de 1024x1024 píxeles. La apertura confocal o pinhole se fijó en una unidad de Airy. Las imágenes se analizaron con el software LCS 1537 (Leica).

3.5. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov seguido del test de Tukey HSD, a excepción de los resultados

obtenidos en el análisis de la expresión de los genes KLF4 y REX1, que debido a su distribución no paramétrica, el análisis fue realizado usando el test de Kruskal-Wallis. El programa utilizado en cada análisis fue el SPSS 17.0 (IBM). En todos los casos, se consideró el valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Estudio sobre la capacidad de migración de las mBMSCs hacia sitios de daño o inflamatorios utilizando diferentes patologías

4.1.1 Aislamiento y caracterización de las mBMSCs según criterios mínimos

El estroma de la médula ósea consiste en una población heterogénea de células adherentes y no adherentes, donde además de células troncales hematopoyéticas y progenitoras de la médula ósea, encontramos células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, adipocitos y células osteogénicas (Pittenger et al., 1999). Formando parte de la población de células adherentes, encontramos las MSCs, y a pesar de que el número total de células varía entre un 0,01 y 0,001% (Beyer Nardi & da Silva Meirelles, 2006; Jori et al., 2005; Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997) del total de células nucleadas, son relativamente fáciles de aislar y de expandir en cultivo.

Durante este trabajo se aislaron mBMSCs de las muestras obtenidas directamente del interior del canal óseo de los fémures y tibias de los ratones, según el protocolo descrito anteriormente en el apartado 3.1.1.5. Una vez que las células llegaron a un grado de confluencia alrededor del 90% después de realizar el tercer pase, y que toda la población de células no adherentes fue eliminada con los diferentes cambios de medio, las células se caracterizaron para comprobar que la población aislada correspondía a las mBMSCs. Siguiendo las mismas indicaciones sobre los criterios mínimos (Dominici et al., 2006) que definen actualmente a las hMSCs caracterizamos las BMhMSCs. Estos criterios son:

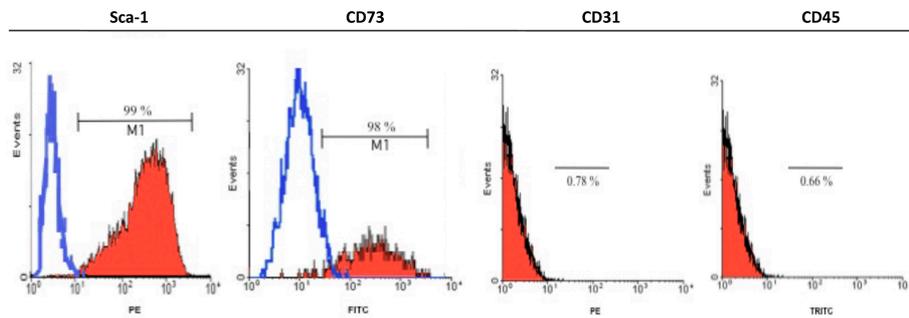
(1) Adherencia a placa.

Las células aisladas fueron capaces de mantenerse adheridas en la placa bajo condiciones *in vitro* mostrando una morfología similar a la fibroblástica con características fusiformes.

(2) Análisis de marcadores de superficie.

Se analizó la expresión de una combinación consenso de marcadores de superficie, mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 12A. Entre los marcadores positivos, los resultados mostraron una expresión del 99% para Sca-1 (antígeno 1 de célula troncal) y del 98% para CD73. Para los marcadores negativos, marcadores típicos hematopoyéticos, los valores fueron del 0,78% para CD31 o PECAM-1 y del 0,66% para CD45.

A



B

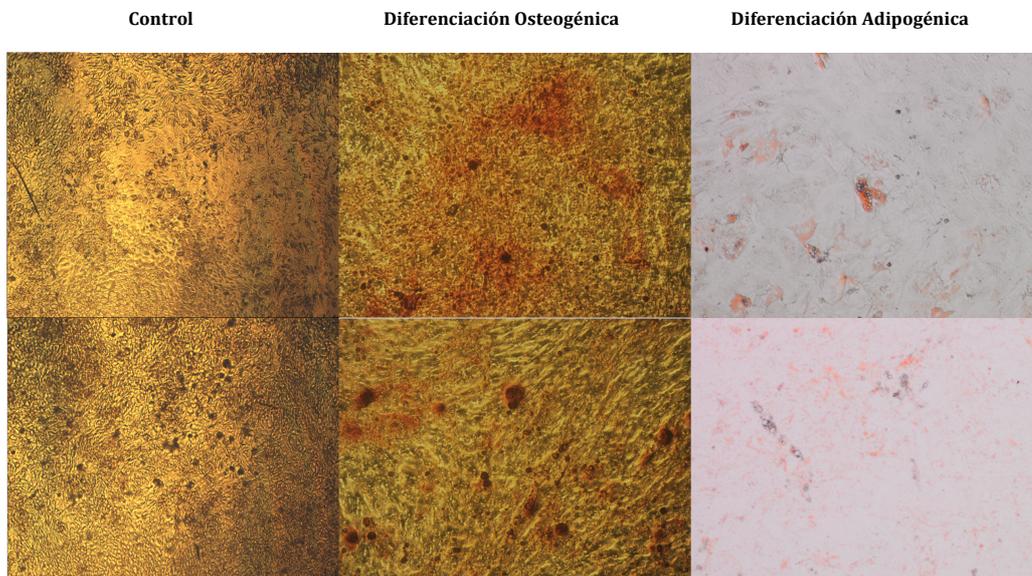


Figura 12: Caracterización de las mBMSCs aisladas de la médula ósea de los fémures y tibias de ratones hembra Balb/c de seis semanas de edad siguiendo las mismas indicaciones sobre los criterios mínimos que definen actualmente a las hMSCs. [A] El análisis de la expresión de los marcadores de superficie mediante citometría de flujo mostró niveles de expresión superior al 98% para los marcadores positivos Sca-1 y CD73 y niveles de expresión inferiores al 0,78% para los marcadores negativos CD31 y CD45. **[B]** Tras mantener a las mBMSCs en condiciones de inducción de diferenciación y posteriormente mediante tinción con Red Oil O y Alizarin Red S, fue evaluada la capacidad de las mBMSCs a diferenciarse tanto a adipocitos como a osteocitos respectivamente. Los controles fueron mantenidos en condiciones normales.

(3) Diferenciación *in vitro*.

Se evaluó el potencial multipotente de las células aisladas bajo estímulos específicos *in vitro*. La inducción de la diferenciación adipogénica fue mantenida durante 21 días y se evaluó la formación de vacuolas lipídicas mediante tinción con Oil Red O. La inducción de la diferenciación osteogénica fue mantenida durante 14 días y la acumulación de calcio en las células fue evaluada mediante tinción con Alizarin Red S. En la figura 12B, se muestran las imágenes donde se observa que las células fueron capaces de diferenciarse tanto a osteocitos como a adipocitos.

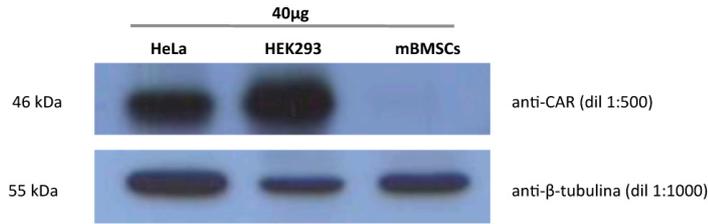
4.1.2. Caracterización de la permisividad celular de las mBMSCs a la infección por vectores adenovirales

La eficacia en la transferencia génica es un paso esencial para el éxito en el desarrollo de aplicaciones terapéuticas. Los niveles de expresión del receptor CAR en las células a modificar, supone el factor limitante a la hora de una transferencia génica eficaz.

Con el fin de evaluar la capacidad de los adenovirus para infectar MSCs, se estudiaron los niveles de expresión del receptor CAR en las mBMSCs mediante *western-blot* y citometría de flujo. En la figura 13A se muestra el análisis realizado *por western-blot*. Como control positivo de células que expresan el receptor CAR, se utilizaron extractos de proteína de las líneas celulares HeLa y HEK293. Como control de carga se empleó β -tubulina. Los resultados mediante *western-blot* indicaron que las células mBMSCs no expresaban el receptor CAR o que los niveles de expresión eran muy bajos para ser detectados.

Estos resultados se confirmaron mediante el análisis por citometría de flujo (figura 13B) que mostraron que tan sólo un pequeño porcentaje de la población de células (1,7%) expresaban el receptor CAR.

A



B

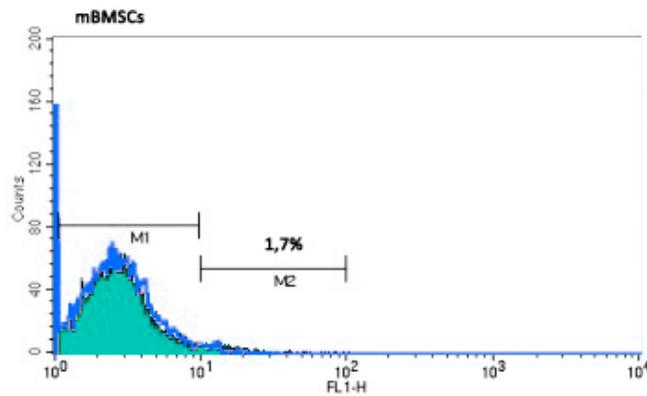


Figura 13: Análisis por *western-blot* y citometría de flujo de los niveles de receptor CAR en las mBMSCs. [A] Expresión de CAR por *western-blot* en MSCs, células HeLa y células HEK293. Nótese que no fue obtenida ninguna banda de 46 kDa en el caso de las mBMSCs. Como control de carga fue utilizada β-tubulina. **[B]** Expresión de CAR por citometría de flujo donde sólo un 1,7% de las mBMSCs fueron positivas.

Debido a la falta de expresión del receptor CAR en las células, se analizaron por citometría de flujo los niveles de expresión de las integrinas αβ3 y αβ5, que funcionan como receptores secundarios por los cuales se produce la internalización del vector adenoviral. En la figura 14 se muestran los resultados de la citometría de flujo, en la cual se observa que las mBMSCs presentan altos niveles de expresión tanto de la integrina αβ3 (98,3%) como de la integrina αβ5 (97,2%), pudiendo facilitarse a través de esta vía, la internalización del adenovirus.

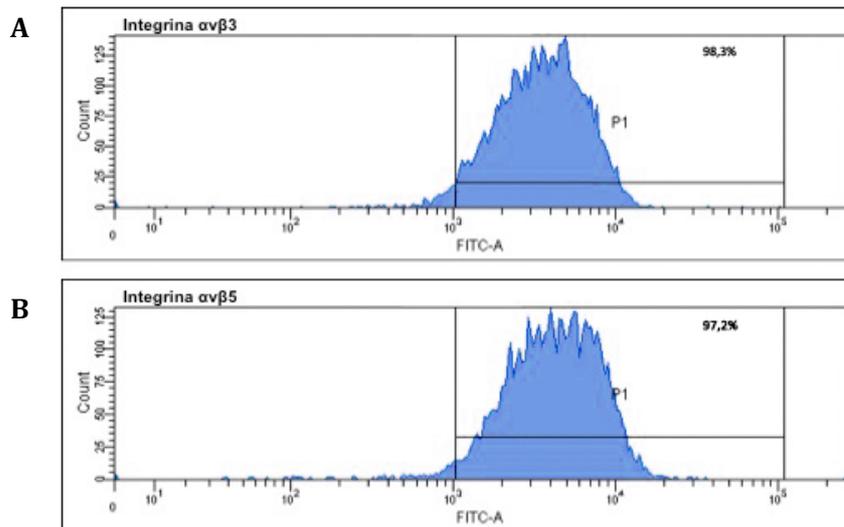


Figura 14: Análisis por citometría de flujo de los niveles de expresión de las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ en las mBMSCs. **[A]** Los niveles de expresión de las integrinas $\alpha\beta3$ fueron de un 98,3%. **[B]** Fueron obtenidos valores similares para la expresión de las integrinas $\alpha\beta5$ (97,2%).

4.1.3. Infección con vectores adenovirales en mBMSCs

Con el objetivo de analizar la efectividad que se obtendría, *in vitro*, empleando vectores adenovirales en células mBMSCs donde los niveles de expresión del receptor son bajos, se realizaron distintos ensayos de infectividad con algunos de los vectores que se emplearán durante todo el trabajo. Según lo descrito por Conget et al., para realizar infecciones con vectores adenovirales en células deficientes de expresión del receptor CAR, eran necesarias concentraciones de 2000 MOIs para obtener altos porcentajes de células infectadas (Conget & Minguell, 2000). Otros como Shih-Chieh et al., indicaban que con una infección a una concentración de 1000 MOIs, el 90% de las células conseguían ser infectadas (Hung, Lu, Shyue, Liu, & Ho, 2004).

Con estos datos, realizamos infecciones en las mBMSCs con diferentes vectores adenovirales (AdfLuc y AdhNIS) a diferentes MOIs. La figura 15A, muestra los resultados obtenidos a las 48 horas de la infección de las mBMSCs con un AdfLuc a 200, 500 y 1000 MOIs. Tras 15 minutos de la administración de 100 μ l de luciferina a una concentración final de 150 μ g/ml a las células, los niveles de expresión de luciferasa fueron evaluados mediante el uso del escáner IVIS Lumina. En las imágenes pudo

detectarse señal debida a la expresión de luciferasa a 500 y 1000 MOIs con sólo 30 segundos de exposición, mientras que a 200 MOIs, únicamente pudo detectarse señal de luciferasa con 300 segundos de exposición. En la figura 15B se observó claramente las diferencias en los niveles de expresión de luciferasa a diferentes MOIs y tiempos de exposición.

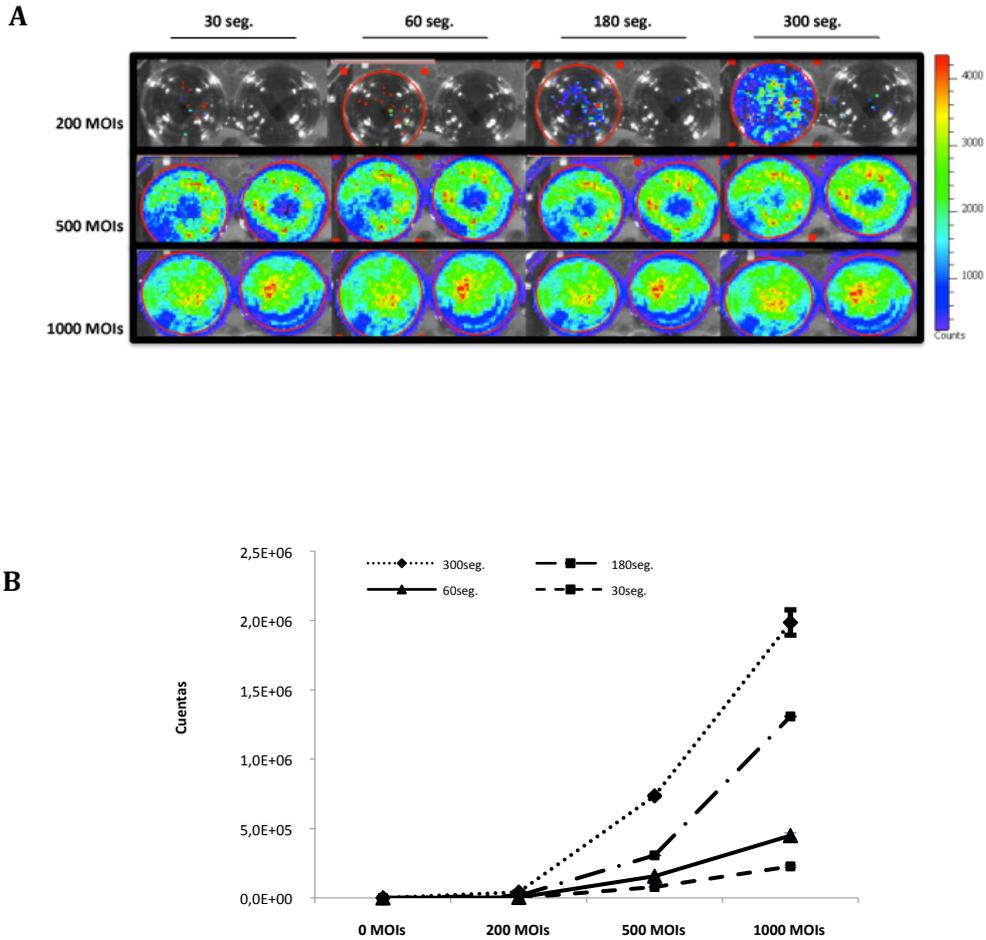


Figura 15: Ensayos de infectividad *in vitro* de las mBMSCs con un AdfLuc a diferentes multiplicidades de infección o MOIs. [A] Visualización mediante IVIS Lumina de las mBMSCs infectadas con un AdfLuc a 200, 500 y 1000 MOIs por triplicado. 48 horas tras la infección se añadió a las células 100µl de luciferina a una concentración final de 150µg/ml. Las imágenes poseen un espectro de color, donde el azul corresponde a la señal de bioluminiscencia más débil y el rojo a la más intensa. Diferentes tiempos de exposición (30, 60, 180 y 300 segundos) fueron ensayados. **[B]** Representación de la cuantificación de la señal de bioluminiscencia calculado mediante la delimitación de la región de interés o ROI. Ninguna diferencia fue observada a 200 MOIs, mientras que a 500 y 1000 MOIs se observan diferencias en los distintos tiempos de exposición empleados.

En la figura 16, se muestran los resultados obtenidos de la infección de las células mBMSCs a 500 MOIs con un AdhNIS. Como control positivo de infectividad se emplearon células A549, que son células CAR positivas y que fueron infectadas con un AdhNIS a 50 MOIs. Para comprobar que la infección con el AdhNIS en las células genera expresión funcional de hNIS, se realizó un ensayo de captación de I^{125} . En ambos casos, comparado con el control en el que el flujo de yodo estaba inhibido, las células eran capaces de acumular yodo de forma significativa en su interior, debido a una expresión funcional de hNIS.

Los resultados mostraron la capacidad de las mBMSCs de ser infectadas de forma eficaz mediante vectores adenovirales y a una concentración adenoviral de 500 MOIs, 4 veces menor a lo anteriormente descrito, ya que a concentraciones de 2000 MOIs, tras 72 horas de la infección, se observó un elevado porcentaje de muerte celular.

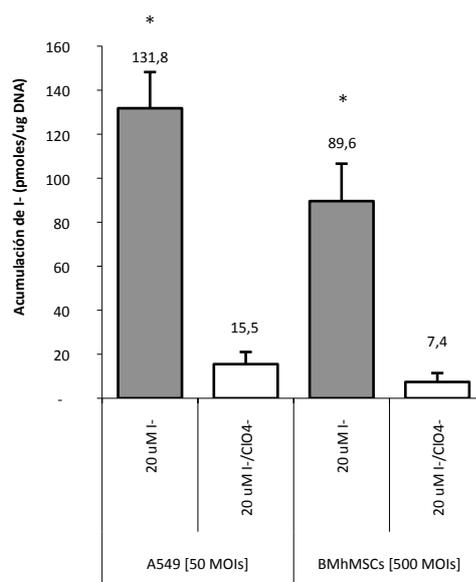


Figura 16: Capacidad de acumulo de I^{125} por las mBMSCs infectadas con AdhNIS. Las células A549, que expresan el receptor CAR, se infectaron a 50 MOI y las mBMSCs a 500 MOI ambas por triplicado. Tras 72 horas de la infección, las células fueron expuestas a una solución de PBS suplementada con 140mM de NaCl, 20 μM de IK y 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ de I^{125} . Las barras 20 $\mu\text{M I}^-$, indican la acumulación de I^- (pmoles/ $\mu\text{g ADN}$) versus las barras 20 $\mu\text{M I}^-/\text{ClO}_4^-$ que indican la acumulación de I^- (pmoles/ $\mu\text{g ADN}$) en un sistema donde el flujo de I^- está inhibido. El análisis estadístico fue realizado con el test Kolmogorov-Smirnov seguido del test Tukey HSD. (* $p < 0,05$).

4.1.4. Tropismo de las mBMSCs en diferentes patologías *in vivo*

Con el fin de comprobar la capacidad *in vivo* de las mBMSCs a migrar hacia zonas de daño o zonas en las que existe un proceso inflamatorio, se realizaron en paralelo y de forma simultánea diferentes modelos de patologías con abordajes similares. Para ello se utilizaron modelos de diabetes tipo 1, herida y tumor.

4.1.4.1. Modelo tumoral

Cuando los tumores subcutáneos de células HeLa alcanzaron el tamaño deseado, aproximadamente 50mm³, los animales fueron separados aleatoriamente en tres grupos: grupo ensayo GFP (n=10), grupo ensayo hNIS (n=4) y grupo control (n=4). Los animales de cada grupo ensayo recibieron inyecciones intravenosas en la vena lateral de la cola de 10⁶ mBMSCs-GFP o mBMSCs-hNIS, infectadas previamente con un vector lentiviral LV-GFP y un vector adenoviral AdhNIS a 500 MOIs, respectivamente. Los animales del grupo control recibieron una inyección intravenosa de 200µl de PBS.

En el grupo ensayo GFP, los animales fueron sacrificados a día 1, 8, 10, 17 y 27 tras recibir la inyección intravenosa de mBMSCs-GFP y los tumores y otros órganos fueron procesados. En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos del análisis de las muestras. Por PCR se obtuvieron resultados positivos a partir del día 8 en los tumores. Como control positivo de GFP se utilizaron muestras de mBMSCs-GFP. Como control de la reacción de PCR se empleó GAPDH. Los pulmones también resultaron ser positivos en los animales sacrificados a día 1, 8 y 10. En los animales sacrificados a día 17 y 27 las muestras fueron negativas. El resto de órganos analizados, hígado, corazón y cerebro, resultaron negativos. Estos resultados fueron confirmados por *western-blot* y microscopía confocal. Para el análisis de las muestras por *western-blot*, los tumores resultaron positivos para expresión de GFP en todos los días analizados (d8-d27). Como control positivo, se utilizaron extractos de muestras de mBMSCs-GFP. Como control de carga se empleó GAPDH. Por último, las imágenes obtenidas de microscopía confocal de cortes de los tumores mostraron expresión de GFP. Como control negativo se utilizaron cortes de tumores control.

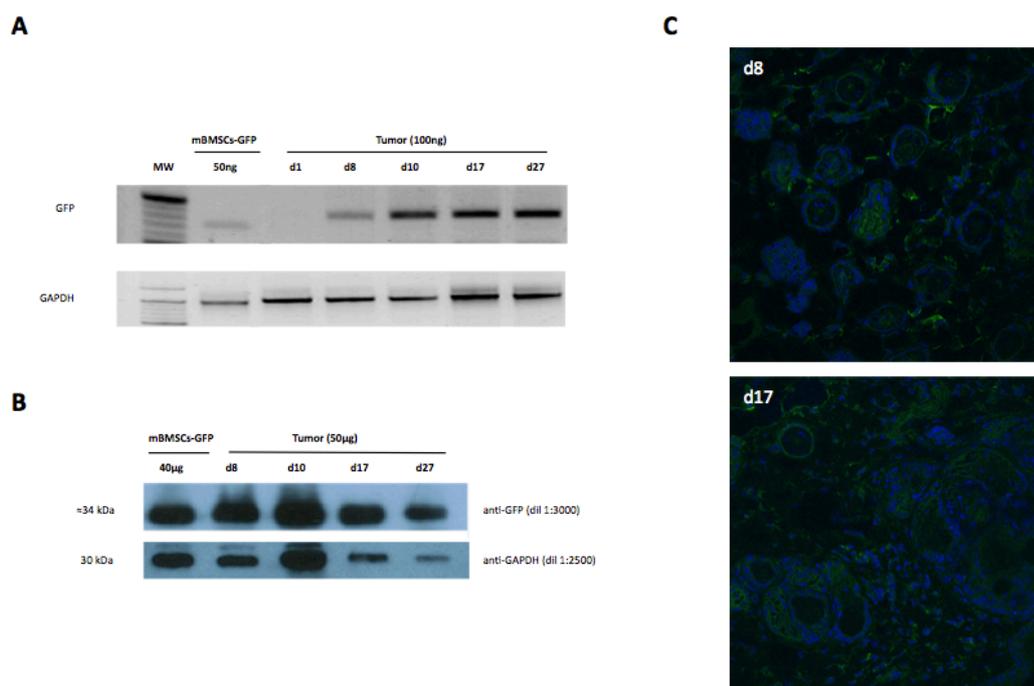


Figura 17: Detección de GFP en tumores de animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-GFP. Los animales fueron sacrificados a días 1, 8, 10, 17 y 27 tras recibir la inyección intravenosa de mBMSCs-GFP. **[A]** Detección de GFP a partir del día 8 en ADN genómico extraído de los tumores. Como control positivo de GFP se utilizaron muestras de mBMSCs infectadas con un vector lentiviral LV-GFP. Como control de la PCR se detectó GAPDH. **[B]** Expresión de GFP por western-blot a partir del día 8 en extractos de proteínas obtenidos de los tumores. Como control positivo de GFP se utilizaron muestras de mBMSCs infectadas con un vector lentiviral LV-GFP. Como control de carga se empleó GAPDH. **[C]** Expresión de GFP por microscopía confocal en cortes realizados en los tumores. Las imágenes mostradas corresponden a los días 8 (40x) y 17 (40x).

En el grupo ensayo hNIS, los animales fueron escaneados mediante nanoSPECT. Las imágenes obtenidas por nanoSPECT o nanoSPECT/CT tienen un espectro de color, donde el azul corresponde a la señal más débil y el rojo a la más intensa. En los animales del grupo control, se observó señal endógena en tiroides, glándulas salivares, estómago, vejiga urinaria y glándulas mamarias. La expresión de NIS en los tres primeros sitios fue previamente descrita (Spitzweg, Joba, Eisenmenger, & Heufelder, 1998), siendo la señal en la vejiga debida a la excreción del radioisótopo Tc^{99m} . No se encontró ninguna señal en el área del tumor.

En la figura 18 se muestra la imagen dorsal (longitudinal) del animal entero a día 14 tras la inyección de las mBMSCs-hNIS. En la imagen, el área del tumor se localizó en el lado derecho inferior, donde pudo observarse señal. En la imagen se observó también otras señales debidas a la expresión endógena de NIS, que correspondieron al acumulo del radioisótopo en el estómago y en la vejiga urinaria.

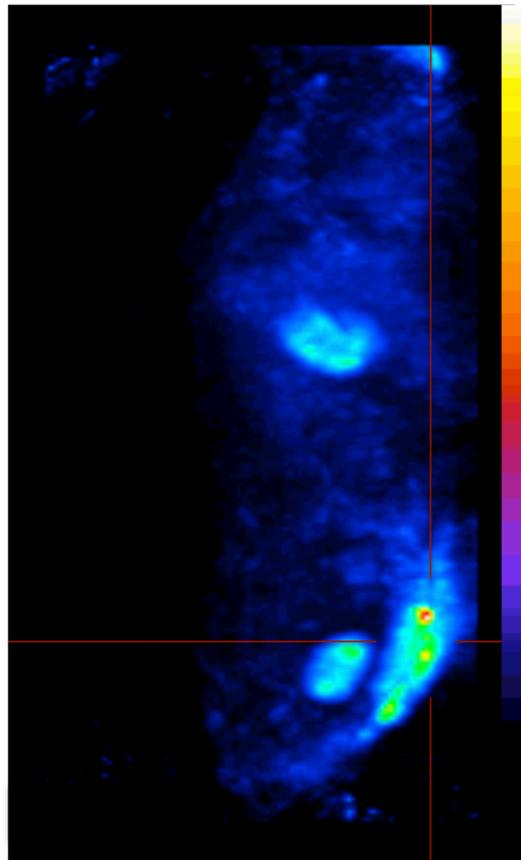


Figura 18: Visualización de la expresión de hNIS en los tumores de animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-hNIS mediante nanoSPECT. La imagen mostrada corresponde al animal entero en posición dorsal a día 14 tras la inyección de las mBMSCs-hNIS. El tumor se localiza en el lado derecho inferior. Las otras dos señales corresponden a la expresión endógena de NIS, en el centro de la imagen el estómago, y en la zona inferior central de la imagen la vejiga. La imagen posee un espectro de color, donde el azul corresponde a la señal más débil y el rojo a la más intensa.

4.1.4.2. Modelo de diabetes tipo 1

Para confirmar el estado de los animales, una vez transcurridos 10 días de la administración intraperitoneal de una dosis de 150mg/kg de estreptozocina, se midieron los niveles de glucosa plasmática en ayuno y a intervalos regulares tras una sobrecarga de glucosa. La figura 19 muestra la curva de glucemia de los animales que recibieron la administración de estreptozocina y de los animales control, indicando que la administración de la estreptozocina provocó la necrosis de las células β generando por tanto, un proceso diabético tipo 1 (Li, Liu, Chen, & Li, 2012).

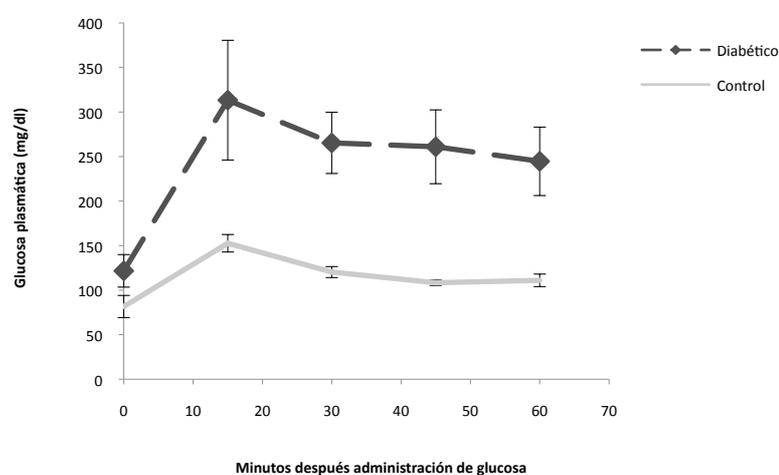


Figura 19: Curva de glucemia de los animales que recibieron una inyección intraperitoneal de estreptozocina.

Medición de la glucosa plasmática en ayuno, después de 10 días de la administración intraperitoneal de una dosis de 150mg/kg de estreptozocina y tras una sobrecarga de glucosa. Los animales control no recibieron la administración de estreptozocina por lo que son capaces de metabolizar de forma normal la glucosa administrada.

Posteriormente los animales fueron separados aleatoriamente en tres grupos: grupo ensayo GFP (n=10), grupo ensayo fLuc (n=4) y grupo control (n=4). Los animales de cada grupo ensayo recibieron inyecciones intravenosas en la vena lateral de la cola de 10^6 mBMSCs-GFP o mBMSCs-fLuc, infectadas previamente con un vector lentiviral LV-GFP y un vector adenoviral AdfLuc a 500 MOIs, respectivamente. Los animales del grupo control recibieron una inyección intravenosa de 200 μ l de PBS.

En este modelo animal no se empleó el marcaje con hNIS debido a la señal endógena del mismo en la zona abdominal, lo que dificultaría discernir de la señal debida a las células marcadas. Por ello se eligió el marcaje con fLuc, ya que este tipo de marcaje no presenta ningún tipo de señal endógena en los animales.

En el grupo ensayo GFP, los animales fueron sacrificados a día 4, 8, 10, 17 y 27 tras recibir la inyección intravenosa de mBMSCs-GFP y los órganos fueron procesados. En la figura 20, se observan los resultados obtenidos del análisis de las muestras.

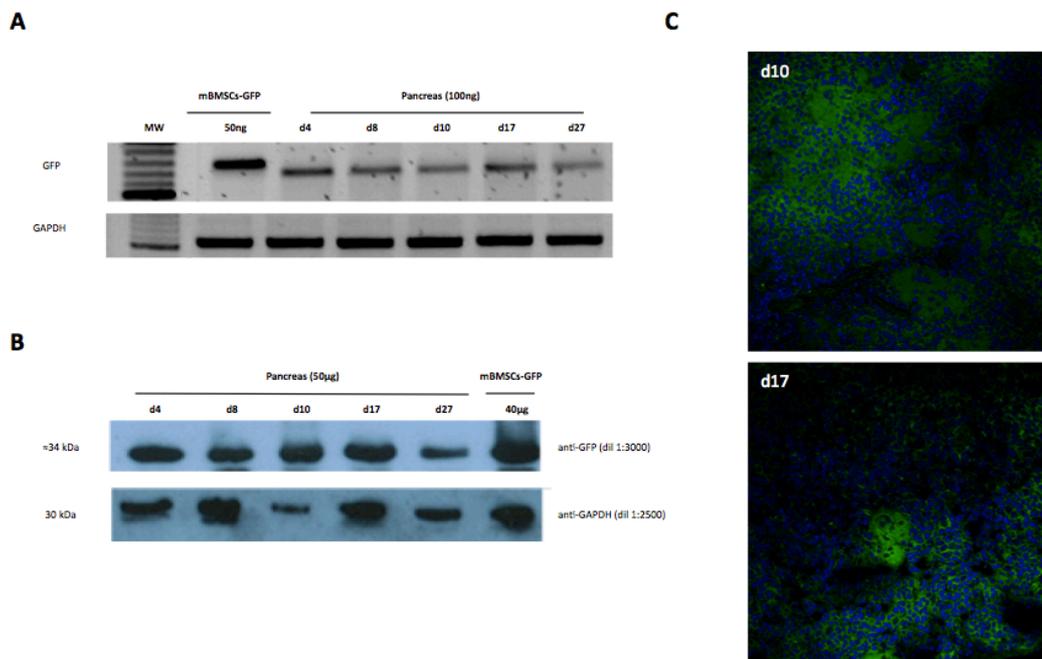


Figura 20: Detección de GFP en los páncreas de animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-GFP. Los animales fueron sacrificados a día 4, 8, 10, 17 y 27 tras recibir la inyección intravenosa de mBMSCs-GFP. **[A]** Detección de GFP a partir del día 4 en ADN genómico extraído de los páncreas. Como control positivo de GFP se utilizaron muestras de mBMSCs infectadas con un vector lentiviral LV-GFP. Como control de la PCR se empleó GAPDH. **[B]** Expresión de GFP por western-blot a partir del día 4 en extractos de proteínas obtenidos de los páncreas. Como control positivo de GFP se utilizaron muestras de mBMSCs infectadas con un vector lentiviral LV-GFP. Como control de carga se empleó GAPDH. **[C]** Expresión de GFP por microscopía confocal en cortes realizados en los páncreas. Las imágenes mostradas corresponden a los días 10 (40x) y 17 (40x).

Por PCR se obtuvieron resultados positivos desde el día 4 hasta el día 27 en las muestras obtenidas del páncreas de los animales. Otros órganos fueron también analizados. Los pulmones fueron positivos en los animales sacrificados hasta el día 10. En los animales sacrificados a día 17 y 27 las muestras fueron negativas. El resto de órganos analizados, hígado, corazón y cerebro, resultaron negativos. El análisis de las muestras por *western-blot* confirmó los resultados obtenidos con PCR en las muestras del páncreas de los animales, al igual que las imágenes obtenidas de los cortes de los páncreas por microcopía confocal.

En el grupo ensayo fLuc, los animales fueron escaneados utilizando el sistema IVIS Lumina. Las imágenes obtenidas, al igual que las obtenidas mediante SPECT, tienen un espectro de color, donde el azul corresponde a la señal más débil y el rojo a la más intensa. En los animales del grupo control, no se observó ninguna señal. La figura 21 muestra las imágenes de los escaneos en los días 5, 8 y 14 tras la inyección de las mBMSCs-fLuc. Los animales R1 y R2 pertenecen al grupo ensayo y el animal R3 al grupo control. A diferencia de la imagen del animal control, en las imágenes de los animales R1 y R2 puede observarse señal en la zona abdominal superior confirmando la presencia de células con expresión de fLuc, en la zona del páncreas.

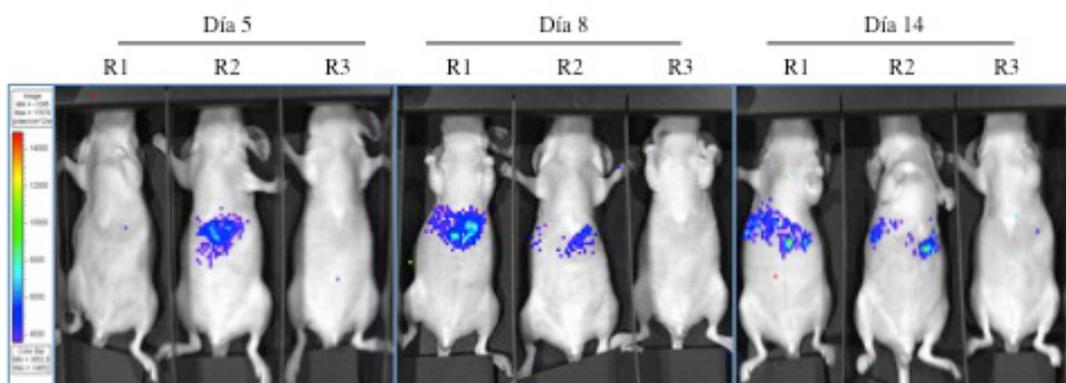


Figura 21: Visualización mediante el sistema IVIS Lumina de la expresión de fLuc en los páncreas de animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-fLuc. Los animales fueron escaneados a días 5, 8 y 14 tras recibir la inyección de mBMSCs-fLuc. La imagen mostrada corresponde al animal entero en posición dorsal a día 14 tras la inyección de las mBMSCs-hNIS. Las imágenes poseen un espectro de color, donde el azul corresponde a la señal más débil y el rojo a la más intensa. Los animales R1 y R2 pertenecen al grupo de ensayo. El animal R3 pertenece al grupo control.

4.1.4.3. Modelo de herida

Una vez inducida la herida, los animales fueron separados aleatoriamente en tres grupos: grupo ensayo GFP (n=6), grupo ensayo hNIS (n=6) y grupo control (n=4). Los animales de cada grupo ensayo recibieron inyecciones intravenosas en la vena lateral de la cola de 10^6 mBMSCs-GFP o mBMSCs-hNIS, infectadas previamente con un vector lentiviral LV-GFP y un vector adenoviral AdhNIS a 500 MOIs, respectivamente.

Los animales del grupo control recibieron una inyección intravenosa de 200 μ l de PBS. En el grupo ensayo GFP, los animales fueron sacrificados a día 1, 4 y 8 tras recibir la inyección intravenosa de mBMSCs-GFP. Una vez sacrificados, la zona de piel donde se realizó la herida y otros órganos fueron procesados.

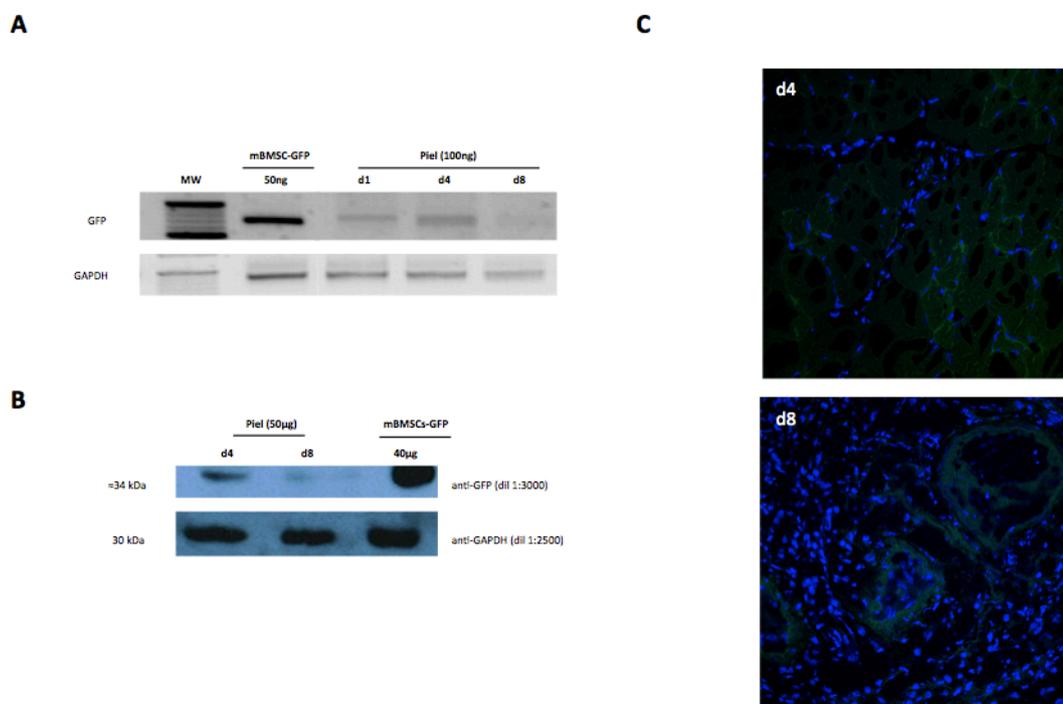


Figura 22: Detección de GFP en la zona de piel donde se realizó la herida de los animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-GFP. Los animales fueron sacrificados a día 1, 4 y 8 tras recibir la inyección intravenosa de mBMSCs-GFP. **[A]** Detección de GFP a partir del día 4 en ADN genómico extraído de la zona de piel donde se realizó la herida. Como control positivo de GFP se utilizaron muestras de mBMSCs infectadas con un vector lentiviral LV-GFP. Como control de la PCR se empleó GAPDH. **[B]** Expresión de GFP por western-blot a partir del día 4 en extractos de proteínas obtenidos de la zona de piel donde se realizó la herida. Como control positivo de GFP se utilizaron muestras de mBMSCs infectadas con un vector lentiviral LV-GFP. Como control de carga se empleó GAPDH. **[C]** Expresión de GFP por microscopía confocal en cortes realizados en la zona de piel donde se realizó la herida. Las imágenes mostradas corresponden a los días 4 (40x) y 8 (40x).

En la figura 22 se observan los resultados obtenidos del análisis de las muestras. Por PCR se obtuvieron resultados positivos a día 1 y 4 en las muestras obtenidas de la piel. A día 8, la señal apenas fue detectada. Otros órganos fueron analizados. Los pulmones fueron positivos en todos los días. En hígado fue positivo sólo a día 4. El resto de órganos analizados, corazón y cerebro, resultaron negativos. El análisis de las muestras por *western-blot* confirmó los resultados obtenidos con PCR. En las imágenes obtenidas por microcopía confocal, se observó expresión de GFP en los cortes de la piel.

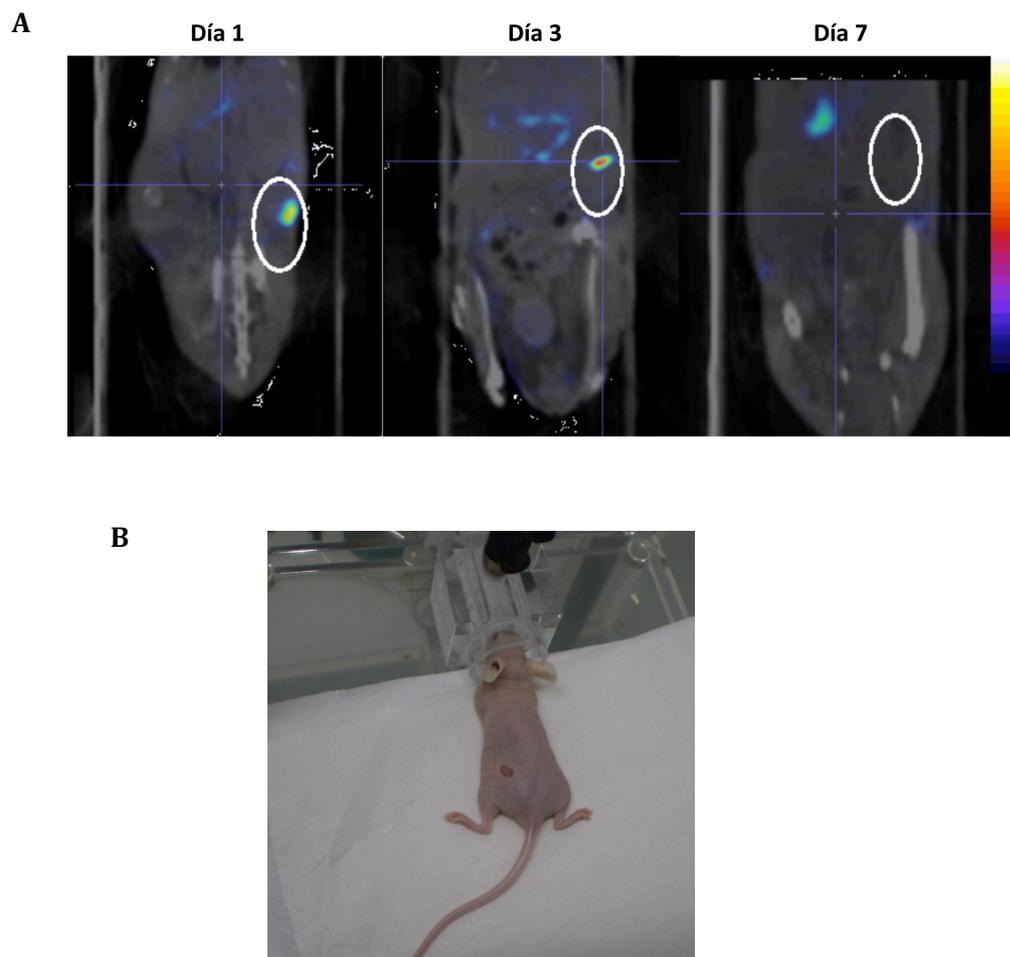


Figura 23: Visualización mediante nanoSPECT de la expresión de hNIS en la zona de piel donde se realizó la herida de animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-hNIS. [A] Las imágenes corresponden a la mitad inferior de los animales en posición dorsal a días 1, 3 y 7 tras la inyección de las mBMSCs-hNIS. La herida se localiza en el lado derecho. Las imágenes poseen un espectro de color, donde el azul corresponde a la señal más débil y el rojo a la más intensa. **[B]** Fotografía de uno de los animales del grupo ensayo donde la herida se localiza en el lado derecho

En el grupo ensayo hNIS, los animales fueron escaneados mediante nanoSPECT/CT. En la figura 23 se muestra la imagen dorsal del animal entero a días 1, 3 y 7 tras la inyección de las mBMSCs-hNIS. La zona de la herida se localizó en el lado derecho inferior de la imagen donde pudo observarse señal. Las señales más intensas se encuentran a días 1 y 3. A día 7, la señal es apenas detectada. En la imagen pudo verse también otras señales debidas a la expresión endógena de NIS, que correspondieron al estómago y glándulas mamarias.

Los resultados obtenidos de los experimentos realizados utilizando tres modelos animales distintos, demostraron que la población de células aisladas del estroma de la médula ósea de los ratones, las mBMSCs, poseen la capacidad de migrar *in vivo* e injertarse en zonas de daño y en el caso de los modelos de tumor y diabetes, son capaces de mantenerse hasta 27 días en el estroma tumoral y páncreas respectivamente.

4.1.5. Efecto terapéutico *in vivo* tras la administración del radioisótopo I¹³¹ en un modelo de tumor

Una vez comprobada la habilidad de las mBMSCs *in vivo* de migrar e injertarse en zonas de daño e inflamación y de mantenerse durante semanas, analizamos la capacidad de las mismas de emplearse como vehículos de un AdhNIS, en una terapia antitumoral con administración de I¹³¹. Para minimizar el daño tiroideo, 7 días antes de la administración del radioisótopo, los animales se trataron con L-tirosina (T4), a una dosis de 5mg/l en el agua durante una semana (Dwyer et al., 2011).

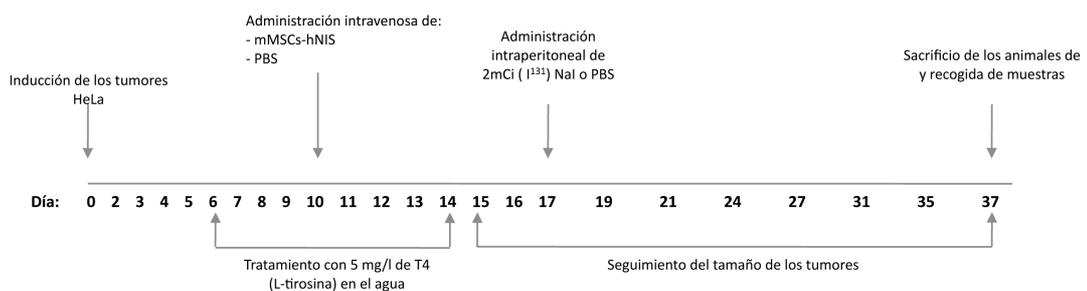
Cuando los tumores subcutáneos de células HeLa alcanzaron el tamaño deseado, aproximadamente unos 10mm³, los animales fueron separados aleatoriamente en cuatro grupos (n=4). En la figura 24A se indica la secuencia temporal seguida durante el ensayo. Los animales del primer grupo recibieron una inyección intravenosa de 10⁶ mBMSCs-hNIS (grupo mBMSCs-hNIS). Los animales del segundo grupo recibieron una inyección intravenosa de 10⁶ mBMSCs-hNIS y una posterior inyección intraperitoneal de una dosis de 2mCi de I¹³¹ (grupo mBMSCs-hNIS + I¹³¹). Los animales del tercer grupo recibieron una inyección intravenosa de 200μl de PBS (grupo PBS). Por último, los animales del cuarto grupo recibieron una inyección intravenosa de 200μl de PBS y una posterior inyección intraperitoneal de una dosis de 2mCi de I¹³¹ (grupo PBS + I¹³¹).

En la figura 24B se muestra el patrón de crecimiento de los tumores seguido en cada grupo de animales. Hasta el día 15, los tumores de todos los grupos mostraron un

patrón de crecimiento similar. Las diferencias entre los distintos grupos se empezaron a observar a partir del día 21. El promedio del tamaño de los tumores en los animales del grupo PBS fue de $122,20 \pm 5,86 \text{mm}^3$, en los del grupo PBS + I^{131} fue de $95,21 \pm 12,97 \text{mm}^3$, en los del grupo mBMSCs-hNIS fue de $82,40 \pm 10,22 \text{mm}^3$ y finalmente en los del grupo mBMSCs-hNIS + I^{131} fue de $60,15 \pm 17,12 \text{mm}^3$. A día 37, después de 20 días de la administración del radioisótopo, sólo los tumores de los animales del grupo mBMSCs-hNIS + I^{131} , mantuvieron una tasa de crecimiento similar durante los 20 días, llegando a ser significativamente menor que el resto de los grupos ($60,16 \pm 10,08 \text{mm}^3$). En el caso de los tumores de los animales del grupo mBMSCs-hNIS, el promedio de los tamaños fue de $173,53 \pm 11,87 \text{mm}^3$, los del grupo PBS + I^{131} fue de $154,01 \pm 12,27 \text{mm}^3$ y los del grupo PBS fue de $182,78 \pm 4,99 \text{mm}^3$.

Estos resultados mostraron un crecimiento significativamente menor de los tumores de los animales que recibieron la administración de las mBMSCs-hNIS y el tratamiento posterior con I^{131} , mientras que en los resultados obtenidos con el resto de grupos no hubo diferencias significativas. Demostrando así la capacidad de utilizarse a las mBMSCs como vehículos en terapias antitumorales.

A



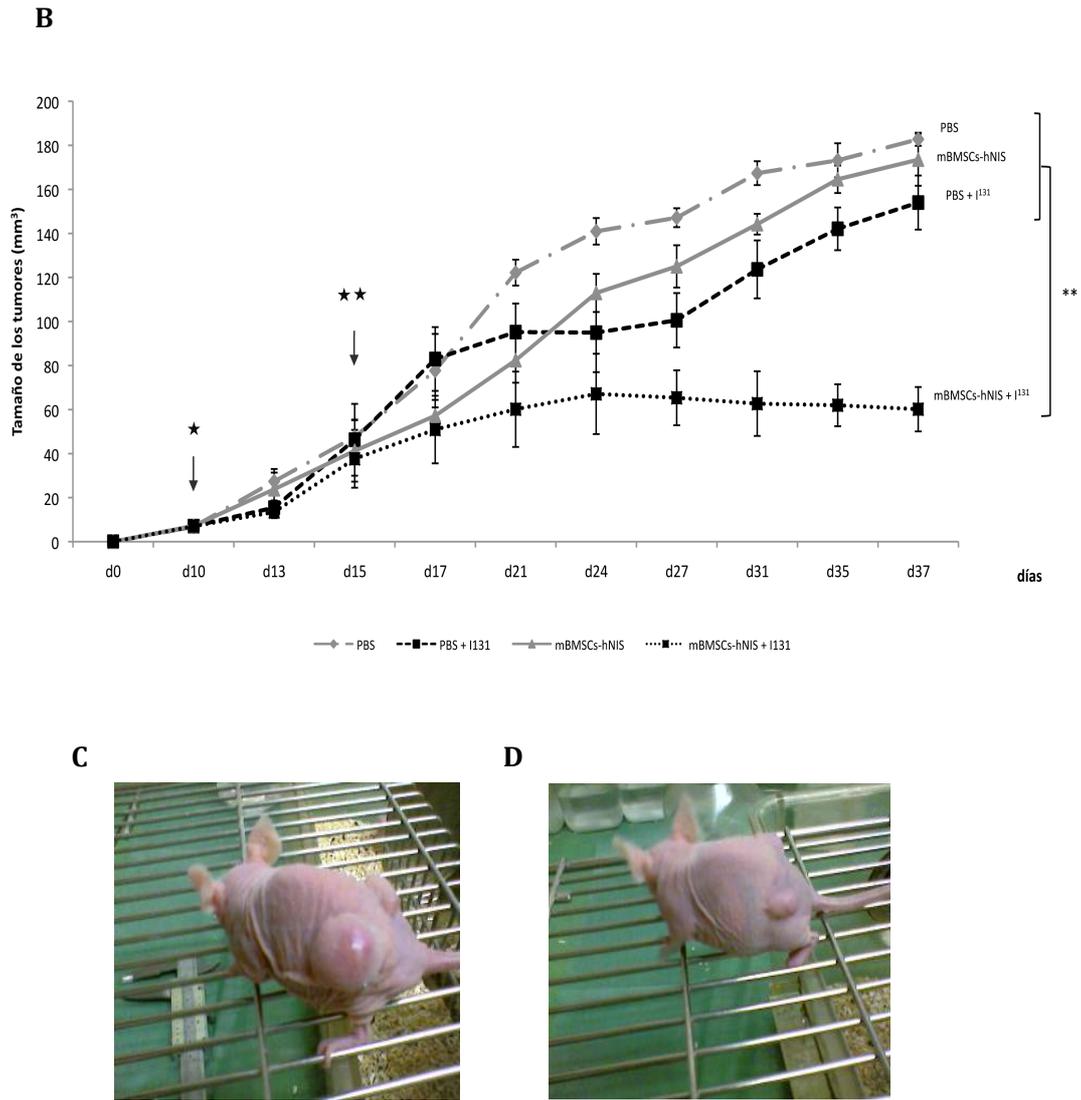


Figura 24: Efecto en el tamaño de los tumores de animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-hNIS y tratamiento con I¹³¹. [A] Secuencia temporal seguida durante el ensayo con I¹³¹. Aproximadamente 10 días tras la inducción de los tumores HeLa, se inyectaron de forma intravenosa las mBMSCs-hNIS o PBS. Entre 4-7 días antes de la administración de las mBMSCs-hNIS, los animales fueron tratados con una dosis de 5mg/l de L-tirosina en el agua. Transcurrido ese tiempo, a los animales de los grupos mBMSCs-hNIS + I¹³¹ y PBS + I¹³¹, les fue administrada de forma intraperitoneal una dosis de 2mCi de I¹³¹. A los animales de los grupos mBMSCs-hNIS y PBS, le fue administrado de forma intraperitoneal un volumen de 200µl de PBS. Durante los 20 días posteriores, los tumores fueron medidos cada 2-3 días. Finalmente, los animales fueron sacrificados a día 37. [B] Representación grafica del efecto terapéutico del tratamiento con I¹³¹. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de unos 10mm³, los animales (n=4) recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs-hNIS o de PBS (indicado con ★). Una semana después, a los animales de los grupos mBMSCs-hNIS + I¹³¹ y PBS + I¹³¹, les fue administrada de forma intraperitoneal una dosis de 2mCi de I¹³¹. A los animales de los grupos mBMSCs-hNIS y PBS, le fue administrado de forma intraperitoneal un volumen de 200µl de PBS (indicado con ★★). [C] Fotografía de un animal del grupo control a día 37. [D] Fotografía de un animal del grupo mBMSCs-hNIS + I¹³¹ a día 37. El análisis estadístico fue realizado con el test Kolmogorov-Smirnov seguido del test Tukey HSD. (p<0,01).**

4.2. Diferencias en la capacidad de migración de hMSCs derivadas de distintos tejidos mediante visualización con técnicas de imagen molecular no invasivas

4.2.1 Caracterización de hMSCs aisladas de diferentes tejidos

Desde la identificación de las células troncales mesenquimales en el estroma de la médula ósea hacia los años 60, multitud de células similares a las de medula ósea han sido identificadas en una gran variedad de tejidos adultos y fetales, usando metodologías similares. Estas células aisladas de otros tejidos comparten un número importante de características con las BMhMSCs, como la propiedad de adherirse a la placa de cultivo, la expresión de un patrón característico de marcadores de superficie y la capacidad de diferenciarse bajo estímulos específicos.

4.2.1.1. Definición de las hMSCs según criterios mínimos

Las diferentes líneas de hMSCs, BMhMSCs, hASCs, hEESCs, hESSCs y hAMCs, se caracterizaron siguiendo las indicaciones sobre los criterios mínimos que definen actualmente a las hMSCs (Dominici et al., 2006). Estos criterios son mostrados en la figura 25.

(1) Adherencia a placa:

Las células fueron capaces de mantenerse adheridas *in vitro* bajo condiciones específicas para cada línea. De forma general, las células mostraron una morfología similar a la fibroblástica con características fusiformes.

(2) Análisis de marcadores de superficie:

Se analizó la expresión de una combinación consenso de marcadores de superficie mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en las figuras 25A-C. Los marcadores negativos analizados en todas las líneas de hMSCs fueron CD45, CD34, HLA-DR. Los marcadores positivos analizados fueron CD90, CD73 y CD105. En las líneas hEESCs y hESSCs, se analizaron también CD9 y CD13 respectivamente. Los resultados obtenidos para los marcadores positivos en todas las líneas de hMSCs mostraron una expresión $\geq 97,5\%$, mientras que los valores de los marcadores negativos fueron $\leq 19,1\%$.

(3) Diferenciación *in vitro*:

Al igual que en las células mBMSCs, la inducción de la diferenciación adipogénica fue mantenida durante 21 días y se evaluó la formación de vacuolas lipídicas usando la tinción con Oil Red O. La inducción de la diferenciación osteogénica fue mantenida durante 14 días y se evaluó la acumulación de calcio en las células mediante tinción con Alizarin Red S. Los resultados son mostrados en la figura 25D, y demostraron la capacidad de cada una de las líneas de hMSCs ensayadas para diferenciarse tanto a osteocitos como a adipocitos.

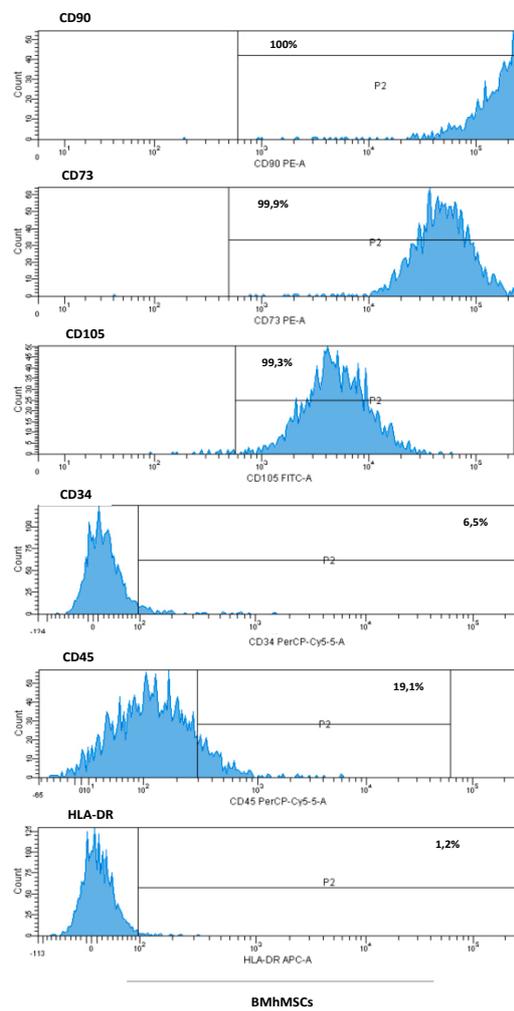


Figura 25A: Caracterización de las diferentes líneas de hMSCs siguiendo las indicaciones sobre los criterios mínimos. Análisis de la expresión de los marcadores de superficie mediante citometría de flujo en las células BMhMSCs, Los valores mostraron niveles de expresión superior al 97,5%, para los marcadores positivos CD90, CD73 y CD105 y niveles de expresión inferiores al 19,1% para los marcadores negativos CD45, CD34 y HLA-DR.

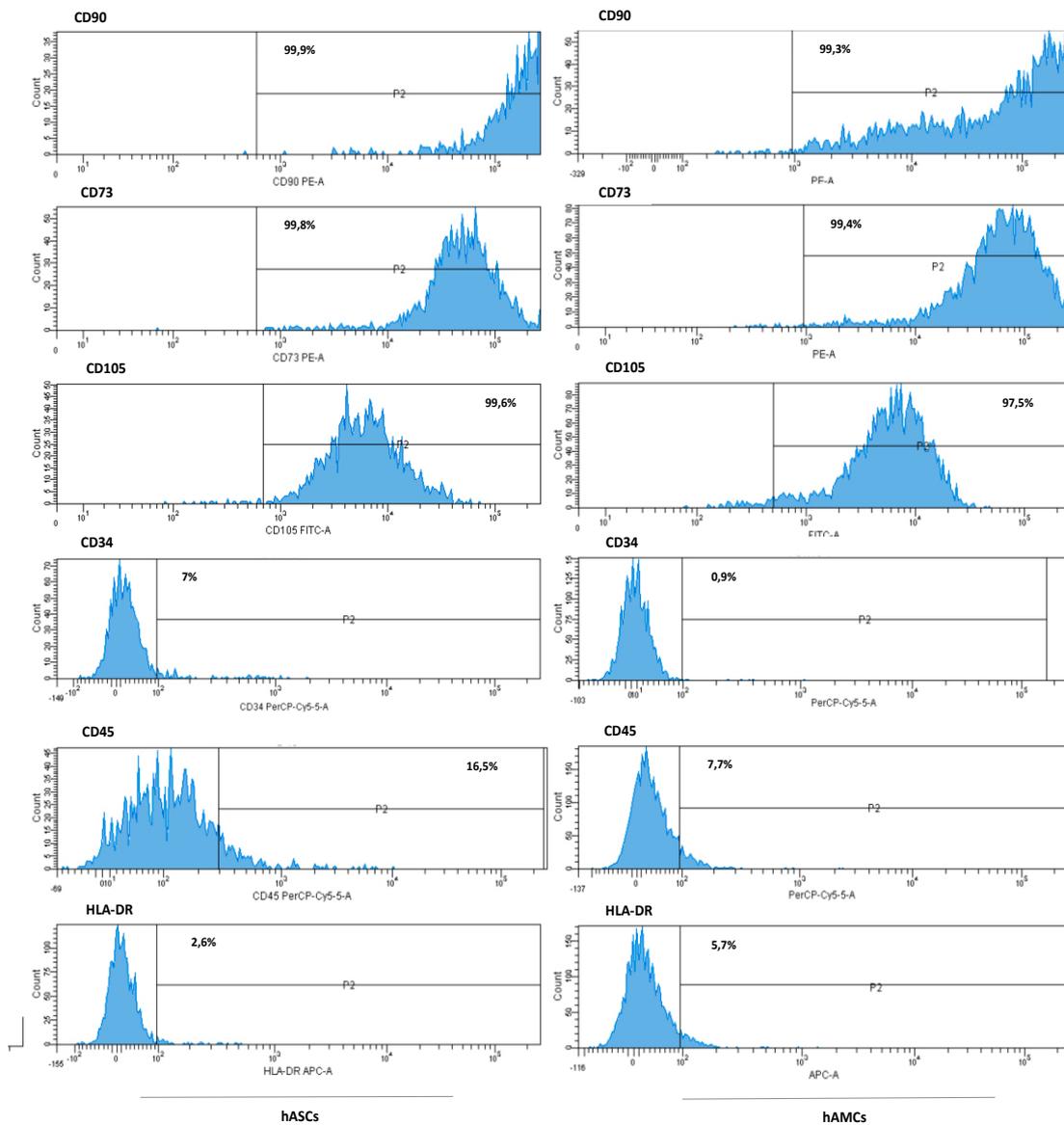


Figura 25B: Caracterización de las diferentes líneas de hMSCs siguiendo las indicaciones sobre los criterios mínimos. Análisis de la expresión de los marcadores de superficie mediante citometría de flujo en las células hASCs y hAMCs. Los valores mostraron niveles de expresión superior al 97,5%, para los marcadores positivos CD90, CD73 y CD105 y niveles de expresión inferiores al 19,1% para los marcadores negativos CD45, CD34 y HLA-DR.

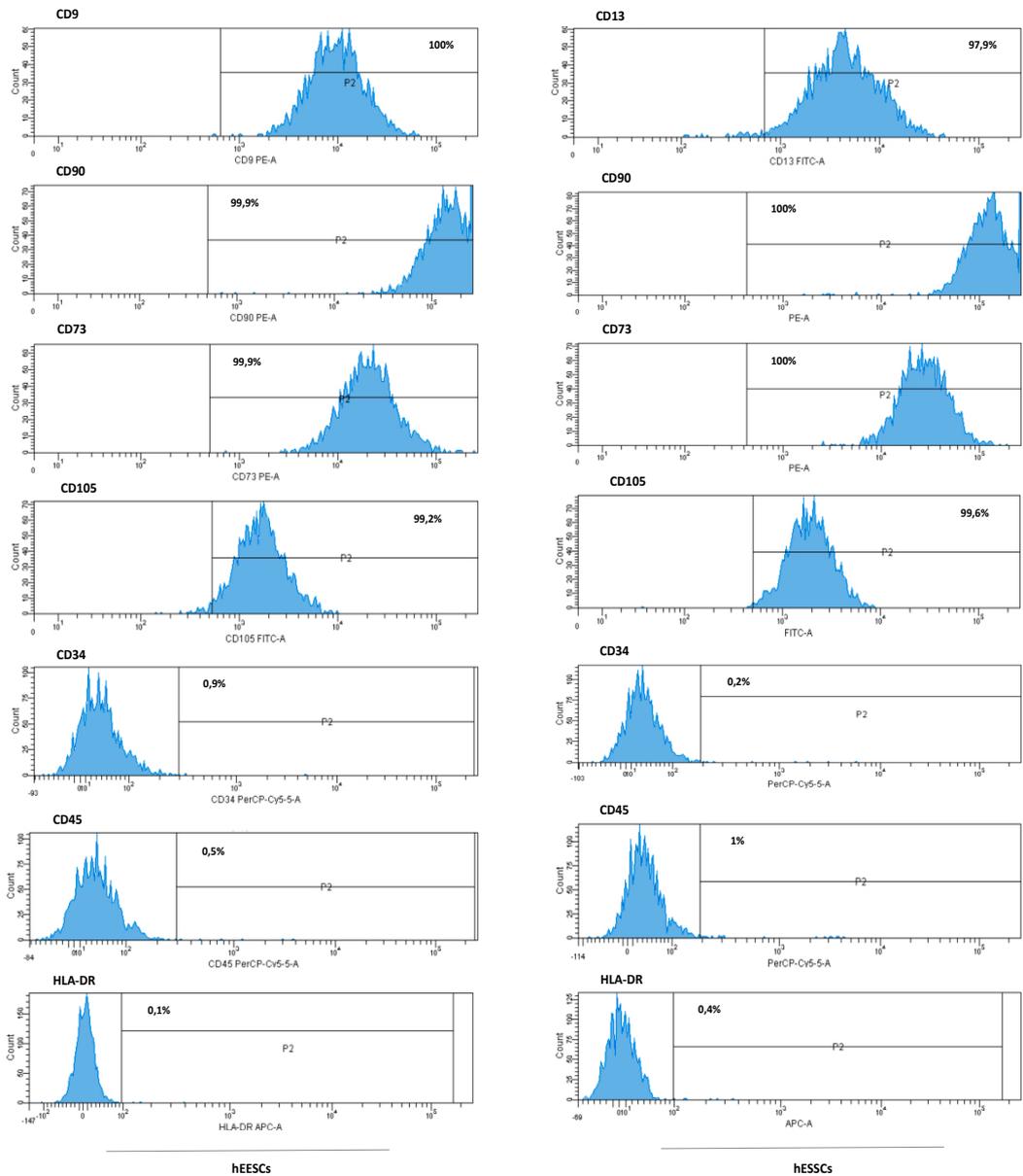


Figura 25C: Caracterización de las diferentes líneas de hMSCs siguiendo las indicaciones sobre los criterios mínimos. Análisis de la expresión de los marcadores de superficie mediante citometría de flujo en las células hEESCs y hESSCs. Los valores mostraron niveles de expresión superior al 97,5%, para los marcadores positivos CD90, CD73, CD105, CD9 y CD13 y niveles de expresión inferiores al 19,1% para los marcadores negativos CD45, CD34 y HLA-DR.

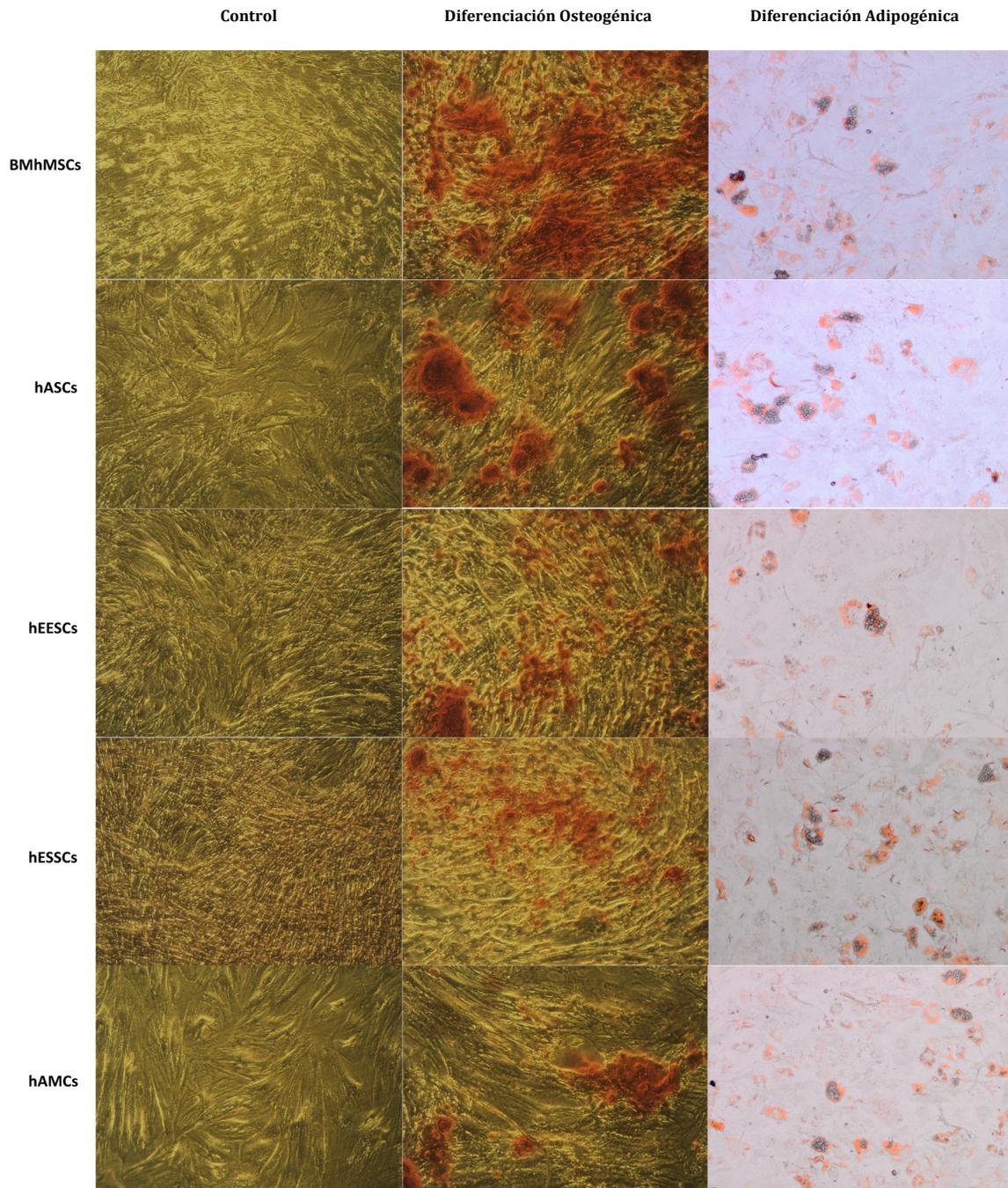


Figura 25D: Caracterización de las diferentes líneas de hMSCs siguiendo las indicaciones sobre los criterios mínimos. Tras mantener a cada una de las líneas de hMSCs en condiciones de inducción de diferenciación y posteriormente mediante tinción con Red Oil O y Alizarin Red S, la capacidad de las BMhMSCs, hASCs, hEESCs, hESSCs y hAMCs a diferenciarse tanto a adipocitos como a osteocitos respectivamente fue evaluada. Los controles fueron mantenidos en condiciones normales.

4.2.1.2. Efecto de la concentración de oxígeno en la viabilidad y proliferación celular

Fisiológicamente, los nichos donde residen las MSCs de médula ósea como de otros tejidos, poseen baja tensión de oxígeno de alrededor de 1-3% (Rosová, Dao, Capoccia, Link, & Nolte, 2008; Saller et al., 2012). A pesar de que se conoce que la concentración de O₂ es a menudo un factor importante en muchos aspectos de la biología de las MSCs, generalmente son mantenidas *in vitro* bajo condiciones no fisiológicas (21% de O₂).

Con el fin de evaluar el efecto de la concentración de O₂ en el mantenimiento y estado de las MSCs, se realizó un ensayo de viabilidad mediante la técnica del AlamarBlue, durante un periodo de 11 días. Para ello, cada una de las líneas de hMSCs se mantuvieron en sus medios de cultivos óptimos tanto en normoxia (21% de O₂) como en hipoxia (3% de O₂). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 26. En las BMhMSCs mantenidas en condiciones de hipoxia, los valores obtenidos hasta el día 7 fueron mayores que en el caso de las mantenidas en normoxia mostrando así una fase exponencial de crecimiento significativamente más rápida. A partir del día 9, y después de una fase estacionaria las células entraron en fase de declive o muerte celular en ambas condiciones. En el caso de las hEESCs y hESSCs las diferencias en la curva de crecimiento entre ambas condiciones fueron significativas. Las células mantenidas en condiciones de hipoxia, llegaron de forma mucho más rápida a la fase estacionaria respecto a las células mantenidas en condiciones de normoxia, que a día 11 aún no habían llegado a la fase estacionaria. Las hAMCs mantenidas tanto en hipoxia como en normoxia, apenas mostraron diferencias en su curva de crecimiento. Los valores obtenidos de las hASCs, mostraron una curva similar en ambas condiciones con valores ligeramente superiores en las células mantenidas en normoxia.

Los resultados demostraron que en las líneas BMhMSCs, hEESCs y hESSCs, el efecto de una baja concentración de O₂, ejerce de forma significativa una curva de crecimiento más rápida, mientras que en el caso de las líneas hASCs y hAMCs, no se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones.

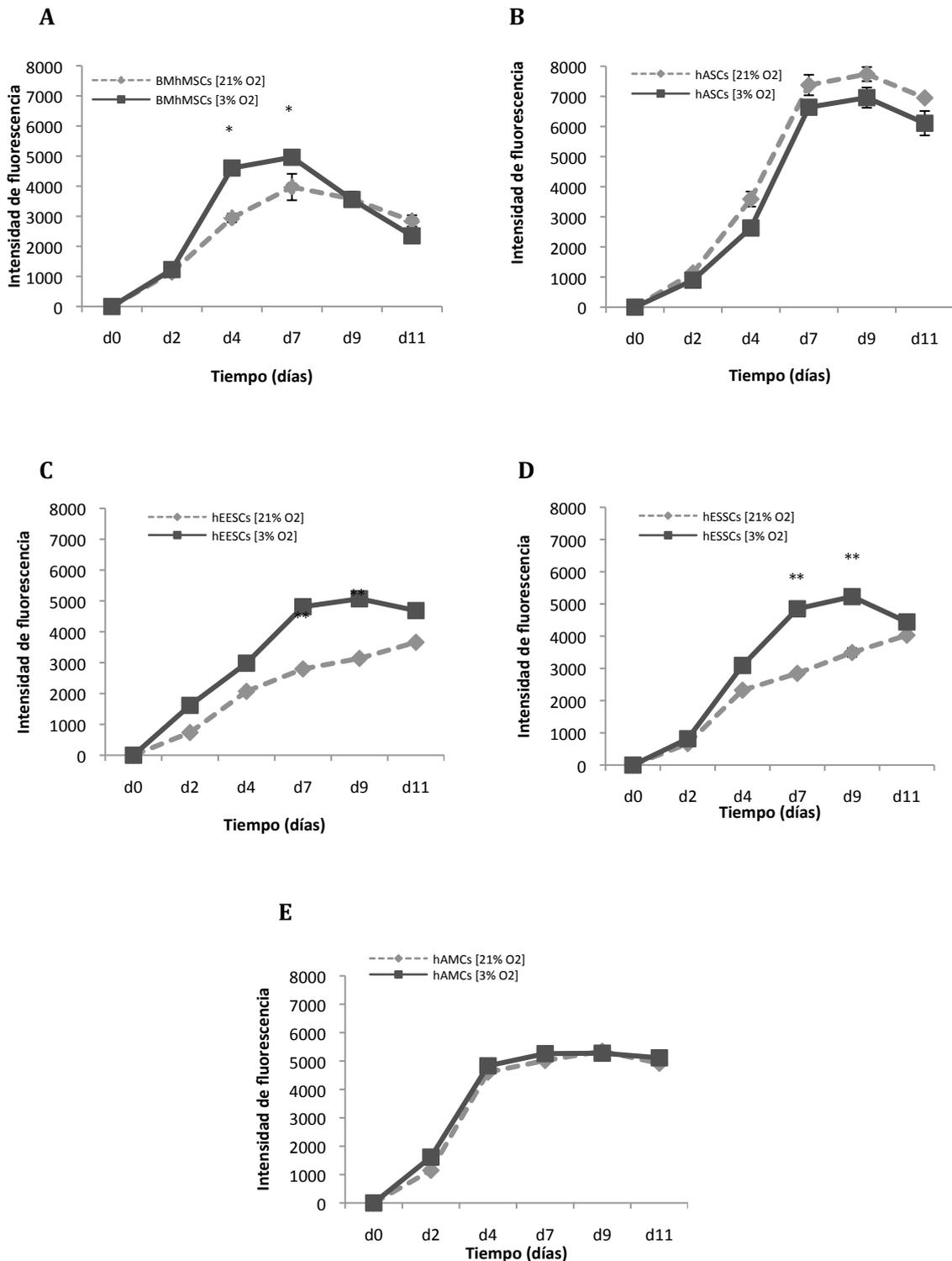


Figura 26: Análisis del efecto de la concentración de oxígeno en la viabilidad y proliferación de las diferentes líneas de hMSCs. Cada línea de hMSCs fue mantenida en condiciones de normoxia (21% de O₂) y en condiciones de hipoxia (3% de O₂) durante un periodo de 11 días. El ensayo fue realizado por AlamarBlue y evaluada por lectura de absorbancia a 590nm. **[A]** BMhMSCs; **[B]** hASCs; **[C]** hEESCs; **[D]** hESSCs; **[E]** hAMCs. El análisis estadístico fue realizado con el test Kolmogorov-Smirnov seguido del test Tukey HSD. (* p<0,05; **p<0,01).

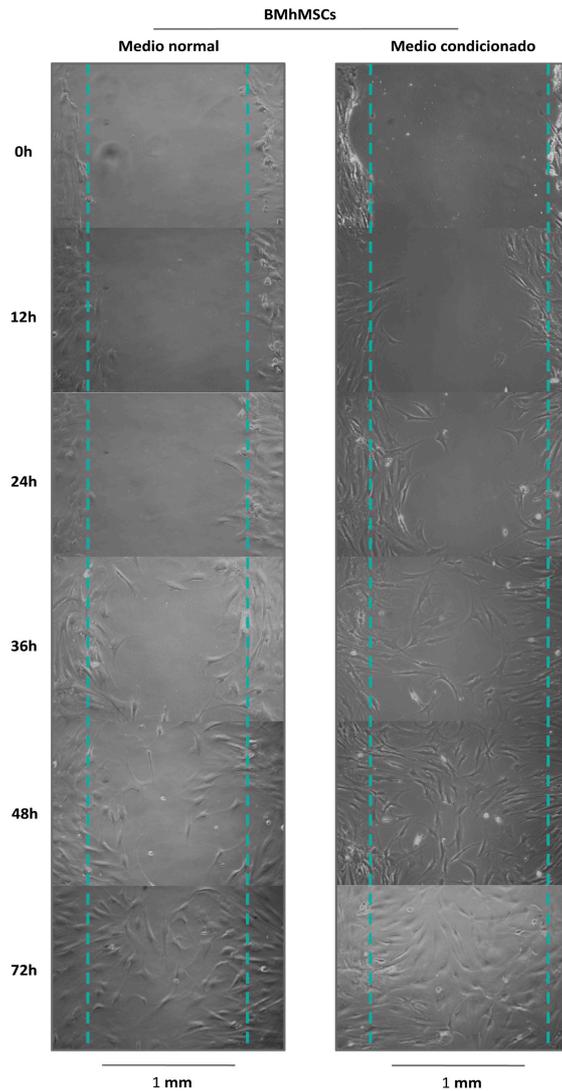
4.2.1.3. Capacidad de migración *in vitro*

Con el objetivo de estudiar el proceso de migración de las hMSCs, se realizó con cada una de las líneas de hMSCs, un ensayo *in vitro*, mediante el cual se permitió a las células colonizar un espacio generado en la monocapa, imitando en rasgos generales a la migración celular *in vivo*. Fueron ensayadas dos condiciones diferentes (i) empleando medio de cultivo normal de cada línea de hMSCs, y (ii) empleando medio de cultivo normal de cada línea de hMSCs suplementado o condicionado (manteniendo células A549 en el medio de cultivo durante 24 horas y que es posteriormente filtrado).

En la figura 27 se muestran las imágenes a distintos intervalos de tiempo obtenidas para cada condición. En todas las líneas de hMSCs, la velocidad de colonización del espacio libre fue más rápido cuando se añadió el medio condicionado. En las BMhMSCs, la velocidad de migración fue más lenta comparada con el resto de hMSCs. Hasta después de las 72 horas no se observó cierre completo del espacio bajo condiciones normales comparado con las 48 horas con medio condicionado. El resto de hMSCs siguieron patrones similares. En el caso de las hASCs y hEESCs, el cierre del espacio se produjo antes de las 24 horas con medio condicionado mientras que en condiciones normales no se observó hasta después de las 36 horas. Para las hESSCs y hAMCs, el cierre del espacio se produjo después de las 48 bajo condiciones normales mientras que en medio condicionado, el cierre del espacio se observó a las 48 horas.

Los resultados obtenidos mostraron un patrón de migración *in vitro* similar para las líneas hASCs, hEESCs, hESSCs y hAMCs en ambas condiciones. La línea de BMhMSCs, fueron las células que presentaron una velocidad de colonización más lenta. La adición a las células del medio condicionado, supuso en todos los casos, un aumento en la velocidad de migración y cierre del espacio generado.

A



B

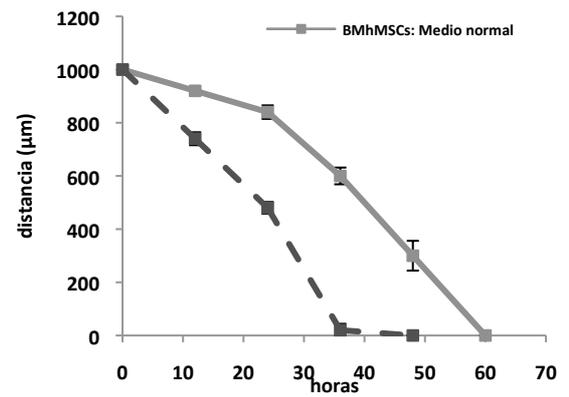


Figura 27: Capacidad de las hMSCs de colonizar un espacio generado en la monocapa celular. El espacio generado fue de aproximadamente 1mm de grosor. La colonización del espacio libre fue evaluado a 0, 12, 24, 36, 48 y 72 horas. Las células fueron mantenidas tanto en medio normal como en medio condicionado de células A549. **[A]** Fotografías del ensayo de BMhMSCs. Imágenes a 10x. **[B]** Representación grafica de la velocidad de colonización de ambas condiciones de las BMhMSCs.

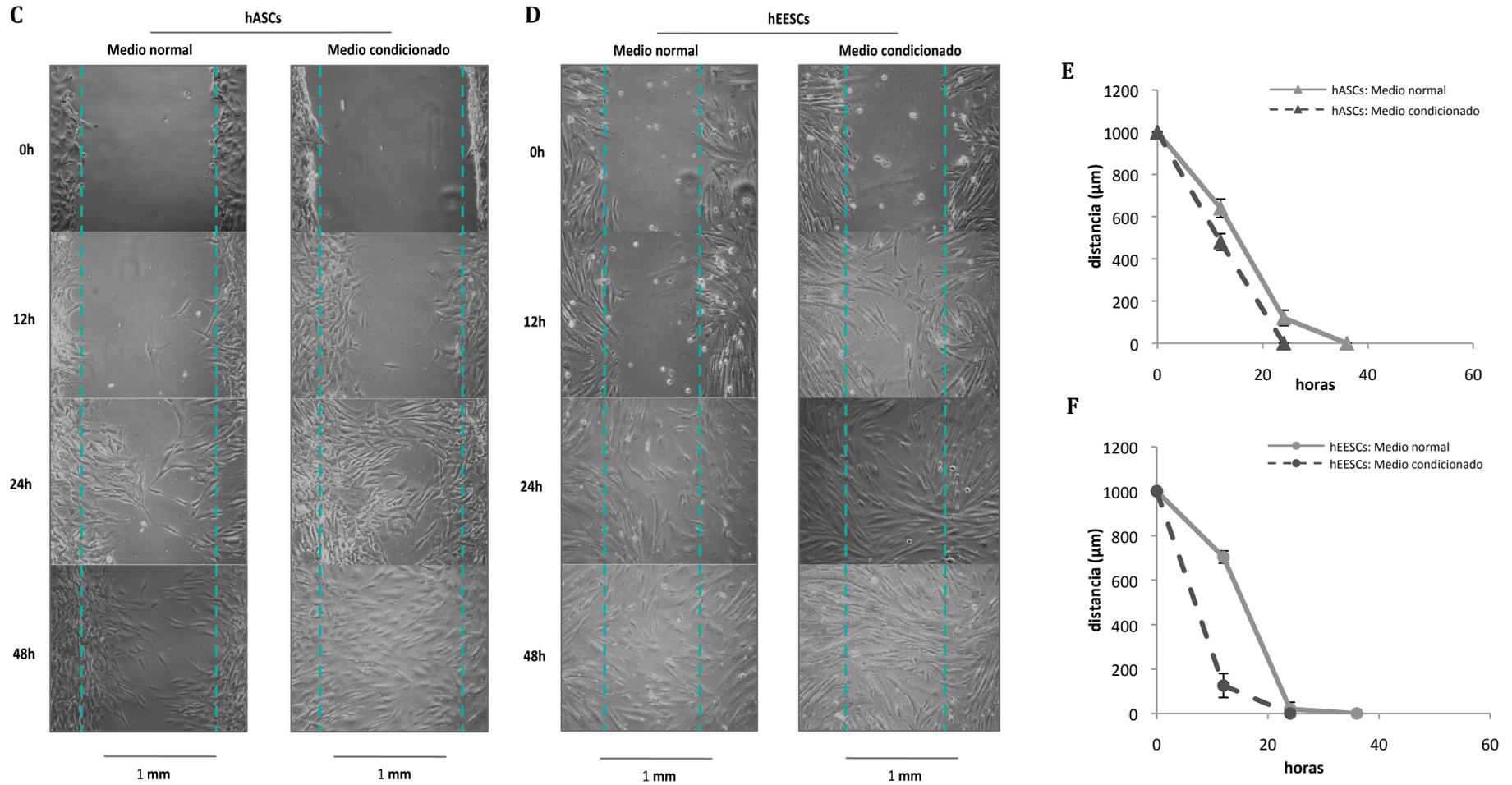


Figura 27: Capacidad de las hMSCs de colonizar un espacio generado en la monocapa celular. El espacio generado fue de aproximadamente 1mm de grosor. La colonización del espacio libre fue evaluado a 0, 12, 24 y 48 horas. Las células fueron mantenidas tanto en medio normal como en medio condicionado de células A549. **[C]** Fotografías del ensayo de hASCs (10x). **[D]** Fotografías del ensayo de hEESCs (10x). **[E]** Representación grafica de la velocidad de colonización de ambas condiciones de las hASCs. **[F]** Representación grafica de la velocidad de colonización de ambas condiciones de las hEESCs.

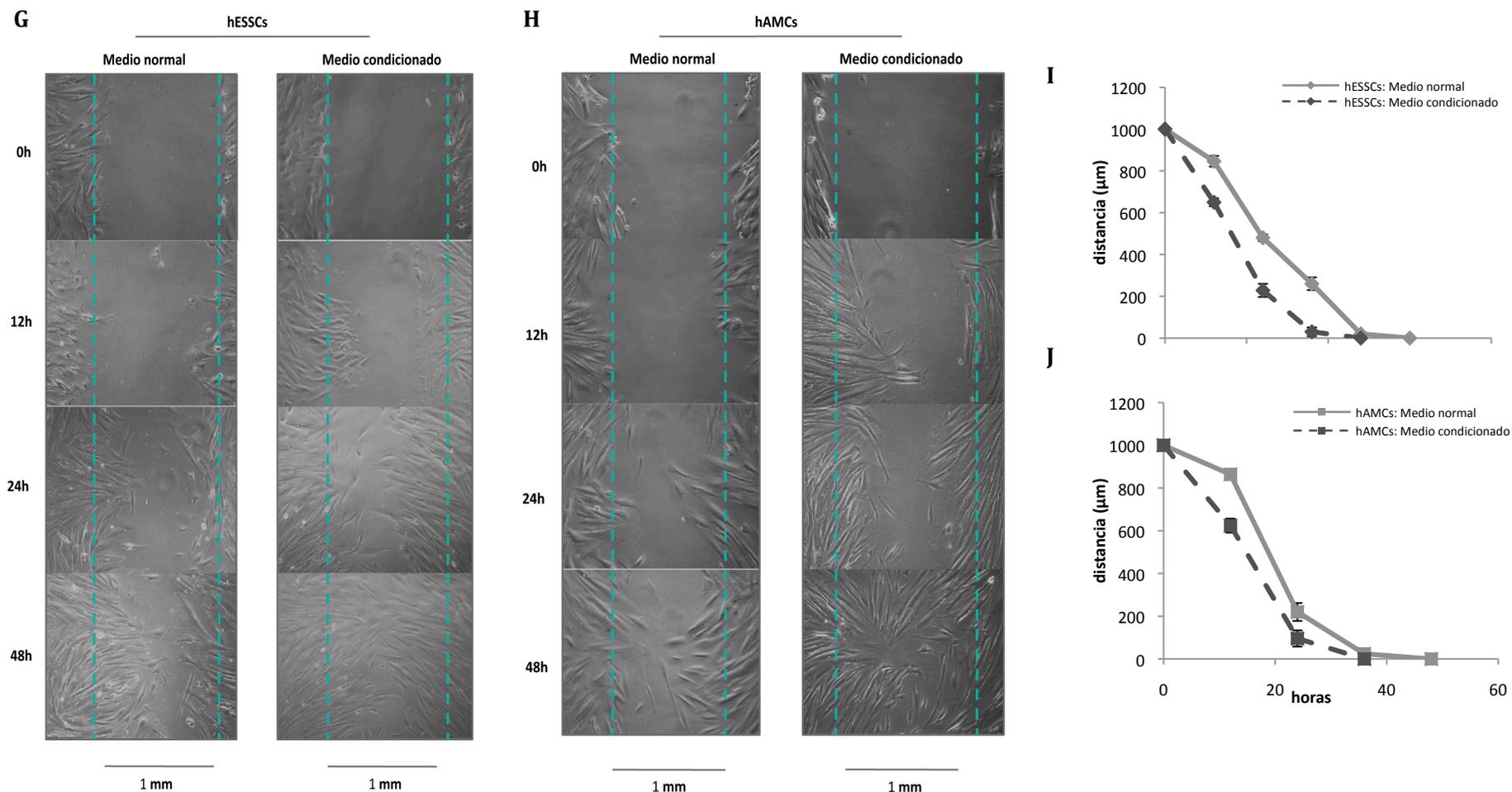


Figura 27: Capacidad de las hMSCs de colonizar un espacio generado en la monocapa celular. El espacio generado fue de aproximadamente 1mm de grosor. La colonización del espacio libre fue evaluado a 0, 12, 24 y 48 horas. Las células fueron mantenidas tanto en medio normal como en medio condicionado de células A549. **[G]** Fotografías del ensayo de hESCs (10x). **[H]** Fotografías del ensayo de hAMCs (10x). **[I]** Representación grafica de la velocidad de colonización de ambas condiciones de las hESCs. **[J]** Representación grafica de la velocidad de colonización de ambas condiciones de las hAMCs.

4.2.2. Caracterización de la permisividad celular de las hMSCs a la infección por vectores adenovirales

4.2.2.1. Análisis de la expresión del receptor CAR en hMSCs

Con el fin de evaluar la capacidad de las distintas líneas de hMSCs a ser infectadas por adenovirus, igual que se realizó con las mBMSCs, se analizó la expresión del receptor CAR por *western-blot*. Como control positivo de células humanas que expresan el receptor, se utilizaron extractos de proteína de las líneas A549, HT29 y HEK293. Como control de carga se empleó β -actina. Los resultados mostrados en la figura 28 indicaron que ninguna de las líneas de hMSCs analizadas expresan el receptor CAR o que los niveles de expresión, al igual que ocurría con las mBMSCs, eran muy bajos para ser detectados por *western-blot*. A diferencia de lo observado en las diferentes líneas de hMSCs, se encontró expresión del receptor CAR en las hiPSCs, mostrando niveles similares a los encontrados en la línea de células HEK293.

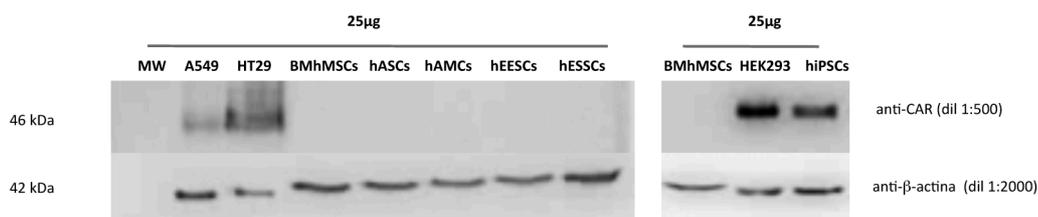


Figura 28: Análisis de la expresión de CAR por *western-blot* en cada una de las líneas de hMSCs y en hiPSCs. Como control positivo de CAR se utilizaron extractos de proteínas de células A549, HT29 y HEK293. Como control de carga fue utilizada β -actina. Ninguna banda de 46 kDa fue obtenida en el caso de las hMSCs, mientras que si se obtuvo banda en caso de las hiPSCs.

4.2.2.2. Infección con vectores adenovirales en hMSCs

Ya que los resultados obtenidos acerca del receptor CAR en las líneas de hMSCs analizadas, fueron similares a los encontrados con las mBMSCs, se realizó un ensayo de infectividad empleando un AdGFP, para evaluar la capacidad que tienen dichas células para ser eficazmente infectadas mediante vectores adenovirales. Para ello probamos a realizar infecciones a 10, 100, 500 y 2000 MOIs. En la figura 29, se muestran las imágenes de fluorescencia obtenidas a 100 y 500 MOIs a las 48 horas de la infección.

Con el análisis de las imágenes, se comprobó la capacidad de las células a ser infectadas de forma eficaz mediante vectores adenovirales. A 24 horas de la infección, solamente se observó expresión de GFP en las células infectadas a 500 y 2000 MOIs. No se observó expresión de GFP ni a 10 ni a 100 MOIs. 48 horas tras la infección, se observó expresión de GFP en todas las concentraciones adenovirales empleadas. A 72 horas tras la infección, en las BMhMSCs, hASCs y hAMCs infectadas a 2000 MOIs, se empezó a observar muerte celular, mientras que en las hEESCs y hESSCs infectadas a 2000 MOIs, la mayoría de las células estaban muertas. Con estos resultados, se determinó la concentración adenoviral de 500 MOIs como la adecuada para realizar los ensayos durante todo el trabajo de tesis.

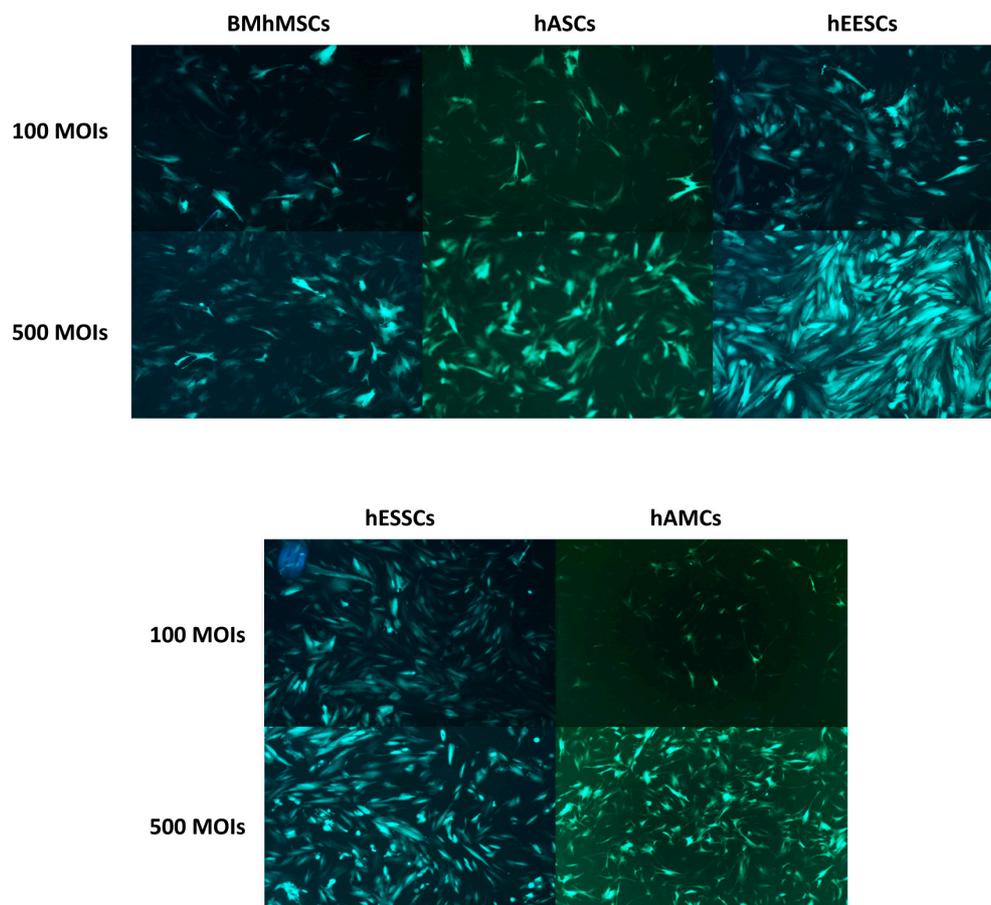


Figura 29: Visualización mediante microscopía de fluorescencia de las hMSCs infectadas con un AdGFP a diferentes multiplicidades de infección o MOIs. Las fotografías corresponden a las células 48 horas tras la infección con un AdGFP a 100 y 500 MOIs. Imágenes a 10x.

4.2.3. Tropismo de las hMSCs *in vivo* en un modelo de tumor

Con el objetivo de confirmar la capacidad *in vivo* de migrar hacia zonas de daño obseada anteriormente en las mBMSCs era idéntica en las distintas líneas de hMSCs, se realizaron dos técnicas de imagen molecular no invasivas diferentes, en un modelo de tumor (i) MRI, utilizando nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro o SPIO para marcar las células; y (ii) nanoSPECT/CT, empleando hNIS como gen reportero para el seguimiento de las células. En la figura 30, se indica la secuencia temporal seguida durante los ensayos.

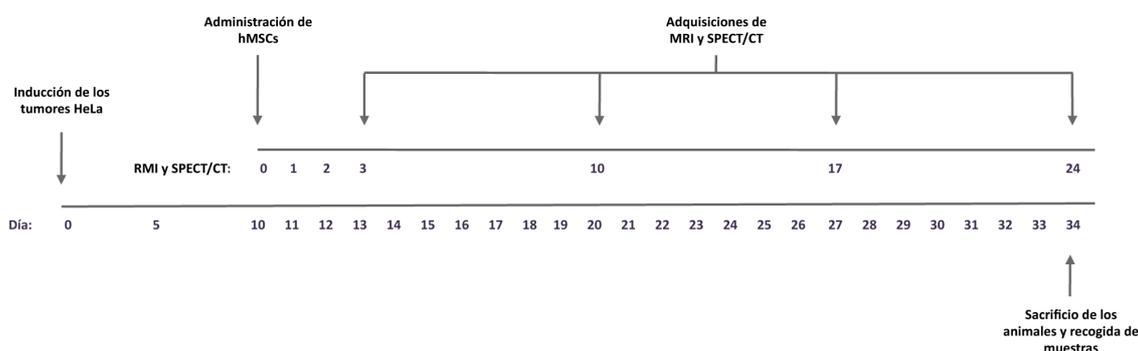


Figura 30: Secuencia temporal seguida durante los experimentos *in vivo* de nanoSPECT/CT y MRI. Aproximadamente 10 días tras la inducción de los tumores, se inyectaron de forma intravenosa las hMSCs en ambos experimentos. Las adquisiciones de las imágenes se realizaron a día 3, 10, 17 y 24 de la inyección intravenosa de las hMSCs o a día 13, 20, 27 o 34 de la inducción de los tumores. Finalmente, los animales fueron sacrificados tras realizar las últimas adquisiciones a día 24 de la inyección intravenosa o a día 34 de la inducción de los tumores.

4.2.3.1. Imagen por MRI

Antes de realizar los ensayos *in vivo* de MRI, tanto la viabilidad y proliferación de las células marcadas con SPIO como la capacidad de retención de las mismas, fue valorada durante un periodo de 10 días *in vitro* por exclusión con azul tripán y tinción con Azul de Prusia. Como control se utilizaron células no marcadas y representadas como el 100% de viabilidad celular. Como muestra la figura 31, los valores obtenidos comparados con el control fueron de $99.23 \pm 3.18\%$ en las BMhMSCs, de $101.53 \pm 5.6\%$ en las hASCs, de $96.4 \pm 1.75\%$ en las hEESCs, de $100.28 \pm 0.97\%$ en las hESSCs y de $98.05 \pm 6.15\%$ en las hAMCs. Los resultados revelaron que el marcaje con SPIO no afecta de manera significativa ni a la viabilidad ni a la proliferación celular. Además, como se observa en la figura 32, después de 10 días del marcaje, se observa coloración azul,

indicando que las células fueron capaces de retener en su interior las nanopartículas de SPIO.

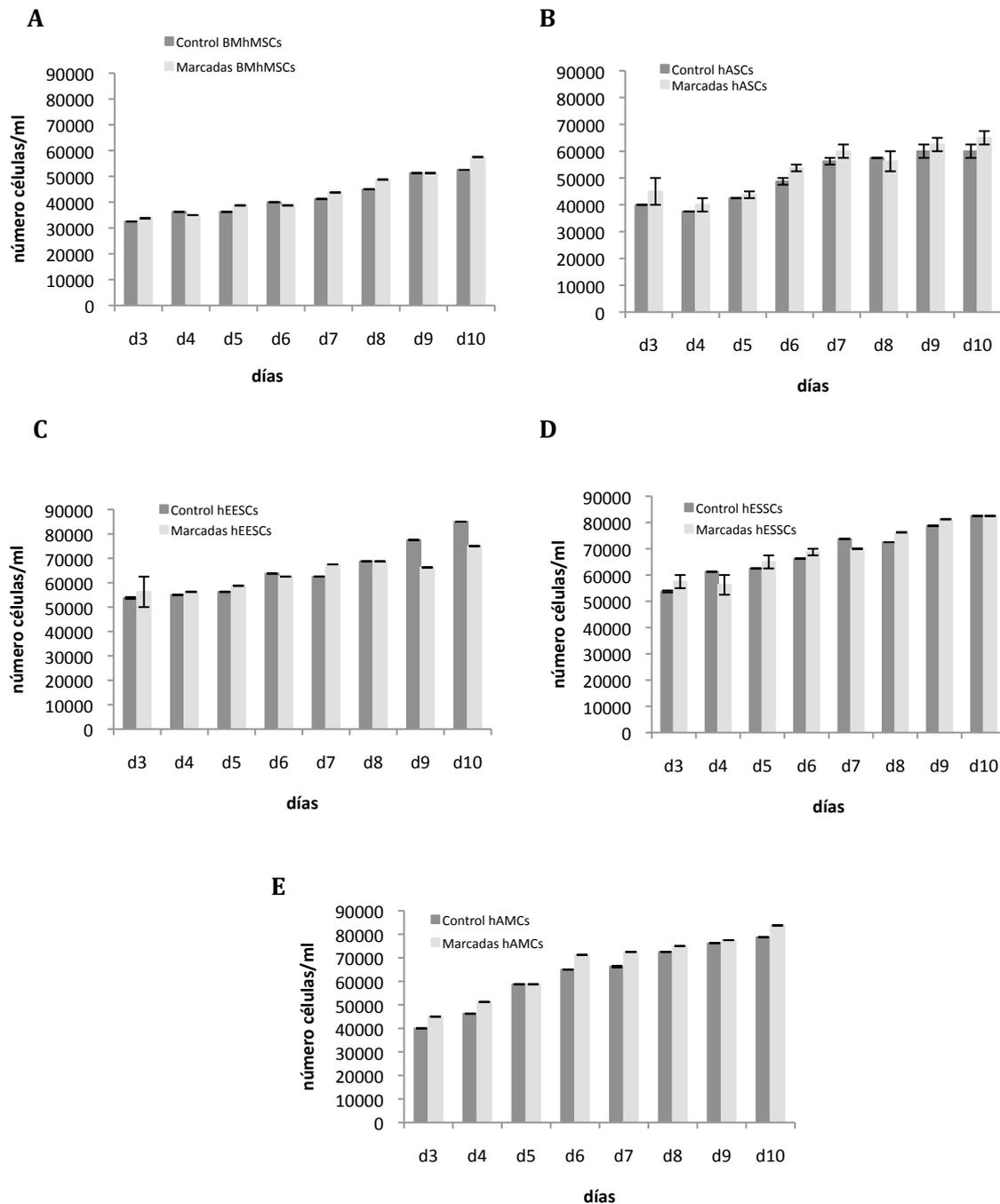


Figura 31: Análisis de la viabilidad y proliferación *in vitro* de cada una de las líneas de hMSCs marcadas durante un periodo de 10 días con las nanopartículas SPIO. La viabilidad y proliferación fueron evaluadas mediante exclusión con azul tripán. Como control se utilizaron cada una de las líneas de hMSCs sin marcar con SPIO y mantenidas en condiciones normales. [A] BMhMSCs; [B] hASCs; [C] hEESCs; [D] hESSCs; [E] hAMCs.

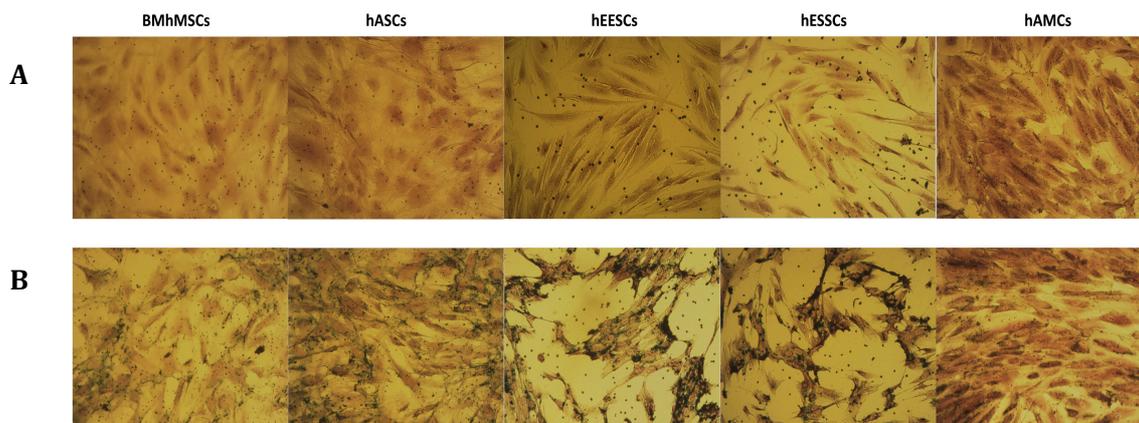


Figura 32: Capacidad de retención de las nanopartículas SPIO en cada una de las líneas de hMSCs durante un periodo de 10 días. La capacidad de retención del marcaje fue evaluado mediante tinción con hematoxilina-eosina y azul de Prusia. **[A] Células control.** Se utilizaron cada una de las líneas de hMSCs sin marcar con SPIO y fueron mantenidas en condiciones normales. **[B] Células marcadas con SPIO.** La coloración azul indicó presencia de nanopartículas de óxido de hierro (SPIO). Imágenes a 10x.

Los estudios de RMI se realizaron con el objetivo de evaluar la capacidad de cada una de las líneas de hMSCs para migrar *in vivo* a los tumores. Cuando los tumores subcutáneos de células HeLa alcanzaron el tamaño deseado, aproximadamente 50mm³, los animales fueron separados aleatoriamente en cinco grupos ensayo: grupo BMhMSCs-SPIO (n=4), grupo hASCs-SPIO (n=4), grupo hEESCs-SPIO (n=4), grupo hESSCs-SPIO (n=4), grupo hAMCs-SPIO (n=4); y un grupo control (n=4). Los animales de cada grupo ensayo recibieron inyecciones intravenosas en la vena lateral de la cola de 10⁶ de cada una de las líneas de hMSCs marcadas con SPIO. Los animales del grupo control recibieron una inyección intravenosa de 200µl de PBS.

En las imágenes transversales obtenidas, los tumores se observaron como zonas claras o brillantes. El reclutamiento de las células marcadas con SPIO en los tumores resultó en un descenso en la intensidad de la señal (SI) correspondiéndose con las zonas oscuras en la zona de los tumores. Los cambios en la SI fueron detectados en imágenes T2 ponderadas (figura 34). Ningún descenso en la SI fue observado en las imágenes de los animales del grupo control (figura 33). En las adquisiciones realizadas a día 3 tras la inyección intravenosa, se pudieron observar cambios en la SI entre los diferentes grupos de ensayo. Las imágenes obtenidas de los grupos hASCs-SPIO,

hEESCs-SPIO y hESSCs-SPIO a día 3 mostraron un descenso mayor en la SI respecto a lo que se observó en las imágenes de los grupos hAMCs-SPIO y BMhMSCs-SPIO. Estas diferencias fueron más pronunciadas a día 10, dejando ver diferencias en la capacidad de migración entre las distintas líneas de hMSCs. En todos los grupos de ensayo, el descenso en la SI fue primero observado alrededor del área del tumor y después hacia el interior del mismo, siendo mucho más significativo en el caso de los grupos hEESCs-SPIO y hESSCs-SPIO. Para confirmar estos resultados, al finalizar el último escaneo a día 24, los animales fueron sacrificados y los tumores de cada grupo ensayo fueron procesados, mediante tinción con Azul de Prusia, para detectar las células marcadas con SPIO.

En los cortes de los tumores de cada grupo ensayo, mostrados en la figura 35, se observaron zonas de intenso color azul que correspondía a zonas con presencia de nanopartículas de óxido de hierro. En las imágenes a mayor magnificación se comprobó que la localización de esas nanopartículas se encontraban de forma intracitoplasmática y que había ausencia de ellas en el exterior celular. Los cortes de los animales del grupo control, fueron negativos a la tinción con Azul de Prusia.

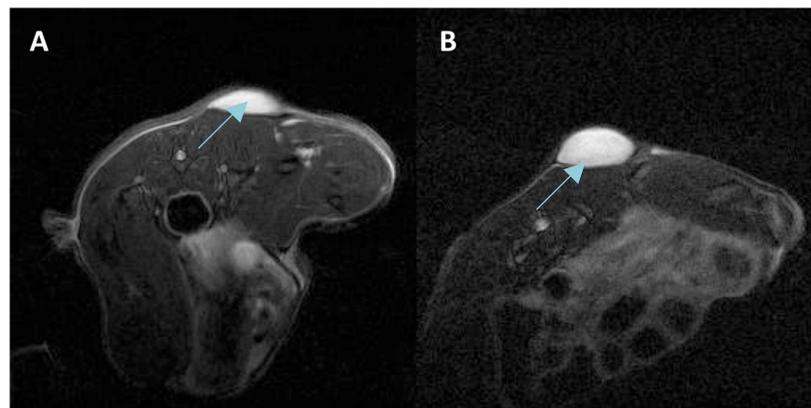


Figura 33: Visualización mediante MRI de los tumores de los animales control. Las imágenes corresponden a las adquisiciones realizadas a día 10 y 17 en los animales control tras la inyección intravenosa de PBS. Los tumores se localizan en el lado izquierdo de las imágenes transversales de los animales. Los tumores fueron observados como zonas claras o brillantes (indicado por una flecha). Ningún cambio fue detectado en la intensidad de señal (SI). **[A]** Sección transversal del animal a día 10; **[B]** Sección transversal del animal a día 17.

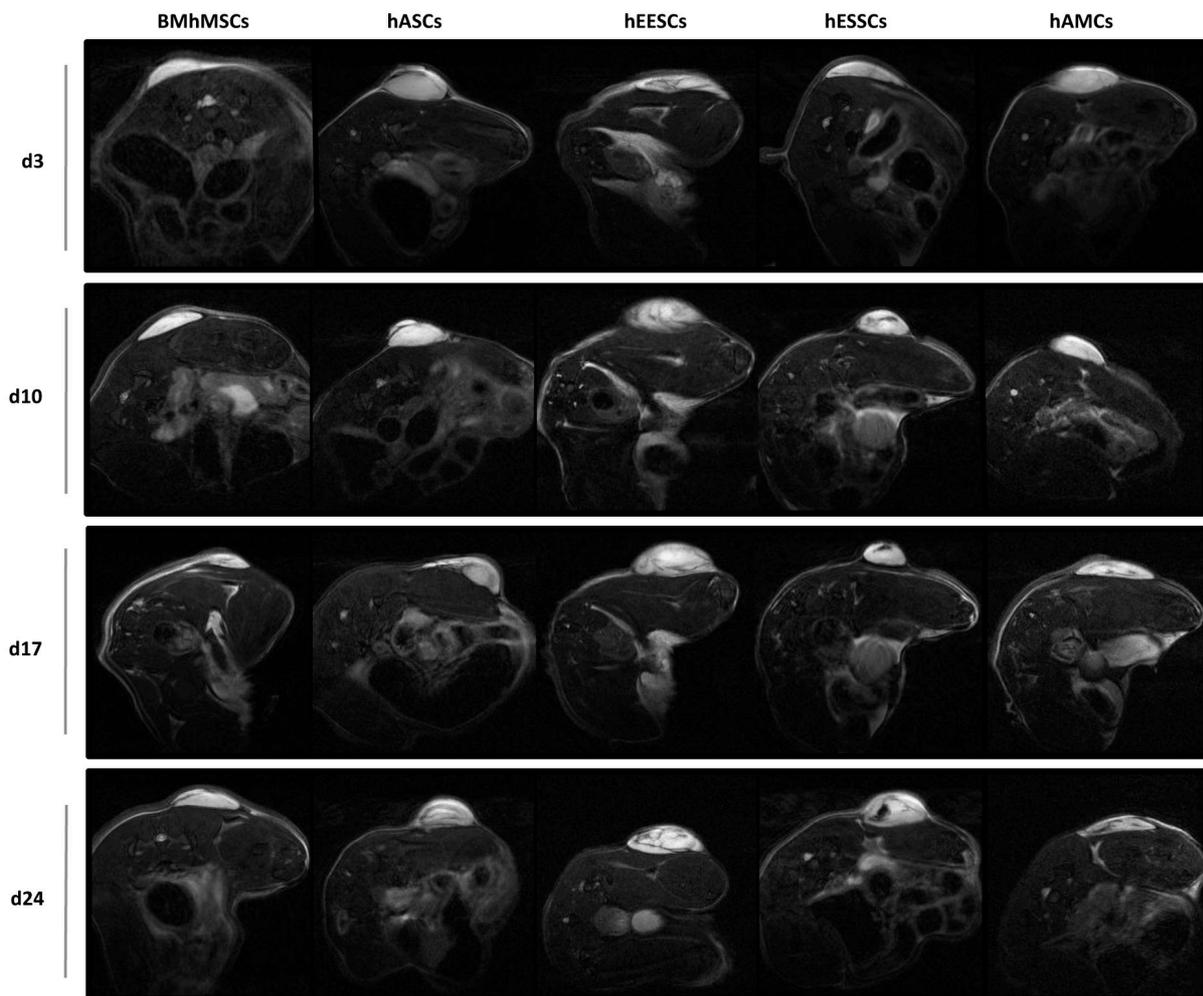


Figura 34: Visualización mediante MRI de la presencia de nanopartículas SPIO en los tumores de los animales que recibieron una inyección intravenosa de cada una de las líneas de hMSCs-SPIO. Las imágenes corresponden a las adquisiciones realizadas a día 3, 10, 17 y 24 en los animales del grupo ensayo tras la inyección intravenosa de hMSCs-SPIO. Los tumores se localizan en el lado izquierdo de las imágenes transversales de los animales. Los mismos animales son representados a lo largo del ensayo. Los tumores fueron observados como zonas claras o brillantes. El reclutamiento de las hMSCs-SPIO en los tumores de cada grupo ensayo resultó en un descenso de la intensidad de señal (SI) originando zonas oscuras.

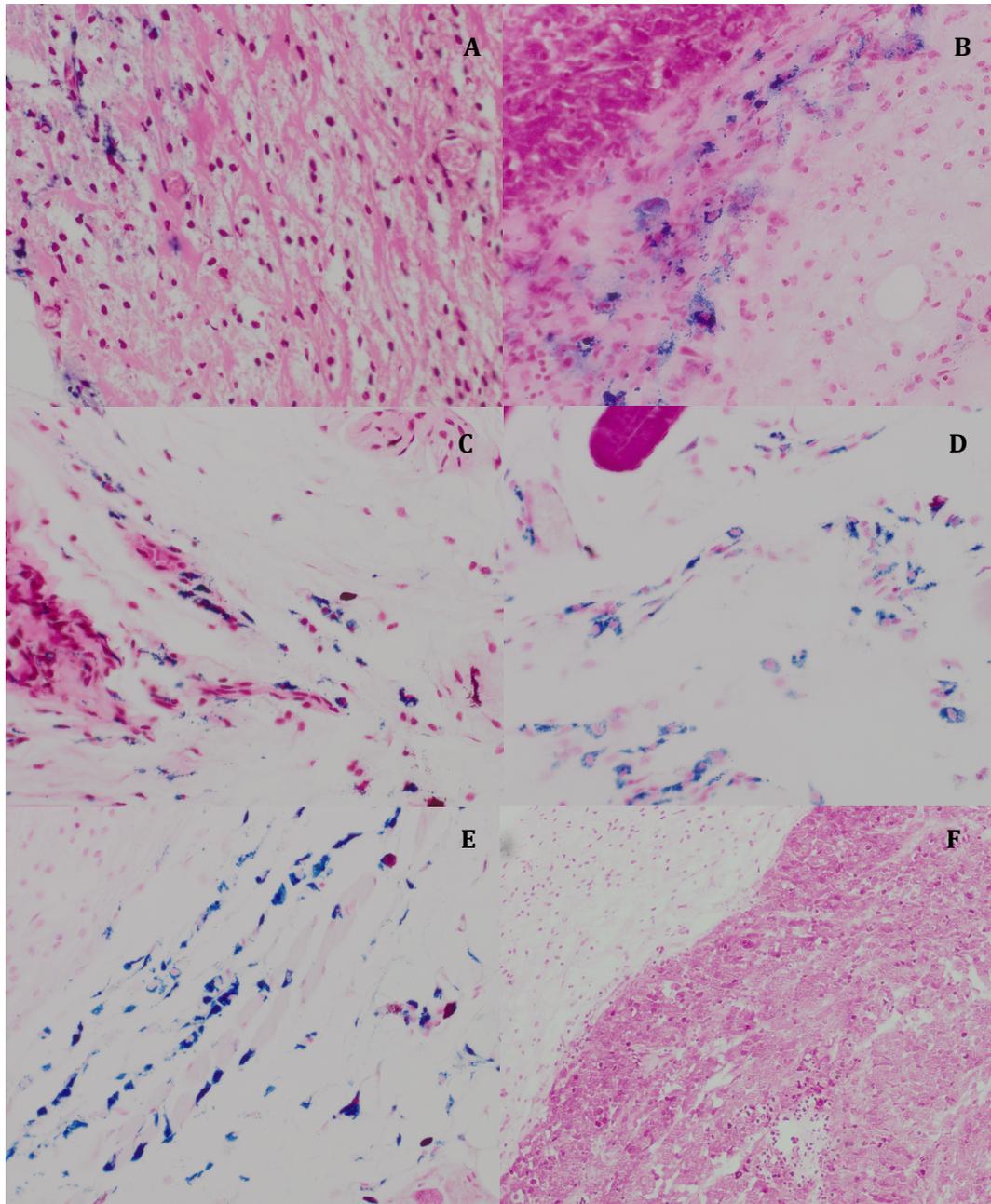


Figura 35: Detección de las SPIO en cortes de tumores de los animales que recibieron una inyección intravenosa de hMSCs-SPIO mediante tinción con Azul de Prusia. Los animales fueron sacrificados tras realizar la adquisición del día 24. Las muestras fueron procesadas por tinción con hematoxilina-eosina y Azul de Prusia. La coloración azul intenso indicó presencia de las nanopartículas de óxido de hierro (SPIO). **[A]** Imágenes de BMhMSCs-SPIO (20x); **[B]** Imágenes de hASCs-SPIO (20x); **[C]** Imágenes de hEESCs-SPIO (20x); **[D]** Imágenes de hESSCs-SPIO (20x); **[E]** Imágenes de hAMCs-SPIO (20x); **[F]** Imágenes de tumor control (10x).

Las células positivas a la tinción Azul de Prusia, fueron calculadas contando el número de células positivas en campos de alta magnificación o HPF. La figura 36 confirma los resultados obtenidos en las imágenes de MRI, donde los mayores valores se observaron en el caso de las hESSCs, siendo significativamente mayor que los obtenidos con las BMhMSCs.

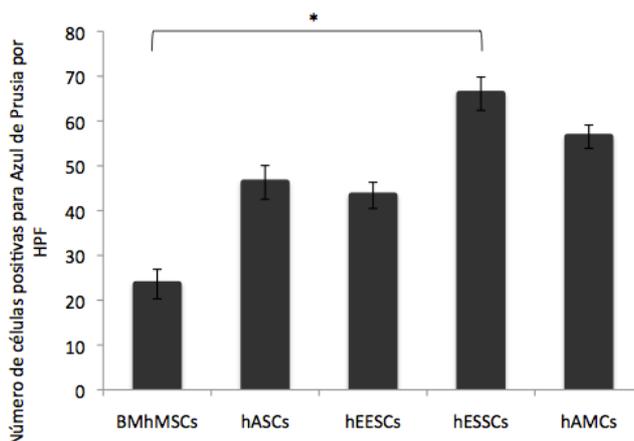


Figura 36: Contaje del número de células positivas para la detección de SPIO en las tinciones de Azul de Prusia. Las células fueron contadas en campos de alta magnificación o HPF en las secciones obtenidas de los tejidos de cada grupo de animales. Para el cálculo se contaron en 5 HPF por sección en 5 secciones de cada tejido. El análisis estadístico fue realizado con el test Kolmogorov-Smirnov seguido del test Tukey HSD. (* p<0,05).

4.2.3.2. Imagen por nanoSPECT/CT

Con el objetivo de continuar profundizando en el estudio de la capacidad de estas líneas de hMSCs para migrar *in vivo* a los tumores y evaluar las diferencias en esa capacidad que existen entre las distintas células, se utilizó una segunda técnica *in vivo* de imagen molecular. Además, debido a que podría ser que el grado de pluripotencia entre todas ellas sea un factor importante que esté afectando a la migración, en este estudio se añadió un control de células pluripotentes, las hiPSCs. En los últimos años, la equivalencia funcional entre las hES y las hiPSCs ha sido ampliamente aceptada (Maherali & Hochedlinger, 2008).

Para ello, cuando los tumores subcutáneos de células HeLa alcanzaron el tamaño deseado, aproximadamente 50mm³, los animales fueron separados aleatoriamente en seis grupos ensayo: grupo BMhMSCs-hNIS (n=4), grupo hASCs-hNIS

(n=4), grupo hEESCs-hNIS (n=4), grupo hESSCs-hNIS (n=4), grupo hAMCs-hNIS (n=4), grupo hiPSCs-hNIS (n=4); y un grupo control (n=4). Los animales de cada grupo ensayo recibieron inyecciones intravenosas en la vena lateral de la cola de 10^6 células de cada una de las líneas de hMSCs infectadas previamente con un AdhNIS a 500MOIs. Los animales del grupo control recibieron una inyección intravenosa de 200 μ l de PBS.

Al igual que lo descrito en el apartado 4.1.4.1., las imágenes obtenidas por nanoSPECT/CT poseen un espectro de color, donde el azul corresponde a la señal más débil y el rojo a la señal más intensa. En las imágenes de los animales del grupo control, mostradas en la figura 37, como era de esperar, se observó señal endógena de NIS en tiroides, glándulas salivares, estómago, vejiga urinaria y glándulas mamarias, no encontrándose ninguna señal en el área del tumor.

En la figura 38, la acumulación del radioisótopo Tc^{99m} , reflejando la expresión de hNIS, fue detectada en el área del tumor en los animales de los grupos ensayo. Al igual que lo ocurrido en los ensayos de MRI, se observaron diferencias en los niveles de señal detectados en las adquisiciones realizadas a día 3 tras la inyección de las hMSCs-hNIS. La tasa entre el consumo tumor/músculo de Tc^{99m} , mostró diferencias en la capacidad de migración entre las distintas líneas de hMSCs y las hiPSCs (figura 39). En las imágenes del grupo de BMhMSCs-hNIS, no se detectó señal en las adquisiciones a día 3, obteniendo la señal más intensa en las adquisiciones a día 10 (1.92 ± 0.72). En las adquisiciones posteriores la intensidad de la señal disminuyó hasta el día 24 (1.07 ± 0.12). Tanto en el grupo hiPSCs-hNIS, como en el resto de grupos de hMSCs-hNIS, se detectaron diferentes señales en las adquisiciones a día 3, obteniendo la menor señal en el grupo hASCs-hNIS (1.44 ± 0.69) y la señal más intensa en el grupo hESSCs-hNIS (2.01 ± 0.18). La intensidad de las señales detectadas aumentaron en las adquisiciones posteriores.

En los grupos de hMSCs-hNIS, la señal más intensa encontrada fue a día 17, correspondiéndose de nuevo con el grupo hESSCs-hNIS (3.84 ± 0.41), mientras que para el grupo hiPSCs-hNIS, la señal más intensa fue a día 24 (6.73 ± 1.23). A día 24, en todos los grupos de hMSC-hNIS, la intensidad de la señal disminuyó respecto a las adquisiciones del día 17, observándose las más intensas en los grupos hAMCs-hNIS (3.07 ± 0.29) y hESSCs-hNIS (2.89 ± 0.69) y las menores en los grupos hASCs-hNIS (2.46 ± 0.68) y hEESCs-hNIS (2.52 ± 0.72).

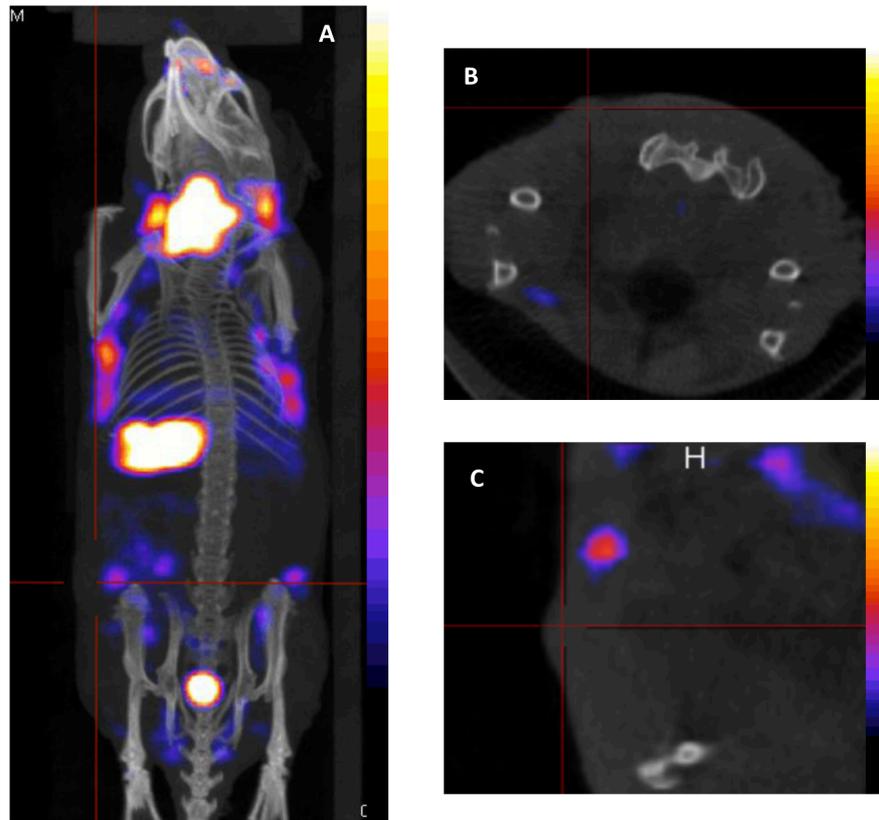


Figura 37: Visualización mediante nanoSPECT/CT de los tumores en los animales control. Las imágenes corresponden a las adquisiciones realizadas a día 10 en los animales control tras la inyección intravenosa de PBS. Previo a los escaneos, a los animales se les administró una dosis de 18,5MBq de Tc^{99m} . Las imágenes poseen un espectro de color, donde el azul corresponde a la señal más débil y el rojo a la más intensa. Los tumores se localizan en el lado izquierdo del animal indicados sobre cruces de color rojo. Fueron detectadas señales debidas a la expresión endógena de NIS. No se observó acumulación del radioisótopo en el área del tumor. **[A]** Vista dorsal del animal entero; **[B]** Sección transversal del animal; **[C]** Sección dorsal del animal .

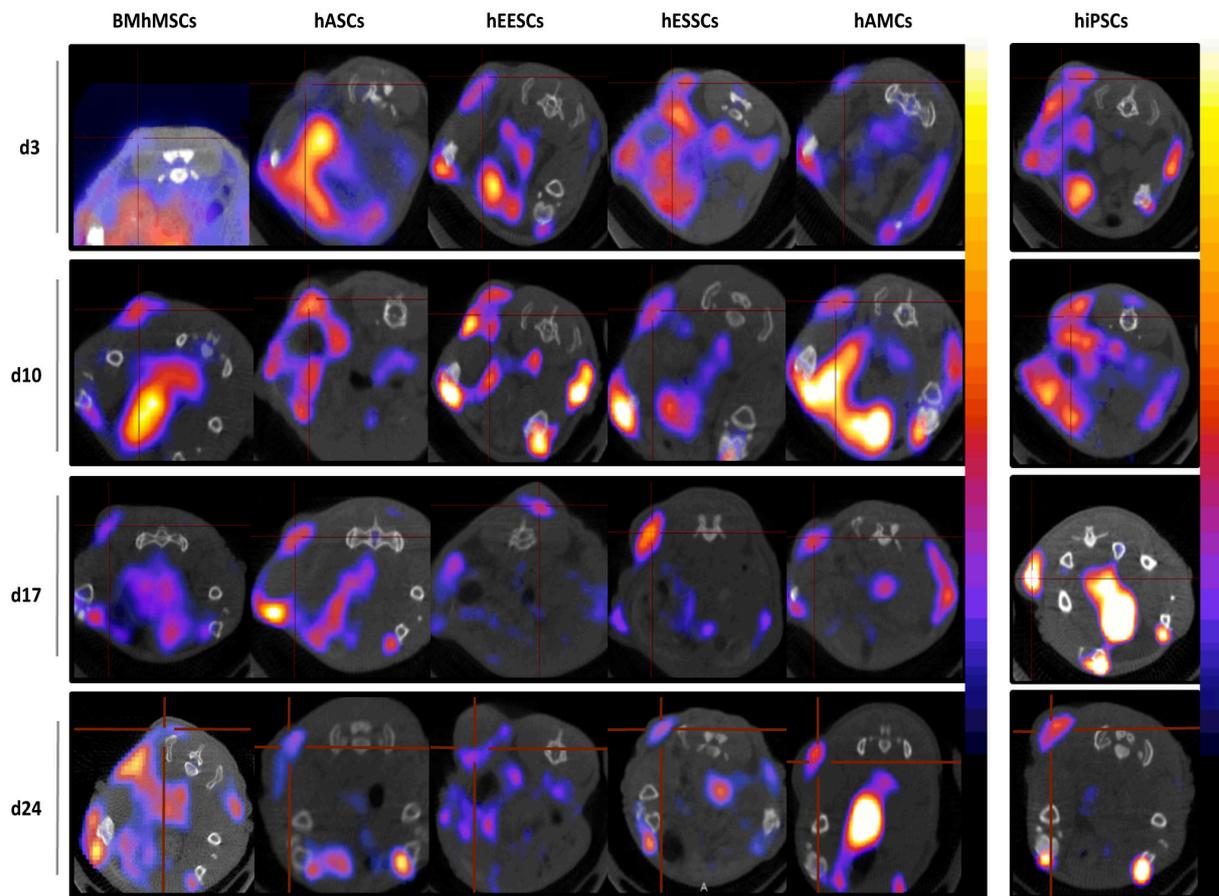


Figura 38: Visualización mediante nanoSPECT/CT de la expresión de hNIS en los tumores de animales que recibieron una inyección intravenosa de cada una de las líneas de hMSCs-hNIS. Las imágenes corresponden a las adquisiciones realizadas a día 3, 10, 17 y 24 en los animales del grupo ensayo tras la inyección intravenosa de hMSCs-hNIS. Previo a los escaneos, a los animales se les administró una dosis de 18,5MBq de Tc^{99m} . Las imágenes poseen un espectro de color, donde el azul corresponde a la señal más débil y el rojo a la más intensa. Los tumores se localizan en el lado izquierdo de las imágenes transversales de los animales indicados sobre cruces de color rojo. Se detectó acumulación del radioisótopo en el área del tumor de cada uno de los grupos ensayo. También se detectaron señales debidas a la expresión endógena de NIS. Los mismos animales son representados a lo largo del ensayo.

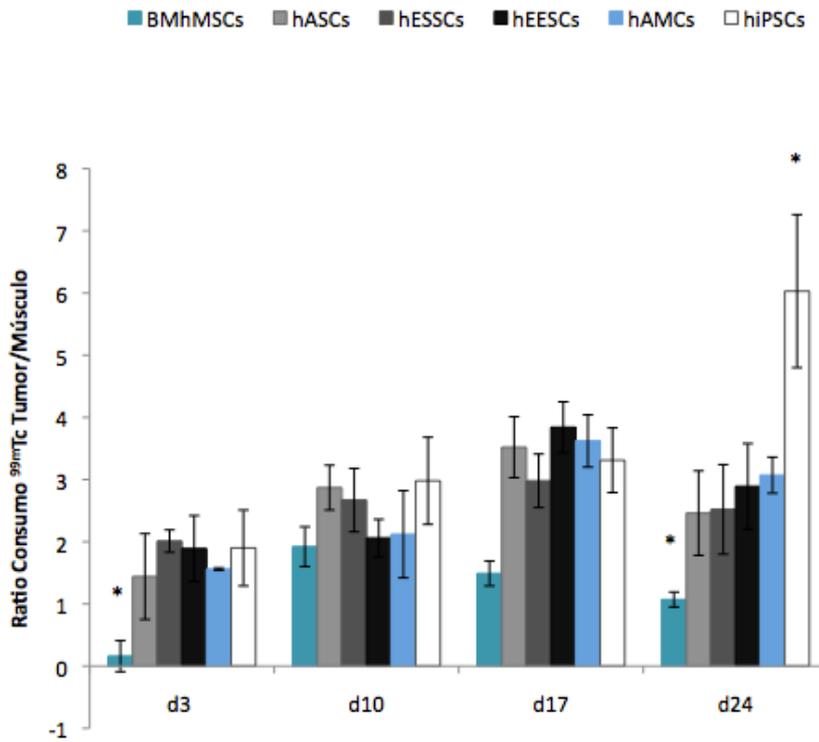


Figura 39: Tasa de consumo entre tumor/músculo de Tc^{99m} mediante nanoSPECT/CT.

Análisis de la acumulación del radioisótopo en el área del tumor y en el músculo en las adquisiciones realizadas a día 3, 10, 17 y 24 en los animales del grupo ensayo tras la inyección intravenosa de hMSCs-hNIS. Previo a los escaneos, a los animales se les administró una dosis de 18,5MBq de Tc^{99m}. El análisis estadístico fue realizado con el test Kolmogorov-Smirnov seguido del test Tukey HSD. (* p<0,05).

Estos resultados fueron confirmados por (RT)-PCR. Al finalizar los escaneos del día 24, se sacrificaron los animales y el ARN fue extraído de los tumores. La expresión de hNIS (figura 40) fue detectada en todos los grupos con diferencias en la intensidad, detectándose la menor señal en el caso del grupo BMhMSCs-hNIS. Estas diferencias en los niveles de intensidad pudieron ser debidos tanto a la distribución de las células en los tumores, al trozo de muestra utilizado para la extracción de ARN como a que la expresión de hNIS es de forma episomal.

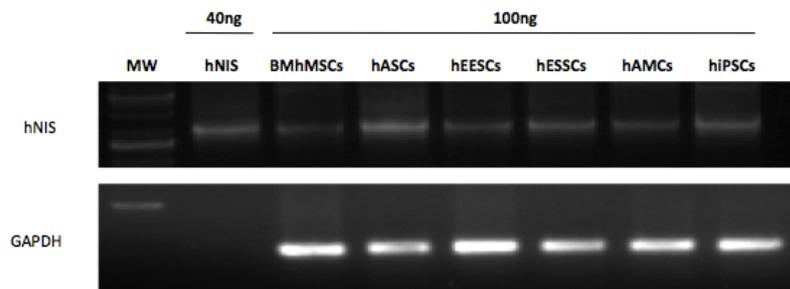


Figura 40: Detección de la expresión de hNIS mediante (RT)-PCR en los tumores de los animales que recibieron una inyección intravenosa de hMSCs-hNIS. Tras la adquisición del día 24, los animales fueron sacrificados y el ARN fue extraído de los tumores. Como control fue empleado un plásmido conteniendo hNIS. Como control de carga se utilizó GAPDH.

4.2.4. Análisis del patrón de pluripotencia en las hMSCs

Para investigar si el grado de pluripotencia de las células podría ser un factor importante en la capacidad de migración de las mismas se realizó, el análisis de un patrón de genes típicos relacionados con pluripotencia mediante qPCR. Los genes analizados fueron NANOG, KLF4, OCT4, SOX2 y REX1.

La figura 41 muestra los resultados obtenidos, en los que se observó que la expresión de los genes estudiados fue significativamente menor en todas las líneas de hMSCs comparadas con el control positivo, las hiPSCs (tomadas como el 100% de expresión). Aún así, se encontraron diferencias en los niveles de expresión entre las hMSCs. La expresión de NANOG y KLF4 fue superior en las líneas hEESCs (0.07% y 19.12% respectivamente) y hESSCs (0.072% y 21.17% respectivamente). Para SOX2 no se observaron diferencias significativas entre las diferentes hMSCs (<0.01%), mientras que para OCT4, se observaron niveles similares en todas las hMSCs (<5%) excepto en las hAMCs, cuya expresión fue significativamente menor (0.96%). REX1 solo fue expresado en las hESSCs y BMhMSCs (<0,01%). Estos resultados mostraron claramente que aunque todas las líneas de células estudiadas son consideradas hMSCs, poseen un patrón de pluripotencia muy diferente entre ellas y también cuando son comparadas con las hiPSCs, pudiendo estas diferencias estar relacionadas con las diferencias en la capacidad de migración y mantenimiento y efecto en el tumor.

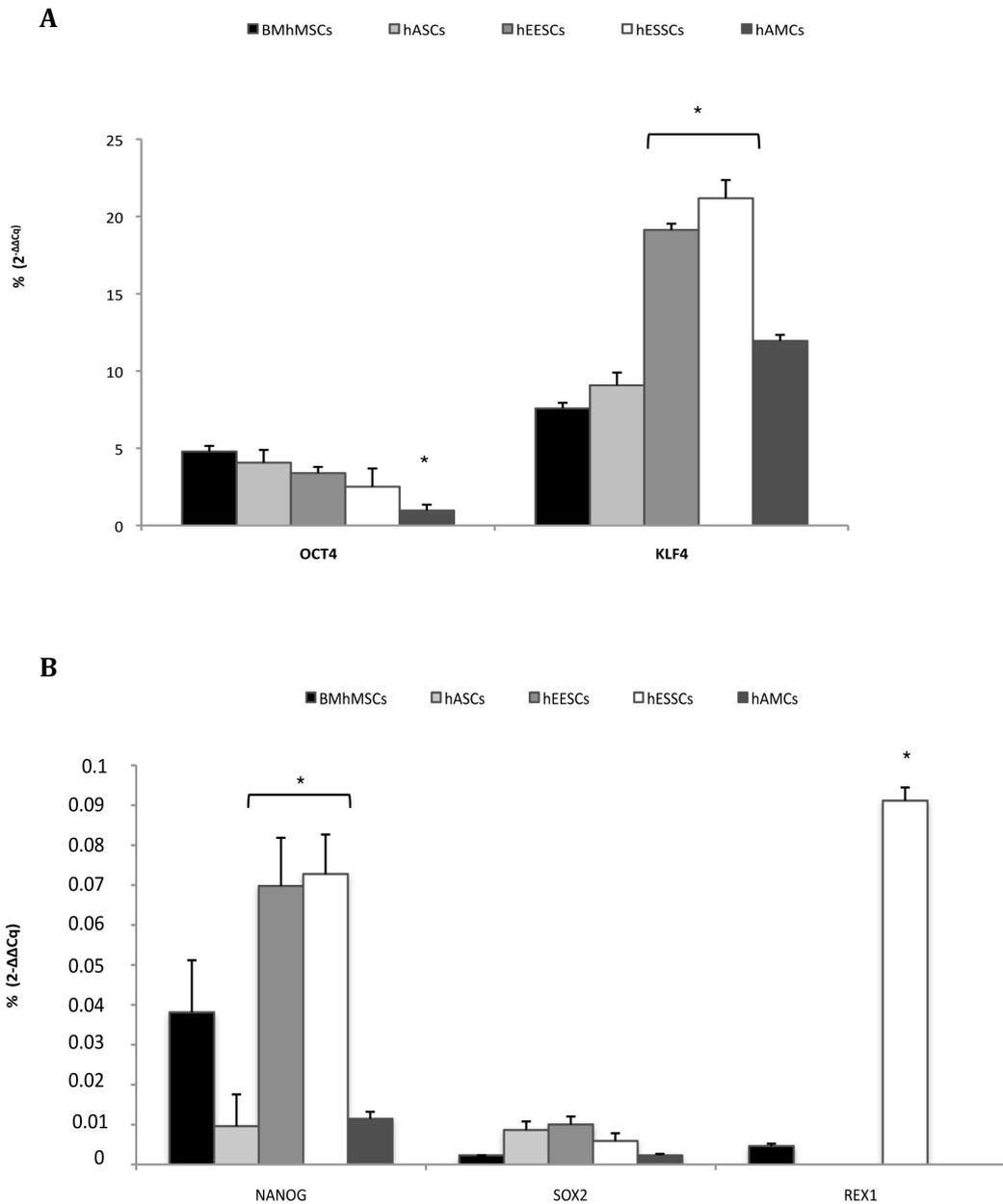


Figura 41: Análisis de la expresión en cada una de las líneas de hMSCs de diferentes genes relacionados con pluripotencia por qPCR. Los niveles de expresión fueron normalizados con el gen de referencia 18s. Los valores obtenidos con las hiPSCs fueron usados como calibrador, siendo representado como el 100% de expresión. Los resultados fueron expresados como $2^{-\Delta\Delta Cq}$ indicando así el cambio en los niveles de expresión entre las muestras y el calibrador. **[A]** OCT4 y KLF4; **[B]** NANOG, SOX2 y REX1. El análisis estadístico para las variables con distribución normal fue realizado con el test Kolmogorov-Smirnov seguido del test Tukey HSD. Aquellas variables con distribución no paramétrica (KLF4 y REX1), fueron analizadas con el test Kruskal-Wallis. (* $p < 0,05$).

4.3. Efecto generado por las hMSCs en el tumor una vez administradas de forma sistémica

4.3.1. Colaboración al microambiente tumoral

Con el objetivo de estudiar el efecto en el tamaño del tumor que podrían ejercer las células que fueron capaces de migrar y mantenerse durante largo periodo de tiempo, hasta 24 días después de su administración o 34 días desde el inicio del experimento, se realizaron medidas de los mismos durante los experimentos *in vivo* descritos en el apartado 4.2.3.

En la figura 30 se mostró la secuencia temporal seguida durante los ensayos. En ambos experimentos, cuando los tumores alcanzaron un tamaño alrededor de 50mm³, aproximadamente 10 días tras la inducción de los tumores, los animales recibieron una inyección intravenosa de hMSCs o hiPSCs. El crecimiento de los tumores en cada grupo de animales, mostrado en la figura 42, fue claramente diferente dependiendo del tipo de hMSCs o hiPSCs inyectada. Hasta el día 13, los tumores de todos los grupos mostraron un patrón de crecimiento similar. Las diferencias entre los distintos grupos se empezaron a observar a partir del día 20. En este día, el promedio del tamaño de los tumores en los animales de los grupos control fue de 110±26,8mm³. En los grupos hASCs, hEESCs, hESSCs y hAMCs, los tamaños alcanzaron valores entre 346 y 315mm³, significativamente mayor que los obtenidos en los grupos control y en el grupo BMhMSCs (147,9±17,7mm³). Los tumores del grupo de hiPSCs, fueron los que alcanzaron las tasas de crecimiento más rápidas, llegando a medir 594.8mm³, significativamente mucho más grandes que los obtenidos en el resto de grupos.

Estos resultados obtenidos mostraron un crecimiento significativamente mayor de los tumores de los animales que recibieron inyecciones de hMSCs o hiPSCs frente a los animales del grupo control, lo que demostró ser un efecto debido a la migración y al mantenimiento de las células en los tumores.

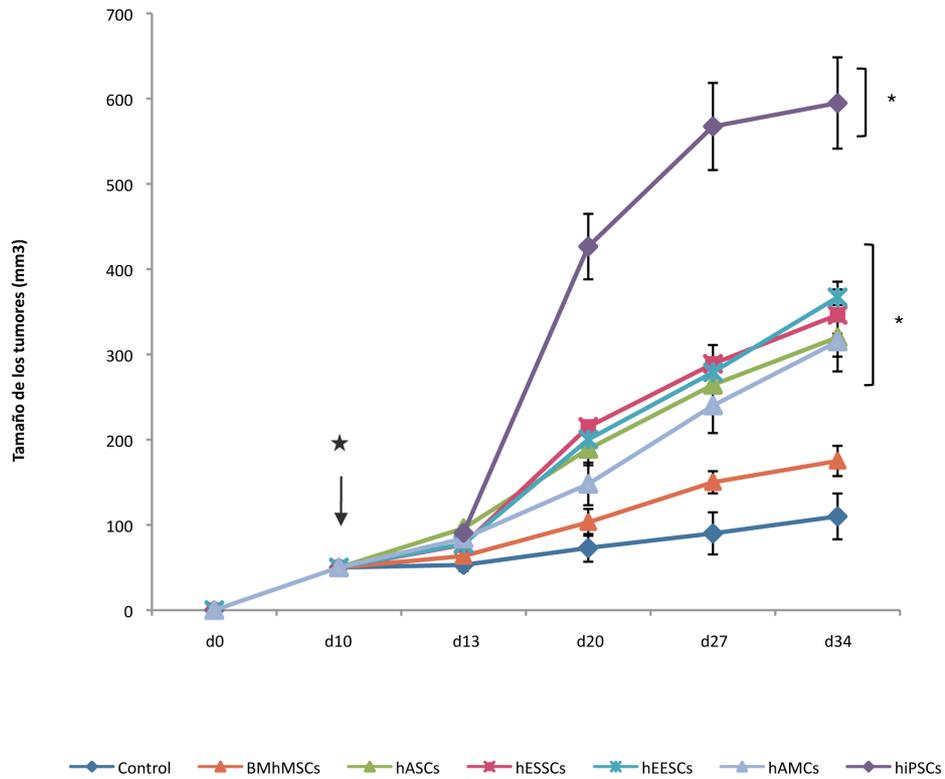


Figura 42: Crecimiento de los tumores tras la administración de las hMSCs. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 50 mm³, cada grupo ensayo de animales (n=8, y n=4 para el grupo de hiPSCs) recibieron una inyección intravenosa de cada una de las líneas de hMSCs (indicado con ★), mientras que los animales de los grupos control recibieron una inyección intravenosa de PBS. El tamaño de los tumores fue medido hasta el final de los experimentos (a día 24 tras la inyección intravenosa o a día 34 tras la inducción de los tumores). El análisis estadístico fue realizado con el test Kolmogorov-Smirnov seguido del test Tukey HSD. (* p<0,05).

4.3.2. Efecto en los genes relacionados con migración

Con el fin de analizar lo que ocurre con la expresión de genes relacionados con migración en los tumores de los animales de los grupos control y de los tumores de los animales de los grupos de hMSCs y de hiPSCs, se cuantificaron mediante qPCR los niveles de CXCR4 (receptor de quimioquina CXC tipo 4 o CD184), CXCL12 (factor 1 derivado de células estromales o SDF-1), CCL5 (factor de regulación tras la activación normal de los linfocitos T o RANTES), CCL2 (proteína quimiotáctica de monocitos 1 o MCP-1) y MMP2 (metaloproteinasa de matriz 2). Las muestras analizadas fueron los tumores de los grupos de animales sacrificados después del escaneo mediante nanoSPECT/CT a día 24.

En general, la expresión de estos genes en los tumores obtenidos de los animales de todos los grupos de hMSCs o hiPSCs disminuyeron de manera significativa comparados con los niveles obtenidos en el grupo control (figura 43). En los tumores, los niveles de expresión de estos genes son altos, sirviendo de gradiente de señalización para la migración de las MSCs. La expresión de CXCL12 fue disminuida en todos los grupos, observando la menor disminución en el grupo BMhMSCs ($-4,4 \pm 0,04$ veces) frente a la observada en los grupos hASCs, hEESCs y hESSCs, donde el descenso en la expresión fue mucho mayor (entre -9 y -11 veces). En el caso de CCL5, los niveles fueron menores en los grupos BMhMSCs ($-1,69 \pm 0,25$ veces), hEESCs ($-2,31 \pm 0,08$ veces) y hESSCs ($-2,58 \pm 0,08$ veces) mientras que la expresión fue incrementada en los grupos hAMCs ($1,73 \pm 0,07$ veces) y hiPSCs ($0,85 \pm 0,1$ veces). En el grupo hASCs, el nivel de expresión de CCL5 se mantuvo similar al control ($-0,25 \pm 0,12$ veces). Los niveles de expresión de CCL2 y CXCR4 fueron menores en los tumores de todos los grupos de hMSCs, siendo el grupo hAMCs el que mostró la menor disminución ($-1,05 \pm 0,07$ veces y $-0,98 \pm 0,12$ veces, respectivamente), mientras que en el grupo hiPSCs se observó un incremento en los niveles de expresión en ambos genes ($5,53 \pm 0,18$ veces y $0,60 \pm 0,33$ veces, respectivamente). Por último, la expresión de MMP-2 fue menor en los grupos BMhMSCs ($-6,28 \pm 0,22$ veces), hASCs ($-6,99 \pm 0,12$ veces), hEESCs ($-5,62 \pm 0,13$ veces) y hAMCs ($-3,09 \pm 0,06$ veces), mientras que se observó un incremento en los niveles en los grupos hESSCs ($2,28 \pm 0,07$ veces) y hiPSCs ($6,48 \pm 0,14$ veces).

Estos resultados mostraron que las hMSCs, además de colaborar en el crecimiento del tumor, son capaces de ejercer efecto en el microambiente del tumor, disminuyendo de forma general distintos factores que se expresan en condiciones inflamatorias comparado con los tumores control. Una vez más, se observaron también diferencias entre las distintas líneas de hMSCs y con las hiPSCs.

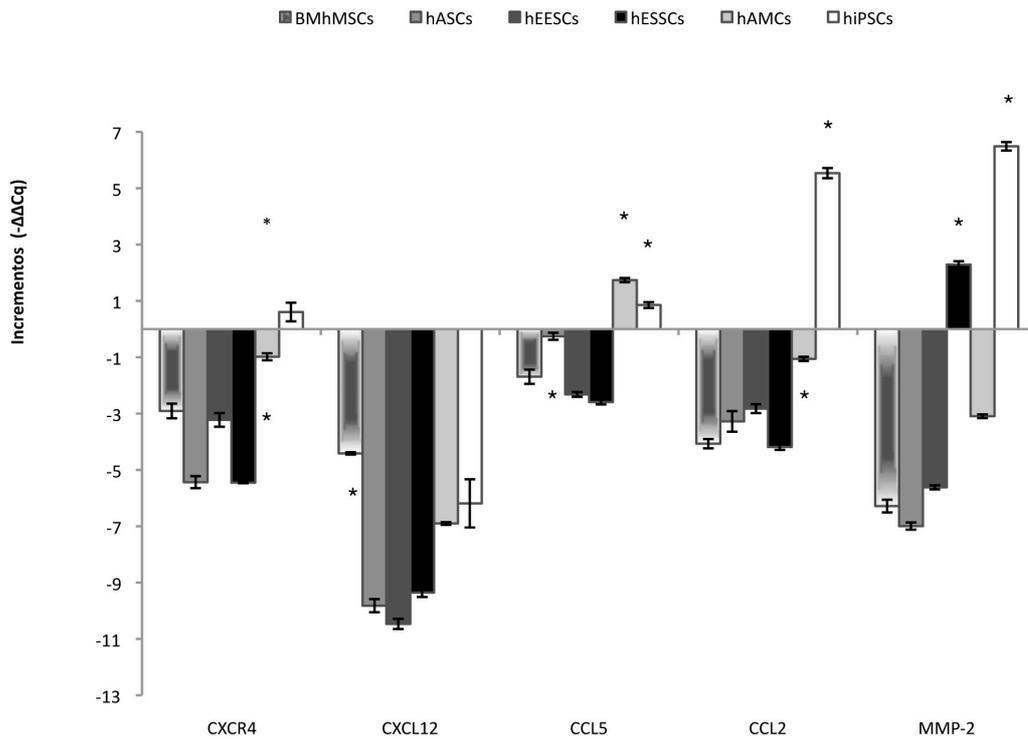


Figura 43: Análisis de la expresión de diferentes genes relacionados con migración por qPCR. Tras las adquisiciones del día 24 en los experimentos de nanoSPECT/CT, los animales fueron sacrificados y el ARN fue extraído de los tumores. Los genes analizados fueron CXCR4, CXCL12, CCL5, CCL2 y MMP-2. Los niveles de expresión fueron normalizados con el gen de referencia 18s. Los valores obtenidos en las muestras de los animales control fueron usados como calibrador. Los resultados fueron expresados como $-\Delta\Delta Cq$, indicando así el cambio en los niveles de expresión entre las muestras y el calibrador en forma de incrementos. El análisis estadístico fue realizado con el test Kolmogorov-Smirnov seguido del test Tukey HSD (* $p < 0,05$).

4.3.3. Establecimiento de las MSCs en el microambiente tumoral

En la actualidad, poco se conoce sobre lo que ocurre con las hMSCs una vez que han migrado hasta el tumor. Diferentes hipótesis han sido postuladas sobre el destino de estas células, reforzadas por la evidencia de que son capaces de migrar e injertarse preferentemente en zonas de daño, en las que existen procesos inflamatorios, hipoxia o apoptosis en diversas patologías. Entre las hipótesis planteadas destacan la posibilidad de transdiferenciación, fusión celular o simplemente ejercer su efecto mediante función paracrina en respuesta a distintos factores del microambiente.

Con el objetivo de estudiar, si tras la llegada de las MSCs al tumor, sucede algún evento de fusión celular con las células del tumor, se realizó un ensayo *in vivo*, en el cual, en un modelo de tumor subcutáneo de células TE671-LoxP/LacZ se permitió migrar hacia los tumores a las BMhMSCs-Cre. La fusión entre ambas células, provocaría la escisión de la región loxP-STOP-loxP, permitiendo de este modo la expresión de LacZ.

Antes de realizar el ensayo *in vivo*, fue evaluada *in vitro* la capacidad de las células TE671-LoxP/LacZ de expresar LacZ una vez infectadas con un AdCre. En la figura 44 se muestran las imágenes de células TE671-LoxP/LacZ infectadas con un AdCre a 50, 100 y 250 MOIs. Las células control no fueron infectadas. Tras 48 horas de la infección, las células fueron procesadas mediante tinción de β -galactosidasa. Los resultados mostraron expresión de LacZ en las células TE671-LoxP/LacZ una vez infectadas con el AdCre.

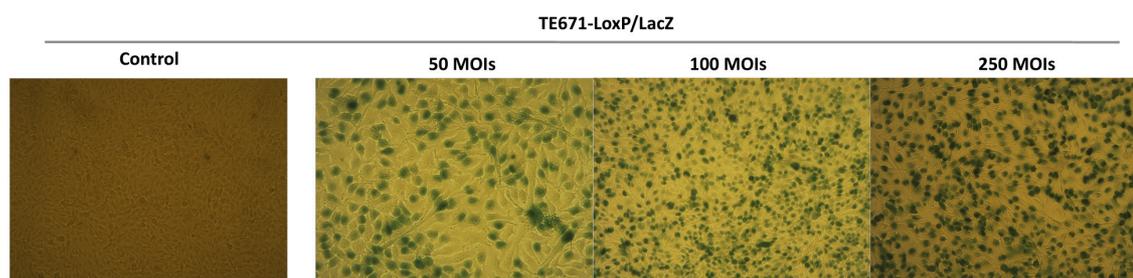


Figura 44: Detección de la expresión de LacZ *in vitro* en células TE671-LoxP/LacZ tras realizar una infección con un AdCre. Las fotografías corresponden a las células a las 48 horas tras la infección con un AdCre a 50, 100 y 250 MOIs y procesadas mediante tinción de β -galactosidasa. El color azul o verdoso debido al color del medio de las células, indica expresión positiva para LacZ. Las células control no fueron infectadas. Imágenes a 10x.

Para los estudios *in vivo* y cuando los tumores subcutáneos de células TE671-LoxP/LacZ alcanzaron el tamaño deseado, aproximadamente 50mm³, los animales fueron separados aleatoriamente en tres grupos: grupo ensayo BMhMSCs-Cre (n=9), grupo AdCre (n=2) y grupo control (n=2).

Los animales del grupo ensayo recibieron inyecciones intravenosas en la vena lateral de la cola de 10⁶ BMhMSCs infectadas previamente con un AdCre a 500MOIs. Los animales del grupo control recibieron una inyección intravenosa de 200µl de PBS. Los animales del grupo AdCre, recibieron una inyección intratumoral de 10⁸ pFUs de AdCre resuspendido en 100µl de PBS. Los animales fueron sacrificados en los tiempos descritos en la figura 45. Los animales del grupo ensayo fueron sacrificados tras una semana (d27), dos semanas (d34) y tres semanas (d41) de la administración de las BMhMSCs-Cre. Los tumores y otros órganos fueron extraídos. Una pequeña muestra de cada órgano fue utilizado para extraer ARN. El resto fue procesado para la tinción *in toto* de β-galactosidasa. Para optimizar la tinción de β-galactosidasa se utilizó una muestra de estómago debido a la expresión endógena de LacZ.

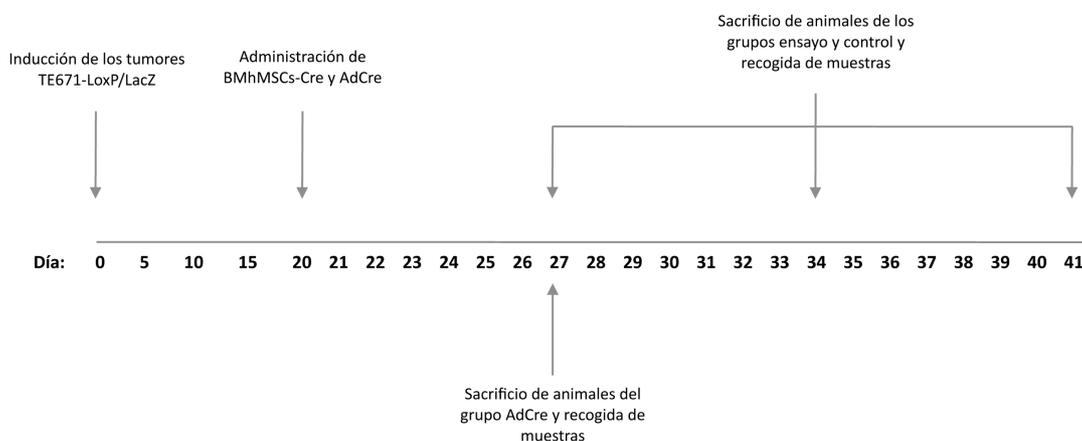


Figura 45: Secuencia temporal seguida durante el experimento *in vivo* de los tumores TE671-LoxP/LacZ. Aproximadamente 20 días tras la inducción de los tumores TE671-LoxP/LacZ, se inyectaron de forma intravenosa las BMhMSCs-Cre. Los animales del grupo AdCre fueron sacrificados en la semana 1 (d27). Los animales del grupo ensayo fueron sacrificados tras una semana (d27), dos semanas (d34) y tres semanas (d41) de la administración de las BMhMSCs-Cre. Por último, los animales del grupo control fueron sacrificados en la primera y tercera semana (d27 y d41).

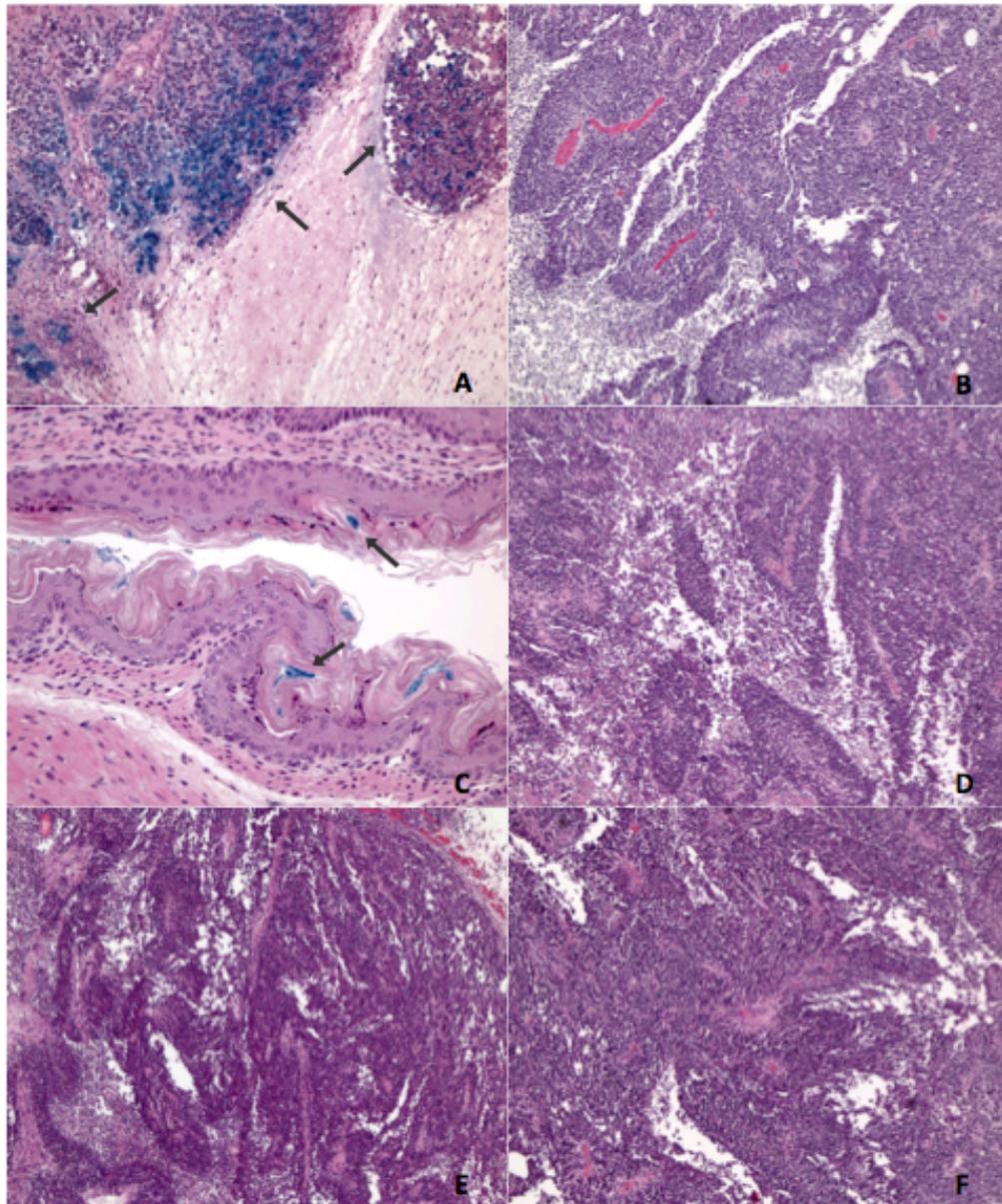


Figura 46: Detección de la expresión de LacZ mediante tinción de β -galactosidasa *in toto* en los tumores TE671-LoxP/LacZ de los animales que recibieron una inyección intravenosa de BMhMSCs-Cre. Los animales del grupo ensayo fueron sacrificados tras una semana (d27), dos semanas (d34) y tres semanas (d41) de la administración de las BMhMSCs-Cre. Las muestras fueron procesadas por tinción con hematoxilina-eosina y β -galactosidasa. La coloración azul intenso indicó expresión de LacZ. [A] Imágenes de grupo AdCre administradas intratumoralmente a d27(100x); [B] Imágenes de la expresión endógena de LacZ en el estómago a d27(200x); [C] Imágenes de grupo control (50x); [D] Imágenes de grupo ensayo BMhMSCs-Cre a d27 (50x); [E] Imágenes de grupo ensayo BMhMSCs-Cre a d34 (50x); [F] Imágenes de grupo ensayo BMhMSCs-Cre a d41 (50x).

En la figura 46 se muestran las imágenes tras la tinción de β -galactosidasa en los tumores. En las imágenes obtenidas del grupo de animales que recibieron la inyección intratumoral 10^8 pFUs de AdCre, pudo observarse coloración azul intensa debida a la expresión de LacZ en las células TE671-LoxP/LacZ tras la escisión de la región loxP-STOP-loxP. También pudo observarse expresión de LacZ en la muestra del estómago debida a la expresión endógena. No se detectó señal en los tumores del grupo control. Finalmente, en ninguno de los tumores de los animales del grupo que recibieron la administración intravenosa de BMhMSCs-Cre fue detectada expresión de LacZ.

Para comprobar que los resultados negativos en la expresión de LacZ, no fue debida a la incapacidad de las BMhMSCs-Cre de migrar hacia las zonas tumorales, se analizó la expresión de Cre mediante (RT)-PCR. Para ello cuando los animales fueron sacrificados, de una muestra de los tumores se extrajo el ARN. Como muestra la figura 47, la expresión de Cre fue detectada en el grupo de animales que recibieron la inyección intratumoral de AdCre, confirmando los resultados obtenidos con la tinción de β -galactosidasa. Sin embargo, en las muestras analizadas de los tumores de los animales del grupo BMhMSCs-Cre, pudo detectarse expresión de Cre en el 33% de los animales sacrificados en la primera semana y el 66% en los sacrificados en la segunda y tercera semana, aunque con diferencias en la intensidad de la banda. Estas diferencias pudieron ser debidas al trozo de muestra utilizado para extraer ARN, a la distribución de las BMhMSCs-Cre en el tumor o a la expresión de forma episomal de Cre. No se detectó ninguna señal en los tumores de los animales control. Los resultados obtenidos demostraron que tras la migración e injerto de las BMhMSCs-Cre en la zona del tumor, no se dio ningún evento de fusión entre las células tumorales y las BMhMSCs.

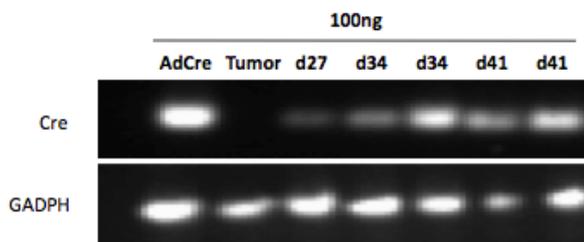


Figura 47: Detección de la expresión de Cre mediante (RT)-PCR en los tumores de los animales que recibieron una inyección intravenosa de BMhMSCs-Cre. Los animales del grupo ensayo fueron sacrificados tras una semana (d27), dos semanas (d34) y tres semanas (d41) de la administración de las BMhMSCs-Cre y el ARN fue extraído de los tumores. Como control positivo fue utilizado los tumores que recibieron una inyección intratumoral de AdCre (AdCre). Como control negativo fue empleado ARN de tumores de los animales control (Tumor). Como control de carga se utilizó el GAPDH.

4.3.4. Diferenciación en los tumores tras el establecimiento de las MSCs

Siguiendo con el estudio de los sucesos que se dan en el microambiente tumoral, una vez que las MSCs han migrado y se han establecido, se analizaron por tinción con hematoxilina-eosina los cortes de los tumores de los animales del experimento de nanoSPECT-CT. En estos animales, cuando los tumores subcutáneos de células HeLa alcanzaron el tamaño deseado, los animales fueron separados aleatoriamente en seis grupos ensayo: grupo BMhMSCs-hNIS (n=4), grupo hASCs-hNIS (n=4), grupo hEESCs-hNIS (n=4), grupo hESSCss-hNIS (n=4), grupo hAMCs-hNIS (n=4), grupo hiPSCs-hNIS (n=4); y un grupo control (n=4). Los animales de cada grupo ensayo recibieron inyecciones intravenosas en la vena lateral de la cola de 10^6 células de cada una de las líneas de hMSCs infectadas previamente con un AdhNIS a 500MOIs. Los animales del grupo control recibieron una inyección intravenosa de 200 μ l de PBS.

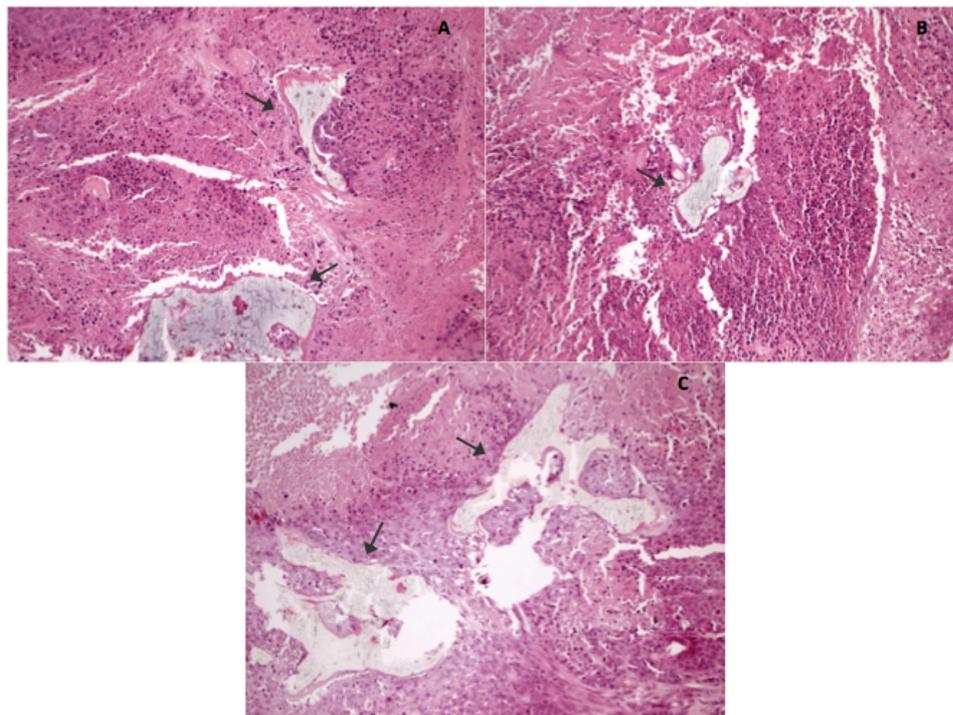


Figura 48: Detección de zonas óseas en tumores HeLa de animales que recibieron una inyección intravenosa de hAMCs, hEESCs y hiPSCs. Los animales del grupo ensayo hMSCs-hNIS del experimento de nanoSPECT-CT fueron sacrificados tras la adquisición del d24 y una muestra de los tumores fue utilizada para tinción con hematoxilina-eosina. **[A]** Imágenes de grupo hAMCS-hNIS a d24 (100x); **[B]** Imágenes de grupo hEESCs-hNIS a d24 (100x); **[C]** Imágenes de grupo hiPSCs-hNIS a d24 (100x).

Como muestran las imágenes de la figura 48, se detectaron formaciones óseas en los tumores de los grupos ensayo hAMSCs, hEESCs y hiPSCs, demostrando que la presencia de estas MSCs pueden promover la diferenciación como consecuencia de las condiciones encontradas en el microambiente tumoral. No se encontró ninguna formación ósea en el resto de grupos ensayo BMhMSCs, hASCs y hEESCs, ni en el grupo control.

4.4. Aumento de la transferencia génica mediante infección con vectores adenovirales en células CAR negativas

Actualmente, los vectores virales más empleados en aplicaciones terapéuticas son adenovirus. Sin embargo, existen limitaciones en el uso de estos vectores debido principalmente a que la expresión del receptor CAR en las células determina su tropismo. En caso de algunos tipos celulares, la eficacia de la infección es baja debida a la escasa o a la expresión nula de CAR. La modificación de las proteínas de la fibra, añadiendo distintos péptidos, ha sido una estrategia empleada con éxito para aumentar la eficacia de la infección. Con el objetivo de mejorar las eficiencias de la transferencia génica en mBMSCs mediante el uso de vectores adenovirales convencionales sin necesidad de modificación genética, estudiamos la posibilidad de utilizar un compuesto comercial, un derivado de polietilimina conjugado con el péptido RGD (PEI-RGD).

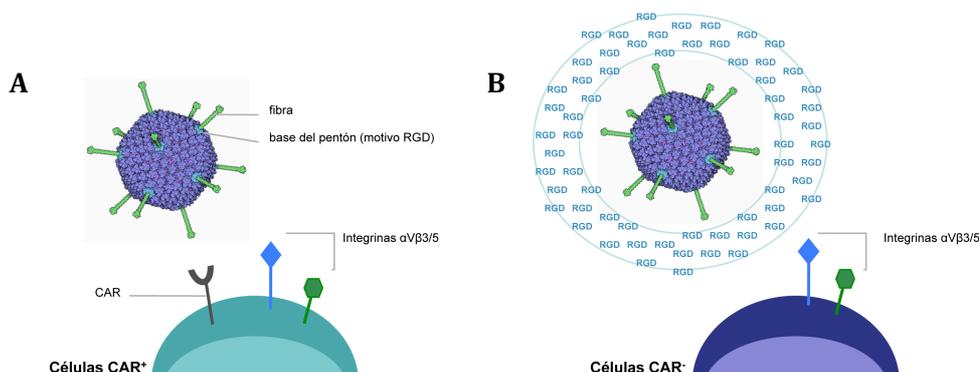


Figura 49: Transferencia génica mediante transfección adenoviral usando un derivado de polietilimina conjugado con el péptido RGD (PEI-RGD). [A] La entrada en células CAR⁺ es iniciada por la interacción de la fibra con el receptor CAR. Esta unión permite una segunda interacción del péptido RGD (Arg-Gly-Asp) con diferentes integrinas, como $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_v\beta_1$, ayudando a la internalización del adenovirus en el interior celular. [B] En el caso de células CAR⁻, la internalización es mediada solo vía integrinas. Por lo que las eficiencias en la internalización de adenovirus, y por tanto, de la transferencia génica, disminuyen de forma importante. Para mejorar este proceso, empleamos un derivado de polietilimina conjugado con el péptido RGD (PEI-RGD) para transfectar el adenovirus al interior celular.

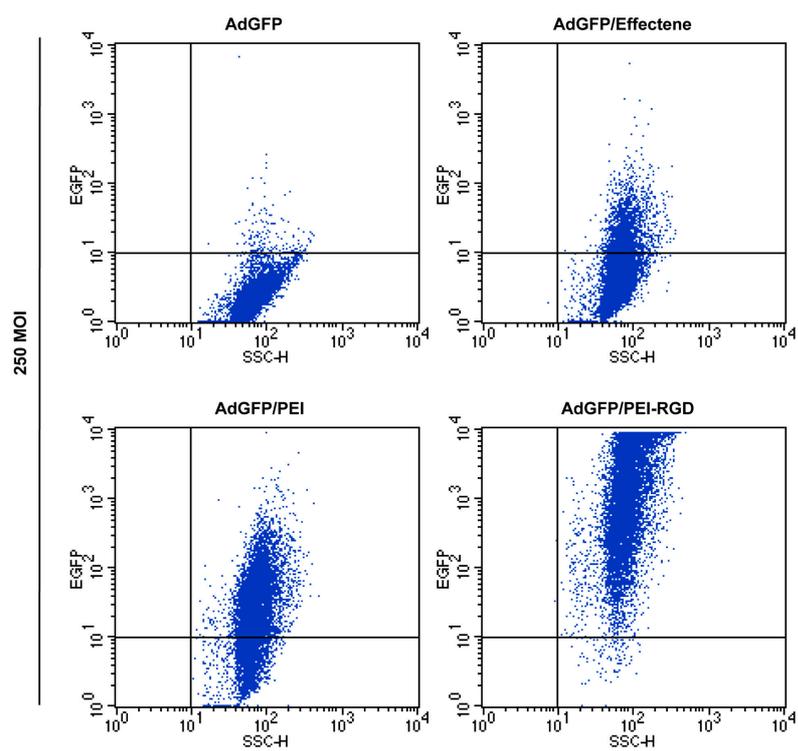
4.4.1. Mejora de la transferencia génica empleando vectores adenoviral

Como previamente fue comprobado en el apartado 4.1.2., las mBMSc presentan escasa expresión de receptor CAR en su superficie. De ahí, la necesidad de encontrar alguna estrategia para aumentar la eficacia de la transferencia génica con vectores adenovirales. Para ello, fue evaluada la transferencia génica mediante el uso de un AdGFP y el uso de tres estrategias diferentes de transfección. A las dosis ensayadas según las indicaciones comerciales, no fue detectada ninguna toxicidad derivada de los compuestos comerciales (Effectene Transfection Reagent®, jetPEI™ y jetPEI™-RGD).

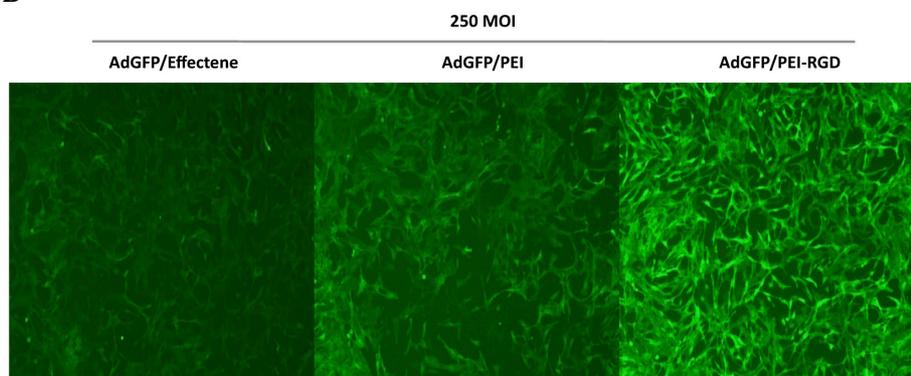
Los resultados fueron mostrados mediante microscopía de fluorescencia, citometría de flujo y *western-blot*. Como control se realizaron infecciones del AdGFP solo. *In vitro*, el aumento de la expresión de GFP con cada una de las estrategias fue mayor comparado con la expresión de GFP con el control. Los mayores niveles de expresión fueron obtenidos cuando la transferencia del AdGFP se realizó mediante la formación del complejo AdGFP/PEI-RGD.

En la figura 50A, se muestran los resultados obtenidos por citometría de flujo 48 horas después de la transferencia del AdGFP a 250 MOIs con cada una de las estrategias. Mediante la transferencia o “transfección” con el complejo AdGFP/PEI-RGD, el 99,03% de las células mostraron expresión de GFP, comparado con el 72,96% y 25,83% obtenido con los complejos AdGFP/PEI y AdGFP/Effectene, respectivamente. Tan solo un 1,55% de células mostraron expresión de GFP cuando fueron infectadas con el AdGFP. Las imágenes obtenidas por *western-blot* y por microscopía de fluorescencia se muestran en las figuras 50B y 50C, respectivamente. En ambos casos, las diferencias en los niveles de expresión de GFP entre las distintas estrategias se observaron claramente. Los resultados mostraron un incremento de 64 veces los niveles de transferencia génica mediante el uso de complejos de AdGFP y derivados de polietilimina conjugados con el péptido RGD (PEI-RGD) en su superficie comparado con la infección con el AdGFP solo.

A



B



C

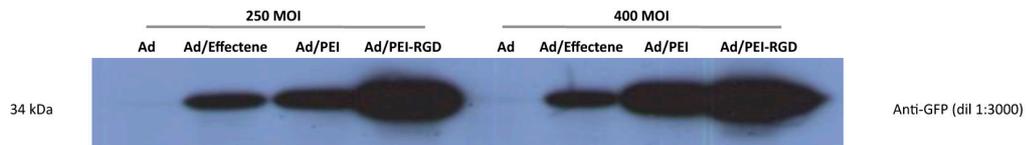


Figura 50: Análisis de los niveles de expresión de GFP en las mBMSCs empleando diferentes estrategias de transfección adenoviral. Se utilizaron tres estrategias para la transfección de un AdGFP mediante la formación de distintos complejos (AdGFP/Effectene, AdGFP/PEI y AdGFP/PEI-RGD). Como control se utilizó la infección de un AdGFP. **[A]** Comparación de los niveles de expresión de GFP mediante citometría de flujo utilizando los diferentes complejos y a un título adenoviral de 250 MOIs. **[B]** Comparación de los niveles de expresión de GFP mediante microscopía de fluorescencia utilizando los diferentes complejos y una concentración adenoviral de 250 MOIs. Imágenes a 10x. **[C]** Comparación de los niveles de expresión de GFP mediante *western-blot* utilizando los diferentes complejos y una concentración adenoviral de 250 y 400 MOIs.

4.4.2. Efecto de la transferencia adenoviral mediante los complejos Ad/PEI-RGD sobre el fenotipo de las mBMSCs

Con el fin de estudiar si la transfección adenoviral mediante los complejos Ad/PEI-RGD podría afectar de algún modo al fenotipo de las mBMSCs, y modificar sus características, se analizó mediante citometría de flujo un patrón de marcadores de superficie característico, antes y 24 horas después de realizar la transfección adenoviral a 600 MOIs con AdGFP/PEI-RGD. Los marcadores de superficie positivos analizados fueron Sca-1 y CD73 y los marcadores negativos fueron CD31 y CD45.

En los resultados obtenidos, mostrados en la tabla 11, no se observaron cambios significativos en el patrón de marcadores de superficie analizados, demostrando que la transfección adenoviral con el complejo Ad/PEI-RGD, no afecta al fenotipo de las células.

	mBMSCs		mBMSCs-Ad/PEI-RGD	
	Resultados	Porcentaje (%)	Resultados	Porcentaje (%)
CD31	Negativo	1,47	Negativo	1,25
CD45	Negativo	1,32	Negativo	3,79
Sca-1	Positivo	94,83	Positivo	82,66
CD73	Positivo	90,12	Positivo	63,22

Tabla 11: Análisis de la expresión de los marcadores de superficie mediante citometría de flujo después de la transferencia con el complejo AdGFP/PEI-RGD en mBMSCs. Los resultados se compararon con los niveles de expresión de células mBMSCs control sin infectar. Los marcadores positivos analizados fueron Sca-1 y CD73 mientras que los marcadores negativos fueron CD31 y CD45.

4.4.3. Efecto terapéutico *in vivo* tras la administración del radioisótopo I¹³¹ mediante el uso de los complejos Ad10/PEI-RGD en un modelo de tumor

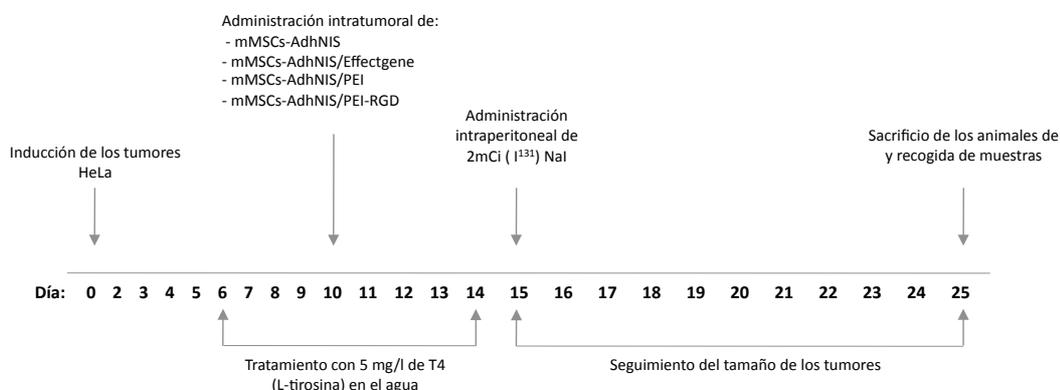
Ya que la transferencia adenoviral mediante los complejos Ad/PEI-RGD no provocó cambios significativos en el patrón de marcadores de superficie, se estudió si podría afectar a la funcionalidad del producto génico en las células. Para ello, se analizó el efecto terapéutico en tumores de animales tratados con I¹³¹. En la figura 51A se indica la secuencia temporal seguida durante el ensayo.

Cuando los tumores subcutáneos de células HeLa alcanzaron el tamaño deseado, aproximadamente unos 50mm³, los animales fueron separados aleatoriamente en cuatro grupos (n=4). Los animales del primer grupo recibieron una inyección intravenosa de 10⁶ mBMSCs, infectados de forma convencional con un AdhNIS (grupo mBMSCs-AdhNIS). Los animales del segundo grupo recibieron una inyección intratumoral de 10⁶ mBMSCs, transfectados mediante los complejos AdhNIS/Effectene (grupo mBMSCs-AdhNIS/Effectene). Los animales del tercer grupo recibieron una inyección intratumoral de 10⁶ mBMSCs, transfectados mediante los complejos AdhNIS/PEI (grupo mBMSCs-AdhNIS/PEI). Por último, los animales del cuarto grupo recibieron una inyección intratumoral de 10⁶ mBMSCs, transfectados mediante los complejos AdhNIS/PEI-RGD (grupo mBMSCs-AdhNIS/PEI-RGD). Todos los animales de cada grupo, recibieron una posterior inyección intraperitoneal de una dosis de 2 mCi de

I^{131} . Para minimizar el daño tiroideo, 7 días antes de la administración del radioisótopo, los animales se trataron con L-tirosina (T4), a una dosis de 5mg/l en el agua durante una semana.

En la figura 51B se muestra el patrón de crecimiento de los tumores seguido en cada grupo de animales. Las diferencias en los tamaños de los tumores entre los distintos grupos se empezaron a observar a partir del día 17. El promedio del tamaño de los tumores en los animales del grupo mBMSCs-AdhNIS/PEI-RGD fue de $65,40 \pm 8,74 \text{mm}^3$, frente a los tamaños observados en los grupos mBMSCs-AdhNIS/PEI ($93,60 \pm 17,38 \text{mm}^3$), mBMSCs-AdhNIS/Effectene ($97,99 \pm 10,50 \text{mm}^3$) y mBMSCs-AdhNIS ($101,39 \pm 20,59 \text{mm}^3$) en los que se obtuvieron valores similares. Finalmente, a día 25, después de 10 días de la administración del radioisótopo, los tumores de los animales del grupo mBMSCs-AdhNIS/PEI-RGD mostraron un tamaño significativamente menor que el resto de grupos ($99,58 \pm 15,83 \text{mm}^3$), demostrando de nuevo que el empleo de los complejos Ad/PEI-RGD aumenta de forma significativa la eficiencia en la transferencia génica aumentando los niveles de expresión de hNIS en las células comparado con el resto de estrategias y con la infección convencional. Estos resultados también demuestran que la utilización de los complejos Ad/PEI-RGD, además de lo anteriormente indicado sobre su fenotipo, tampoco afecta a la funcionalidad del producto génico. Los tamaños obtenidos con el resto de estrategias fueron para el grupo mBMSCs-AdhNIS/PEI de $170,13 \pm 10,88 \text{mm}^3$, mBMSCs-AdhNIS/Effectene de $196,01 \pm 16,05 \text{mm}^3$ y mBMSCs-AdhNIS de $252,62 \pm 18,60 \text{mm}^3$. No hubo diferencias significativas entre estos grupos.

A



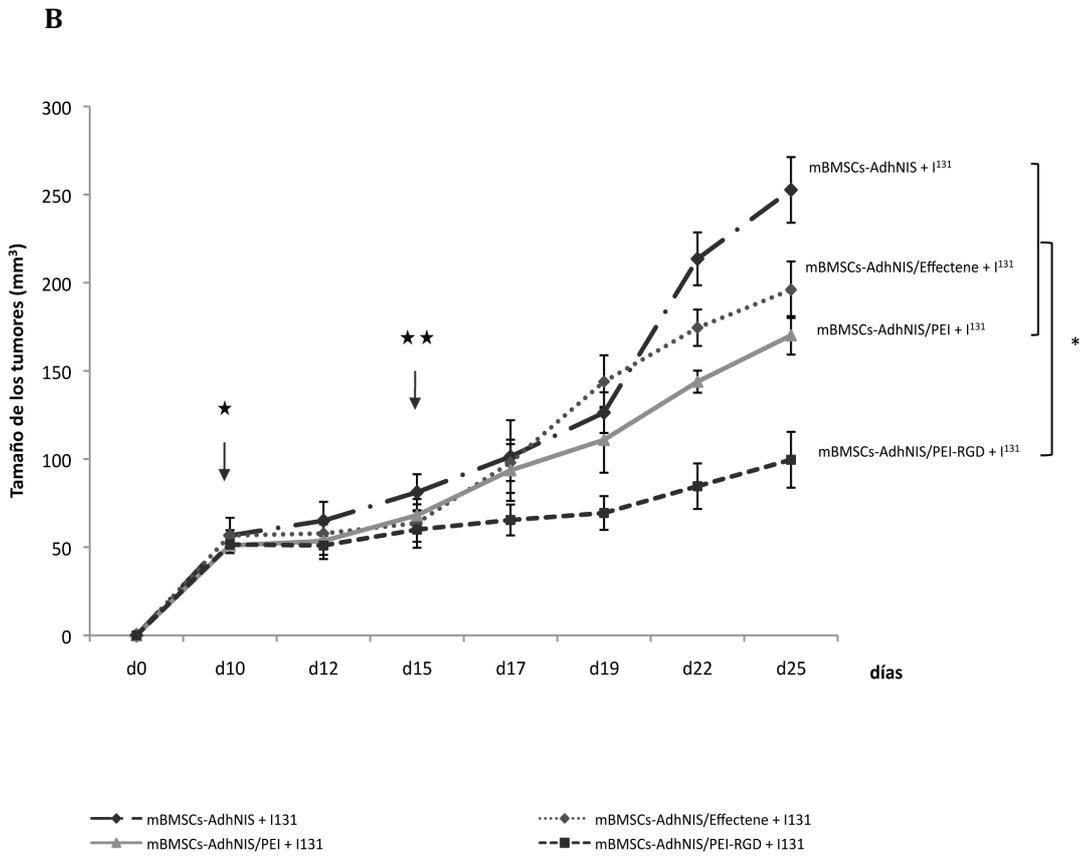


Figura 51: Efecto en el tamaño de los tumores de animales que recibieron una inyección intravenosa de mBMSCs transfectadas con AdhNIS mediante diferentes estrategias y tratamiento con I¹³¹. [A] Secuencia temporal seguida durante el ensayo con I¹³¹. Aproximadamente 10 días tras la inducción de los tumores HeLa, se inyectaron de forma intratumoral las mBMSCs previamente transfectadas mediante diferentes estrategias (AdhNIS, AdhNIS/Effectene, AdhNIS/PEI y AdhNIS/PEI-RD). Entre 4-7 días antes de la administración del radioisótopo, los animales fueron tratados con una dosis de 5mg/l de L-tirosina en el agua. Transcurrido ese tiempo, a los animales de cada grupo les fue administrada de forma intraperitoneal una dosis de 2 mCi de I¹³¹. Durante los 10 días posteriores, los tumores fueron medidos cada 2-3 días. Finalmente, los animales fueron sacrificados a día 25. [B] Representación grafica del efecto terapéutico del tratamiento con I¹³¹. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de unos 50 mm³, los animales recibieron una inyección intratumoral de mBMSCs-hNIS (mBMSCs-AdhNIS, mBMSCs-AdhNIS/Effectene, mBMSCs-AdhNIS/PEI o mBMSCs-AdhNIS/PEI-RD) (indicado con ★). Cinco días después, a todos los animales de cada grupo, les fue administrada de forma intraperitoneal una dosis de 2 mCi de I¹³¹ (indicado con ★ ★). El análisis estadístico fue realizado con el test Kolmogorov-Smirnov seguido del test Tukey HSD. (* p<0,05).

5. DISCUSIÓN

Actualmente, entre los abordajes clásicos para el tratamiento del cáncer, se incluyen principalmente cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo estos tratamientos presentan una eficacia limitada y los esfuerzos se enfocan en encontrar terapias alternativas que complementen a estos tratamientos mediante diferentes estrategias como (i) inducción de la apoptosis o (ii) superando las resistencias empleando diferentes drogas dirigidas a las células tumorales o a cualquier otro elemento del estroma tumoral o (iii) estrategias donde se combinen el uso de genes específicos antitumorales o (iv) el uso de adenovirus de replicación condicionada (CRAds) y (v) el empleo de vectores que se dirijan e incorporen directamente en el tumor y puedan administrarse eficazmente de forma sistémica. El potencial terapéutico que poseen las MSCs para migrar de forma específica a zonas tumorales las hace un herramienta ideal para su utilización como vehículos o vectores de terapias antitumorales, en una terapia génica y celular combinada.

5.1. Características de las MSCs

La identificación y caracterización de las MSCs *in vivo* no es sólo un interés científico, sino un requerimiento regulatorio que deriva de su potencial en el empleo en aplicaciones clínicas (L Sensebé, Krampera, Schrezenmeier, Bourin, & Giordano, 2010; Luc Sensebé, 2008). Debido a la incapacidad en identificar a las MSCs de forma inequívoca y distinguir las de otros tipos celulares mediante un único marcador, la identificación recae exclusivamente en el análisis *in vitro* de las poblaciones que son mantenidas en cultivo. Las diferencias entre las condiciones en las que se encuentran en su nicho natural, comparadas con las condiciones *in vitro*, podrían alterar sus características, pudiendo sufrir cambios fenotípicos durante la manipulación *ex vivo* y perder la expresión de algunos marcadores o adquirir otros (Jones et al., 2002).

Entre los criterios utilizados para la caracterización de las MSCs, y siguiendo las indicaciones sobre los criterios mínimos que definen actualmente a las hMSC, encontramos pequeñas diferencias que resaltan que esta combinación de propiedades físicas, fenotípicas y funcionales, no son enteramente válidas entre MSCs de diferentes especies, ni entre MSCs aisladas de diferentes tejidos dentro de una misma especie (Jo, Ahn, Kim, Seong, & Lee, 2007; Morikawa et al., 2009).

En este trabajo, la caracterización de las MSCs se realizó, tanto de las mBMSCs como de cada una de las líneas de hMSCs, siguiendo las indicaciones sobre los criterios

mínimos que definen actualmente a las hMSCs. Los resultados mostraron que cada una de las líneas de MSCs ensayadas fueron capaces de mantenerse en placas cultivo, demostrando su capacidad de adherirse al plástico. Sin embargo, las líneas hEESCs y hESSCs mostraron una menor capacidad para adherirse necesitando un pretratamiento con gelatina y diferentes condiciones y suplementos en el medio de cultivo (tabla 2).

Por otro lado, todas las líneas de hMSCs mostraron niveles de expresión similares para cada marcador analizado, encontrándose pequeñas diferencias en varios marcadores entre las diferentes hMSCs. Nuestro análisis confirma lo descrito por Fiorina et al., en que las principales variaciones de expresión se pueden encontrar en los marcadores CD34 y CD105 (Fiorina et al., 2009). Los niveles de expresión de CD105 fueron de $\geq 99,2\%$ para todas las hMSCs excepto en las hAMCs, donde los niveles obtenidos fueron de $97,5\%$. En el caso de CD34, los valores más elevados se obtuvieron en las BMhMSCs ($6,5\%$), mientras que en el resto de líneas los valores fueron $\leq 0,9\%$. Además, también encontramos diferencias en la expresión de CD45, obteniendo valores entre el $19,1\%$ en las BMhMSCs y de $0,5\%$ en las hEESCs.

Las MSCs presentan la habilidad para diferenciarse *in vitro* a células del linaje mesenquimal bajo los estímulos adecuados. Sin embargo, existe una idea creciente, de que las poblaciones de MSCs aisladas de diferentes tejidos son heterogéneas con variaciones en su potencial de diferenciación. Karystinou et al., mostraron que MSCs aisladas de líquido sinovial fueron capaces de diferenciarse a osteocitos y condrocitos pero sólo un 30% de la población testada fue capaz de diferenciarse a adipocitos (Karystinou et al., 2009).

En los resultados mostrados en la figura 25, demostramos que todas las líneas de hMSCs ensayadas fueron capaces de diferenciarse tanto a osteocitos como a adipocitos. Sin embargo, se observaron algunas diferencias en el grado de diferenciación osteogénica, ya que en las BMhMSCs la presencia de calcio se detectó prácticamente por toda la población testada, mientras que en las hASCs y hAMCs se observaron grandes acúmulos de calcio menos homogéneos repartidos por la población. Estas pequeñas diferencias pueden ser debidas a variaciones dependientes del origen de hMSCs.

En el trabajo de Cervelló et al., del grupo del Dr. Carlos Simón, quienes amablemente nos cedieron ambas líneas de hMSCs aisladas de endometrio, observan mayor capacidad de diferenciación osteogénica en las hEESCs, mientras que en la

diferenciación adipogénica los resultados son similares entre ambas líneas de células. En nuestros resultados, no observamos diferencias (Cervelló et al., 2011).

Bajo las condiciones apropiadas, las MSCs han sido capaces de diferenciarse también a otros linajes mesenquimales como miocitos esqueléticos y tenocitos, y también se ha descrito la capacidad de diferenciar *in vitro* a las MSCs a linajes de las tres capas embrionarias, como cardiomiocitos, neuronas y astrocitos (Beyer Nardi & da Silva Meirelles, 2006; Bianco & Gehron Robey, 2000; Jori et al., 2005; Pittenger et al., 1999; Tokcaer-Keskin et al., 2009). Bai et al., comparan la capacidad de diferenciación a cardiomiocitos de las hMSCs aisladas de líquido amniótico y de la gelatina Wharton del cordón umbilical. Tras la diferenciación, se analizaron por qPCR los niveles de expresión de genes típicos de cardiomiocitos (GATA-4, cTnT, Cx43 y α -actina), aunque ambos tipos celulares fueron capaces de diferenciarse, la expresión de los genes fue menor en el caso de las células aisladas de la gelatina Wharton. También indicaron diferencias en la capacidad de adherencia a la placa de las hMSCs aisladas de la gelatina Wharton, siendo 2 veces menor que en las hMSCs aisladas de líquido amniótico (Bai et al., 2012).

Hay pocos datos disponibles sobre la existencia de nichos de MSCs *in vivo* (da Silva Meirelles, Caplan, & Nardi, 2008), sugiriendo una localización perivascular de las MSCs (Kuhn & Tuan, 2010). Sin embargo, esta idea es rechazada por otros debido a la existencia de células similares a las MSCs en tejidos avasculares como en el cartílago articular (Barbero, Ploegert, Heberer, & Martin, 2003; Dell'Accio, De Bari, & Luyten, 2003; Dowthwaite et al., 2004). Las condiciones en las que las MSCs son mantenidas *in vivo* en sus nichos, tampoco se conocen exactamente (Hennig et al., 2007; Hwang et al., 2009; Ivanova-Todorova et al., 2009; Meijer, de Bruijn, Koole, & van Blitterswijk, 2008; Roubelakis et al., 2007; Zhu et al., 2008). Las células que residen en médula ósea, poseen baja tensión de oxígeno, alrededor de 1-3% (Rosová, Dao, Capoccia, Link, & Nolte, 2008; Saller et al., 2012) y a pesar de que se conoce que la concentración de O₂ es a menudo un factor importante en muchos aspectos de la biología de las células, generalmente son mantenidas *in vitro* bajo condiciones no fisiológicas (21% de O₂).

Nuestros resultados demostraron que existen diferencias entre las líneas de hMSCs ensayadas en los requerimientos de O₂. En las líneas BMhMSCs, hEESCs y hESSCs, el efecto de una baja concentración de O₂, ejerció de forma significativa una curva de crecimiento mas rápida, lo que podría suponer unas condiciones con baja tensión de O₂ en sus nichos originales. Según Valarani et al., comparó el mantenimiento

de las hASCs obtenidas de cuatro donantes distintos, en condiciones de normoxia y de hipoxia (2% O₂), demostrando un aumento en la viabilidad y proliferación y menos apoptosis y necrosis en las células mantenidas en cultivo en condiciones de hipoxia (Valorani et al., 2012). En contraposición con estos resultados, en nuestro caso observamos, que el mantenimiento de las hASCs en condiciones de hipoxia aumenta los niveles de proliferación celular aunque de forma no significativa cuando lo comparamos con las hASCs mantenidas en condiciones de normoxia. Según Saller et al. y Rosová et al., en trabajos comparando las BMhMSCs en ambas condiciones de O₂, afirma que el mantenimiento de las hMSCs en condiciones de hipoxia podría alterar la expresión de integrinas retrasando la entrada en senescencia de las células, incrementando la homogeneidad de la población, aumentando los niveles de proliferación y autorrenovación celular y afectando a la capacidad de migración de las mismas (Rosová et al., 2008; Saller et al., 2012).

De este modo, los criterios actuales que definen a las MSCs, parecen ser muy dependientes de las condiciones de cultivo en las que se mantienen y se expanden, aunque hay evidencias de que las diferencias entre las MSCs son debidas posiblemente a diferencias en sus nichos de origen. Esto último parece ser la principal fuente de variaciones en las propiedades biológicas de las MSCs (De Bari & Dell'accio, 2008), mostrando heterogeneidad en sus fenotipos, diferencias en su mantenimiento *in vitro* y aunque con similitudes en su potencial de diferenciación y proliferativo, también con variaciones entre ellas (De Bari & Dell'accio, 2008; Phinney & Prockop, 2007). Estos criterios permiten sólo una definición en retrospectiva de una población de células conteniendo MSCs, pero no en prospectiva, por lo que es necesario la búsqueda de nuevos criterios de identificación, para aclarar la verdadera naturaleza, identidad, origen y capacidad multipotente de las MSCs y normalizar los métodos y condiciones para mantener a las células *in vitro*.

5.2. Habilidad para migrar a sitios de daño o inflamatorios

La utilización de MSCs, es una de las estrategias más prometedoras en el campo de las aplicaciones terapéuticas en medicina regenerativa para múltiples enfermedades como en el tratamiento de alteraciones del sistema nervioso o enfermedades como Parkinson o Huntington (Lescaudron, Naveilhan, & Neveu, 2012; Yang et al., 2012). También en el empleo de las MSCs como terapia en casos de infarto de miocardio, han

mostrado un gran potencial mejorando la prognosis de los pacientes (S. Chen et al., 2004; Y.-H. Choi, Kurtz, & Stamm, 2011; Hare et al., 2009). Debido a su participación en la reparación y remodelación de los tejidos, las MSCs han sido aplicadas en multitud de otras enfermedades, como isquemia cerebral (J. S. Lee et al., 2010), diabetes (Fiorina et al., 2009; R. Jiang et al., 2011; D.-S. Li et al., 2009), trasplantes de riñón (Tan et al., 2012) o esclerosis múltiple (Connick et al., 2012; Siatskas, Payne, Short, & Bernard, 2010), mostrando diferentes grados de eficacia entre las terapias, pero siempre con buenos niveles de seguridad (Sng & Lufkin, 2012).

En el caso de los tumores, la formación del estroma tumoral se asemeja en gran modo a ciertos procesos inflamatorios como la cicatrización y remodelado de las heridas que como en una herida sin curar, mantiene un ambiente constante de mediadores inflamatorios como citoquinas y quimioquinas inflamatorias, factores de crecimiento y células del sistema inmunológico. Bajo estas condiciones, las MSCs son capaces de migrar hacia estos sitios inflamatorios, injertándose y pudiendo contribuir en la formación del estroma tumoral.

Estudios previos han mostrado que tras la administración sistémica de MSCs expandidas *in vitro*, pueden ser detectadas en múltiples órganos en animales sanos, como en pulmón, hígado, riñón y bazo, sin embargo, éstas son incapaz de injertarse. Cuando la administración se realiza directamente con un extracto aislado de médula ósea, las MSCs se han detectado en bazo y médula ósea, pero cuando las células son previamente expandidas *in vitro*, no se han podido localizar de nuevo en la médula (S. K. Kang, Shin, Ko, Jo, & Ra, 2012).

Nuestro trabajo evaluó la capacidad de migración *in vivo* de las MSCs, en este caso específicamente de las mBMSCs, hacia zonas de daño o zonas en las que existe un proceso inflamatorio, de forma paralela y simultánea, con la misma fuente de células, mediante diferentes modelos de patologías y utilizando abordajes similares. Las MSCs fueron detectadas en los sitios diana en las tres patologías, mediante diferentes técnicas de biología molecular, como PCR, *western-blot* y microscopía confocal y mediante técnicas de visualización como SPECT o bioluminiscencia. En el modelo de tumor HeLa, las mBMSCs pudieron detectarse desde el día 8 tras la inyección intravenosa hasta la finalización del experimento, mientras que en los animales diabéticos, fueron detectadas desde el día 4. En ambos modelos, pudieron detectarse en los pulmones hasta el día 10. En los animales a los que se les realizó una herida, las

mBMSCs fueron detectadas hasta el día 4. En estos animales, se detectaron en pulmón hasta el día 8 y en hígado a día 4.

Kidd et al., estudiaron la capacidad de migración de las mBMSCs en diferentes modelos de herida en piel, donde a un grupo de animales se les hizo varias punzadas a lo largo de la cola y otro grupo de animales a los que se les realizó una incisión en la zona del abdomen que posteriormente se suturó. En ambos casos, tras su administración intravenosa, las células fueron localizadas mediante visualización por bioluminiscencia en las zonas diana desde el día 3 y hasta el día 5. Y de forma similar a nuestros resultados, en ambos modelos se detectó señal en los pulmones desde el día 1, disminuyendo hasta el día 5 (Kidd et al., 2009). Estos resultados sugieren que los receptores o factores expresados y secretados por los tejidos que han sufrido la herida facilitan la migración, adhesión y la infiltración de las MSCs al sitio inflamatorio, ejerciendo a su vez un efecto terapéutico a nivel de la regeneración del tejido, promoviendo la cicatrización y el descenso de la inflamación (Chamberlain, Fox, Asthon, & Middleton, 2007). Esto se corresponde con nuestros resultados, ya que a día 8 tras la administración de las mBMSCs, no se detecta señal en la zona de la herida.

En el mismo trabajo, estudiaron también la migración de mBMSCs a metástasis en pulmón de células MDA-231. En este caso, los resultados fueron similares, fueron capaces de detectar a las mBMSCs en los pulmones desde el día 3 tras la administración intravenosa hasta la finalización del experimento a día 29, tras lo cual, los pulmones, hígado, bazo y otros órganos fueron visualizados una vez extraídos de los animales. Sólo detectó señal en los pulmones y en el hígado. En los animales control sin ninguna patología, fueron capaces de detectar las mBMSCs en los pulmones hasta el día 14, además de en hígado y bazo. En otros trabajos y como muestran nuestros resultados, existe un importante efecto de retención de las células en los pulmones, tanto en animales sanos como con patologías. Barbash et al., administraron de forma intravenosa MSCs extraídas de médula ósea en un modelo de infarto de miocardio en ratas, y observaron que la mayoría de las células se encontraban en los pulmones y sólo una pequeña cantidad en el corazón, mientras que con una administración directamente en el ventrículo, fue observada prácticamente la totalidad de las células (Barbash et al., 2003).

La retención en los pulmones de las MSCs administradas sistémicamente ocurre en otros estudios donde las células son mantenidas en condiciones *in vitro*, donde las células pueden aumentar de tamaño, y cambiar su patrón de expresión de marcadores y

de moléculas de adhesión, además del modelo animal que se emplee. Gao et al., observaron que el tratamiento con un vasodilatador de nitroprusiato sódico disminuye el número de células retenidas en los pulmones (Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, 2001), pero aunque una fracción de las MSCs administradas se retengan en los pulmones, en la mayoría de los estudios, tras 48-72 horas empiezan a desaparecer. Durante este paso a través de los pulmones, las MSCs embolizadas son capaces de activarse y secretar la proteína antiinflamatoria 6 inducida por TNF- α (TNAIP-6 o TSG-6) que es capaz en un modelo de infarto de miocardio, de reducir la zona infartada y mejorar la función cardíaca (R. H. Lee et al., 2009). Estos descubrimientos, indican que las MSCs también pueden ejercer efectos desde la distancia en los órganos diana.

Otros modelos de patologías como diabetes (Davis, Hamilton, & Fontaine, 2012; Y.-Y. Li, Liu, Chen, & Li, 2012; Milanesi et al., 2012) o daño nervioso, también han sido utilizados para evaluar la capacidad de las MSCs para migrar desde el torrente sanguíneo, a través del endotelio hasta el tejido donde ocurre el proceso inflamatorio (J. Chen et al., 2001; Devine et al., 2001; Hofstetter et al., 2002; W.-H. Jiang et al., 2005; Sordi et al., 2005; Yang et al., 2012). En un modelo de daño en nervio ciático, la administración de las MSCs produjo un efecto beneficioso aumentando la función electrofisiológica, la mielinización del nervio y mejorando la expresión de factores neurotróficos y del receptor de acetilcolina (Yang et al., 2012).

5.3. Diferencias entre hMSCs aisladas de diversos tejidos para migrar e injertarse en un modelo de tumor

Los mecanismos y factores responsables de esta habilidad aún no están del todo claros, citoquinas, quimioquinas y otras moléculas quimioatrayentes secretadas tanto por las células del tumor como por los distintos componentes del estroma y la expresión de los receptores correspondientes en las MSCs, resultan la principal causa (R M Dwyer & Kerin, 2010; Spaeth, Kidd, & Marini, 2012). Sin embargo, el grado de heterogeneidad en los fenotipos que presentan las células aisladas de diferentes tejidos, las diferencias en su mantenimiento *in vitro* y potencial proliferativo (De Bari & Dell'accio, 2008), podrían ser factores que afectarían a su capacidad de migración y por tanto a su elección como fuente para aplicaciones terapéuticas.

Esta habilidad fue evaluada en este trabajo, con cinco líneas de hMSCs aisladas de diferentes tejidos y caracterizadas mediante diferentes ensayos *in vitro*, en el cual se permitió a las células colonizar un espacio generado en la monocapa, e *in vivo* mediante diferentes técnicas de imagen molecular no invasivas. En ambos abordajes, los resultados obtenidos fueron similares. En el modelo de tumor HeLa, todas las líneas de hMSCs ensayadas mostraron una amplia capacidad para migrar e injertarse en la zona de los tumores. Sin embargo se encontraron diferencias entre las hMSCs. La capacidad de migración de las BMhMSCs, tras una administración intravenosa, fue significativamente menor y más lenta comparado con el resto de hMSCs, en las que se detectaron antes y la intensidad de las señales se mantuvieron durante más tiempo. Todos los tipos celulares fueron detectados por MRI y SPECT-CT desde la primera adquisición, a día 3 excepto en el caso de las BMhMSCs, y hasta el final del experimento a día 24, demostrando su capacidad para migrar y persistir en la zona del tumor. Los animales que recibieron la administración de las hEESCs mostraron la señal más intensa entre los días 17 y 24, demostrando una capacidad mayor de migración que el resto de las hMSCs. Estos resultados fueron confirmados mediante tinción con azul de Prusia, para detectar las partículas de SPIO, y hNIS en los tumores.

Diferentes trabajos han mostrado la migración de las BMhMSCs hacia diferentes modelos de tumor. Dwyer et al., mostraron la capacidad de migración de las BMhMSCs en un modelo de cáncer de mama mediante visualización de la expresión de hNIS por SPECT-CT (Roisin M Dwyer et al., 2011). A diferencia de lo observado en nuestros resultados, la expresión de hNIS fue detectada en los tumores desde el día 3 tras la administración de las células. Estos resultados podrían ser atribuibles a las diferencias entre donantes, a las condiciones de cultivo *in vitro* en las que las células son mantenidas, al modelo de tumor utilizado y posiblemente al tamaño de los tumores antes de la administración de las BMhMSCs.

Para intentar entender si la existencia de diferencias en el nivel de pluripotencia entre las hMSCs podría ser un factor implicado en la migración hacia los tumores, incluimos en el experimento de SPECT-CT a las hiPSCs, como control positivo de pluripotencia, observando resultados similares comparadas con las hMSCs en las primeras adquisiciones pero detectando los niveles más elevados a día 24, sugiriendo que tal vez diferencias en el patrón de la expresión de genes relacionados con pluripotencia en las hMSCs, aunque por definición son células multipotentes, podría ser un factor importante a tener en cuenta y dependiente del nicho de origen de las hMSCs.

Tras analizar un panel de genes relacionados con pluripotencia, se confirmó un patrón muy diferente entre las hiPSCs y las hMSCs, obteniendo valores mucho menores para los genes analizados SOX2, NANOG, OCT4, KLF4 y REX1 en las hMSCs comparado con las hiPSCs. Sin embargo, se encontraron pequeñas diferencias entre las hMSCs. Las líneas hEESCs y hESSCs, siendo la primera vez que se analizó su capacidad de migración *in vivo*, mostraron las señales más intensas mediante las técnicas de imagen y una expresión significativamente mayor de los genes KLF4, NANOG y REX1 comparado con el resto de hMSCs, aunque con valores mucho menores que los obtenidos con las hiPSCs. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Cervelló et al., en los que detectan expresión de NANOG, pero no de OCT4 (Cervelló et al., 2011). Según Bai et al., las hMSCs aisladas del líquido amniótico y de la gelatina Warton del cordón umbilical muestran características típicas de MSCs, como la expresión de los marcadores de superficie CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105; y de ESs como la expresión de los genes OCT4, SSEA-4 y NANOG, afirmando que estas hMSCs posiblemente se encuentran en un estado intermedio entre las células troncales adultas y las embrionarias, aunque mostrando más características de las células adultas como su capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación *in vitro* (Bai et al., 2012). Estas diferencias en el patrón de pluripotencia entre las diferentes líneas de hMSCs podría influir en las diferencias encontradas en la migración, ya que las células que expresaban estos patrones fueron a su vez las más migratorias.

5.4. Efectos protumorigénicos de las MSCs

Los datos actuales disponibles en la bibliografía sobre los efectos generados en el tamaño tumoral son confusos y contradictorios. Distintos trabajos *in vivo* demuestran que la administración de MSCs, independientemente de la vía de administración, número de células y tipo de modelo tumoral, promueven el crecimiento y la tumorigénesis en el tumor. Otros, sin embargo, afirman poseer un efecto antitumorigénico e inhibitorio en el crecimiento del tumor.

En nuestros experimentos, la administración de cada una de las líneas de hMSCs en un modelo de tumor subcutáneo de células HeLa, provocó un aumento del tamaño de los tumores comparado con los animales control, demostrando que este efecto fue provocado por la migración y llegada de las células a las zonas tumorales, promoviendo posiblemente la proliferación de las MSCs, las células tumorales o de algún otro elemento del estroma tumoral. Los resultados mostraron diferencias significativas en

los tamaños de los tumores entre las hMSCs y las hiPSCs. Aunque la mayoría de los tumores en los que se administraron las MSCs mostraron un patrón de crecimiento similar, los tumores de los animales que recibieron la administración de BMhMSCs, tuvieron un crecimiento significativamente menor al resto de grupos de MSCs, solo algo mayor al de los controles. Diferentes estudios en los que la administración de las MSCs posee un efecto protumorigénico son mostrados en la tabla 1. Todos estos autores utilizaron diferentes modelos tumorales, diferentes tipos de MSCs, diferentes formas de administración, número de células y diferentes tamaño del tumor inicial. Cada uno de estos factores pueden ser determinantes para promover o inhibir el tamaño tumoral (Klopp, Gupta, Spaeth, Andreeff, & Marini, 2011).

Según los experimentos de incorporación de BrdUrd *in vivo* del grupo del doctor Marini (Studený et al., 2002), las MSCs administradas en animales sanos, no fueron capaces de proliferar. De este modo, el crecimiento de la masa tumoral observada podría estar relacionado con incremento del número de células tumorales, con el incremento de la proliferación de las MSCs en el área del tumor, una combinación de ambas o con el incremento de otros elementos del estroma. Cabe destacar, las diferencias obtenidas en los tamaños resultantes de la administración de hiPSCs comparados con los obtenidos con las MSCs, que junto con los resultados obtenidos por imagen molecular, podemos especular que las diferencias en el nivel de pluripotencia, podría ser un factor más que influiría en la capacidad de migración hacia las zonas tumorales.

En caso de las hiPSCs, este y otro trabajo previo (Templin C, Zweigerdt R, 2012) son los primeros que muestran *in vivo* la capacidad de migración y establecimiento permaneciendo durante un largo periodo de tiempo en los tumores.

5.5. MSCs en el microambiente del tumor

Poco se conoce sobre los procesos que sufren las MSCs una vez que han llegado a la zona tumoral tras su administración. Una vez allí, éstas son capaces de interactuar con las células del tumor y con las células no tumorales residentes del estroma, como las células del sistema inmune y las células endoteliales, apoyar la vasculogénesis, y secretar citoquinas y factores de crecimiento (Brooke et al., 2007). Como resultado de esta interacción, muchos trabajos junto con el nuestro, han mostrado que las MSCs promueven el crecimiento tumoral (Dai et al., 2011). Según Mishra et al., y Spaeth et al., las MSCs son capaces de diferenciarse y adquirir fenotipo

de TAFs tras la exposición al microambiente tumoral, modificando su patrón de marcadores (Mishra et al., 2008; Spaeth et al., 2009).

Se han planteado varias hipótesis sobre el destino final de las MSCs *in vivo*, sugiriendo la posibilidad de que estas células sufran algún evento de transdiferenciación, fusión celular o simplemente ejercer su efecto mediante función paracrina en respuesta a distintos factores del microambiente. Diferentes trabajos muestran que la contribución de las MSCs en sitios de daño tisular *in vivo* y su posterior efecto regenerativo, sucede mediante transdiferenciación (Bailey et al., 2006), mientras que otros hablan de fusión celular (Piquer-Gil, García-Verdugo, Zipancic, Sánchez, & Alvarez-Dolado, 2009).

En el caso de tumores, Rappa et al., mostró la formación de híbridos de forma espontánea *in vitro* originados mediante fusión celular entre BMhMSCs y dos líneas de células de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MA11). Los híbridos mostraron características típicas de MSCs, un perfil de expresión génica mixto y un aumento en el número de ploidias, además de una mayor capacidad invasiva y metastásica (Rappa, Mercapide, & Lorico, 2012). Por otro lado, Wang et al., mostraron *in vitro* que la fusión celular de hMSCs derivadas de cordón umbilical y de células de carcinoma de esófago, genera híbridos con una tasa de crecimiento inferior, niveles superiores de apoptosis e inhibición de la tumorigénesis (Wang et al., 2012).

Nuestros resultados demostraron *in vivo*, que tras la llegada de las BMhMSCs a la zona tumoral, no se dio ningún evento de fusión celular entre las BMhMSCs y las células tumorales. Sin embargo no podemos afirmar que no existan otros procesos de fusión celular entre las MSCs y otros elementos del estroma tumoral, promoviendo tal vez la tumorigénesis y el crecimiento de los tumores. Ferrand et al., demostró la capacidad de las MSCs tanto *in vitro* como *in vivo* de adquirir características epiteliales mediante mecanismos de fusión celular con células tumorales epiteliales gástricas e intestinales. En este proceso, las MSCs sufrieron la pérdida de expresión de sus marcadores típicos, sugiriendo la posibilidad de ser un proceso previo a su reprogramación y posterior diferenciación a células epiteliales (Ferrand et al., 2011). En nuestros resultados, encontramos en el caso de los tumores de los animales que recibieron la administración intravenosa de hAMCs, hEESCs e hiPSCs, formaciones óseas, demostrando la capacidad de estas células para diferenciarse a células del mismo linaje mesenquimal. Sin embargo, las líneas BMhMSCs, hASCs y hEESCs no fueron capaces de diferenciarse.

5.6. Cambios en el patrón de expresión de diferentes genes relacionados con la migración

Aunque los mecanismos por los que las MSCs son capaces de migrar, no son del todo entendidos todavía, se cree que la principal causa es la liberación de un gradiente de factores quimioatrayentes por parte del tumor y la expresión de un conjunto de receptores de quimioquinas y citoquinas en la superficie celular de las MSCs, que *in vitro* responden funcionalmente a esos ligandos mientras que *in vivo*, su modificación implica cambios en su comportamiento y en la capacidad de migración (Honczarenko et al., 2006; Ponte et al., 2007; Ringe et al., 2007; Sordi et al., 2005; Von Lüttichau et al., 2005).

Generalmente, la actividad quimiotáctica de las quimioquinas es menos eficiente que la producida por distintos factores de crecimiento como IGF-1 y PDGF-AB, aún así, las quimioquinas con mayor actividad en la migración de las MSCs parecen ser CCL5 o RANTES, CXCL12 o SDF-1 y CCL2 o MCP-1 (Ponte et al., 2007). Honczarenko et al., muestra *in vitro* que las BMhMSCs secretan un amplio panel de quimioquinas como CXCL12, CCL2 y CCL5, que están implicadas en la activación de diferentes rutas de señalización como MAPK, FAK y STAT para la inducción de distintas respuestas biológicas, revelando posibles efectos autocrinos asociados a estas moléculas (Honczarenko et al., 2006).

Entre las diferentes parejas de receptor y ligando descritos como responsables de la migración destacan la pareja CXCR4/CXCL12. En numerosos trabajos y empleando diferentes modelos de tumor, tanto *in vitro* como *in vivo* (R M Dwyer et al., 2007; Heissig et al., 2002; Orimo et al., 2005; Petit et al., 2002; Ponte et al., 2007; Ringe et al., 2007; Sordi et al., 2005), se ha demostrado que la migración de las BMhMSCs es dependiente de la dosis de CXCR4/CXCL12 a través de la activación de la ruta PI3K/Akt (Yu et al., 2010). Posteriormente ha sido también descrito en otras líneas de hMSCs, como en las derivadas de líquido amniótico (Kang et al., 2012) y de la sangre del cordón umbilical (Yang et al., 2012). En condiciones de hipoxia, tanto las células tumorales como las células del estroma tumoral, como los TAFs, son capaces de inducir la expresión de CXCL12 (Kryczek, Wei, Keller, Liu, & Zou, 2007; Ryu et al., 2010), y de este modo promover el crecimiento tumoral y la angiogénesis (Mishra et al., 2008).

Wynn et al., examinaron la expresión de CXCR4 en hMSCs mantenidas *in vitro*, mostrando que el receptor esta presente en menos de 1% en la superficie celular. La

mayoría de CXCR4 (83-98%) está localizado de forma intracelular en compartimentos endosomales, pudiendo ser movilizado a la superficie celular tras la estimulación mediada por citoquinas (Chamberlain et al., 2007; Son et al., 2006), ya que tras el empleo de un antagonista de CXCR4, el AMD3100, la quimiotaxis de las MSCs hacia CXCL12 fue inhibida de forma significativa, confirmando que la pareja CXCR4/CXCL12 regula la respuesta migratoria de las MSCs.

La relación entre la migración y el estado inflamatorio (Ponte et al., 2007) pudo ser confirmado en un ensayo *in vitro* en el que el pretratamiento con TNF α de las BMhMSCs incrementó la capacidad de migración, al igual que con MMP2, CXCL12 y CCL5. En este sentido, CCL2 juega un importante papel en el reclutamiento y activación de los macrófagos en procesos inflamatorios, y como muestran los resultados de Dwyer et al., controlando la migración de las MSCs mediante su secreción por parte de las células del tumor (R M Dwyer et al., 2007). Sin embargo, otros estudios *in vitro* no detectan ningún efecto quimiotáctico en las BMhMSCs en respuesta a CCL2 (Ringe et al., 2007). Todos estos resultados contradictorios pueden ser explicados a la falta de homogeneidad en las poblaciones empleadas (Dawson, Chae, Jain, & Duda, 2011), variaciones entre los donantes, origen de las MSCs, condiciones en que son mantenidas *in vitro*, confluencia, número de pases y condiciones de hipoxia.

Nuestros resultados mostraron, que por lo general, cuando las MSCs son injertadas en el microambiente tumoral, se produce un descenso en la expresión de diferentes genes relacionados con migración en el tumor tras 4 semanas, aunque con diferencias dependiendo del tipo de hMSCs administrada. En todos los casos, la expresión de la pareja CXCR4 y CXCL12 en el microambiente tumoral fue disminuida significativamente comparada con los niveles obtenidos en los tumores control. En el caso de las hiPSCs, los niveles de expresión de cada uno de los genes analizados fueron mayores comparados con el control, excepto para CXCL12. Con estos resultados, y a diferencia de lo observado con las MSCs, los niveles de CXCR4 fueron incrementados rompiendo la correlación del eje CXCR4/CXCL12. Esta razón podría ser consecuencia de que la expresión de CXCL12 esta relacionada a fracciones más inmaduras de MSCs o del estado embrionario (Kortesidis et al., 2005).

Varias excepciones se detectaron en el caso de los genes MMP2 y CCL5. MMP2 es sobreexpresado en condiciones de hipoxia, y se ha propuesto que confieren a las células tumorales la habilidad de atravesar las barreras biológicas e iniciar un proceso metastásico. Las MSCs, son también capaces de secretar estas MMPs, pudiendo

participar en el proceso migratorio (Bhoopathi et al., 2011; Son et al., 2006). En nuestros resultados, encontramos que en el caso de los tumores a los que se les administró las hEESCs, los niveles de expresión de MMP2 aumentaron. Soria et al., mostraron que la expresión de CCL2 y CCL5 son adquiridas en el curso de la transformación maligna de las células tumorales y median la comunicación entre las células tumorales y las células del estroma tumoral (Makinoshima & Dezawa, 2009). CCL5 aumentó en el caso de los tumores en los que se les administró las hAMCs. Estos resultados sugirieron diferencias en el efecto generado por las distintas MSCs y en su función paracrina y autocrina pudiendo ser debidas principalmente a las distintas condiciones entre los nichos de MSCs, indicando además la importancia de mantener estas células en las condiciones idóneas para evitar una posible modificación en el patrón de expresión de sus receptores, lo que podría concluir en diferencias migratorias (Chamberlain et al., 2007).

5.7. Efecto terapéutico antitumoral

La habilidad de las MSCs de migrar específicamente a las zonas tumorales ha permitido su uso como herramienta terapéutica antitumoral, para transportar las terapias específicamente al área neoplásica (Loebinger & Janes, 2010). Las MSCs han sido modificadas para permitir la expresión de proteínas antiangiogénicas (Ghaedi, 2011) o interferón β (IFN- β) en diferentes modelos de tumor como gliomas, cáncer de mama, melanoma o próstata (Kidd et al., 2010). El uso de estas MSCs-IFN- β suprime el crecimiento de las células tumorales por inducción de células a sufrir una acumulación en fase S, incremento de la apoptosis, reduciendo así el tamaño de los tumores e incrementando la tasa de supervivencia. Las MSCs también han sido modificadas mediante el empleo de vectores adenovirales para la expresión de IL-12 o mediante el uso de vectores lentivirales condicionados para la expresión de la proteína transmembrana TRAIL bajo el control de doxiciclina, mostrando reducción de las metástasis originadas de tumores subcutáneo, (Luetzkendorf et al., 2010), mediante el uso de CRAds (Komarova, Kawakami, Stoff-Khalili, Curiel, & Pereboeva, 2006) o con el empleo de MSCs expresando genes suicidas como la timidina quinasa de herpes simples (HSV-TK) o la citosina deaminasa (CD) y el uso combinado con su prodrogas ganciclovir o la 5-fluorocitosina respectivamente (N.-H. Kang et al., 2012; Kosaka et al., 2012).

Nuestros resultados confirmaron los resultados obtenidos por Dywer et al. En este trabajo las BMhMSCs infectadas previamente con un AdhNIS, mostraron una reducción del tamaño de los tumores, en un modelo de cáncer de mama de células MDA-MB-231, tras el tratamiento con I¹³¹. La reducción del tamaño a las tres semanas de la administración del I¹³¹ fue de aproximadamente 2 veces, frente a las 3,5 veces obtenidas en nuestros resultados, comparado con los animales control que no recibieron el tratamiento de I¹³¹ (Roisin M Dwyer et al., 2011). Estas diferencias pudieron ser debidas al modelo de tumor empleado, al tipo de MSCs empleada, ya que en nuestro trabajo empleamos mBMSCs y diferimos también en el tamaño del tumor inicial (100mm³ vs. 50mm³). Estos resultados confirman la utilidad del uso del gen hNIS como herramienta de visualización para el seguimiento de las células mediante SPECT/CT y radioisótopos como Tc^{99m} o I¹²³, y su uso además como herramienta terapéutica mediante el tratamiento con I¹³¹.

5.8. Mejora de la infección adenoviral

El receptor CAR, proteína de membrana tipo I, ha sido identificado como el principal receptor usado por los vectores adenovirales que se emplean en aplicaciones terapéuticas. La entrada en las células es iniciada por la interacción de la fibra con el receptor CAR de la superficie celular. Esta unión permite una segunda interacción del péptido RGD (Arg-Gly-Asp) de la base del pentón de la capsida con diferentes integrinas, como $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_v\beta_1$, ayudando a la internalización del adenovirus en el interior celular. Aunque los niveles de transferencia génica mediante el empleo de vectores adenovirales son muy altos, en el caso de algunos tipos celulares, entre los que se encuentran con frecuencia las células tumorales, la eficacia de la infección es baja debida a la escasa o nula de expresión de CAR, que determina su tropismo.

La modificación de las proteínas de la fibra, añadiendo distintos péptidos, ha sido una estrategia empleada, con éxito, para aumentar la eficacia de la infección. Entre estas estrategias encontramos el uso de (i) una fibra mutante conteniendo el péptido RGD (Yong et al., 2009) para aumentar las interacciones con las integrinas, (ii) una cadena de residuos de lisinas (vector AdK7) que en este caso tienen como fin la interacción específica con integrinas α_v , (iii) el uso inespecífico de residuos de heparan sulfato en la superficie celular o (iv) la sustitución de la fibra con otra perteneciente a los serotipos Ad16, Ad35 o Ad50, permitiendo de esta manera la interacción con otros receptores celulares, como CD46, CD80 y CD86 (Kawabata, Sakurai, Koizumi,

Hayakawa, & Mizuguchi, 2005). Estos vectores adenovirales con la fibra modificada han sido aplicados para mejorar las eficacias de la transferencia génica en las MSCs. Sin embargo, la modificación de las cápsidas no es de metodología sencilla, ya que requiere de un amplio conocimiento del vector adenoviral y de ingeniería genética para obtener fibras funcionales. En el caso de CRAds, la modificación de la cápsida, puede resultar en bajos niveles de replicación viral ya que estas modificaciones pueden interferir con la producción de la progenie y la oncolisis viral (Raki, Rajecki, Kirn, & Hemminki, 2009). De esta forma han sido planteadas otras estrategias alternativas en las que no se requiera de modificación de la cápsida (Alenzi, Lotfy, Tamimi, & Wyse, 2010; J.-W. Choi, Lee, Kim, & Yun, 2012).

Nuestros resultados muestran un incremento mayor de 60 veces en los niveles de transferencia génica mediante el uso de complejos de Ad y derivados de polietilimina conjugados con el péptido RGD (Ad/PEI-RGD) en su superficie, comparado con la infección con el AdGFP sólo en las MSCs. Ensayos con el AdK7 muestran una eficacia en la transferencia génica de 460 veces mayor comparado con un vector adenoviral convencional, mientras un vector conteniendo la fibra de Ad35 (AdF35) o el AdRGD aumentan los niveles de transferencia génica 160 o 16 veces respectivamente (Mizuguchi, Sasaki, Kawabata, Sakurai, & Hayakawa, 2005). La transferencia génica mediante transfección adenoviral con los complejos Ad/PEI-RGD, no alteró el fenotipo ni la capacidad de migración de las MSCs, demostrando la utilidad, la eficacia y la seguridad de esta estrategia.

El interés de la comunidad científica en estas estrategias ha sido tal, que las compañías biotecnológicas han comenzado a comercializar formulaciones. Entre las estrategias comerciales que han aparecido en los últimos años, mostrando altos niveles de transferencia génica mediante el uso de distintos reactivos para la transfección adenoviral en células CAR negativas, hay que destacar el uso de ViraDuctin™ de Cell Biolabs (USA), en el que los niveles de transferencia génica aumentan hasta 12 veces comparado con la infección convencional (Ackerman, Summerfield, Vandre, Robinson, & Kniss, 2008). De esta manera podemos afirmar que la combinación entre el derivado de polietilimina conjugado con el péptido RGD y los adenovirus (Ad/PEI-RGD), es más eficaz que las existentes en el ámbito comercial actual.

6. CONCLUSIONES

Primera. Las MSCs son capaces de migrar a zonas de daño o hacia procesos inflamatorios tras su administración sistémica, independientemente de la patología o enfermedad.

Segunda. Las MSCs procedentes de diferentes tejidos u órganos estudiadas, son capaces de migrar al microambiente tumoral tras su administración sistémica, pudiendo detectarse durante un periodo largo de tiempo mediante diferentes técnicas de imagen molecular.

Tercera. El estudio de las MSCs aisladas de diferentes tejidos u órganos, muestra características similares entre ellas pero con diferencias en el patrón de expresión, potencial multipotente, habilidad de migración y efecto generado en las zonas tumorales, pudiendo ser debidas a diferencias en las que se encuentran en su nicho natural *in vivo*, a diferencias en los protocolos para aislarlas, a las condiciones no fisiológicas en las que son mantenidas en cultivo o a cualquier otro factor aún desconocido.

Cuarta. Las BMhMSCs poseen menor capacidad de migración a las zonas tumorales y menor efecto protumorigénico, mientras que las hAMCs y a las hEESCs son las líneas con mayor habilidad para migrar tanto *in vitro* como *in vivo*, originando los tamaños de tumores más grandes. Estas células mostraron diferencias en el patrón de expresión de genes relacionados con pluripotencia, indicando que esta diversidad podría provenir de un estado intermedio entre las células troncales adultas y las embrionarias, aunque mostraron características más cercanas a las células adultas, como su capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación *in vitro*.

Quinta. El potencial que poseen las MSCs para migrar de forma específica a zonas tumorales las hace un herramienta ideal para su utilización como vehículos o vectores de terapias antitumorales, en una terapia génica y celular combinada. Sin embargo, los datos necesarios para la elección del tipo celular adecuado aún es limitado debido a la heterogeneidad entre poblaciones, a las diferencias observadas entre diferentes modelos tumorales, vías de administración y dosis, confirmando la necesidad de continuar estudiando la naturaleza de estas células y obtener criterios más específicos y restrictivos para la seguridad en su empleo en aplicaciones clínicas.

Sexta. A pesar de las hipótesis actuales sobre el destino de las MSCs en el microambiente tumoral nuestros resultados no demuestran eventos de fusión entre las MSCs y las células tumorales. Sin embargo en el caso de las hAMCs y hEESCs se observaron zonas de osificación intratumoral *in vivo* que podrían provenir de la diferenciación de las MSCs en los tumores.

Séptima. La utilización de hNIS para la visualización y el seguimiento de las células administradas mediante técnicas de imagen molecular empleadas en clínica como SPECT/CT o PET, junto con el empleo de radioisótopos como Tc^{99m} o I¹²³, y su posterior uso como herramienta terapéutica mediante el tratamiento con I¹³¹, lo hace una herramienta de gran utilidad para aplicaciones de terapia génica y celular combinada.

Octava. La combinación entre el derivado de polietilimina conjugado con el péptido RGD y los adenovirus (Ad/PEI-RGD), constituye una herramienta eficaz para aumentar los niveles de transferencia génica en células CAR negativas, como las MSCs, evitando la necesidad de manipulación del genoma adenoviral para conseguir niveles aceptables de transferencia génica sin necesitar infectar con altas dosis virales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M. J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., et al.** (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature biotechnology*, 26(11), 1276–84.
- Ackerman, W. E., Summerfield, T. L. S., Vandre, D. D., Robinson, J. M., & Kniss, D. A.** (2008). Nuclear factor-kappa B regulates inducible prostaglandin E synthase expression in human amnion mesenchymal cells. *Biology of reproduction*, 78(1), 68–76.
- Aggarwal, S., & Pittenger, M. F.** (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815–22.
- Albini, A., & Sporn, M. B.** (2007). The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature reviews. Cancer*, 7(2), 139–47.
- Alenzi, F. Q., Lotfy, M., Tamimi, W. G., & Wyse, R. K. H.** (2010). Review: Stem cells and gene therapy. *Laboratory hematology: official publication of the International Society for Laboratory Hematology*, 16(3), 53–73.
- Alison, M. R., Poulson, R., Otto, W. R., Vig, P., Brittan, M., Direkze, N. C., Lovell, M., et al.** (2004). Recipes for adult stem cell plasticity: fusion cuisine or readymade? *Journal of clinical pathology*, 57(2), 113–20.
- Alvarez-Buylla, A., & Garcia-Verdugo, J. M.** (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(3), 629–34.
- Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J. M., Fike, J. R., Lee, H. O., Pfeffer, K., Lois, C., et al.** (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425(6961), 968–73.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C. M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., et al.** (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell stem cell*, 8(4), 376–88.
- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., et al.** (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5889), 699–702.
- Assay, S., & Cory, G.** (2011). Cell Migration. (C. M. Wells & M. Parsons, Eds.), 769, 25–30.
- Bai, J., Hu, Y., Wang, Y.-R., Liu, L.-F., Chen, J., Su, S.-P., & Wang, Y.** (2012). Comparison of human amniotic fluid-derived and umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stromal cells: Characterization and myocardial differentiation capacity. *Journal of geriatric cardiology: JGC*, 9(2), 166–71.

- Bailey, A. S., Willenbring, H., Jiang, S., Anderson, D. A., Schroeder, D. A., Wong, M. H., Grompe, M., et al.** (2006). Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(35), 13156–61.
- Bailey, S. M., Knox, R. J., Hobbs, S. M., Jenkins, T. C., Mauger, A. B., Melton, R. G., Burke, P. J., et al.** (1996). Investigation of alternative prodrugs for use with E. coli nitroreductase in “suicide gene” approaches to cancer therapy. *Gene therapy*, *3*(12), 1143–50.
- Barbash, I. M., Chouraqui, P., Baron, J., Feinberg, M. S., Etzion, S., Tessone, A., Miller, L., et al.** (2003). Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, *108*(7), 863–8.
- Barbero, A., Ploegert, S., Heberer, M., & Martin, I.** (2003). Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis and rheumatism*, *48*(5), 1315–25.
- Belmar, C., So, P.-W., Vassaux, G., Moleiro-SanEmeterio, V., & Martín-Duque, P.** (2007). Non-invasive genetic imaging for molecular and cell therapies of cancer. *Clinical and Translational Oncology*, *9*(11), 703–714.
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., et al.** (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science (New York, N.Y.)*, *275*(5304), 1320–3.
- Beyer Nardi, N., & da Silva Meirelles, L.** (2006). Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of experimental pharmacology*, (174), 249–82.
- Bhoopathi, P., Chetty, C., Gogineni, V. R., Gujrati, M., Dinh, D. H., Rao, J. S., & Lakka, S. S.** (2011). MMP-2 mediates mesenchymal stem cell tropism towards medulloblastoma tumors. *Gene therapy*, *18*(7), 692–701.
- Bianco, P., & Gehron Robey, P.** (2000). Marrow stromal stem cells. *The Journal of clinical investigation*, *105*(12), 1663–8.
- Bieback, K., & Klüter, H.** (2007). Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Current stem cell research & therapy*, *2*(4), 310–23.
- Bischoff, J. R., Kirn, D. H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., et al.** (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science (New York, N.Y.)*, *274*(5286), 373–6.
- Bortolanza, S., Bunuales, M., Otano, I., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Ortiz-de-Solorzano, C., Perez, D., Prieto, J., et al.** (2009). Treatment of pancreatic cancer with an oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 in Syrian hamsters. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, *17*(4), 614–22.

- Bosch, P., Fouletier-Dilling, C., Olmsted-Davis, E. A., Davis, A. R., & Stice, S. L.** (2006). Efficient adenoviral-mediated gene delivery into porcine mesenchymal stem cells. *Molecular reproduction and development*, 73(11), 1393–403.
- Brad, K.** (2009). Gene Therapy for Cancer. *Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanism and Strategies* (pp. 761–799). CRC Press.
- Brooke, G., Cook, M., Blair, C., Han, R., Heazlewood, C., Jones, B., Kambouris, M., et al.** (2007). Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Seminars in cell & developmental biology*, 18(6), 846–58.
- Caplan, A. I.** (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), 641–50.
- Carrasco, L., & Almendral del Río, J. M.** (2006). *Virus patógenos*. Editorial Helice, Fundación BBVA.
- Castells, M., Thibault, B., Delord, J.-P., & Couderc, B.** (2012). Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *International journal of molecular sciences*, 13(8), 9545–71.
- Cervelló, I., Gil-Sanchis, C., Mas, A., Delgado-Rosas, F., Martínez-Conejero, J. A., Galán, A., Martínez-Romero, A., et al.** (2010). Human endometrial side population cells exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. *PloS one*, 5(6), e10964.
- Cervelló, I., Mas, A., Gil-Sanchis, C., Peris, L., Faus, A., Saunders, P. T. K., Critchley, H. O. D., et al.** (2011). Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines. *PloS one*, 6(6), e21221.
- Chamberlain, G., Fox, J., Asthon, B., & Middleton, J.** (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*, 25, 2739–2749.
- Chan, E. M., Ratanasirintraooot, S., Park, I.-H., Manos, P. D., Loh, Y.-H., Huo, H., Miller, J. D., et al.** (2009). Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nature biotechnology*, 27(11), 1033–7.
- Chapel, A., Bertho, J. M., Bensidhoum, M., Fouillard, L., Young, R. G., Frick, J., Demarquay, C., et al.** (2003). Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *The journal of gene medicine*, 5(12), 1028–38.
- Chen, G., Shukeir, N., Potti, A., Sircar, K., Aprikian, A., Goltzman, D., & Rabbani, S. A.** (2004). Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer*, 101(6), 1345–56.

- 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; a journal of cerebral circulation*, *32*(4), 1005–11.
- Chen, S., Fang, W., Ye, F., Liu, Y.-H., Qian, J., Shan, S., Zhang, J., et al.** (2004). Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*, *94*(1), 92–5.
- Choi, J.-W., Lee, J.-S., Kim, S. W., & Yun, C.-O.** (2012). Evolution of oncolytic adenovirus for cancer treatment. *Advanced drug delivery reviews*, *64*(8), 720–9.
- Choi, Y.-H., Kurtz, A., & Stamm, C.** (2011). Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy. *Human gene therapy*, *22*(1), 3–17.
- Chopp, M., & Li, Y.** (2002). Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet neurology*, *1*(2), 92–100.
- Chu, L., Gu, J., Sun, L., Qian, Q., Qian, C., & Liu, X.** (2008). Oncolytic adenovirus-mediated shRNA against Apollon inhibits tumor cell growth and enhances antitumor effect of 5-fluorouracil. *Gene therapy*, *15*(7), 484–94.
- Clements, B. A., Bai, J., Kucharski, C., Farrell, L.-L., Lavasanifar, A., Ritchie, B., Ghahary, A., et al.** (2006). RGD conjugation to polyethyleneimine does not improve DNA delivery to bone marrow stromal cells. *Biomacromolecules*, *7*(5), 1481–8.
- Cody, J. J., & Douglas, J. T.** (2009). NIH Public Access, *16*(6), 473–488.
- Conget, P. a, & Minguell, J. J.** (2000). Adenoviral-mediated gene transfer into ex vivo expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Experimental hematology*, *28*(4), 382–90.
- Connick, P., Kolappan, M., Crawley, C., Webber, D. J., Patani, R., Michell, A. W., Du, M.-Q., et al.** (2012). Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet neurology*, *11*(2), 150–6.
- Dai, L.-J., Li, H. Y., Guan, L.-X., Ritchie, G., & Zhou, J. X.** (2009). The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem cell research*, *2*(1), 16–25. d
- Dai, L.-J., Moniri, M. R., Zeng, Z.-R., Zhou, J. X., Rayat, J., & Warnock, G. L.** (2011). Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Cancer letters*, *305*(1), 8–20.
- Dariel, A., Nguyen, T. H., Pichard, V., Schmitt, F., Aubert, D., Ferry, N., & Podevin, G.** (2009). A new surgical approach to improve gene transfer in liver using lentiviral vectors. *Journal of pediatric surgery*, *44*(3), 517–22.

- da Silva Meirelles, L., Caplan, A. I., & Nardi, N. B.** (2008). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(9), 2287–99.
- Davis, N. E., Hamilton, D., & Fontaine, M. J.** (2012). Harnessing the Immunomodulatory and Tissue Repair Properties of Mesenchymal Stem Cells to Restore β Cell Function. *Current diabetes reports*, 12(5), 612–22.
- Dawson, M. R., Chae, S.-S., Jain, R. K., & Duda, D. G.** (2011). Direct evidence for lineage-dependent effects of bone marrow stromal cells on tumor progression. *American journal of cancer research*, 1(2), 144–54.
- De Bari, C., & Dell'accio, F.** (2008). Cell therapy: a challenge in modern medicine. *Bio-medical materials and engineering*, 18(1 Suppl), S11–7.
- De Becker, A., Van Hummelen, P., Bakkus, M., Vande Broek, I., De Wever, J., De Waele, M., & Van Riet, I.** (2007). Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica*, 92(4), 440–9.
- Dell'Accio, F., De Bari, C., & Luyten, F. P.** (2003). Microenvironment and phenotypic stability specify tissue formation by human articular cartilage-derived cells in vivo. *Experimental cell research*, 287(1), 16–27.
- Devine, S. M., Bartholomew, A. M., Mahmud, N., Nelson, M., Patil, S., Hardy, W., Sturgeon, C., et al.** (2001). Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Experimental hematology*, 29(2), 244–55.
- Dohán, O., De la Vieja, A., Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., Ginter, C. S., et al.** (2003). The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocrine reviews*, 24(1), 48–77.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., et al.** (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–7.
- Dowthwaite, G. P., Bishop, J. C., Redman, S. N., Khan, I. M., Rooney, P., Evans, D. J. R., Houghton, L., et al.** (2004). The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *Journal of cell science*, 117(Pt 6), 889–97.
- Dubois, S. G., Floyd, E. Z., Zvonic, S., Kilroy, G., Wu, X., Carling, S., Halvorsen, Y. D. C., et al.** (2008). Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 449, 69–79.
- Dvorak, H. F.** (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine*, 315(26), 1650–9.

- Dwyer, R M, & Kerin, M. J.** (2010). Mesenchymal stem cells and cancer: tumor-specific delivery vehicles or therapeutic targets? *Human gene therapy*, 21(11), 1506–12.
- Dwyer, R M, Potter-Beirne, S. M., Harrington, K. a, Lowery, a J., Hennessy, E., Murphy, J. M., Barry, F. P., et al.** (2007). Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(17), 5020–7.
- Dwyer, Roisin M, Ryan, J., Havelin, R. J., Morris, J. C., Miller, B. W., Liu, Z., Flavin, R., et al.** (2011). Mesenchymal Stem Cell-mediated delivery of the sodium iodide symporter supports radionuclide imaging and treatment of breast cancer. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 29(7), 1149–57.
- Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., & Hochedlinger, K.** (2008). Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(10), 2467–74.
- Feng, Q., Lu, S.-J., Klimanskaya, I., Gomes, I., Kim, D., Chung, Y., Honig, G. R., et al.** (2010). Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 28(4), 704–12.
- Ferrand, J., Noël, D., Lehours, P., Prochazkova-Carlotti, M., Chambonnier, L., Ménard, A., Mégraud, F., et al.** (2011). Human bone marrow-derived stem cells acquire epithelial characteristics through fusion with gastrointestinal epithelial cells. *PLoS one*, 6(5), e19569.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., & Mavilio, F.** (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5356), 1528–30.
- Fiorina, P., Jurewicz, M., Augello, A., Vergani, A., Dada, S., La Rosa, S., Selig, M., et al.** (2009). Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(2), 993–1004.
- Flynn, A., Barry, F., & O'Brien, T.** (2007). UC blood-derived mesenchymal stromal cells: an overview. *Cytotherapy*, 9(8), 717–26.
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P.** (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230–47.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V.** (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*, 16(3), 381–90.

- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P. S., McDonnell, T. J., Mitlianga, P., Shi, Y. X., et al.** (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene*, *19*(1), 2–12.
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, C. A.** (2001). The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs.*, *169*(1), 12–20.
- Ghaedi, M.** (2011). Mesenchymal stem cells as vehicles for targeted delivery of anti-angiogenic protein to solid tumors, (July 2010), 171–180.
- Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., & Noël, D.** (2010). Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem cell research & therapy*, *1*(1), 2.
- Gibson, A. J., Karasinski, J., Relvas, J., Moss, J., Sherratt, T. G., Strong, P. N., & Watt, D. J.** (1995). Dermal fibroblasts convert to a myogenic lineage in mdx mouse muscle. *Journal of cell science*, *108* (Pt 1, 207–14.
- Glasgow, J. N., Hemminki, A., & Curiel, D. T.** (2009). Modified Adenoviruses for Gene Therapy. *Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanism and Strategies* (2009th ed., pp. 69–85).
- Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W.-F., & Dazzi, F.** (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, *105*(7), 2821–7.
- Groot-Wassink, T., Aboagye, E. O., Glaser, M., Lemoine, N. R., & Vassaux, G.** (2002). Adenovirus biodistribution and noninvasive imaging of gene expression in vivo by positron emission tomography using human sodium/iodide symporter as reporter gene. *Human gene therapy*, *13*(14), 1723–35.
- Gucciardo, L., Lories, R., Ochsenbein-Kölbl, N., Done', E., Zwijsen, A., & Deprest, J.** (2009). Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, *116*(2), 166–72.
- Gussoni, E, Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M., et al.** (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, *401*(6751), 390–4.
- Gussoni, Emanuela, Bennett, R. R., Muskiewicz, K. R., Meyerrose, T., Nolte, J. A., Gilgoff, I., Stein, J., et al.** (2002). Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *The Journal of clinical investigation*, *110*(6), 807–14.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B. W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M. P., et al.** (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, *133*(2), 250–64.

- Hare, J. M., Traverse, J. H., Henry, T. D., Dib, N., Strumpf, R. K., Schulman, S. P., Gerstenblith, G., et al.** (2009). A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, *54*(24), 2277–86.
- Heise, C., Hermiston, T., Johnson, L., Brooks, G., Sampson-Johannes, A., Williams, A., Hawkins, L., et al.** (2000). An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nature medicine*, *6*(10), 1134–9.
- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R., Crystal, R. G., et al.** (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, *109*(5), 625–37.
- Hennig, T., Lorenz, H., Thiel, A., Goetzke, K., Dickhut, A., Geiger, F., & Richter, W.** (2007). Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *Journal of cellular physiology*, *211*(3), 682–91.
- Henning, T., Boddington, S., & Daldrup-Link, H.** (2008). Labeling hESCs and hMSCs with Iron Oxide Nanoparticles for Non-Invasive in vivo tracking with MR Imaging. *Journal of Visualized Experiments*, 663–664.
- Hofstetter, C. P., Schwarz, E. J., Hess, D., Widenfalk, J., El Manira, A., Prockop, D. J., & Olson, L.** (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(4), 2199–204.
- Honzarenko, M., Le, Y., Swierkowski, M., Ghiran, I., Glodek, A. M., & Silberstein, L. E.** (2006). Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *24*(4), 1030–41.
- Hu, B.-Y., Weick, J. P., Yu, J., Ma, L.-X., Zhang, X.-Q., Thomson, J. A., & Zhang, S.-C.** (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(9), 4335–40.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., et al.** (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature biotechnology*, *26*(11), 1269–75.
- Hung, S.-C., Lu, C.-Y., Shyue, S.-K., Liu, H.-C., & Ho, L. L.-T.** (2004). Lineage differentiation-associated loss of adenoviral susceptibility and Cocksackie-adenovirus receptor expression in human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *22*(7), 1321–9.

- Hwang, J. H., Shim, S. S., Seok, O. S., Lee, H. Y., Woo, S. K., Kim, B. H., Song, H. R., et al.** (2009). Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. *Journal of Korean medical science*, 24(4), 547–54.
- Imhof, B. A., & Aurrand-Lions, M.** (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature reviews. Immunology*, 4(6), 432–44.
- Imitola, J., Raddassi, K., Park, K. I., Mueller, F.-J., Nieto, M., Teng, Y. D., Frenkel, D., et al.** (2004). Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(52), 18117–22.
- Ivanova-Todorova, E., Bochev, I., Mourdjeva, M., Dimitrov, R., Bukarev, D., Kyurkchiev, S., Tivchev, P., et al.** (2009). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunology letters*, 126(1-2), 37–42.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D.** (2011). Global Cancer Statistics, 61(2), 69–90.
- Jemal, A., Bray, F., & Ferlay, J.** (2011). Global Cancer Statistics, 61(2), 69–90.
- Jiang, G., Xin, Y., Zheng, J.-N., & Liu, Y.-Q.** (2011). Combining conditionally replicating adenovirus-mediated gene therapy with chemotherapy: a novel antitumor approach. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 129(2), 263–74.
- Jiang, R., Han, Z., Zhuo, G., Qu, X., Li, X., Wang, X., Shao, Y., et al.** (2011). Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study. *Frontiers of medicine*, 5(1), 94–100.
- Jiang, W.-H., Ma, A.-Q., Zhang, Y.-M., Han, K., Liu, Y., Zhang, Z.-T., Wang, T.-Z., et al.** (2005). Migration of intravenously grafted mesenchymal stem cells to injured heart in rats. *Sheng li xue bao: [Acta physiologica Sinica]*, 57(5), 566–72.
- Jo, C. H., Ahn, H. J., Kim, H. J., Seong, S. C., & Lee, M. C.** (2007). Surface characterization and chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells derived from synovium. *Cytotherapy*, 9(4), 316–27.
- Jones, E. A., Kinsey, S. E., English, A., Jones, R. A., Straszynski, L., Meredith, D. M., Markham, A. F., et al.** (2002). Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis and rheumatism*, 46(12), 3349–60.
- Jori, F. P., Napolitano, M. A., Melone, M. A. B., Cipollaro, M., Cascino, A., Altucci, L., Peluso, G., et al.** (2005). Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, 94(4), 645–55.

- Jung, H.** (2002). The sodium/substrate symporter family: structural and functional features. *FEBS letters*, 529(1), 73–7.
- Kanerva, A., Zinn, K. R., Chaudhuri, T. R., Lam, J. T., Suzuki, K., Uil, T. G., Hakkarainen, T., et al.** (2003). Enhanced therapeutic efficacy for ovarian cancer with a serotype 3 receptor-targeted oncolytic adenovirus. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 8(3), 449–58.
- Kang, N.-H., Hwang, K., Yi, B.-R., Lee, H. J., Jeung, E.-B., Kim, S. U., & Choi, K.-C.** (2012). Human amniotic fluid-derived stem cells expressing cytosine deaminase and thymidine kinase inhibits the growth of breast cancer cells in cellular and xenograft mouse models. *Cancer gene therapy*, 19(6), 412–9.
- Kang, S. K., Shin, I. S., Ko, M. S., Jo, J. Y., & Ra, J. C.** (2012). Journey of Mesenchymal Stem Cells for Homing: Strategies to Enhance Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy. *Stem cells international*, 2012, 342968.
- Karp, J. M., & Leng Teo, G. S.** (2009). Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell stem cell*, 4(3), 206–16.
- Karystinou, A., Dell'Accio, F., Kurth, T. B. A., Wackerhage, H., Khan, I. M., Archer, C. W., Jones, E. A., et al.** (2009). Distinct mesenchymal progenitor cell subsets in the adult human synovium. *Rheumatology (Oxford, England)*, 48(9), 1057–64.
- Kawabata, K., Sakurai, F., Koizumi, N., Hayakawa, T., & Mizuguchi, H.** (2005). Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. *Molecular pharmaceutics*, 3(2), 95–103.
- Kemp, K. C., Hows, J., & Donaldson, C.** (2005). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leukemia & lymphoma*, 46(11), 1531–44.
- Khakoo, A. Y., Pati, S., Anderson, S. A., Reid, W., Elshal, M. F., Rovira, I. I., Nguyen, A. T., et al.** (2006). Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *The Journal of experimental medicine*, 203(5), 1235–47.
- Kidd, S., Caldwell, L., Dietrich, M., Samudio, I., Spaeth, E. L., Watson, K., Shi, Y., et al.** (2010). Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment. *Cytotherapy*, 12(5), 615–25.
- Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J. L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., Battula, V. L., et al.** (2009). Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 27(10), 2614–23.
- Kidd, S., Spaeth, E., Watson, K., Burks, J., Lu, H., Klopp, A., Andreeff, M., et al.** (2012). Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PloS one*, 7(2), e30563.

- Kim, J. B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Araúzo-Bravo, M. J., et al.** (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, *454*(7204), 646–50.
- Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S., & Epstein, S. E.** (2004). Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation research*, *94*(5), 678–85.
- Klopp, A. H., Gupta, A., Spaeth, E., Andreeff, M., & Marini, F.** (2011). Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *29*(1), 11–9.
- Kogai, T., Taki, K., & Brent, G. A.** (2006). Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. *Endocrine-related cancer*, *13*(3), 797–826.
- Komarova, S., Kawakami, Y., Stoff-Khalili, M. A., Curiel, D. T., & Pereboeva, L.** (2006). Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Molecular cancer therapeutics*, *5*(3), 755–66.
- Kortesidis, A., Zannettino, A., Isenmann, S., Shi, S., Lapidot, T., & Gronthos, S.** (2005). Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood*, *105*(10), 3793–801. d
- Kosaka, H., Ichikawa, T., Kurozumi, K., Kambara, H., Inoue, S., Maruo, T., Nakamura, K., et al.** (2012). Therapeutic effect of suicide gene-transferred mesenchymal stem cells in a rat model of glioma. *Cancer gene therapy*, *19*(8), 572–8.
- Kryczek, I., Wei, S., Keller, E., Liu, R., & Zou, W.** (2007). Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *American journal of physiology. Cell physiology*, *292*(3), C987–95.
- Kuhn, N. Z., & Tuan, R. S.** (2010). Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *Journal of cellular physiology*, *222*(2), 268–77. d
- Körbling, M., Estrov, Z., & Champlin, R.** (2003). Adult stem cells and tissue repair. *Bone marrow transplantation*, *32 Suppl 1*, S23–4.
- Lamfers, M. L. M., Gianni, D., Tung, C.-H., Idema, S., Schagen, F. H. E., Carette, J. E., Quax, P. H. A., et al.** (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression from an oncolytic adenovirus inhibits matrix metalloproteinase activity in vivo without affecting antitumor efficacy in malignant glioma. *Cancer research*, *65*(20), 9398–405.
- Lee, J. S., Hong, J. M., Moon, G. J., Lee, P. H., Ahn, Y. H., & Bang, O. Y.** (2010). A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *28*(6), 1099–106.

- Lee, R. H., Pulin, A. a, Seo, M. J., Kota, D. J., Ylostalo, J., Larson, B. L., Semprun-Prieto, L., et al.** (2009). Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell*, 5(1), 54–63.
- Lescaudron, L., Naveilhan, P., & Neveu, I.** (2012). The use of stem cells in regenerative medicine for Parkinson's and Huntington's diseases. *Current medicinal chemistry*.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S.** (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology*, 7(9), 678–89.
- Li, C., Lee, C. J., & Simeone, D. M.** (2009). Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 568, 161–73.
- Li, D.-S., Warnock, G. L., Tu, H.-J., Ao, Z., He, Z., Lu, H., & Dai, L.-J.** (2009). Do immunotherapy and beta cell replacement play a synergistic role in the treatment of type 1 diabetes? *Life sciences*, 85(15-16), 549–56.
- Li, Y.-Y., Liu, H.-H., Chen, H.-L., & Li, Y.-P.** (2012). Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate STZ-induced pancreas damage in type 1 diabetes. *Bio-medical materials and engineering*, 22(1), 97–103.
- Li, Z., Tan, F., Liewehr, D. J., Steinberg, S. M., & Thiele, C. J.** (2010). In vitro and in vivo inhibition of neuroblastoma tumor cell growth by AKT inhibitor perifosine. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(11), 758–70.
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L.** (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, 2(2), 329–33.
- Loebinger, M. R., & Janes, S. M.** (2010). Stem cells as vectors for antitumour therapy. *Thorax*, 65(4), 362–9.
- Lowry, W. E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A. D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A. T., et al.** (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 2883–8.
- Luetzkendorf, J., Mueller, L. P., Mueller, T., Caysa, H., Nerger, K., & Schmoll, H.-J.** (2010). Growth inhibition of colorectal carcinoma by lentiviral TRAIL-transgenic human mesenchymal stem cells requires their substantial intratumoral presence. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(9), 2292–304.
- Luster, A. D., Alon, R., & von Andrian, U. H.** (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature immunology*, 6(12), 1182–90.

- Mader, E. K., Maeyama, Y., Lin, Y., Butler, G. W., Russell, H. M., Galanis, E., Russell, S. J., et al.** (2009). Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(23), 7246–55.
- Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., & Hochedlinger, K.** (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, 3(3), 340–5.
- Maherali, N., & Hochedlinger, K.** (2008). Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, 3(6), 595–605.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., et al.** (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell stem cell*, 1(1), 55–70.
- Makinoshima, H., & Dezawa, M.** (2009). Pancreatic cancer cells activate CCL5 expression in mesenchymal stromal cells through the insulin-like growth factor-I pathway. *FEBS letters*, 583(22), 3697–703.
- Malvezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C., & Negri, E.** (2012). European cancer mortality predictions for the year 2012. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 23(4), 1044–52.
- Meijer, G. J., de Bruijn, J. D., Koole, R., & van Blitterswijk, C. A.** (2008). Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials*, 29(21), 3053–61.
- Merron, A, Peerlinck, I., Martin-Duque, P., Burnet, J., Quintanilla, M., Mather, S., Hingorani, M., et al.** (2007). SPECT/CT imaging of oncolytic adenovirus propagation in tumours in vivo using the Na/I symporter as a reporter gene. *Gene therapy*, 14(24), 1731–8.
- Milanesi, A., Lee, J.-W., Li, Z., Da Sacco, S., Villani, V., Cervantes, V., Perin, L., et al.** (2012). β -Cell Regeneration Mediated by Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *PloS one*, 7(8), e42177.
- Mishra, P. J., Mishra, P. J., Humeniuk, R., Medina, D. J., Alexe, G., Mesirov, J. P., Ganesan, S., et al.** (2008). Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer research*, 68(11), 4331–9.
- Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., et al.** (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature biotechnology*, 27(8), 743–5.
- Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D. L., Kano, Y., Nishikawa, S., et al.** (2011). Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell stem cell*, 8(6), 633–8.

- Mizuguchi, H., Sasaki, T., Kawabata, K., Sakurai, F., & Hayakawa, T.** (2005). Fiber-modified adenovirus vectors mediate efficient gene transfer into undifferentiated and adipogenic-differentiated human mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *332*(4), 1101–6.
- Moon, R. T., Kohn, A. D., De Ferrari, G. V., & Kaykas, A.** (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nature reviews. Genetics*, *5*(9), 691–701.
- Morikawa, S., Mabuchi, Y., Kubota, Y., Nagai, Y., Niibe, K., Hiratsu, E., Suzuki, S., et al.** (2009). Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *The Journal of experimental medicine*, *206*(11), 2483–96.
- Motaln, H., Schichor, C., & Lah, T. T.** (2010). Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer*, *116*(11), 2519–30.
- Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Chen, J., et al.** (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer research*, *65*(8), 3307–18.
- Nemunaitis, J., Ganly, I., Khuri, F., Arseneau, J., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., et al.** (2000). Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer research*, *60*(22), 6359–66.
- Nishikawa, S., Goldstein, R. A., & Nierras, C. R.** (2008). *Therapy*, *9* (September), 725–729.
- Noël, D., Djouad, F., Bouffi, C., Mrugala, D., & Jorgensen, C.** (2007). Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leukemia & lymphoma*, *48*(7), 1283–9.
- Ohlsson, L. B., Varas, L., Kjellman, C., Edvardsen, K., & Lindvall, M.** (2003). Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Experimental and molecular pathology*, *75*(3), 248–55.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S.** (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science (New York, N.Y.)*, *322*(5903), 949–53.
- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., et al.** (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, *121*(3), 335–48.
- Ostman, A., & Augsten, M.** (2009). Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Current opinion in genetics & development*, *19*(1), 67–73. d

- Pan, Q., Liu, B., Liu, J., Cai, R., Liu, X., & Qian, C.** (2008). Synergistic antitumor activity of XIAP-shRNA and TRAIL expressed by oncolytic adenoviruses in experimental HCC. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 47(1), 135–44.
- Payer, B., Lee, J. T., & Namekawa, S. H.** (2011). X-inactivation and X-reactivation: epigenetic hallmarks of mammalian reproduction and pluripotent stem cells. *Human genetics*, 130(2), 265–80.
- Pei, Z., Chu, L., Zou, W., Zhang, Z., Qiu, S., Qi, R., Gu, J., et al.** (2004). An oncolytic adenoviral vector of Smac increases antitumor activity of TRAIL against HCC in human cells and in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 39(5), 1371–81.
- Peinado, H., Alecković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., et al.** (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*, 18(6), 883–91.
- Pereboeva, L., Komarova, G., Mikheeva, G., Krasnykh, V., & Curiel, D.** (2003). Approaches to Utilize Mesenchymal Progenitor Cells as Cellular Vehicles. *STEM CELLS*, 21, 389–404.
- Pereira, R. F., Halford, K. W., O'Hara, M. D., Leeper, D. B., Sokolov, B. P., Pollard, M. D., Bagasra, O., et al.** (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(11), 4857–61.
- Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., et al.** (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature immunology*, 3(7), 687–94.
- Phinney, D. G., & Prockop, D. J.** (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(11), 2896–902.
- Piquer-Gil, M., García-Verdugo, J. M., Zipancic, I., Sánchez, M. J., & Alvarez-Dolado, M.** (2009). Cell fusion contributes to pericyte formation after stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 29(3), 480–5.
- Pittenger, M. F., Mackay, a M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. a, et al.** (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), 143–7.
- Ponte, A. L., Marais, E., Gallay, N., Langonné, A., Delorme, B., Héroult, O., Charbord, P., et al.** (2007). The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(7), 1737–45.
- Prockop, D. J.** (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5309), 71–4.

- Qian, W., Liu, J., Tong, Y., Yan, S., Yang, C., Yang, M., & Liu, X.** (2008). Enhanced antitumor activity by a selective conditionally replicating adenovirus combining with MDA-7/interleukin-24 for B-lymphoblastic leukemia via induction of apoptosis. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 22(2), 361–9.
- Qiao, L., Xu, Z., Zhao, T., Zhao, Z., Shi, M., Zhao, R. C., Ye, L., et al.** (2008). Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell research*, 18(4), 500–7.
- Qu, C., Mahmood, A., Lu, D., Goussev, A., Xiong, Y., & Chopp, M.** (2008). Treatment of traumatic brain injury in mice with marrow stromal cells. *Brain research*, 1208, 234–9.
- Raki, M., Rajewski, M., Kirn, D., & Hemminki, A.** (2009). Chapter 8: Oncolytic viruses for treatment of cancer. *Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanism and Strategies* (pp. 193–205). CRC Press.
- Rappa, G., Mercapide, J., & Lorico, A.** (2012). Spontaneous formation of tumorigenic hybrids between breast cancer and multipotent stromal cells is a source of tumor heterogeneity. *The American journal of pathology*, 180(6), 2504–15.
- Reagan, M. R., & Kaplan, D. L.** (2011). Concise review: Mesenchymal stem cell tumor-homing: detection methods in disease model systems. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 29(6), 920–7.
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., et al.** (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell*, 2(2), 141–50.
- Ren, Z., Ye, X., Fang, C., Lu, Q., Zhao, Y., Liu, F., Liang, M., et al.** (2008). Intratumor injection of oncolytic adenovirus expressing HSP70 prolonged survival in melanoma B16 bearing mice by enhanced immune response. *Cancer biology & therapy*, 7(2), 191–95.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L.** (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105–11.
- Ringe, J., Strassburg, S., Neumann, K., Endres, M., Notter, M., Burmester, G.-R., Kaps, C., et al.** (2007). Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *Journal of cellular biochemistry*, 101(1), 135–46.
- Rivera, A. A., Davydova, J., Schierer, S., Wang, M., Krasnykh, V., Yamamoto, M., Curiel, D. T., et al.** (2004). Combining high selectivity of replication with fiber chimerism for effective adenoviral oncolysis of CAR-negative melanoma cells. *Gene therapy*, 11(23), 1694–702.
- Robinton, D. A., & Daley, G. Q.** (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481(7381), 295–305.

- Rochefort, G. Y., Delorme, B., Lopez, A., Hérault, O., Bonnet, P., Charbord, P., Eder, V., et al.** (2006). Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *24*(10), 2202–8.
- Rodriguez, R., Schuur, E. R., Lim, H. Y., Henderson, G. A., Simons, J. W., & Henderson, D. R.** (1997). Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer research*, *57*(13), 2559–63.
- Rosová, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D., & Nolte, J. A.** (2008). Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *26*(8), 2173–82.
- Ross, D. S.** (2011). Radioiodine therapy for hyperthyroidism. *The New England journal of medicine*, *364*(6), 542–50.
- Roubelakis, M. G., Pappa, K. I., Bitsika, V., Zagoura, D., Vlahou, A., Papadaki, H. A., Antsaklis, A., et al.** (2007). Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, *16*(6), 931–52.
- Ryu, C. H., Park, S. a, Kim, S. M., Lim, J. Y., Jeong, C. H., Jun, J. A., Oh, J. H., et al.** (2010). Migration of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells mediated by stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis via Akt, ERK, and p38 signal transduction pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, *398*(1), 105–10.
- Salem, H. K., & Thiemermann, C.** (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *28*(3), 585–96.
- Saller, M. M., Prall, W. C., Docheva, D., Schönitzer, V., Popov, T., Anz, D., Clausen-Schaumann, H., et al.** (2012). Increased stemness and migration of human mesenchymal stem cells in hypoxia is associated with altered integrin expression. *Biochemical and biophysical research communications*, *423*(2), 379–85
- Schmidt, N. O., Przylecki, W., Yang, W., Ziu, M., Teng, Y., Kim, S. U., Black, P. M., et al.** (2005). Brain tumor tropism of transplanted human neural stem cells is induced by vascular endothelial growth factor. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *7*(6), 623–9.
- Schofield, R.** (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*, *4*(1-2), 7–25.
- Sell, S.** (2003). *Stem cells handbook* (First.). Humana Press.
- Sensebé, L., Krampera, M., Schrezenmeier, H., Bourin, P., & Giordano, R.** (2010). Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox sanguinis*, *98*(2), 93–107.
- Sensebé, Luc.** (2008). Clinical grade production of mesenchymal stem cells. *Bio-medical materials and engineering*, *18*(1 Suppl), S3–10.

- Seri, B., García-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., & Alvarez-Buylla, A.** (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(18), 7153–60.
- Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., et al.** (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell research*, 20(5), 510–8.
- Shih, Y.-R. V., Kuo, T. K., Yang, A.-H., Lee, O. K., & Lee, C.-H.** (2009). Isolation and characterization of stem cells from the human parathyroid gland. *Cell proliferation*, 42(4), 461–70.
- Short, B., Brouard, N., Occhiodoro-Scott, T., Ramakrishnan, A., & Simmons, P. J.** Mesenchymal stem cells. *Archives of medical research*, 34(6), 565–71.
- Siatskas, C., Payne, N. L., Short, M. A., & Bernard, C. C. A.** (2010). A consensus statement addressing mesenchymal stem cell transplantation for multiple sclerosis: it's time! *Stem cell reviews*, 6(4), 500–6.
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A.** (2012). Cancer Statistics, 2012.
- Sng, J., & Lufkin, T.** (2012). Emerging Stem Cell Therapies: Treatment, Safety, and Biology. *Stem Cells International*, 2012, 1–9.
- Sommer, C. A., Stadtfeld, M., Murphy, G. J., Hochedlinger, K., Kotton, D. N., & Mostoslavsky, G.** (2009). Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 27(3), 543–9.
- Son, B.-R., Marquez-Curtis, L. a, Kucia, M., Wysoczynski, M., Turner, a R., Ratajczak, J., Ratajczak, M. Z., et al.** (2006). Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(5), 1254–64.
- Sordi, V., Malosio, M. L., Marchesi, F., Mercalli, A., Melzi, R., Giordano, T., Belmonte, N., et al.** (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*, 106(2), 419–27.
- Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M., & Marini, F.** (2008). Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells, 730–738.
- Spaeth, E. L., Dembinski, J. L., Sasser, a K., Watson, K., Klopp, A., Hall, B., Andreeff, M., et al.** (2009). Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PloS one*, 4(4), e4992.
- Spaeth, E. L., Kidd, S., & Marini, F. C.** (2012). Stem Cell Mobilization. (M. G. Kolonin & P. J. Simmons, Eds.), 904, 173–190.

- Spitzweg, C., Dutton, C. M., Castro, M. R., Bergert, E. R., Goellner, J. R., Heufelder, A. E., & Morris, J. C.** (2001). Expression of the sodium iodide symporter in human kidney. *Kidney international*, *59*(3), 1013–23.
- Spitzweg, C., Harrington, K. J., Pinke, L. A., Vile, R. G., & Morris, J. C.** (2001). Clinical review 132: The sodium iodide symporter and its potential role in cancer therapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *86*(7), 3327–35.
- Spitzweg, C., Joba, W., Eisenmenger, W., & Heufelder, A. E.** (1998). Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *83*(5), 1746–51.
- Spring, H., Schüler, T., Arnold, B., Hämmerling, G. J., & Ganss, R.** (2005). Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(50), 18111–6.
- Stadtfeld, M., Brennand, K., & Hochedlinger, K.** (2008). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Current biology: CB*, *18*(12), 890–4.
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T., & Hochedlinger, K.** (2008). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell stem cell*, *2*(3), 230–40.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., & Hochedlinger, K.** (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science (New York, N.Y.)*, *322*(5903), 945–9.
- Strioga, M., Viswanathan, S., Darinkas, A., Slaby, O., & Michalek, J.** (2012). Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem cells and development*, *00*(00).
- 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 research*, *62*(13), 3603–8.
- Studeny, M., Marini, F. C., Dembinski, J. L., Zompetta, C., Cabreira-hansen, M., Bekele, B. N., Champlin, R. E., et al.** (2004). Mesenchymal Stem Cells: Potential Precursors for Tumor Stroma and Targeted-Delivery Vehicles for Anticancer Agents, *96*(21).
- Sun, N., Panetta, N. J., Gupta, D. M., Wilson, K. D., Lee, A., Jia, F., Hu, S., et al.** (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(37), 15720–5.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S.** (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, *131*(5), 861–72.

- Takahashi, K., & Yamanaka, S.** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663–76.
- Tan, J., Wu, W., Xu, X., Liao, L., Zheng, F., Messinger, S., Sun, X., et al.** (2012). Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, *307*(11), 1169–77.
- Templin C, Zweigerdt R, S. K. et al.** (2012). Transplantation and tracking of human induced pluripotent stem cells in a pig model of myocardial infarction: assessment of cell survival, engraftment and distribution by hybrid SPECT-CT imaging of sodium iodide symporter transgene expression. *Circulation*.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., et al.** (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, *416*(6880), 542–5.
- Tokcaer-Keskin, Z., Akar, A. R., Ayaloglu-Butun, F., Terzioglu-Kara, E., Durdu, S., Ozyurda, U., Ugur, M., et al.** (2009). Timing of induction of cardiomyocyte differentiation for in vitro cultured mesenchymal stem cells: a perspective for emergencies. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, *87*(2), 143–50.
- Torsvik, A., Røsland, G. V., Svendsen, A., Molven, A., Immervoll, H., McCormack, E., Lønning, P. E., et al.** (2010). Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer research*, *70*(15), 6393–6.
- Touchefeu, Y., Franken, P., & Harrington, K. J.** (2012). Radiovirotherapy: principles and prospects in oncology. *Current pharmaceutical design*, *18*(22), 3313–20.
- Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., & Hochedlinger, K.** (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *Journal of cell science*, *122*(Pt 19), 3502–10.
- Valorani, M. G., Montelatici, E., Germani, a, Biddle, a, D'Alessandro, D., Strollo, R., Patrizi, M. P., et al.** (2012). Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials. *Cell proliferation*, *45*(3), 225–38.
- Vayre, L., Sabourin, J. C., Caillou, B., Ducreux, M., Schlumberger, M., & Bidart, J. M.** (1999). Immunohistochemical analysis of Na⁺/I⁻ symporter distribution in human extra-thyroidal tissues. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, *141*(4), 382–6.
- Von Lüttichau, I., Notohamiprodjo, M., Wechselberger, A., Peters, C., Henger, A., Seliger, C., Djafarzadeh, R., et al.** (2005). Human adult CD34⁺ progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem cells and development*, *14*(3), 329–36.

- Wang, Y., Fan, H., Zhou, B., Ju, Z., Yu, L., Guo, L., Han, J., et al.** (2012). Fusion of human umbilical cord mesenchymal stem cells with esophageal carcinoma cells inhibits the tumorigenicity of esophageal carcinoma cells. *International journal of oncology*, 40(2), 370–7.
- 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.
- Weinberg, R. a.** (2007). *The biology of cancer*. Garland Science.
- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., et al.** (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 458(7239), 766–70.
- Yang, D.-Y., Sheu, M.-L., Su, H.-L., Cheng, F.-C., Chen, Y.-J., Chen, C.-J., Chiu, W.-T., et al.** (2012). Dual regeneration of muscle and nerve by intravenous administration of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells regulated by stromal cell-derived factor-1 α in a sciatic nerve injury model. *Journal of neurosurgery*, 116(6), 1357–67.
- Ying, Q.-L., Nichols, J., Evans, E. P., & Smith, A. G.** (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 416(6880), 545–8.
- Yong, R. L., Shinojima, N., Fueyo, J., Gumin, J., Vecil, G. G., Marini, F. C., Bogler, O., et al.** (2009). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer research*, 69(23), 8932–40.
- Yu, D. C., Chen, Y., Dilley, J., Li, Y., Embry, M., Zhang, H., Nguyen, N., et al.** (2001). Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel. *Cancer research*, 61(2), 517–25.
- Yu, Jun, Li, M., Qu, Z., Yan, D., Li, D., & Ruan, Q.** (2010). *SDF-1/CXCR4-mediated migration of transplanted bone marrow stromal cells toward areas of heart myocardial infarction through activation of PI3K/Akt*. *Journal of cardiovascular pharmacology* (Vol. 55, pp. 496–505).
- Yu, Junying, Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., et al.** (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5858), 1917–20.
- Zeyaulah, M., Patro, M., Ahmad, I., Ibraheem, K., Sultan, P., Nehal, M., & Ali, A.** (2012). Oncolytic Viruses in the Treatment of Cancer: A Review of Current Strategies. *Pathology oncology research*
- Zhang, L., Gu, J., Lin, T., Huang, X., Roth, J. A., & Fang, B.** (2002). Mechanisms involved in development of resistance to adenovirus-mediated proapoptotic gene therapy in DLD1 human colon cancer cell line. *Gene therapy*, 9(18), 1262–70.

- Zhang, Z.-X., Guan, L.-X., Zhang, K., Zhang, Q., & Dai, L.-J.** (2008). A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury. *Cytotherapy*, *10*(2), 134–9.
- Zhu, Y., Liu, T., Song, K., Fan, X., Ma, X., & Cui, Z.** (2008). Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell biochemistry and function*, *26*(6), 664–75.

