



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación del efecto inmunomodulador de los cuerpos apoptóticos de células estromales mesenquimales de Gelatina de Wharton

Karl Michael Beltrán Ricaurte

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de medicina, Departamento de microbiología

Bogotá, Colombia

Año 2022

Evaluación del efecto inmunomodulador de los cuerpos apoptóticos de células estromales mesenquimales de Gelatina de Wharton

Karl Michael Beltrán Ricaurte

Tesis de maestría:

Maestría en inmunología

Director (a):

Gustavo Salguero M.D PhD

Codirector (a):

Sandra Henao MSc.

Línea de Investigación:

Inmunoterapia y medicina traslacional

Grupo de Investigación:

Unidad de Terapias Avanzadas (UTA) - IDCBIS

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de medicina, Departamento de microbiología

Bogotá, Colombia

Año 2022

RESUMEN

Evaluación del efecto inmunomodulador de los cuerpos apoptóticos de células estromales mesenquimales de Gelatina de Wharton.

Las inmunoterapias basadas en células estromales mesenquimales (CEM) representan herramientas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Sin embargo, su aplicación clínica actualmente es un reto. La biodistribución de las CEM parece ser deficiente, lo que promueve la activación de la apoptosis y la liberación de cuerpos apoptóticos (AB). Dado que recientemente se ha propuesto una interacción entre los AB derivados de las CEM (CEM-AB) y componentes del sistema inmunitario, en este proyecto se demostró que los CEM-AB ejercen efectos inmunomoduladores sinérgicos en modelos de inflamación *in-vitro*. Para lo anterior, se obtuvieron CEM de la gelatina de Wharton (WJ) mediante un proceso de disgregación. La exposición a la irradiación gama (25Gy) indujo eficazmente la apoptosis; tal y como demostraron la fragmentación del ADN, la translocación de fosfatidilserina, la expresión de caspasas 3/7 y la pérdida de permeabilidad de la membrana. Los CEM-AB se aislaron, caracterizaron y utilizaron para los ensayos inmunológicos. Tras la activación de linfocitos humanos con perlas anti-CD3/anti-CD28, los CEM-AB no indujeron una inmunosupresión directa, en comparación con controles de células viables. Sin embargo, el pre-condicionamiento de monocitos/macrófagos humanos CD14+ con CEM-AB indujo un fenotipo M2 y desencadenó un potente efecto inhibitorio de la proliferación de linfocitos (>90%). El tratamiento con cuerpos apoptóticos también indujo la sobreexpresión de moléculas de punto de control inmunológico y la secreción diferencial de factores de crecimiento. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los CEM-AB mejoran la acción inmunosupresora preexistente de las CEM, confiriendo a los macrófagos un fenotipo M2 durante la inflamación.

Palabras claves: Células estromales mesenquimales, cuerpos apoptóticos, inmunomodulación, macrófagos, linfocitos.

ABSTRACT

Evaluation of the immunomodulatory effect of apoptotic bodies of Wharton's jelly mesenchymal stromal stromal cells.

Immunotherapies based on mesenchymal stromal cells (MSC) represent tools for the treatment of inflammatory diseases. However, their clinical application is currently challenging. The biodistribution of MSC appears to be poor, which promotes the activation of apoptosis and the release of apoptotic bodies (AB). Since an interaction between MSC-derived AB (MSC-AB) and components of the immune system has recently been proposed, in this project we demonstrated that MSC-AB exert synergistic immunomodulatory effects in in-vitro models of inflammation. For this purpose, MSC were obtained from Wharton's gelatin (WJ) by a disaggregation process. Exposure to gamma irradiation (25Gy) effectively induced apoptosis; as demonstrated by DNA fragmentation, phosphatidylserine translocation, caspases 3/7 expression and loss of membrane permeability. MSC-AB were isolated, characterized and used for immunological assays. Upon activation of human lymphocytes with anti-CD3/anti-CD28 beads, MSC-AB did not induce direct immunosuppression compared to viable cell controls. However, preconditioning of CD14+ human monocytes/macrophages with MSC-AB induced an M2 phenotype and triggered a potent inhibitory effect on lymphocyte proliferation (>90%). Treatment with apoptotic bodies also induced overexpression of immune checkpoint molecules and differential secretion of growth factors. Taken together, these findings suggest that MSC-AB enhance the pre-existing immunosuppressive action of MSC by conferring an M2 phenotype to macrophages during inflammation.

Key words: Mesenchymal stromal cells, apoptotic bodies, immunomodulation, macrophages, lymphocytes.

CONTENIDO

RESUMEN	II
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	VII
AGRADECIMIENTOS.....	IX
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	3
1. ASPECTOS TEÓRICOS.....	4
1.1 PRODUCTOS MEDICINALES DE TERAPIAS AVANZADAS	4
1.1.2 Productos medicinales de terapia celular (CTMPs)	5
1.2 CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES	6
1.2.2 Descubrimiento y orígenes.....	6
1.2.3 Fuentes.....	7
1.2.4 Aislamiento e identificación	8
1.2.5 Inmunomodulación por CEM.....	9
1.2.6 Aplicaciones terapéuticas de CEM	13
1.2.7 Supervivencia y migración de CEM.....	16
1.3 CEM APOPTÓTICAS Y APLICACIONES CLÍNICAS	17
1.3.2 Propiedades inmunomoduladoras de las células apoptóticas	20
1.4 CUERPOS APOPTOTICOS	23
1.4.2 Potencial terapéutico de los cuerpos apoptóticos.	23
1.4.3 Cuerpos apoptóticos para inmunoterapia y vacunación.....	25
1.4.4 Cuerpos apoptóticos para terapia de regeneración	26
1.4.5 Cuerpos apoptóticos para la entrega de fármacos y como herramienta de diagnóstico.....	27
2. DISEÑO EXPERIMENTAL	29
2.1 Aislamiento y caracterización de células estromales mesenquimales a partir de gelatina de Wharton de cordón umbilical.	29
2.2 Generación y evaluación de un modelo in-vitro de apoptosis en células estromales mesenquimales.	29
2.3 Enriquecimiento y caracterización de cuerpos apoptóticos a partir de células estromales mesenquimales apoptóticas.	31

2.4	Evaluación de la interacción de células de linaje monocito/macrófago CD14+ humanas con cuerpos apoptóticos.	33
2.5	Análisis de los datos	35
3.	RESULTADOS.....	37
3.1	La irradiación gama representa el mejor modelo de apoptosis <i>In-vitro</i> para el enriquecimiento de cuerpos apoptóticos de células estromales mesenquimales.	37
3.2	Las células estromales mesenquimales secretan cuerpos apoptóticos de 1000-5000nm que expresan marcadores funcionales.	48
3.3	Los cuerpos apoptóticos de células estromales mesenquimales inducen la reprogramación de monocitos/macrófagos CD14+ e inducen un fuerte fenotipo inmunomodulador.....	52
4.	DISCUSIÓN.....	62
5.	CONCLUSIÓN.....	71
6.	CONFLICTOS DE INTERÉS.	72
7.	RECONOCIMIENTOS Y EVENTOS.....	72
8.	PUBLICACIONES.....	72
9.	TRABAJOS CITADOS.....	74

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Generación de un modelo *In-vitro* de apoptosis.
- Figura 2.** Enriquecimiento y caracterización AB-CEM.
- Figura 3.** Evaluación del efecto inmunomodulador de los AB-CEM.
- Figura 4.** Evaluación del efecto directo de los AB-CEM con células CD3+.
- Figura 5.** Evaluación del efecto sinérgico de los AB-CEM con células CD14+.
- Figura 6.** Producción CEM.
- Figura 7.** Identificación y caracterización CEM.
- Figura 8.** Generación de un modelo *In-vitro* de apoptosis.
- Figura 9.** Irradiación como modelo *in-vitro* de apoptosis.
- Figura 10.** Modelo *in-vitro* de apoptosis.
- Figura 11.** Conteo y caracterización cuerpos apoptóticos CEM (CEM-AB).
- Figura 12.** Evaluación del efecto inmunomodulador de los AB-CEM sobre PBMCs.
- Figura 13.** Evaluación del efecto inmunomodulador de los AB-CEM en monocitos/macrófagos humanos.
- Figura 14.** Secretoma CEM viables durante inmunomodulación.
- Figura 15.** Impacto de la IR sobre el secretoma de CEM.
- Figura 16.** Secretoma de células CD14+ condicionadas con AB-CEM.
- Figura 17.** Secretoma de células CD14+ tipo M2 asociado a inmunomodulación.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AB: Cuerpos apoptótico

ATMPs: Medicamentos de terapias avanzadas

cATMP: Productos de terapias avanzadas combinados

CD: Célula dendrítica

CEM: Células estromales mesenquimales

CTMP: Productos de terapia celular

EMA: Agencia europea de medicamentos.

FGF: Factor de crecimiento de los fibroblastos

GM-CSF: Factor estimulante de colonias granulocitos macrófagos

GTMP: Productos de terapia génica

HGF: Factor de crecimiento de los hepatocitos

IDO: Indolamina-pirrol 2,3-dioxigenasa

IFN- γ : Interferón- γ

IL-12: Interleucina 12

IL-22: Interleucina 22

IL-23: Interleucina 23

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 9

INF- β : Interferón β

ISCT: Sociedad internacional de terapia celular

NK: Célula Natural Killer

ON: Óxido nítrico

PGE2: Prostaglandina E 2

ROS: Especies reactivas de oxígeno

TEP: Productos de ingeniería tisular

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante - β 1

TLR3: Receptor tipo toll 3

TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α

Tregs: Linfocitos regulatorios

UE: Unión europea

VEs: Vesículas extracelulares

AGRADECIMIENTOS.

Este proyecto se realizo con el apoyo y patrocinio del Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en salud (IDCBIS). En dirección del instituto, el Dr. Bernardo Camacho permitió el soporte económico y de infraestructura para la ejecución de los experimentos, agradecimientos por su apoyo. Dentro de la misma institución, un agradecimiento y mención especial a el Dr. Gustavo Salguero quien en calidad de director del proyecto y líder de la UTA brindo un apoyo incondicional de principio a fin, convirtiéndolo en una persona clave y esencial para la realización de esta tesis.

A la profesora Sandra Henao quien en calidad de Co-directora siempre estuvo atenta y dispuesta a ayudar en lo que hiciera falta

A la Universidad Nacional de Colombia, al programa de la Maestría en Inmunología y a todos los profesores asociados por brindar una enseñanza de calidad y permitir un aprendizaje de calidad.

Por ultimo, a mis padres y familia por su amor en todo momento. A mis amigos de la UTA por su apoyo y calidad humana durante todo el desarrollo de este proyecto.

INTRODUCCIÓN

El progreso que han tenido las ciencias biomédicas en los últimos años ha permitido la generación de nuevas posibilidades de tratamiento para enfermedades con necesidades médicas no resueltas. Los medicamentos de terapias avanzadas (ATMPs) son un grupo heterogéneo de oportunidades biotecnológicas modernas que abarcan productos de terapia génica (GTMP), productos de terapia celular (CTMP) y productos de ingeniería tisular (TEP) (Mansnerus, 2017). Los medicamentos celulares son o contienen poblaciones celulares de origen autólogo, alogénico o xenogénico y cuyas características biológicas han sido sustancialmente alteradas mediante manipulación. Se administran a seres humanos con un propósito terapéutico, diagnóstico o preventivo y su acción biológica se ejerce por medio de procesos metabólicos, farmacológicos e inmunológicos. Un ejemplo ampliamente investigado en los últimos años han sido las células estromales mesenquimales (CEM) quienes han demostrado ser eficaces en diferentes enfermedades (Vamvakas et al., 2011).

Las células estromales mesenquimales (CEM) son una de las alternativas médicas más prometedoras entre los productos de terapias avanzadas por su capacidad de diferenciación, regeneración, inmunomodulación, angiogénesis y propiedades antiinflamatorias. A la fecha el portal ClinicalTrials.gov reporta 1200 estudios clínicos basados en CEM para una extensa gama de enfermedades como la enfermedad de injerto contra huésped, la diabetes mellitus tipo I, la epilepsia, la insuficiencia renal crónica, la ontogénesis, la esclerosis múltiple, e incluso la actual enfermedad pandémica Covid-19 (Ugurlu & Karaoz, 2020). Sin embargo, a pesar del éxito terapéutico que se ha logrado obtener a través de esta terapia, la distribución, supervivencia y migración *In vivo* de las CEM sigue siendo un interrogante asociado a su mecanismo de acción. Aunque en teoría se desea la presencia de las células estromales mesenquimales en el área afectada, aún no está claro que esto sea estrictamente necesario. Modelos murinos de isquemia

miocárdica han demostrado que tras la administración intravenosa las CEM quedan atrapadas en los pulmones, sin embargo, se observa un beneficio en la función cardíaca (Wobma & Satwani, 2021). Adicionalmente, un estudio reciente demostró que la inducción de apoptosis en las CEM por parte de las células citotóxicas del receptor es necesario para la inmunomodulación en la enfermedad de injerto contra huésped (Galleu et al., 2017).

La apoptosis es una forma de muerte celular programada que elimina las células malignas, deterioradas y senescentes para regular tanto el desarrollo normal como la homeostasis celular. La inhibición o deterioro de la apoptosis es una de las principales causas de muchas enfermedades como el cáncer, la autoinmunidad y las enfermedades degenerativas (Yang et al., 2019). La apoptosis en las CEM puede inducir efectos inmunomoduladores, a diferencia de otras poblaciones celulares apoptóticas, sin embargo, los mecanismos mediante el cual se induce este proceso y cómo interactúan con el sistema inmune aun no es del todo claro. La mayoría de las células que sufren apoptosis son eliminadas por los fagocitos en forma de pequeñas vesículas conocidas como cuerpos apoptóticos (*apoptotic bodies*, AB). Los AB son vesículas relativamente grandes en comparación con los exosomas y las microvesículas, adicionalmente, contienen ADN, ARN y proteínas de forma similar. A pesar de que actualmente no existe una respuesta definitiva sobre el propósito de los cuerpos apoptóticos, se propone que la ruptura de las células apoptóticas en AB contribuye a un aclaramiento más eficiente y son importantes en el control de las respuestas inmunes (Xu et al., 2019). Recientemente se demostró que el tratamiento con CEM para un modelo de infarto de miocardio promovió la producción y liberación de AB, lo que mejoró la angiogénesis y la recuperación de la función cardíaca. En cuanto al mecanismo, se encontró que las células endoteliales fagocitaron los CEM-AB lo cual indujo procesos de autofagia, mecanismo que a su vez promovió una mejora en la enfermedad (H. Liu et al., 2020).

Por lo tanto, en la presente tesis de Maestría, se evaluó el efecto biológico de los cuerpos apoptóticos generados a partir de un modelo *In-vitro* de apoptosis, así como el impacto inmunológico de la interacción con células de linaje monocito/macrófago CD14+ humanas.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el papel inmunomodulador de cuerpos apoptóticos de células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton y el efecto de la interacción con células del linaje monocito/macrófago humanas CD14+.

ESPECÍFICOS

- Establecer un modelo *In-vitro* de apoptosis en células estromales mesenquimales aisladas de gelatina de Wharton.
- Aislar y caracterizar los cuerpos apoptóticos de células estromales de gelatina de Wharton.
- Evaluar el efecto inmunomodulador de los cuerpos apoptóticos y el efecto de la interacción con células de linaje monocito/macrófago humanos CD14+.

1. ASPECTOS TEÓRICOS

1.1 PRODUCTOS MEDICINALES DE TERAPIAS AVANZADAS

Los medicamentos de terapias avanzadas (*advanced therapy medicinal product*, ATMP, por sus siglas en inglés) conforman un grupo de productos biológicos complejos e innovadores desarrollados en los últimos años y cuyo desarrollo en la mayoría de los casos requiere procesos complejos. El primer producto ATMP aprobado en la Unión Europea (UE) en 2009 fue ChondroCelect, un medicamento de ingeniería tisular utilizado para el tratamiento de defectos del cartílago (EMA, 2009). En Estados Unidos (EE. UU.), el primer ATMP aprobado surgió 1 año después con PROVENGE, una terapia celular somática para el tratamiento de algunos cáncer de próstata (*PROVENGE (Sipuleucel-T) | FDA*, n.d.).

El avance de los ATMPs ha presentado varias dificultades, la unión entre el concepto teórico y los primeros ensayos clínicos que conducen a la aprobación de un nuevo tratamiento, presenta múltiples retos que surgen de la naturaleza de los ATMP, incluyendo no solo los desafíos científicos y técnicos, sino también los regulatorios (ten Ham et al., 2018). El primer paso en su desarrollo es la definición del producto y posteriormente su clasificación, lo cual, en algunos casos, puede resultar difícil al distinguir entre las diferentes subcategorías biológicas. La correcta clasificación de un producto determinará el marco regulatorio y el plan de desarrollo. Los ATMPs son productos medicinales que dentro de su desarrollo pueden incluir ácidos nucleicos, células y/o tejidos, lo que permite dividirlos en cuatro subcategorías: productos de ingeniería tisular (*tissue engineering product*, TEP), productos de terapia génica (*gene therapy medicinal product*, GTMP), productos de terapia celular (*cell therapy medicinal product*, CTMP) y los ATMP combinados (cATMP). Dentro de la regulación europea se presenta una diferenciación clara entre los CTMPs considerados como terapias avanzadas y las terapias celulares cubiertas por otros marcos legales (Hemoderivados y trasplantes) donde no son considerados un medicamento y la sustancia activa, es decir las células, no pueden fabricarse a escala industrial por razones éticas y legales (Iglesias-López et al., 2019).

1.1.2 Productos medicinales de terapia celular (CTMPs)

La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) define los productos medicinales de terapias celulares como medicamentos a base de células que han sufrido un proceso de manipulación sustancial de modo que se hayan alterado sus funciones biológicas, o productos constituidos por células que no están destinadas a cumplir la misma función esencial en el receptor y en el donante. En la unión europea los CTMPs presentan los mismos criterios de inclusión en su definición que los TEP, sin embargo, difieren en su indicación. En los CTMPs el producto es administrado a los seres humanos con el objetivo de tratar, prevenir o diagnosticar una enfermedad por medio de mecanismos farmacológicos, inmunológicos o metabólicos. Para el caso de los TEP, el producto se administra a seres humanos con el fin de regenerar, reparar o sustituir tejidos. En ese sentido, la clave para determinar la subcategoría más adecuada de un medicamento de terapia avanzada se basa en prestar atención al mecanismo de acción predominante de la sustancia activa y la función deseada. Sin embargo, productos como las células estromales mesenquimales (CEM), que podrían inducir la regeneración o reparación del tejido mediante la secreción de factores paracrinós, cumplen con los criterios de inclusión para ATMP y también para TEP, y deben ser revisados al detalle de acuerdo con su propósito de uso (Therapies, 2012).

Adicionalmente, la categorización de los productos a base de células difiere un poco entre la regulación de la Unión Europea y los Estados Unidos. Mientras que en la UE existe una diferenciación entre los CTMPs y TEPs de acuerdo con su indicación, en EE. UU los productos celulares y tisulares que constituyen una terapia avanzada son clasificados como terapia celular somática humana (SCT). Por ejemplo, el producto denominado "MACI" es un producto medicinal aprobado tanto en la UE como en EE. UU, que consiste en condrocitos autólogos sembrados en una membrana de colágeno de origen animal indicado para la reparación de cartílago en la rodilla. Para la regulación estadounidense el MACI es una terapia celular (producto combinado) con fines terapéuticos, sin embargo, para la UE es un TEP combinado ya que su principal mecanismo de acción y su indicación es para la regeneración, reparación y reemplazo tisular (International et al., 2005) (*MACI (Autologous Cultured Chondrocytes on a Porcine Collagen Membrane) | FDA, n.d.*).

En cuanto a los procesos de manufactura, estos deben ir orientados a cumplir con los criterios de inclusión (manipulación y uso no homologado) y con la caracterización de los

productos. En ese sentido, la manipulación debe modificar las características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales relevantes para su uso clínico. La separación, concentración o purificación de células no representa una manipulación sustancial si las células siguen conservando la misma función biológica que en el cuerpo humano. Por otro lado, el cultivo celular, los procesos de expansión o la activación de estas con factores de crecimiento, si modifican parcialmente algunas características de las células. En consecuencia, el procesamiento de productos basados en células y/o tejidos incluye la trituración, el moldeado, el cultivo, la digestión enzimática y la descélularización. La expansión, encapsulación, activación o modificación genética se consideran manipulaciones que alteran en gran medida el producto (Therapies, 2012).

Las células estromales mesenquimales (CEM) son una herramienta terapéutica prometedora para el desarrollo de terapias avanzadas a base de células y actualmente son objeto de estudios clínicos que abarcan diversas enfermedades autoinmunes, así como aplicaciones para la regeneración y reparación de tejidos. Las CEM como medicamento de terapia celular se clasifica como un ATMP y su fabricación debe hacerse bajo las directrices y normas de buenas prácticas de fabricación (GMP). Como consecuencia, el adecuado desarrollo y validación de métodos de fabricación, así como de ensayos clínicos, son de gran importancia para el éxito de la investigación traslacional (Radrizzani et al., 2016) .

1.2 CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES

1.2.2 Descubrimiento y orígenes

El descubrimiento y caracterización de las células estromales mesenquimales fue el resultado de una variedad de observaciones que permitieron determinar su complejidad y propiedades. Julius Cohnheim describió por primera vez en 1867 la presencia de células madre no hematopoyéticas en la médula ósea y atribuyó propiedades de migración y reparación de tejidos a esta población celular. Tavassoli y Crosby 100 años después aportaron al descubrir que un modelo murino, el trasplante de trozos de médula ósea en sitios extramedulares reconstituía la hematopoyesis y daba lugar a la formación de estructuras similares a la médula ósea nativa. Sin embargo, a pesar de reportes previos en la literatura es hasta 1970 cuando Friedenstein realiza el descubrimiento definitivo de

las CEM a través de una serie de publicaciones. Este último autor, demostró por medio de una serie de experimentos la existencia de una población celular en la medula con morfología fibroblastoide, capacidad de adherencia al plástico en cultivo, formación de colonias, potencial de diferenciación en osteoblastos In-vitro y que eran capaces de transferir el microambiente hematopoyético, de modo que surgió la idea de que las células del estroma de la medula ósea eran responsables del microambiente (Almeida-Porada et al., 2020).

Experimentos posteriores permitieron caracterizar esta población celular con más profundidad. En 1991 se desarrolló el anticuerpo anti Stro-1, antígeno que se utilizó durante mucho tiempo como marcador de CEM. Adicionalmente, en el mismo año Caplan (Caplan? incluir referencia), quien ha sido una autoridad para acuñar la terminología, atribuyó propiedades de células madre a esta población celular de acuerdo con su capacidad de diferenciación. A partir de estos estudios pioneros, el avance en cuanto al conocimiento de las células estromales mesenquimales ha ido aumentando considerablemente. Actualmente se sabe que las CEM representan una parte fundamental del microambiente especializado de la medula ósea, además ayuda a mantener las células progenitoras hematopoyéticas por medio del contacto célula-célula y/o a través de un efecto paracrino (Almeida-Porada et al., 2020). Así mismo están presentes en una variedad de tejidos desempeñando funciones reguladoras e interactuando con una gran cantidad de células del sistema inmune.

1.2.3 Fuentes

El desarrollo de nuevas terapias celulares a base de CEM y el incremento en su interés de aplicación clínica han conducido a la identificación de nuevas fuentes de aislamiento. A pesar de que su descubrimiento y la mayor parte de resultados han sido de células aisladas a partir de medula ósea, se han aislado células con propiedades de CEM de una gran variedad de tejidos humanos adultos y perinatales como tejido adiposo, piel, pulpa dental, sangre periférica, sangre de cordón umbilical, placenta y gelatina de Wharton de cordón umbilical (Petrenko et al., 2020). Adicionalmente, se ha descrito que las CEM específicas de tejido o pericitos (progenitor perivascular de CEM) se distribuyen en las regiones perivasculares de casi todos los tejidos del cuerpo, donde desempeña un rol importante en la homeostasis y reparación tisular. Sin embargo, pese a que las células aisladas de

cada uno de los tejidos se identifiquen de forma similar en cuanto a fenotipo y diferenciación general, existen diferencias en el transcriptoma y secretoma, sugiriendo que las CEM de cada tejido poseen una huella molecular que indica su origen, lo que probablemente refleja sus propiedades y potencial biológico (Sacchetti et al., 2016).

1.2.4 Aislamiento e identificación

Los métodos de aislamiento de CEM son diversos y han sido objeto de estudio para su correcta aplicación clínica. En general, todos los métodos aprovechan su capacidad de adherencia al plástico y su potencial para homogenizar las poblaciones por medio del cultivo celular. No obstante, y en adición a la variabilidad generada por su origen, se ha descubierto que el método utilizado para el aislamiento puede alterar sustancialmente la identidad y funciones biológicas de las CEM, generando subpoblaciones con preferencias de diferenciación y expresión de marcadores. En consecuencia, para las aplicaciones clínicas es fundamental partir de una población celular bien definida y validar su funcionalidad. Desafortunadamente, actualmente no existe un ensayo *In-vivo* para cuantificar su capacidad de crecimiento y potencial de diferenciación, lo que dificulta la identificación de las CEM menos diferenciadas y con un mayor potencial terapéutico. Así las cosas, diversos estudios han intentado determinar antígenos exclusivos de las CEM que permitan un aislamiento con relativa pureza y la selección de subpoblaciones de acuerdo con sus características inmunomoduladoras y su sesgo de diferenciación.

Pese a los esfuerzos realizados para definir un marcador específico de las CEM, los resultados no han permitido concretar la existencia de antígenos específicos de esta población celular. Se ha demostrado la expresión de varias moléculas incluyendo CD29, CD44, CD54 (molécula de adhesión intercelular 1 [ICAM-1]), CD73, CD90, CD105, CD106 (molécula de adhesión celular vascular 1 [VCAM-1]) y Stro-1, sin embargo, ninguna de estas es específica de CEM. Como consecuencia, y con el objetivo de obtener resultados comparables entre grupos, el Comité de Células Madre Mesenquimales y Tisulares de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) definió un conjunto de criterios mínimos para definir las CEM humanas y son los que se utilizan actualmente para caracterizar estas células después de su expansión *In-vitro*. Estos criterios incluyen: (1) Adherencia al plástico; (2) expresión de los antígenos CD105, CD73 y CD90; (3) ausencia de marcadores hematopoyéticos (CD45, CD34, CD11b, CD12 y CD19); (4) expresión del isotipo HLA-DR;

y (5) la capacidad de diferenciarse a condrocitos, osteoblastos y adipocitos *In-vitro* bajo los estímulos adecuados. Adicionalmente, se propone la ausencia de CD31 (molécula de adhesión de células endoteliales a las plaquetas [PECAM]) con el propósito de diferenciarlas de células endoteliales que fenotípicamente son muy similares (Almeida-Porada et al., 2020).

Cabe resaltar que los criterios establecidos por la ISCT reflejan las características de las CEM expandidas en cultivos *In-vitro* y puede que no representen con precisión las propiedades biológicas de las CEM *In-vivo*. De igual forma, aunque la población celular cumpla con estos criterios mínimos de identidad pueden seguir siendo heterogéneas en cuanto a su actividad biológica y potencial terapéutico. Por tal motivo, los procesos de manufactura actualmente se enfrentan a un reto de ámbito traslacional que abarca una gran cantidad de variables enfocadas a homogenizar la terapia con CEM y aclarar su comportamiento *In-vivo* (Caplan et al., 2019).

1.2.5 Inmunomodulación por CEM

Las células estromales mesenquimales se utilizaron inicialmente para reparación y regeneración de tejidos debido a su capacidad de diferenciación, sin embargo, rápidamente se incrementó el conocimiento sobre su capacidad de interactuar con el sistema inmune y ejercer un efecto inmunomodulador. Las CEM interactúan tanto con la inmunidad innata como con la inmunidad adaptativa principalmente mediante dos mecanismos; contacto célula-célula y por medio de una actividad paracrina. La función inmunomoduladora de las CEM puede aplicarse sobre una gran variedad de células inmunes donde podemos incluir células T, células B, células asesinas naturales (NK), macrófagos, monocitos, células dendríticas (CD) y neutrófilos (Song et al., 2020).

Mediante el contacto celular las CEM han demostrado tener la capacidad de regular el sistema inmune a través de la expresión de moléculas regulatorias y polarizando la respuesta hacia un perfil inmunosupresor. *In-vitro* se ha reportado que el co-cultivo con células T CD4+ activa la vía Notch1/FOXP3 induciendo un subtipo de linfocitos T regulatorios (Tregs) (Del Papa et al., 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que las CEM derivadas de placenta expresan altos niveles de los ligandos de muerte celular programa PDL-1 y PDL-2, los cuales pueden inhibir la proliferación de células T (Wang et

al., 2013). Cabe resaltar que el efecto supresor de las CEM sobre los linfocitos T no tiene ninguna restricción inmunogénica, siendo similares los resultados obtenidos con mesenquimales autólogas o alogénicas (Zhao et al., 2016). Yan et al demostraron que las Tregs expuestas a CEM resultaron ser más inmunosupresoras que las que no se co-cultivan y que la expresión de PDL-1 e IL10 podrían ser los factores determinantes en la interacción (Yan et al., 2014). Dentro del linaje linfocitario las CEM también pueden interactuar y ejercer un efecto sobre los linfocitos B. Las CEM pueden alterar considerablemente la diferenciación de células B reduciendo significativamente la producción de anticuerpos de isotipo IgM, IgG e IgA, así como, también disminuye la expresión de CXCR4, CXCR5 y CCR7 alterando las propiedades quimiotácticas (Lee et al., 2014).

El alcance inmunomodulador de las células estromales mesenquimales es tan amplio que también interactúan con el sistema inmune innato modulando gran parte de su respuesta. Las CEM también tienen la capacidad de alterar el fenotipo NK, suprimiendo su proliferación, disminuyendo la secreción de citocinas y reduciendo la citotoxicidad contra células que expresen HLA clase I. Los mecanismos incluyen el contacto célula-célula y la secreción de factores solubles donde se destaca el TGF β 1 y la PGE2, lo que demuestra diferentes formas de las CEM para interactuar con esta población celular (Sotiropoulou et al., 2006). Xiang et al. demostraron que las CEM indujeron la expresión de CD40, CD80, CD86 y HLA-DR durante la diferenciación de células dendríticas (CD) derivadas de monocitos y disminuyeron la expresión de CD86 y CD80 en co-cultivos con células dendríticas maduras (W. X. Gao et al., 2017). Adicionalmente, la diferenciación de progenitores de médula ósea en células dendríticas en presencia de sobrenadantes condicionados con CEM fue inhibida a través de la secreción de IL-6. Así mismo, las células mesenquimales pueden inhibir las propiedades efectoras de las CD como el procesamiento de antígenos y la presentación a células. Por último, los co-cultivos de CD y CEM, así como la administración *In-vivo*, da lugar a una regulación a la baja en la expresión de CCR7 y CD49d, dos moléculas implicadas en el retorno de las CD a los órganos linfoides. Como consecuencia, se produce la inhibición de la migración de las células dendríticas a los ganglios linfáticos y la presentación antigénica a las células T específicas de antígeno (Chiesa et al., 2011).

Las células de origen mieloide también son blanco del potencial inmunomodulador de las células estromales mesenquimales. Durante el periodo inflamatorio los neutrófilos son una de las primeras células en migrar al órgano afectado. Las CEM tienen la capacidad de conservar la viabilidad y la función de los neutrófilos inhibiendo la apoptosis de células en reposo y activadas por la IL-8, sin afectar la fagocitosis, la expresión de moléculas de adhesión y la capacidad migratoria. De igual forma, la secreción de IL-6 por parte de las CEM rescata a los neutrófilos de la apoptosis preservando su viabilidad (Raffaghello et al., 2008). Cassatella et al. demostraron que después de la activación del TLR3 las CEM derivadas de medula ósea tuvieron la capacidad de ejercer un efecto anti-apoptótico sobre los neutrófilos, preservando su viabilidad y funcionalidad. Los experimentos de neutralización indicaron que los efectos biológicos de las CEM sobre los neutrófilos estuvieron mediados por la secreción de IL-6, Interferón- β (INF- β) y el factor estimulante de colonias granulocitos macrófagos (GM-CSF) (Cassatella et al., 2011). Por lo tanto, los neutrófilos podrían considerarse uno de los blancos celulares más representativos en la mediación del efecto inmunomodulador de las CEM.

Los macrófagos desempeñan un rol fundamental en el sistema inmune innato, son células especializadas en la eliminación de células muertas y restos celulares. Además, los macrófagos son células efectoras que participan en la respuesta inmune citotóxica mediada por células. El conocimiento acerca de la regulación de estas células por parte de las CEM ha ido aumentando en los últimos años y actualmente se sabe que esta interacción es muy importante para una respuesta inmune correcta durante la inflamación y la reparación de lesiones tisulares. En un modelo murino de sepsis la inyección de CEM derivadas de medula ósea tuvo un efecto terapéutico en mejorar la supervivencia del animal. Los resultados sugieren que las CEM interactúan con los monocitos y macrófagos reprogramando su fenotipo, a la vez que aumentan la producción de IL-10 y disminuye la expresión de TNF- α e IL-6. En cuanto al mecanismo, se comprobó que el efecto regulador de las CEM dependió de la secreción de prostaglandina E2 (PGE2) que actuó sobre los macrófagos a través de los receptores de prostaglandina EP2 y EP4 (Németh et al., 2009). Gao et al. demostraron que las CEM de ratón polarizaron los macrófagos hacia un fenotipo M2 de forma independiente del contacto celular. El efecto se vio acompañado de la inhibición de NF- κ B y la activación de la vía STAT3 (S. Gao et al., 2014). Teniendo en cuenta lo anterior, el conocimiento acerca de cómo las CEM logran modificar el fenotipo

de los macrófagos será de gran importancia para el tratamiento de enfermedades inflamatorias en el futuro.

Es importante destacar que las CEM también pueden ejercer su efecto inmunomodulador a través de la secreción de moléculas multifuncionales por medio de mecanismos paracrinos, lo que se denomina secretoma y donde podemos incluir citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Dentro de las principales moléculas reguladoras se encuentra el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la PGE2, el interferón- γ (IFN- γ), el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), la Indolamina-pirrol 2,3-dioxigenasa (IDO) y el óxido nítrico (ON), entre muchos otros. Estos factores paracrinos se empaquetan en vesículas extracelulares (VEs) que suelen dividirse de acuerdo con su tamaño y célula de origen en exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Estos últimos han despertado un interés particular en los últimos años debido a su potencial terapéutico y la falta de conocimiento sobre su función. Adicionalmente, aunque las VEs derivadas de CEM hayan resultado ser terapéuticas de forma similar a las células en sí mismas, sus efectos varían de acuerdo con la fuente, la célula diana y el microambiente que rodea a las células (Song et al., 2020).

El secretoma de las CEM ha tomado importancia debido a que se ha demostrado que estas células pueden actuar sobre el sistema inmune innato y adaptativo por medio de su actividad paracrina. Recientemente Mahmoudi et al. reportaron que los exosomas derivados de CEM humanas aisladas de tejido adiposo disminuyeron la apoptosis de neutrófilos y aumentaron su capacidad de fagocitosis. De igual forma, el medio condicionado con CEM indujo fagocitosis de los neutrófilos y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mahmoudi et al., 2019) . Así mismo, se ha demostrado que las VE provenientes de CEM interfieren en la captación de antígenos por células dendríticas inmaduras e inhiben su maduración. Adicionalmente, inducen una expresión a la baja de marcadores de CD maduras (CD83, CD38 y CD80), al igual que una baja secreción de citocinas proinflamatorias (IL6 e IL-12) y una expresión aumentada de TGF- β (Reis et al., 2018). Por otro lado, y en concordancia con lo mencionado anteriormente, las vesículas extracelulares derivadas de CEM desencadenan la polarización de

macrófagos potenciando la expresión de marcadores antiinflamatorios M2 mediante la regulación a la baja de IL-23 e IL-22 (Hyvärinen et al., 2018).

En el IDCBS, Cruz et al mediante un enfoque simultáneo del transcriptoma completo y el secretoma de las CEM de cordón umbilical durante la modulación inmune, detectaron más de 6.000 genes expresados diferencialmente asociados a una variedad de procesos biológicos como la regulación de la activación leucocitaria, la producción de citoquinas y las moléculas de adhesión de membrana, fuertemente implicados en la regulación de las respuestas inflamatorias. Adicionalmente, los co-cultivos de PBMNC activados/CEM indujeron la reprogramación de las células CD14+ hacia el fenotipo M2-lyke, mostrando altos niveles de expresión de CD206, CD163 y CD301 en comparación con las células CD14+ cebadas con estímulos inflamatorios. Las células CD206/CD163high también secretaron niveles más altos de MCP-1, G-CSF, IL-6, IL-10, IP-10 e IL 4 que los monocitos CD206/CD163low y fueron capaces de suprimir la proliferación de las células T activadas por α CD3/CD28. Además, se demostró que una acción concomitante de los macrófagos M2-like inducidos, la expresión de los ligandos PD-L1/2 derivados de las CEM, la modulación de la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de IL-2R, promueven la regulación de las células T activadas, reduciendo el conjunto de células efectoras y forzando un fenotipo terminalmente diferenciado (TEMRA) (Cruz-Barrera et al., 2020).

1.2.6 Aplicaciones terapéuticas de CEM

Actualmente el campo de aplicación de células estromales mesenquimales ha aumentado considerablemente, lo que se ha reflejado en el incremento de ensayos clínicos en distintas enfermedades de origen inflamatorio crónico, con resultados prometedores. La capacidad inmunomoduladora de las CEM son la base de su aplicación a enfermedades inmunomediadas y dentro de las patologías más tratadas podemos incluir: la enfermedad de injerto contra huésped, enfermedades degenerativas del sistema osteoarticular, enfermedades cardiovasculares y enfermedades del espectro autoinmune (Lupus y esclerosis múltiple), entre otros.

Las enfermedades del tejido óseo como la osteogénesis imperfecta y la hipofosfatemia, han sido objeto de estudio para el tratamiento con CEM debido a sus efectos terapéuticos.

En un ensayo clínico, se combinó el trasplante de progenitores hematopoyéticos con la infusión de CEM del mismo donante, lo que se derivó en un mayor beneficio, pero de corta duración. Adicionalmente, la actividad inmunomoduladora de las CEM hace que las células sean una atractiva herramienta terapéutica para ser utilizado durante o después del trasplante, su aplicación puede reducir la toxicidad de los regímenes de acondicionamiento, al tiempo que induce el injerto hematopoyético y disminuye la gravedad de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Se ha comprobado que el co-trasplante de células madre hematopoyéticas y CEM facilita el injerto, sin embargo, su mecanismo aun no es del todo claro. De igual forma, la infusión de CEM haploidénticas durante el trasplante pediátrico de sangre de cordón umbilical indujo una rápida recuperación hematopoyética (James et al., 2019).

Otro campo de estudio y aplicación para la terapia con CEM son las enfermedades cardiovasculares. Las propiedades de regeneración e inmunomodulación de las células estromales mesenquimales representan una ventaja y son un candidato atractivo para el tratamiento de estas enfermedades. Los ensayos clínicos han demostrado que la terapia con CEM mejora las funciones cardiacas respecto a los grupos control. Las CEM alogénicas son bien toleradas, con un aumento significativo de la eyección del ventrículo izquierdo y una menor incidencia de arritmias y dolor torácico (Joshua M. Hare, Joel E. Fishman, 2017).

Los trastornos autoinmunes se caracterizan por una respuesta inadecuada del sistema inmune contra células y tejidos propios. En la Artritis Reumatoide, cuando el colágeno tipo II es reconocido por las células T activa de forma incontrolada una respuesta inmune, lo que conlleva a la destrucción de las articulaciones. Las propiedades de suprimir la proliferación de células inmunes citotóxicas y de inducir la formación de células regulatorias, convierten a las CEM en una herramienta terapéutica razonable para el tratamiento de esta enfermedad. Zheng et al. aislaron CEM de pacientes con Artritis Reumatoide (AR) y demostraron que estas células inhiben la proliferación de células T, disminuyen la expresión de citocinas proinflamatorias y secretan IL-10. Adicionalmente, describieron que el trasplante de CEM en las articulaciones con AR suprime la inflamación a través de la secreción de TGF- β 1, evitando la destrucción de las articulaciones (Zheng et al., 2008).

Dentro del espectro de enfermedades autoinmunes el lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad sistémica que puede afectar cualquier parte del cuerpo ocasionando graves daños al organismo. Se ha demostrado que los pacientes con LES presentan defectos en el sistema hematopoyético debido a la expresión desequilibrada de citocinas y factores de crecimiento. Adicionalmente, en estos pacientes las células madre CD34+ derivadas de la médula sobre-expresan algunos marcadores de superficie (CD123 y CD166) que están relacionados con la inflamación y desarrollo de células T. Varios estudios han demostrado que las CEM derivadas de médula ósea tienen la capacidad de mejorar la progresión autoinmune de la enfermedad y contribuir a disminuir la inflamación en los órganos afectados (Lufkin, 2013). Al igual que el LES, la diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune, sin embargo, en este caso el daño está mediado por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra las células β del páncreas. La destrucción de estas células disminuye la cantidad de insulina producida impidiendo controlar el nivel de azúcar en sangre. Resultados preliminares in vivo han sugerido que las CEM pueden contribuir a solucionar este problema inmune, ya que pueden diferenciarse en células productoras de insulina que responden a la glucosa, además de presentar propiedades inmunomoduladoras. Adicionalmente, se ha investigado si las CEM residentes del páncreas pueden ser forzadas a adoptar un linaje pancreático. Las CEM aisladas de sangre de cordón umbilical han demostrado la expresión de genes de desarrollo pancreático y pasos de diferenciación similares a los que presentan las células β (Gabr et al., 2017).

La esclerosis múltiple es otra enfermedad autoinmune que involucra células T autorreactivas. Los linfocitos T provocan la destrucción de la mielina y los oligodendrocitos. El tratamiento de la enfermedad incluye fármacos inmunomoduladores o inmunosupresores, sin embargo, a pesar de la eficacia para controlar el número de recaídas, actualmente ninguna terapia es eficaz para detener la fase progresiva. Dado su potencial inmunomodulador, las CEM han sido utilizadas en ensayos clínicos para el tratamiento de esclerosis múltiple recurrente. Los resultados sugieren que estas células promueven la autorreparación, reduciendo la formación de cicatrices y estimulando la formación de nuevos vasos sanguíneos. Adicionalmente, las CEM presentan una actividad paracrina representada por la secreción de factores de crecimiento y neuro-protectores como la superóxido dismutasa 3 (Sarkar et al., 2018).

Muchas enfermedades neurodegenerativas progresan rápidamente y no tienen una terapia eficaz. Actualmente, ningún tratamiento es capaz de detener la progresión de la enfermedad de Alzheimer (EA). Diferentes ensayos preclínicos han intentado mejorar los déficits neuropatológicos en modelos animales de EA por medio de la terapia con células madre. Shin et al. demostraron que las CEM activaron la vía de autofagia y aumentaron la supervivencia de las neuronas a nivel *In-vitro* e *In-vivo*. Adicionalmente, se ha evidenciado que las CEM aisladas de cordón umbilical aumentan la diferenciación de Tregs *In-vitro*, las cuales una vez trasplantadas en modelos animales de EA, modulan la activación de la microglía y promueven la supervivencia de las neuronas (Shin et al., 2014).

Teniendo en cuenta lo anterior, el potencial terapéutico de las CEM ha demostrado ser bastante amplio y atractivo para su aplicación clínica. Sin embargo, se debe destacar que antes de las aplicaciones clínicas es necesario mejorar los protocolos basados en CEM y el conocimiento acerca de la inmunogenicidad y comportamiento *In-vivo*. Uno de los principales interrogantes de la terapia es la supervivencia y migración de las CEM dentro del microambiente al que se enfrentan.

1.2.7 Supervivencia y migración de CEM.

La terapia celular basada en células estromales mesenquimales ha sido objeto de grandes avances en cuanto a su conocimiento y eficacia terapéutica. Independientemente de la fuente, las CEM han mostrado ser útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes tanto en modelos preclínicos como en ensayos clínicos. Los mecanismos asociados, su modo de acción y la biología que subyace al efecto terapéutico se han intentado definir y caracterizar a nivel *in-vitro* y en estudios preclínicos. Sin embargo, la traslación de la efectividad preclínica al ámbito clínico ha presentado varias dificultades. Actualmente se sabe poco sobre la biodistribución de las CEM cuando se enfrentan a un microambiente altamente inflamatorio en un contexto *in-vivo*, principalmente en el ámbito clínico. Dentro del ambiente inflamatorio inherente a cada una de las enfermedades, las CEM se enfrentan a varios estímulos como la hipoxia, el estrés oxidativo, las células citotóxicas, las citocinas proinflamatorias, entre otros, que pueden inducir su muerte. Se sabe poco sobre lo que ocurre con las CEM durante su distribución en el organismo y su infiltración en el lugar de destino, lo que ha introducido nuevas hipótesis sobre una persistencia limitada de las CEM que puede afectar su viabilidad y función

inmunomoduladora (Weiss et al., 2019). Witte et al. realizaron de forma muy precisa el seguimiento por medio de perlas Qtracker de CEM de cordón umbilical en modelos preclínicos y demostraron que las células vivas se acumularon en pulmón inmediatamente después de la infusión. Veinticuatro horas después (24H), la mayoría de CEM estaban muertas y se acumularon en pulmón e hígado, adicionalmente, se encontraron contenidas en monocitos. De igual forma se detectó de manera sistémica presencia de monocitos circulantes que fagocitaron CEM. Lo anterior demuestra que aún hace falta mucho por conocer acerca del comportamiento y supervivencia estas células en el organismo (Baan et al., 2018)

Las investigaciones acerca de la supervivencia y distribución de las CEM han permitido aclarar y conocer un poco sobre su comportamiento en el organismo, sin embargo, han abierto una brecha en el conocimiento de su biología y han sembrado varios interrogantes que actualmente son objeto de discusión científica tales como las circunstancias por las cuales las CEM muertas podrían participar en procesos inflamatorios y si la apoptosis determina cambios en la función moduladora y secretora de estas células. Mejorar el conocimiento sobre el destino y comportamiento de las CEM dentro del microambiente inflamatorio permitirá el desarrollo de terapias celulares más óptimas y mejorará la traslación al ámbito clínico.

1.3 CEM APOPTÓTICAS Y APLICACIONES CLÍNICAS

Actualmente existe relativamente poca información disponible acerca de modelos preclínicos que hayan investigado el efecto de las CEM apoptóticas. Sin embargo, ya se ha documentado y es objeto de investigación actual, los efectos antiinflamatorios que son provocados por la utilización de otras poblaciones celulares apoptóticas, lo que indica que las CEM podrían comportarse de manera similar. En contraste, las investigaciones disponibles con CEM apoptóticas han mostrado resultados prometedores que sugieren que para algunas condiciones inflamatorias este proceso de muerte celular puede representar un potencial mecanismo terapéutico (Weiss et al., 2019). Modelos preclínicos de lesión pulmonar aguda han demostrado que el microambiente inflamatorio afecta la supervivencia y eficacia de la CEM administradas. De la misma manera, un estudio reciente reportó que las administraciones de CEM apoptóticas reducían signos de

inflamación en un modelo murino de respuesta alérgica de las vías respiratorias mediado por una respuesta Th2 (Galleu et al., 2017).

Este efecto terapéutico no se limita solamente a enfermedades pulmonares, Sung et al. en un modelo de rata de sepsis inducida por ligadura y punción cecal, demostraron que la administración de CEM apoptóticas generadas *In-vitro* mediante cultivo en medios privados de suero, tuvo un efecto terapéutico superior que las CEM viables. La expresión de moléculas asociadas a la inflamación (ICAM-1, MMP-9, TNF- α , NF- κ B), estrés oxidativo y reguladores apoptóticos (Bax, caspasa 3) fue menor en los modelos que recibieron CEM apoptóticas. En cuanto al mecanismo, se sugiere que las células estromales mesenquimales apoptóticas son más eficaces para amortiguar la respuesta inmune a la lesión, sin embargo, no se mencionan vías específicas de regulación (Sung et al., 2013). Recientemente, otros investigadores demostraron en un modelo de conejo de cicatrización hipertrófica, que la inyección local de células estromales mesenquimales aisladas de médula ósea reguló la inflamación y evito la formación de cicatrices hipertróficas. El efecto terapéutico se atribuyó a la secreción de la proteína antiinflamatoria gen 6 estimulado por el TNF- α (TSG-6), sin embargo, se evidenció que el número de CEM viables disminuyó notablemente posterior a la administración y se indujo apoptosis en la mayoría de las células. Adicionalmente, la inhibición de las caspasa-3 disminuyo las capacidades inmunomoduladoras de las CEM y atenuó sus efectos terapéuticos (S. Liu et al., 2014). De forma similar, Cheung et al. demostraron que las CEM apoptóticas generadas *In-vitro* mediante el tratamiento de un anticuerpo monoclonal anti-Fas provocó la eferocitosis por parte de los monocitos y polarizó su respuesta hacia un fenotipo inmunosupresor, permitiendo el aumento de la secreción de PGE2 (Medication et al., 2005). Los monocitos juegan un papel importante en la depuración de células apoptóticas y la regulación de la respuesta inmune, sin embargo, no son los únicos fagocitos que han demostrado tener efectos inmunosupresores tras la eferocitosis de CEM apoptóticas. Piraghaj et al. probaron la hipótesis de que la eferocitosis de células estromales mesenquimales apoptóticas promueve la polarización hacia el fenotipo M2 de los macrófagos. Los resultados mostraron que en los co-cultivos de CEM apoptóticas con macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones, se redujo la producción de TNF- α , NO, y se aumentó la producción de IL-10. Adicionalmente, la actividad arginasa y la capacidad de fagocitosis

también fue superior en los macrófagos cultivados con CEM apoptóticas (Ghahremani Piraghaj et al., 2018).

En conjunto, estos resultados resaltan el potencial terapéutico de las CEM apoptóticas para ciertas condiciones, así como la importancia de los fagocitos para poder ejercer su efecto inmunosupresor. Sin embargo, pocas investigaciones estudian los mecanismos asociados a la interacción entre las CEM apoptóticas y el microambiente, así como sus vías de regulación. Un mecanismo que está tomando relevancia y está siendo estudiado recientemente, son las vesículas extracelulares provenientes de células apoptóticas, denominados cuerpos apoptóticos (AB), y su potencial inmunoregulador. Liu et al. en un modelo de infarto de miocardio descubrieron que las CEM trasplantadas sufrieron apoptosis y además liberaron cuerpos apoptóticos para mejorar la angiogénesis y recuperar la función cardíaca a través de la activación de la autofagia. Mecánicamente, estos autores plantean que después del trasplante local, las CEM experimentan una apoptosis a corto plazo y liberan AB que son internalizados por las células endoteliales (CE) del receptor. Posteriormente, al interior de las CE se activa la vía lisosomal y se promueve la expresión del TFEB (Factor de transcripción EB), que es un gen maestro para la biogénesis lisosomal y la autofagia. Estos resultados sugieren que la interacción entre CEM apoptóticas y el microambiente inflamatorio es más complejo de lo que podría parecer a simple vista, lo cual amerita más investigación al respecto (H. Liu et al., 2020).

Cabe resaltar que, dada la complejidad de la interacción, el microambiente y la falta de conocimiento en cuanto al mecanismo, el efecto terapéutico de las CEM apoptóticas no siempre se deriva en resultados positivos. Recientemente un ensayo clínico aleatorio multicéntrico doble ciego demostró que la administración de CEM viables resulto segura pero no eficaz para el tratamiento de síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). Sin embargo, los análisis post hoc identificaron que alrededor del 85% de las células administradas no eran viables. Lo anterior sugiere que las CEM apoptóticas pueden no tener un efecto terapéutico en SDRA, aunque, a esto se deben sumar variables como el momento, dosis y vía de administración, lo cual puede interferir en los resultados obtenidos. Por lo tanto, las CEM apoptóticas no pueden reemplazar desde el punto de vista terapéutico a las células viables, cada una de ellas representa un potencial terapéutico aplicable en diferentes contextos y presumiblemente por diferentes mecanismos. La

creciente investigación y experiencia del efecto terapéutico de las CEM apoptóticas plantea ideas importantes del mecanismo, que permite la generación de hipótesis y su posterior estudio clínico (Weiss et al., 2019).

1.3.2 Propiedades inmunomoduladoras de las células apoptóticas

La apoptosis es un mecanismo regulado de muerte celular que se produce en diferentes situaciones fisiológicas y mantiene la homeostasis de diferentes células inmunes mediante el recambio. Una de las diferencias entre la apoptosis y otros procesos de muerte, es que las células apoptóticas no liberan su contenido citoplasmático evitando una respuesta inflamatoria. Uno de los principales mecanismos para evitar la respuesta inmune a células apoptóticas es la activación de las caspasas. Estas enzimas impiden la respuesta inmune innata al inactivar la secreción de interferones tipo 1 o al oxidar señales de peligro, evitando así la liberación de patrones moleculares asociados al daño o DAMPs. Adicionalmente, la activación de las caspasas efectoras contribuye a la atracción de los fagocitos a través de la secreción de factores quimiotácticos, denominados señales “find-me”, que incluyen lípidos o nucleótidos. De este modo, se realiza de manera silenciosa la eliminación de células apoptóticas y se evita la necrosis secundaria asociada a la liberación de DAMPs, previniendo también la generación de autoinmunidad (Saas et al., 2016).

El segundo requisito, después de la activación de las caspasas, para evitar una respuesta inflamatoria, es la eliminación o aclaramiento eficaz de las células apoptóticas. Este proceso está dirigido por los fagocitos y comprende una serie de pasos que van desde el reclutamiento, el reconocimiento, la fagocitosis y la respuesta final. Antes de ser eliminadas por los fagocitos, las células apoptóticas inducen transitoriamente la respuesta inmune hacia un estado inmunosupresor a través de la expresión de factores como TGF- β , IL-10, CCR5, Anexina-A1, trombospondina-1, entre otros. *In-vivo*, este efecto inmunomodulador se prolonga y aumenta debido a la reprogramación que sufren los fagocitos posterior a la internalización de células moribundas, lo que sugiere una cooperación activa entre los fagocitos y las células apoptóticas. Yamaguchi et al. demostraron que el sobrenadante de células apoptóticas inducía la expresión de genes antiinflamatorios en macrófagos. En cuanto al mecanismo, estos autores encontraron que en los sobrenadantes de células apoptóticas se acumuló monofosfato de adenosina (AMP) que fue metabolizado por los

macrófagos a través del receptor de adenosina A2a, lo que a su vez indujo la expresión de genes antiinflamatorios (Yamaguchi et al., 2014).

La eferocitosis es el proceso mediante el cual los fagocitos, como los macrófagos, eliminan a las células moribundas. Este mecanismo es fundamental para prevenir la liberación de DAMPs, la resolución de la inflamación y para el inicio de la reparación tisular. Se estima que este proceso sucede alrededor de 3 horas después de la señal apoptótica, tiempo en el cual las células apoptóticas pueden reorganizar sus microtúbulos permitiéndoles mantener la integridad de su membrana y evitando la liberación de patrones moleculares asociados al daño. Actualmente se reconoce la existencia de distintos fagocitos con la capacidad de eliminar células apoptóticas, sin embargo, algunos son considerados “principiantes” y otro “profesionales”. Las células epiteliales y los fibroblastos están presentes en tejidos donde los macrófagos son escasos o donde su acceso es limitado, allí pueden fagocitar células apoptóticas y son considerados fagocitos principiantes. Por otro lado, los principales fagocitos implicados en el aclaramiento de células apoptóticas después de la infusión (principalmente por vía intravenosa) son los macrófagos y algunas células dendríticas. Estos fagocitos participan en la captación de leucocitos apoptóticos transportados por la sangre y se localizan en pulmones, hígado y bazo. Se ha demostrado que los macrófagos y las células dendríticas convencionales inmaduras (CD8 α +) de las zonas marginales del bazo participan en la eliminación de células apoptóticas infundidas. Adicionalmente, La reciente caracterización de subtipos de macrófagos y células dendríticas está ayudando a definir el papel de estos subconjuntos de células en la tolerancia inducida por células apoptóticas. De esta forma, se ha demostrado que las células dendríticas CD103+ adquieren antígenos derivados de células apoptóticas en los pulmones y se los presentan a células T en los ganglios linfáticos (Desch et al., 2011).

Una vez se ha realizado el reclutamiento, reconocimiento y fagocitosis de las células apoptóticas, se ha descrito que sigue la reprogramación o polarización de los fagocitos hacia una respuesta antiinflamatoria. La inhibición de este efecto puede conducir a procesos de autoinmunidad, como ocurre con la proteinasa 3 expresada en las células apoptóticas. Después de la eliminación de células apoptóticas, los macrófagos disminuyen la expresión de citocinas proinflamatorias como el TNF- α o IL-12, al tiempo que aumenta la secreción de citocinas antiinflamatorias como TGF- β o IL-10. De forma similar, los

metabolitos derivados de células apoptóticas, en particular los lípidos derivados del colesterol pueden estimular las vías de señalización antiinflamatorias en los fagocitos. Así mismo, en modelos de enfermedades inflamatorias, la administración de células apoptóticas provoca una disminución de citocinas inflamatorias circulantes y aumento de citocinas antiinflamatorias. En particular, la neutralización del TGF- β inhibe el efecto benéfico de las células apoptóticas. Además de citocinas antiinflamatorias, se ha demostrado que los macrófagos después de hacer eferocitosis pueden secretar factores proangiogenicos y metaloproteinasas que favorecen la resolución de la inflamación. Similar a los macrófagos, las células dendríticas en el sistema linfático también tienen la capacidad de eliminar células apoptóticas. La eferocitosis por parte de las células dendríticas causa el bloqueo en una fase inmadura o induce la generación de células tolerogénicas. Estas células pueden presentar el antígeno internalizado a las células T en los ganglios linfáticos de drenaje e inducir la formación de células inmunes reguladoras como células productoras de IL-10 y Tregs. En general, la administración de células apoptóticas puede controlar la inflamación mediante el reinicio del proceso resolutorio. Adicionalmente, este enfoque terapéutico puede restaurar la tolerancia a los autoantígenos mediante la inhibición de las respuestas desreguladas de células T y la inducción de células tolerogénicas y/o reguladoras. Lo anterior justifica el interés para la investigación de los mecanismos asociados, así como el desarrollo de terapias basada en células apoptóticas en contexto de trasplantes (Saas et al., 2016).

Por último, a pesar de los efectos terapéuticos que se han demostrado para las células apoptóticas, actualmente se sabe poco acerca de la naturaleza de la interacción entre estas células y el microambiente donde se generan. El reconocimiento por parte de los fagocitos se ha descrito que se realiza a través de una serie de señales de reclutamiento que promueven la fagocitosis, sin embargo, los estímulos que inducen la apoptosis, así como la forma más eficiente de hacer el aclaramiento y la reprogramación de los fagocitos aun no es del todo claro. En este sentido, y teniendo en cuenta el avance que ha tenido la utilización de vesículas extracelulares en los últimos años, los cuerpos apoptóticos son objeto de estudio actual y representan un potencial terapéutico poco explorado.

1.4 CUERPOS APOPTOTICOS

1.4.2 Potencial terapéutico de los cuerpos apoptóticos.

Las vesículas extracelulares (VEs) son vesículas asociadas a la membrana liberadas por células en diferentes condiciones. Tradicionalmente se han clasificado de acuerdo con su origen, tamaño y marcadores moleculares como exosomas (30-100nm, origen endosomal), microvesículas (50-1000nm, origen membrana plasmática) y los cuerpos apoptóticos (1000-5000nm) liberados exclusivamente por células apoptóticas. Las VEs actúan como importantes mediadores de la comunicación intercelular en diversos contextos a través de la transferencia de moléculas efectoras como proteínas, ARN y ADN. Así mismo, los niveles y el contenido de estas vesículas se han visto asociado a la progresión de infecciones y a la tumorigenesis. Por tal motivo, los exosomas y las microvesículas han sido reconocidos como agentes terapéuticos en los últimos años, probando su eficacia en diferentes modelos preclínicos y ensayos clínicos. Las VEs propias o modificadas han demostrado resultados favorables para la terapia contra el cáncer, vacunación contra patógenos, inmunoterapia, terapia regenerativa y para la administración de fármacos. Por ejemplo, los iExosomes, son exosomas derivados de CEM cargados con un siRNA contra la mutación KrasG12D que actualmente están siendo sometidos a un ensayo fase I para el tratamiento de cáncer de páncreas (Phan et al., 2020).

Mientras que los exosomas y las microvesículas han sido probados ampliamente como agentes terapéuticos, los cuerpos apoptóticos (AB), un tipo de VEs más grandes y generados exclusivamente por células apoptóticas, están menos definidos y su aplicabilidad terapéutica sigue sin ser explorada a profundidad. A la fecha existe un número modesto de estudios sobre los AB, sin embargo, se han realizado esfuerzos importantes para conocer más acerca de su biogénesis y función. La evidencia actual demuestra que los cuerpos apoptóticos son mensajeros claves liberados por las células moribundas para regular procesos como la eliminación de células, la homeostasis de tejidos, diseminación de patógenos y la inmunidad, demostrando así un amplio potencial terapéutico y posicionando los AB como otro candidato en el desarrollo de VEs hacia la aplicación clínica (Phan et al., 2020).

Contrario a lo que se pensaba antes, la formación de cuerpos apoptóticos es un proceso coordinado y regulado que se lleva a cabo después de la inducción de apoptosis, conocido como el desmontaje celular apoptótico. Este proceso tiene una gran importancia en mantener la homeostasis celular de una manera eficiente. Por ejemplo, como parte del desarrollo normal, muchas células son sometidas a apoptosis, sin embargo, pocas veces se observan en condiciones fisiológicas, lo que sugiere una rápida eliminación de estas células. El fraccionamiento de células apoptóticas en AB permite la eliminación rápida de los desechos por medio de fagocitos profesionales. La alteración en este proceso causa una eliminación defectuosa de AB y se ha visto asociado a procesos inflamatorios, así como a la generación de autoinmunidad, debido a lisis de los AB y la exposición de autoantígenos. Fujita et al. demostraron que la diferenciación osteogénica *in-vitro* de CEM indujo muerte celular por apoptosis, y que estas células apoptóticas no eliminadas sirvieron para la formación de los depósitos de calcio durante la diferenciación a osteoblastos (Fujita et al., 2014). De forma similar, los anticuerpos aislados de pacientes con lupus eritematoso sistémico pueden reconocer el autoantígeno histona H3 enriquecido en los AB e inducir una respuesta autoinmune de las células T CD4+ (Fournel et al., 2003). En determinadas infecciones, los ABs también pueden ayudar a la progresión de la enfermedad y empeorar la carga viral. El virus de la gripe A y el virus de la hepatitis C pueden ser transportados a otras células susceptibles a la infección por medio de los AB. Así mismo, los AB derivados de tumores pueden transferir horizontalmente oncogenes a células receptoras favoreciendo la tumorigenesis (Phan et al., 2020).

Además de las funciones básicas que se han reconocido para los AB, cada día es más claro que estas vesículas poseen propiedades similares a los exosomas y microvesículas, que pueden ser explotadas terapéuticamente. Particularmente, los AB están disponibles fácilmente, son fáciles de purificar, facilitan el tráfico de biomoléculas, reprograman la respuesta en células receptoras, entre otras características. La rápida eliminación de las células apoptóticas por parte de los fagocitos es una característica que permite que los AB se consideren como “mensajeros” cruciales entre las células dañadas, las células sanas y las células inmunitarias en procesos de regeneración tisular y la autoinmunidad. De este modo, la investigación asociada a la biogénesis y mecanismos de los AB, así como su interacción con otras células, puede ser rápidamente aprovechada con fines terapéuticos y de diagnóstico.

1.4.3 Cuerpos apoptóticos para inmunoterapia y vacunación

Una de las principales propiedades de los AB es cargar en su interior biomoléculas que puedan ser aprovechadas por otras células del sistema inmune. En el caso del cáncer y la infecciones, estas vesículas cargan antígenos tumorales y patogénicos que pueden desencadenar una respuesta inmune. Los fagocitos profesionales como las células dendríticas hacen fagocitosis de los AB y presentan a las células T promoviendo su respuesta a través del proceso de presentación cruzada. Para la infección con micobacterias se ha descrito que la forma en la que los macrófagos mueran e interactúen con las demás células es crucial para la propagación de la infección. Algunas cepas de micobacterias inducen apoptosis en los macrófagos y la liberación de AB, estas vesículas cargan antígenos bacterianos que pueden inducir la fagocitosis y presentación cruzada por células dendríticas promoviendo la activación de células T CD8+. Particularmente, este efecto benéfico contra las micobacterias se pierde con la inhibición de la apoptosis, lo que sugiere que los AB pueden ser candidatos promisorios para el desarrollo de vacunas en esta enfermedad (Behar et al., 2011). Además de cargar antígenos tumorales o bacterianos, los AB poseen dos (2) propiedades únicas mediante las cuales pueden ~~ofrecen~~ ofrecer una respuesta potente en comparación con VEs de células vivas; 1) reconocimiento y procesamiento específico y rápido por parte de los fagocitos, 2) la generación del complejo MHC-antígeno de manera más eficiente. Esto se ha comprobado en estudios donde hicieron pulsos con AB de células dendríticas y se observó una mayor activación de células T y liberación de interferón γ . Del mismo modo, en estudios de vacunación, las células dendríticas autólogas pulsadas con AB tumorales provocaron una respuesta de linfocito CD8+ antígeno específicos de leucemia y una disminución de Tregs en el 40-60% de los paciente sin generar autoinmunidad (Phan et al., 2020).

Cabe resaltar que no todos los AB resultan ser inmunogénicos y es aquí donde las investigaciones deben tratar de definir la naturaleza de los cuerpos apoptóticos que si lo son. La inmunogenicidad de los AB está asociada a factores como el estímulo de apoptosis, el tipo de célula, la tasa de eliminación, la ausencia de contenido antigénico, entre otros. El contenido antigénico de los cuerpos apoptóticos puede desencadenar la tolerancia en vez de la autoinmunidad o inducir una respuesta antígeno específica. Las células dendríticas residentes de tejidos con células apoptóticas migran hacia los ganglios linfáticos e inducen tolerancia periférica en las células T mediante la secreción de TGF- β

y la inducción de Tregs. Esta propiedad tolerogénica de los AB abre un panorama amplio para hacer la traslación hacia el tratamiento de enfermedades alérgicas y autoinmunes. La diabetes tipo 1, caracterizada por el auto ataque contra las células β del páncreas productoras de insulina, es objetivo de tratamiento con AB. Los ratones diabéticos autoinmunes vacunados con células dendríticas inmaduras pulsadas con AB derivados de células β mostraron una reducción significativa de la incidencia de la enfermedad, así como de la recaída (Phan et al., 2020).

1.4.4 Cuerpos apoptóticos para terapia de regeneración

El interés actual por hacer tratamiento a base de células estromales mesenquimales ha permitido explorar los beneficios terapéuticos de los exosomas y las microvesículas para inducir la regeneración y reparación tisular, obteniendo resultados prometedores. De igual forma, se ha podido identificar que los AB liberados por estas células contienen moléculas de señalización que promueven la supervivencia y diferenciación de los fagocitos no profesionales residentes de tejidos. En los tejidos epiteliales se ha demostrado que las células madre moribundas se comunican con las células adyacentes mediante la producción de cuerpos apoptóticos que contienen Wnt8a para promover el recambio celular en los epitelios. Mecánicamente, las células madre basales fagocitan los cuerpos apoptóticos y activan la señalización Wnt lo que las estimula a dividirse para mantener el número de células (Brock et al., 2019). De forma similar, Qinyu et al. demostraron que los cuerpos apoptóticos obtenidos de osteoblastos maduros promovieron la diferenciación osteogénica (Ma et al., 2019). En general, se ha demostrado que los AB tienen un papel importante en la regulación local de la homeostasis tisular, y se destaca el papel de los cuerpos apoptóticos obtenidos a partir de células madre para la inducción de la regeneración. Cabe resalta la seguridad de los AB en terapia regenerativa ya que no induce una respuesta inflamatoria ni el rechazo del injerto.

1.4.5 Cuerpos apoptóticos para la entrega de fármacos y como herramienta de diagnóstico.

Las VE (exosomas y microvesículas) han sido ampliamente propuestos como vehículos para la carga y entrega de moléculas deseables en las células receptoras. Las VE representan una ventaja técnica con relación a los métodos de entrega sintéticos (liposomas y nanopartículas) debido a la versatilidad de la carga, los métodos de carga, su composición lipídica y la maquinaria molecular de eliminación que mejora su estabilidad y biodisponibilidad. En contraste, los cuerpos apoptóticos son VE de mayor tamaño y generados por células moribundas, sin embargo, la carga y administración sigue sin ser explorada a profundidad. La literatura disponible permite identificar y anticipar el potencial terapéutico de los AB como vehículos de entrega de fármacos, y no es de sorprender que en los próximos años su utilización y potencial crezca de forma exponente. Los estudios de carga antigénica y de biomoléculas en los AB para activar y regular la respuesta inmune, permite inferir que el potencial de carga de los cuerpos apoptóticos con fármacos y su entrega a fagocitos, representa una herramienta atractiva para ser explotada en los próximos años (Phan et al., 2020).

Cabe resaltar que dentro de la investigación enfocada al desarrollo de los AB como vehículos de fármacos se debe considerar algunos aspectos inherentes a la biología de estas vesículas. El primero por considerar es la carga de los AB, ya que en su mayoría se han utilizado las vesículas generadas por la célula y no se conoce muy bien cómo acceder a una carga externa, sin embargo, los resultados sugieren que la mejor forma de cargarlos es a través de la célula que los produce. En segundo lugar, el tamaño y la rápida captación por parte de los fagocitos puede dificultar su biodistribución y disponibilidad. En tercer lugar, las células blanco deberían ser estratégicamente los fagocitos y modular su respuesta. Por último, la baja estabilidad en cultivo (3-6 horas a 37C) que presentan los AB podría afectar su potencial (Phan et al., 2020).

Los cuerpos apoptóticos son un sello distintivo de muerte celular y de ese modo, podrían ser marcadores de enfermedades en la que se induzca la muerte celular como las lesiones inducidas por fármacos, las lesiones cerebrales, el rechazo de trasplantes, trastornos inmunológicos, entre otros. La única herramienta diagnóstica que utiliza los AB es la colopatía apoptótica, una prueba histológica de biopsias gastrointestinales. De forma

similar, los estudios histológicos revelan que los pacientes celíacos presentan un nivel elevado de AB en su biopsia. Sin embargo, este método requiere personal bien formado y técnicas complejas para su visualización. Un enfoque basado en la citometría de flujo para cuantificar los AB están mejorando la precisión y eficacia de estos procedimientos, permitiendo identificar AB específicos de enfermedades y células. De esta forma, la identificación de marcadores de AB también se convierte en un campo de investigación disponible (Phan et al., 2020).

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1 Aislamiento y caracterización de células estromales mesenquimales a partir de gelatina de Wharton de cordón umbilical.

Como insumo celular de partida, mediante un proceso de disgregación mecánica estandarizado en el Área de Producción de la Unidad de Terapias Avanzadas (UTA) del Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e innovación en salud (IDCBIS), se realizó el aislamiento de células estromales mesenquimales (CEM) a partir de la gelatina de Wharton de cordones umbilicales donados mediante el programa cordial y la firma de un consentimiento informado (Cañas-Arboleda et al., 2020). Las CEM se criopreservaron hasta su posterior uso en medio DMEM suplementado con 30% de lisado plaquetario humano (LPh), heparina sódica (16U) y 10% DMSO a -180°C en nitrógeno líquido. Para su uso las células se descongelaron y expandieron en cultivos *in-vitro* monocapa en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de LPh y heparina sódica (16U), mantenidos a 37°C y 5% de CO_2 .

La identificación de la población celular se realizó de acuerdo con los criterios establecidos por la sociedad internacional de terapia celular y protocolos previamente establecidos (Cañas-Arboleda et al., 2020). Por medio de citometría de flujo se determinó la expresión $<2\%$ de los antígenos CD45, CD34, CD31, HLA-DR y $>80\%$ de CD73, CD90 y CD105. Así mismo, se evaluó la diferenciación *in-vitro* de las CEM hacia osteoblastos y adipocitos mediante cultivo en placa y la suplementación con factores de crecimiento específicos. La capacidad de las CEM para inhibir el crecimiento de células CD3+ humanas activadas mediante perlas anti $\alpha\text{CD3/CD28}$ fue evaluado como un criterio de potencia biológica.

2.2 Generación y evaluación de un modelo in-vitro de apoptosis en células estromales mesenquimales.

Con el propósito de inducir muerte celular en las CEM, se estandarizó y evaluó un modelo *in-vitro* de generación de apoptosis bajo diferentes estímulos. Para lo anterior, se realizó la descongelación de viales criopreservados y se expandieron en frascos de cultivo T-75 para su posterior tripsinización mediante el uso de Tripsina-EDTA. Posteriormente, se

estimularon las CEM en presencia de Granzima B humana recombinante (MERCK, SRP6258-10UG), Granzima A humana (MERCK, 368044-10UG), anti-Fas L humano activador (MERCK, 05-201), Puromicina, LPS o irradiación gama (25Gy). La concentración y el tiempo de estimulación se determinó para producir al menos un 50% de apoptosis de forma progresiva.

La evaluación del modelo *In-vitro* de apoptosis se realizó a partir de los principales cambios que tienen lugar en la célula durante un proceso apoptótico. Inicialmente se realizó la evaluación morfológica de las células por medio de microscopia convencional. Por otro lado, se determinó la translocación de la fosfatidilserina mediante el marcaje positivo con Anexina V y la exclusión del 7AAD por medio de citometría de flujo, identificando las células en apoptosis temprana como Anexina V+/7AAD-, apoptosis tardía como Anexina V+/7AAD+ y necróticas como Anexina V-/7AAD+. Adicionalmente, se visualizó la fragmentación del DNA que tiene lugar durante la apoptosis tardía, para lo cual se utilizó la determinación del ciclo celular con PI y la tinción TUNEL mediante el kit ApoTarget™ APO-BRDU (Thermo, KHO1001) que proporciona un método de tinción de dos colores para etiquetar rupturas de ADN y ADN total, permitiendo detectar células apoptóticas por medio de citometría de flujo. Por último, y como signo distintivo de apoptosis, se evaluó la activación de las caspasas 3 y 7 mediante el kit CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Thermo, C10740) que permite la detección por citometría de flujo de la activación de las caspasas 3 y 7, e incorpora el SYTOX AADvanced Dead que permite visualizar de forma sencilla las células apoptóticas y diferenciarlas de las células muertas por necrosis (Fig. 1). Para el modelo de irradiación se utilizó el equipo BIOBEAM 2000 que realiza ciclos completos de irradiación gamma a una dosis de 25Gy.

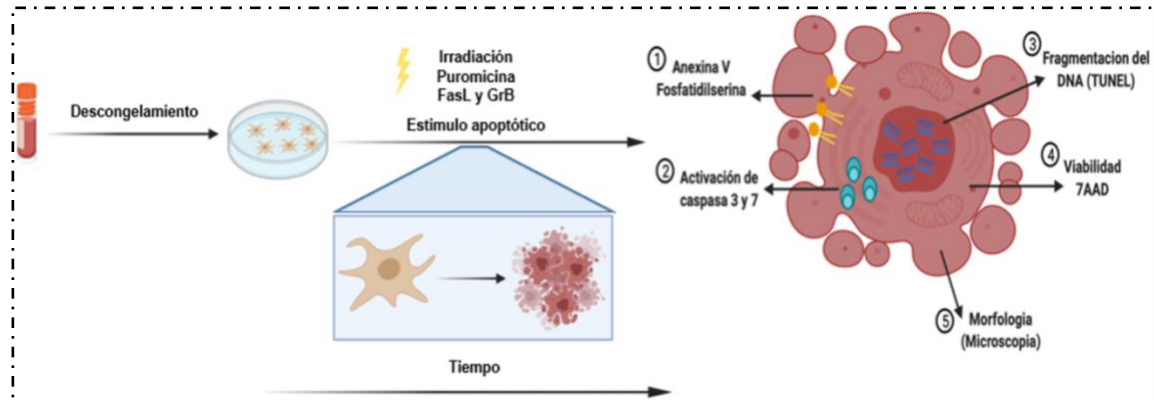


Figura 1. Generación de un modelo *In-vitro* de apoptosis. Las CEM fueron descongeladas y expuestas a varios estímulos apoptóticos. El impacto de los estímulos en el tiempo se evaluó a partir de las diferentes modificaciones celulares de un proceso de muerte celular por apoptosis.

De ese modo, se logró inducir apoptosis en las CEM y se evaluó la eficacia del modelo, siguiendo las células apoptóticas en el tiempo desde distintas aproximaciones metodológicas, asegurando así la diferenciación entre células apoptóticas y necróticas, así como estimando la potencia del estímulo y evitando una necrosis secundaria.

2.3 Enriquecimiento y caracterización de cuerpos apoptóticos a partir de células estromales mesenquimales apoptóticas.

Una vez estandarizado el modelo *in-vitro* para la generación de apoptosis en CEM, se utilizó esta misma estrategia y células para el enriquecimiento de cuerpos apoptóticos (AB-CEM). Una vez inducida la apoptosis en las CEM, se aislaron los cuerpos apoptóticos a partir del sobrenadante de cultivo mediante un protocolo de centrifugación diferencial y se caracterizaron en el tiempo. Para esto, el sobrenadante se centrifugó a 300g durante 10min para descartar células y debris celular. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 4000g x 20min para sedimentar la fracción de cuerpos apoptóticos de 1000 – 5000nm. Para la caracterización de los cuerpos apoptóticos se utilizó el marcaje con un anticuerpo anti-fosfatidilserina para identificar la presencia de este fosfolípido como un marcador característico. De igual forma, se evaluó la presencia de marcadores funcionales para lo cual se realizó la tinción con un anticuerpo anti-PDL-1. Adicional a esto, se cuantificaron los AB a partir de su tamaño utilizando estándares de tamaños específicos y el marcaje con el anticuerpo anti-fosfatidilserina por medio de perlas de conteo en citometría de flujo.

De esta forma se obtuvieron suspensiones enriquecidas de cuerpos apoptóticos provenientes de CEM apoptóticas que fueron utilizados para experimentos posteriores (Fig. 2).

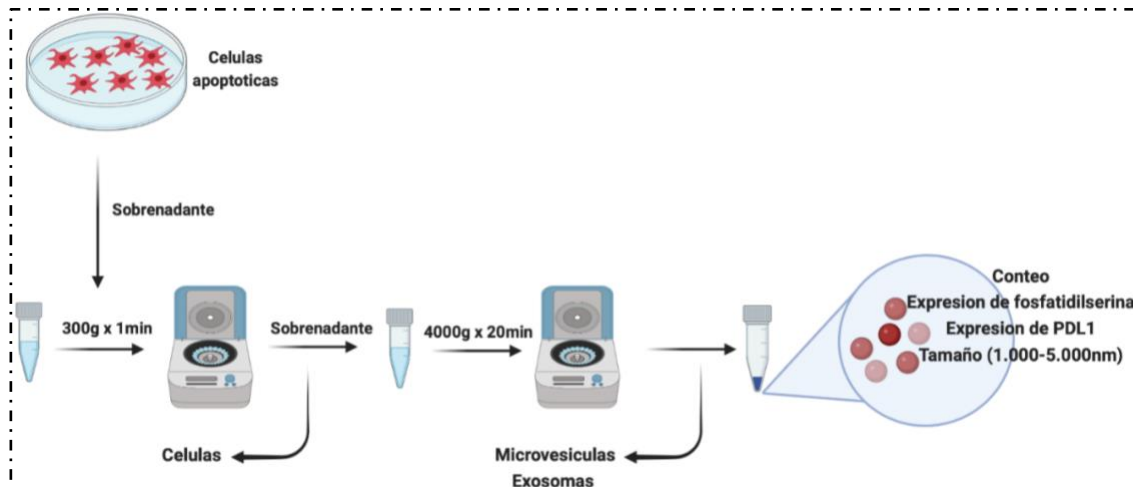


Figura 2. Enriquecimiento y caracterización AB-CEM. El sobrenadante de los cultivos de CEM irradiadas se sometió a un protocolo de centrifugación diferencial. La fracción obtenida se caracterizó a partir del tamaño, expresión de fosfatidilserina, expresión de PDL-1 y su cuantificación.

Para caracterizar el potencial inmunosupresor de los cuerpos apoptóticos se evaluó su capacidad directa para inhibir la proliferación de células CD3⁺ humanas activadas con perlas anti-biotina conjugadas a anticuerpos biotinilados α CD3/CD28 en ensayos de cocultivos, siguiendo metodologías previamente validadas por la UTA (Cruz-Barrera et al., 2020). Para estos ensayos, las PBMCs se aislaron a partir de conos de aféresis proporcionados por el banco de sangre del IDC BIS mediante una centrifugación diferencial utilizando el gradiente con Ficoll y se criopreservaron hasta su uso. La inhibición de la proliferación se cuantificó a través del conteo de poblaciones CD3⁺ mediante citometría de flujo y se calculó un porcentaje de inhibición en base a los conteos de PBMCs, PBMCs activadas y PBMCs activadas + CEM (Fig. 3).

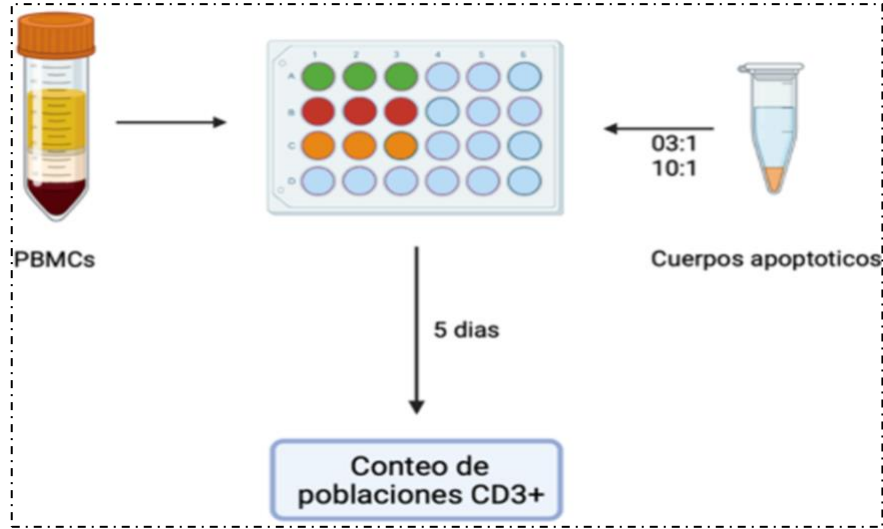


Figura 3. Evaluación del efecto directo de los AB-CEM con células CD3+. Las PBMCs fueron activadas con perlas α CD3/ α CD28 y se co-cultivaron con AB-CEM en relación AB-CEM:PBMC, 3:1 y 10:1. Posterior a 5 días se realizó un conteo de las poblaciones CD3+ y se determinó el porcentaje de inhibición.

2.4 Evaluación de la interacción de células de linaje monocito/macrófago CD14+ humanas con cuerpos apoptóticos.

Una vez enriquecida y caracterizada la fracción que contiene los cuerpos apoptóticos derivados de CEM apoptóticas, se evaluó el efecto de la interacción de éstos con células del linaje monocito/macrófago CD14+ humanas. Para lo anterior, se llevaron a cabo diferentes inmunoensayos estandarizados previamente en la UTA y adaptados a los objetivos del proyecto (Cruz-Barrera et al., 2020) (Fig. 4). Brevemente, se realizó una selección positiva de células CD14+ a partir de PBMCs obtenidas de sangre periférica mediante microperlas magnéticas anti-CD14. Posterior al aislamiento, las células CD14+ se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB y se mantuvieron a 37°C – 5% de CO₂ durante 24h antes de los ensayos. La pureza de las poblaciones se determinó mediante la tinción inmunológica con un anticuerpo anti CD14 y su análisis por citometría de flujo. Los cuerpos apoptóticos se añadieron al cultivo de monocitos/macrófagos CD14+ en relación 1:10 (monocito/macrófago: AB) y se dejaron en cultivo durante 5 días. Después, se determinó el fenotipo regulador de macrófagos M2 en

las células mediante la tinción con los anticuerpos CD163, CD206 y CD301 mediante citometría de flujo.

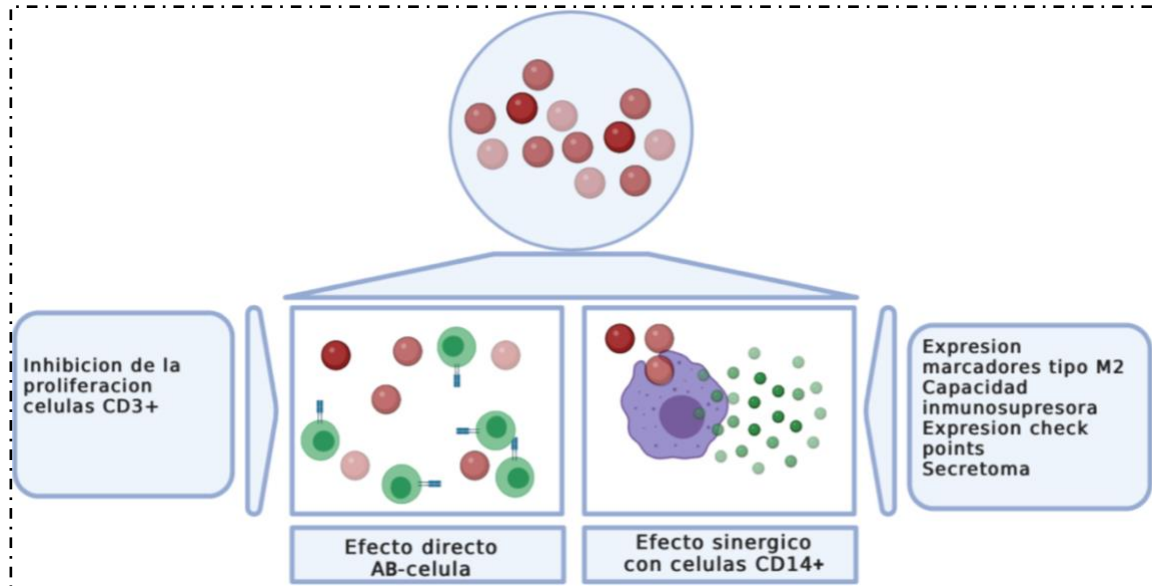


Figura 4. Evaluación del efecto inmunomodulador de los AB-CEM. El potencial inmunomodulador de los cuerpos apoptóticos obtenidos a partir de CEM irradiadas se determinó mediante inmuno-enayos *In-vitro*. El efecto directo de los AB-CEM se evaluó como la capacidad de inhibir la proliferación de poblaciones CD3+. El efecto sinérgico y su interacción con células del linaje monocito/macrófago CD14+ humanas se determinó mediante la respuesta de estas células en términos de expresión de marcadores tipo M2, capacidad inmunosupresora, expresión de check points y análisis de secretoma.

Los monocitos/macrófagos condicionados con AB-CEM y con fenotipo M2 fueron retados en un ambiente de inflamación *in-vitro*, determinando su potencial inmunosupresor (Fig. 5). Los sobrenadantes de estos cultivos se recogieron para realizar el análisis de la secreción de citocinas y factores de crecimiento por medio del ensayo multiplex de citocinas (Luminex) midiendo el cambio en expresión de moléculas como IL1b, IL2, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12, IL15, IL17, TNF- α , IFN- γ , MIP 1-2, MIG, RANTES, GMCSF, GCSF, VEGF, HGF, FGFb y MCP-1 .

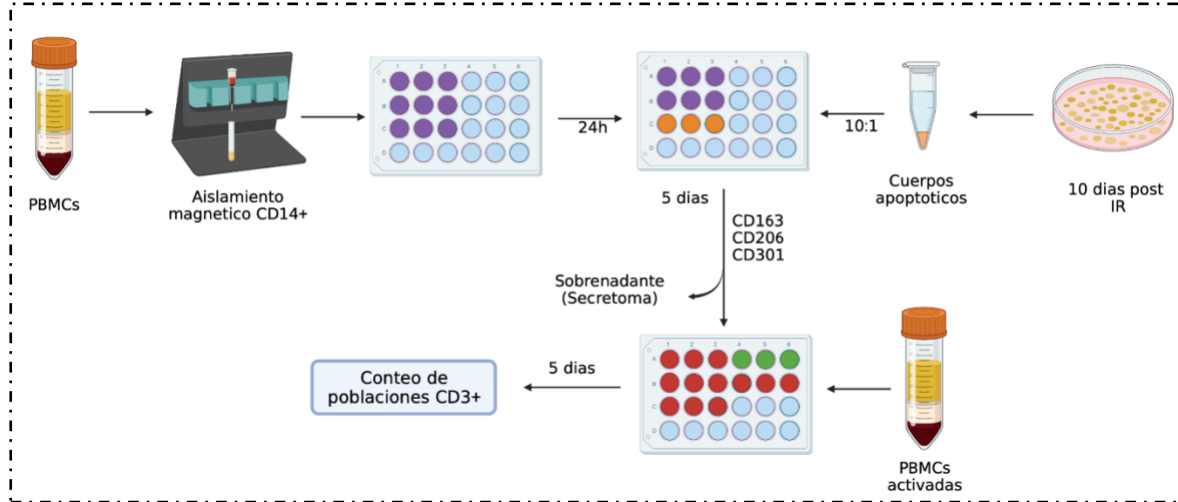


Figura 5. Evaluación del efecto sinérgico de los AB-CEM con células CD14+. A partir de un banco de PBMCs se realizó una selección positiva de células CD14+ mediante perlas micromagnéticas y se sembraron en placa de 24 pozos. Posteriormente, estas células seleccionadas se condicionaron con AB-CEM en relación 10:1 (AB-CEM:CD14) y se dejaron en cultivo durante 5 días. Pasado este tiempo se tomó los sobrenadantes para análisis de secretoma y se evaluó en las células CD14+ la expresión de marcadores tipo M2. Por último, las células CD14+ condicionadas con AB-CEM se retaron con PBMCs activadas con perlas α CD3/ α CD28, se co-cultivaron durante 5 días y se determinó su porcentaje de inhibición.

2.5 Análisis de los datos

Los datos generados mediante citometría de flujo fueron analizados mediante el software FlowJo V10. Las gráficas se generaron a partir del paquete de análisis Prism Graphpad y se realizaron test de ANOVA de 1 vía - 2 vías y pruebas T-student para determinar la significancia de los datos, según corresponda de acuerdo con la distribución de los datos. Para realizar el heatmap y PCA se utilizó el software RStudio versión 3.6.2 (Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)) mediante los paquetes library (gplots, ggplot2, GGally, corrplot, RColorBrewer, cluster, mclust, pheatmap). Para la generación de los RadViz se usó el software Orange 3.22 para Mac OS X para generar los diagramas vectoriales según el aplicativo RadViz y la recomendación del programador. Para los análisis Ward y Ward.D2 también se utilizó el software R mediante los paquetes stats(), dendextend(). Para el análisis ADL, mediante RStudio y haciendo uso de la función 'partimat()' del paquete 'klar', se presenta el resultado gráfico de dicho análisis; así, se representan los límites de clasificación de un modelo discriminante lineal bajo la aproximación del teorema de Bayes para cada par de predictores (citoquinas). Cada color representa una región de

clasificación acorde al modelo (es decir, cada grupo experimental), se muestra el centroide de cada región y el valor real de las observaciones.

3.RESULTADOS.

3.1 La irradiación gama representa el mejor modelo de apoptosis *In-vitro* para el enriquecimiento de cuerpos apoptóticos de células estromales mesenquimales.

Las células estromales mesenquimales se obtuvieron mediante un proceso de disgregación mecánica de la gelatina de Wharton y se realizaron los ensayos necesarios para su identificación (Fig. 6). La determinación de los antígenos de superficie demostró la pureza de las células; el porcentaje de expresión para los marcadores CD73, CD90 y CD105 fue superior al 90% y para CD45, HLADR y CD34 fue inferior al 2% en todos los donantes (Fig. 7A). De igual forma y siguiendo los criterios de identidad propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), se evaluó la capacidad de diferenciación de las CEM hacia los linajes adipogénico y osteogénico. La tinción con rojo de alizarina de los depósitos de calcio permitió evidenciar la diferenciación hacia el linaje adipogénico y la tinción con aceite rojo evidenció la acumulación de lípidos en el citoplasma de las células característico de los condrocitos (Fig. 7B). Por último, se utilizó la capacidad de las CEM para inhibir la proliferación de células CD3+ humanas activadas con perlas anti α CD3/ α CD28 como criterio de potencia para su efecto biológico y se cuantificó mediante el MFI la expresión de PDL-1 como marcador de su acción inmunosupresora (Fig. 7C).

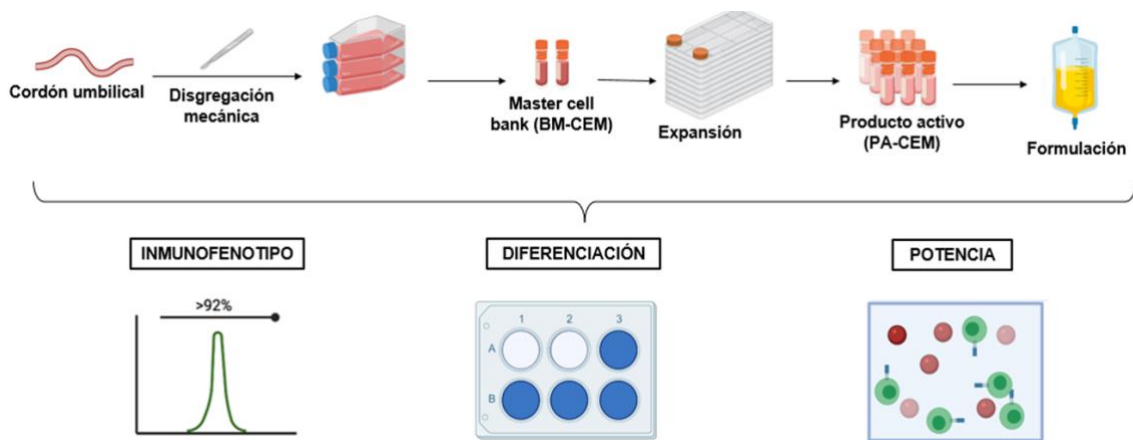


Figura 6. Producción CEM. Las células estromales mesenquimales se aislaron de la gelatina de Wharton mediante un proceso de disgregación mecánico estandarizado en el área de producción de la Unidad de Terapias Avanzadas (UTA) del IDCBIS.

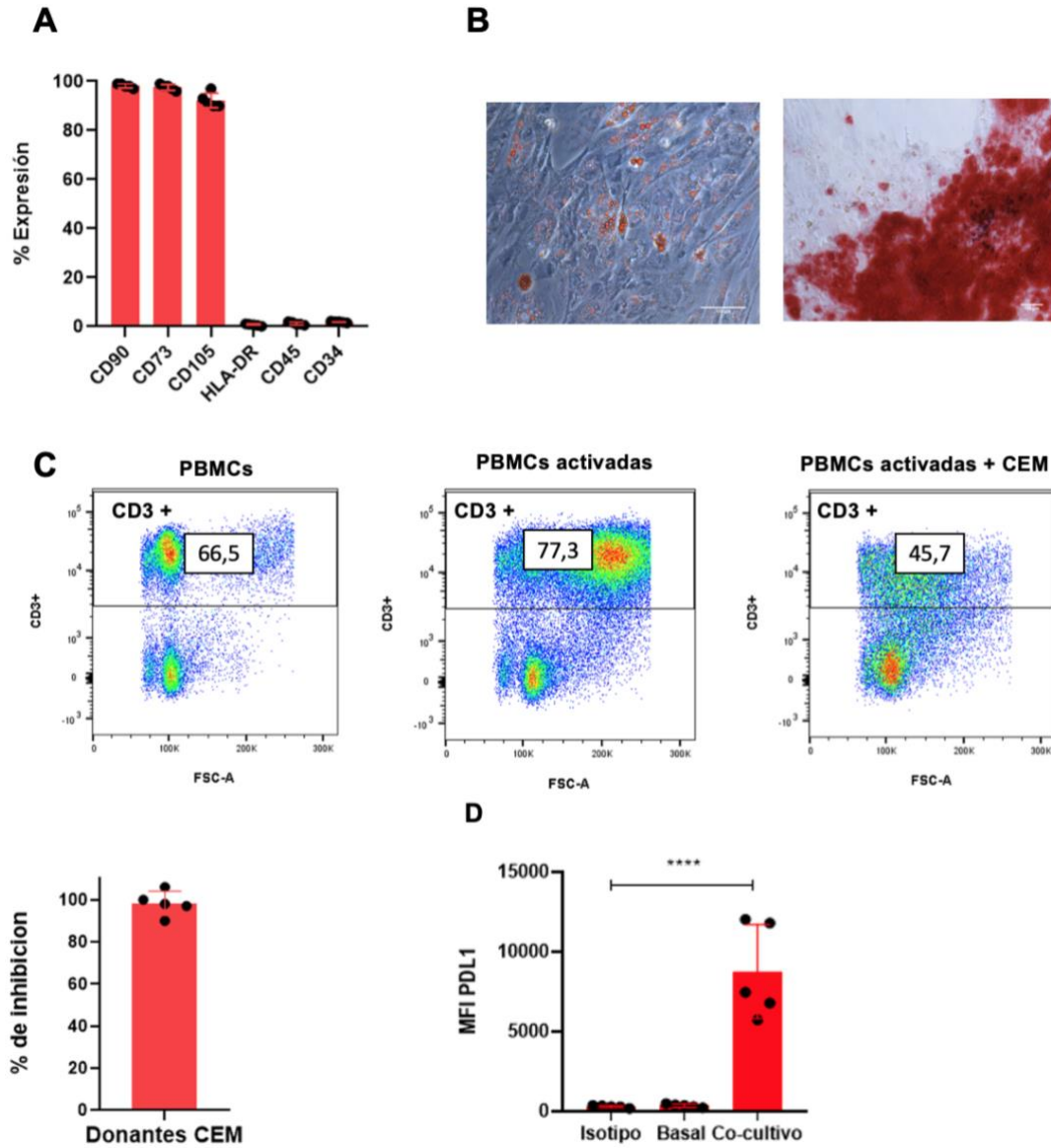


Figura 7. Identificación y caracterización CEM. Para la caracterización de las CEM se determinó el porcentaje de expresión >90% de los antígenos CD73, CD90, CD105 y la expresión <2% de CD45, HLADR y CD34 (A). Así mismo, se indujo y evaluó la diferenciación hacia los linajes adipogénico y osteogénico (B). Por último, se caracterizó el efecto inmunosupresor de las CEM al inhibir la proliferación de células CD3+ humanas activadas con perlas anti CD3/CD28 (C) y se midió la expresión de PDL-1 como marcador de este efecto (D). n=4-5 donantes CEM. ****p<0.0001

Una vez aisladas las CEM, se generó y evaluó un modelo *in-vitro* de apoptosis que permitió enriquecer los cuerpos apoptóticos de forma significativa y evitar en gran medida la necrosis secundaria. Inicialmente, se probaron varios inductores de apoptosis en busca de

uno que impulsara la muerte celular de forma gradual y fuera fácil de replicar en volúmenes grandes. La determinación del ciclo celular con PI demostró ser un método eficiente para evidenciar la fragmentación del DNA y la consecuente acumulación de una población Sub-G0. Los estímulos inflamatorios mediante el tratamiento con FasL activador y Granzima B humana sintética no lograron inducir muerte celular por apoptosis después de las 24 horas. Estos estímulos no fueron eficientes incluso incrementando la dosis de forma significativa y combinándolos (Fig. 8A). Por este motivo, se utilizó el LPS como otro estímulo apoptótico reportado para las CEM. Sin embargo, el tratamiento con lipopolisacárido durante 24 horas tampoco logró enriquecer la población Sub-G0, a pesar de incrementar la dosis al doble (Fig. 8B). Los tratamientos de origen inflamatorio no resultaron ser eficientes en generar la fragmentación del DNA y resultaban poco eficientes al escalar el volumen de tratamiento, por lo cual, se decidió implementar la utilización de un agente químico altamente tóxico para la célula como la puromicina. De igual forma, se incluyó la doble tinción Annexina V/7AAD para detectar la translocación de la fosfatidilserina como un signo temprano de la apoptosis. La puromicina tiene la capacidad de inhibir la síntesis correcta de proteínas y provoca una muerte celular significativa, en dosis altas resulta ser altamente tóxica y en dosis bajas puede provocar una muerte celular gradual. El tratamiento con 0.5 µg/mL de este antibiótico provocó a las 48 horas un aumento significativo de células en apoptosis temprana y tardía, así mismo la morfología de las células se vio afectada (Fig. 8 C y D). A las 72 horas de tratamiento no fue posible detectar células y la muerte fue del 100%, por lo tanto, se descartó este estímulo ya que resultó altamente tóxico para las células en un periodo de tiempo corto, además de su efecto residual en el medio de cultivo.

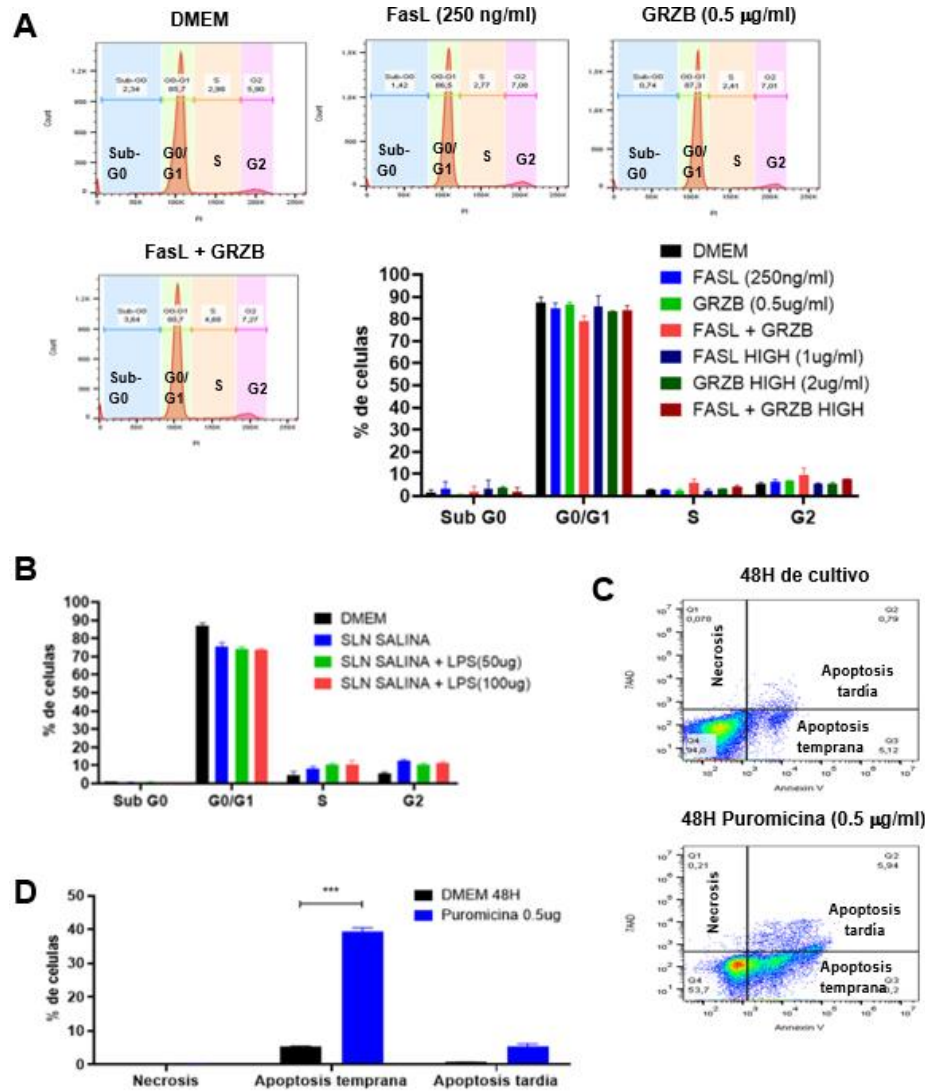
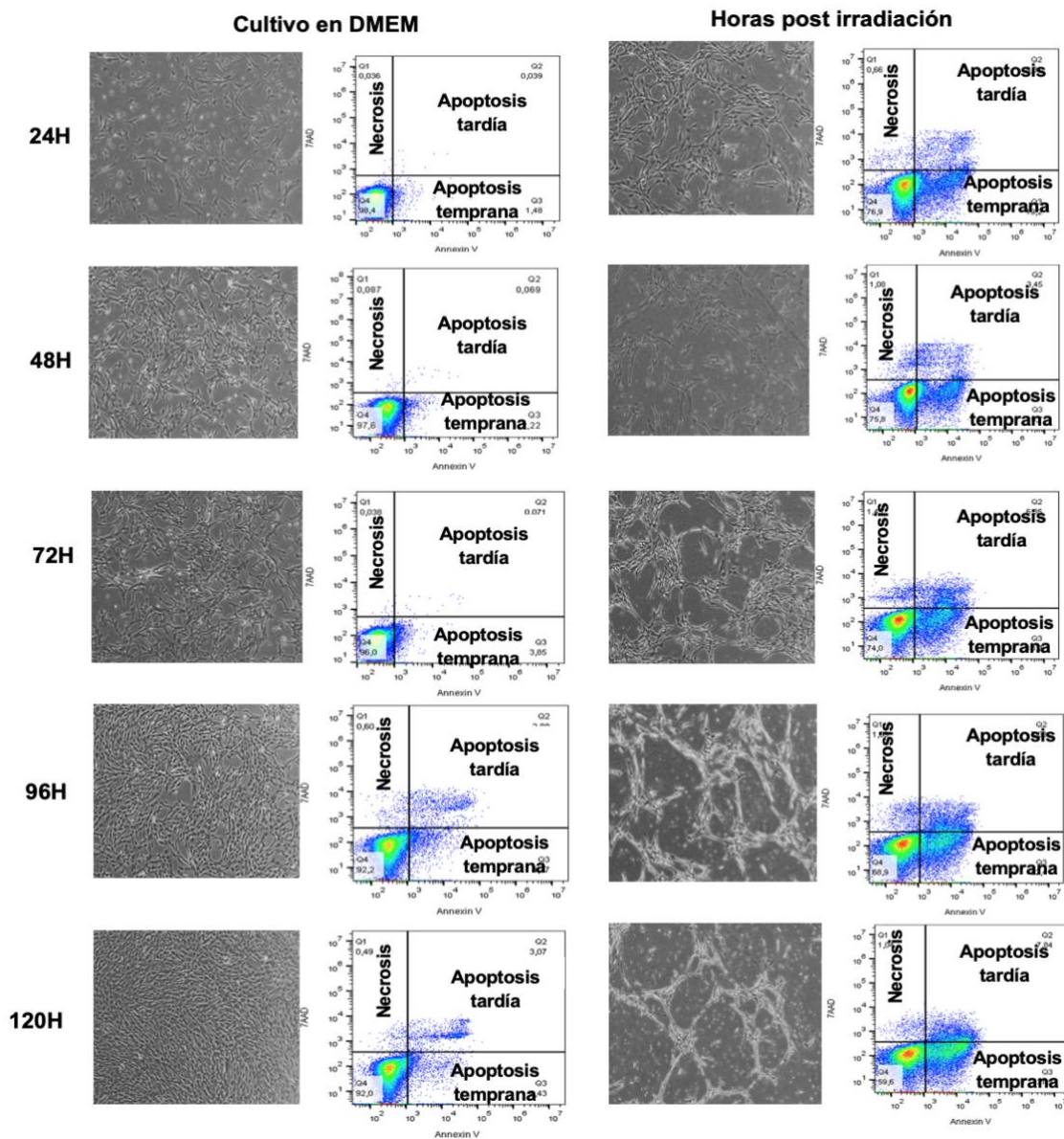


Figura 8. Generación de un modelo *In-vitro* de apoptosis. Las CEM fueron tratadas con estímulos inflamatorios y químicos con el propósito de inducir apoptosis. El tratamiento con FasL activador y Granzima B humana sintética durante 24H de forma individual o combinada, así como en dosis altas (HIGH) y bajas, no logro inducir la fragmentación de DNA cuando se determinó el ciclo celular con PI (A). De forma similar, el tratamiento con LPS durante 24H tampoco consiguió estimular la muerte celular (B). La translocación de la fosfatidilserina y la permeabilidad del 7AAD fue determinada después del tratamiento con puromicina (0.5µg/ml) durante 48 horas (C) y (D). n=4-5 donantes CEM. ***p<0.0002

Debido al poco efecto que tuvieron los estímulos inflamatorios y químicos, se utilizó la irradiación gama dada su relación con la inducción de procesos de muerte inmunogénica y su facilidad al escalar el modelo. Para lo anterior, se realizaron cultivos de CEM en placas de 100mm hasta alcanzar una confluencia del 60-70% y posteriormente se irradiaron con dos ciclos completos a una dosis de 25Gy. Posterior a la irradiación los cultivos se

mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂ hasta su posterior análisis. La valoración del efecto de la irradiación en las CEM se realizó inicialmente por medio de la determinación de la translocación de la fosfatidilserina mediante el marcaje con Anexina V y la pérdida de la integridad de la membrana por medio de la incorporación del 7AAD. El cultivo de 24 horas post irradiación demostró un aumento de células en apoptosis temprana (Anexina V + / 7AAD -) y apoptosis tardía (Anexina V 8+ / 7AAD +) respecto a células sin irradiar cultivadas en DMEM, así mismo, se evidenció pocas células necróticas (Anexina V - / 7AAD -) y un encogimiento de la morfología celular (Fig. 9)



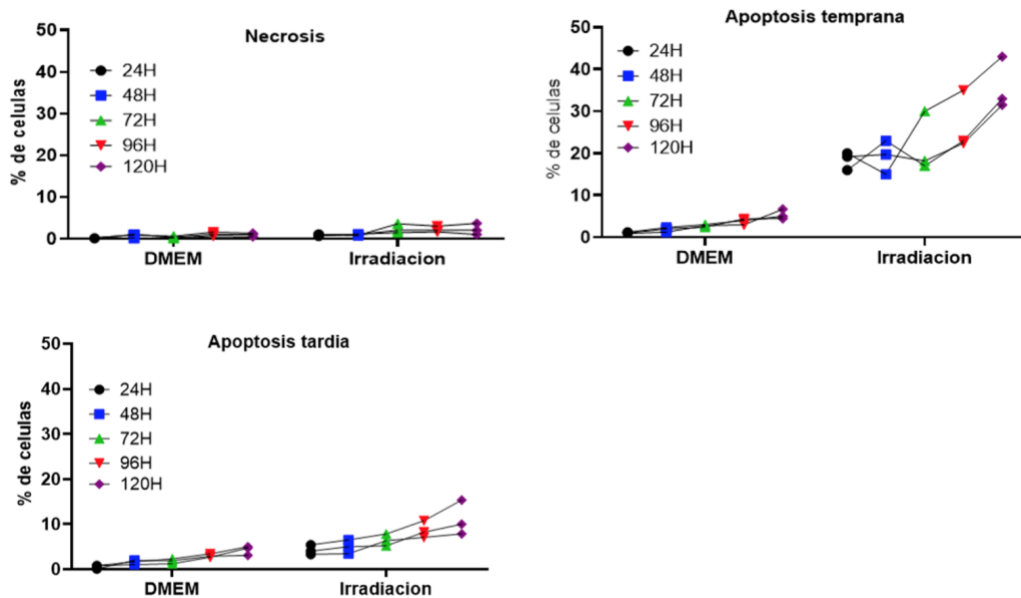


Figura 9. Cambios morfológicos y de membrana en CEM irradiadas. Las CEM fueron sometidas a 2 ciclos completos de irradiación a una dosis de 25Gy. Se evaluó la respuesta de las células al estímulo apoptótico a través de la tinción con Anexina V y 7AAD desde el día 1 hasta el 5 post irradiación, evaluando la translocación de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana, respectivamente. n=3-4 donantes

Estos primeros resultados fueron la motivación para realizar una curva de citotoxicidad para la irradiación y se determinó el momento más adecuado para inducir por lo menos el 50% de células en apoptosis temprana, sin llegar a obtener una gran cantidad de células necróticas. En la curva de citotoxicidad las CEM demostraron ser sensibles a la irradiación de forma progresiva exhibiendo signos característicos de un proceso apoptótico como el encogimiento de la membrana celular, la translocación de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana a partir del día 1 hasta el día 5 de cultivo post irradiación (Fig. 9). A pesar de mostrar rasgos propios de una muerte celular por apoptosis al día 5 post irradiación, las CEM no lograron superar el 40% de células en apoptosis temprana. Teniendo en cuenta lo anterior y que los cuerpos apoptóticos representan el último paso de un proceso apoptótico completo, se evaluó la fragmentación del DNA a partir del día 5 de cultivo post irradiación como un estado intermedio del proceso de muerte celular. La tinción del ciclo celular con PI (Fig. 10 A) y el marcaje de fragmentos de DNA con el ensayo TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) (Fig. 10 B) permitió evaluar de forma precisa la integridad del DNA tanto en los controles como en las CEM post irradiación

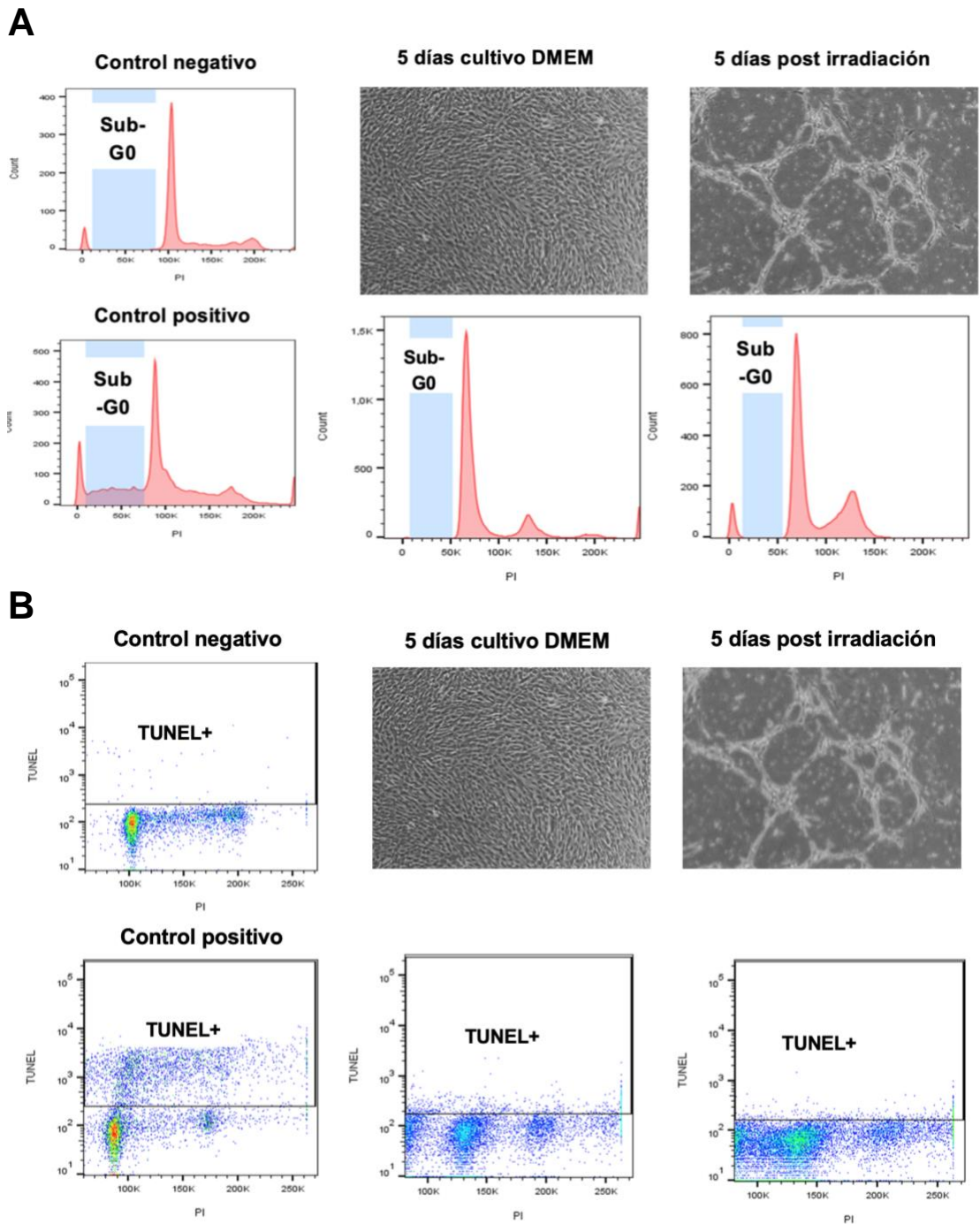
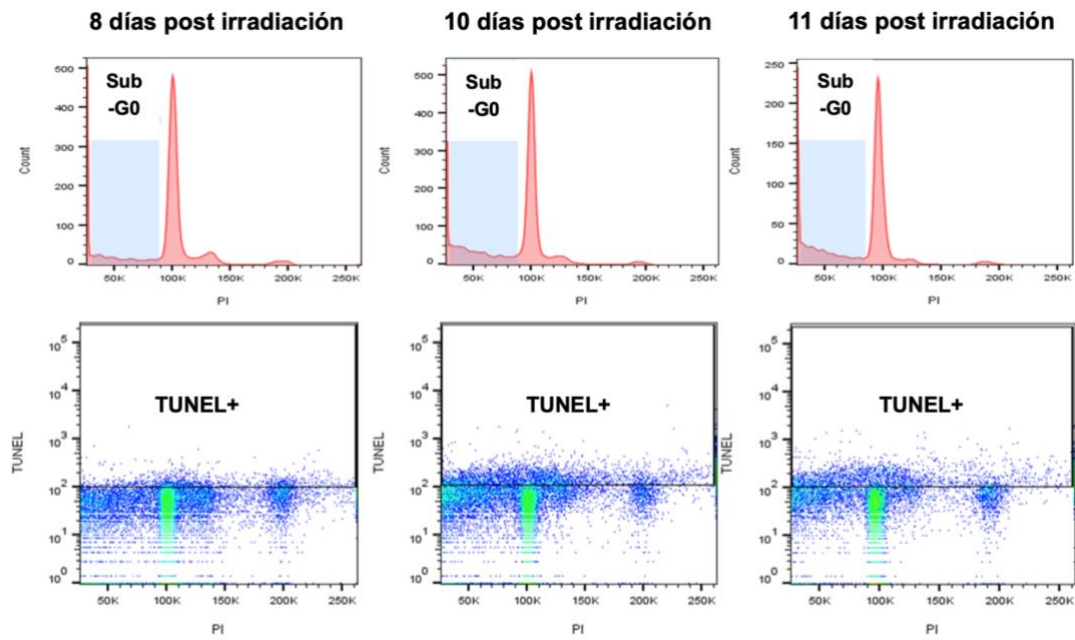


Figura 10. Fragmentación del DNA en CEM irradiadas. Las CEM fueron sometidas a 2 ciclos completos de irradiación a una dosis de 25Gy. La fragmentación del DNA en respuesta a la irradiación en el día 5 se determinó mediante el ciclo celular con PI (A) y el ensayo TUNEL (B) como un signo intermedio de un flujo apoptótico completo. Adicionalmente se observó un cambio en la morfología celular; un desprendimiento y un encogimiento del citoplasma, síntomas característicos de una muerte celular por apoptosis. n=3-4 donantes.

Aunque al día 5 post irradiación las CEM empezaban a expresar marcadores apoptóticos, no fue posible evidenciar la fragmentación del DNA, resultado que permitió inferir que las CEM respondieron de forma progresiva a la irradiación y la aparición de marcadores apoptóticos tardíos estaba ligado al tiempo. Por lo tanto, se evaluó la integridad del DNA en los días 8, 10 y 11 post irradiación (Fig. 11). Fue posible detectar un aumento en la fragmentación del DNA a partir del día 8 post irradiación, sin embargo, desde el día 10 el aumento dejó de ser significativo. Con lo anterior, se confirmó la propiedad de las CEM para responder de forma progresiva a la irradiación y se determinó que la mayor cantidad de AB debía estar en el día 9-10 post irradiación de acuerdo con la expresión de signos de apoptosis tardía.

A



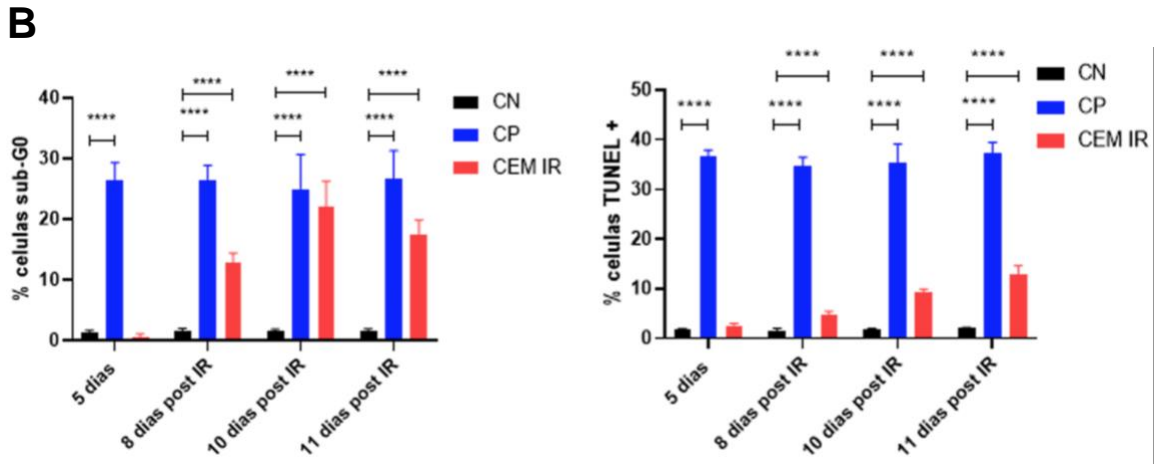
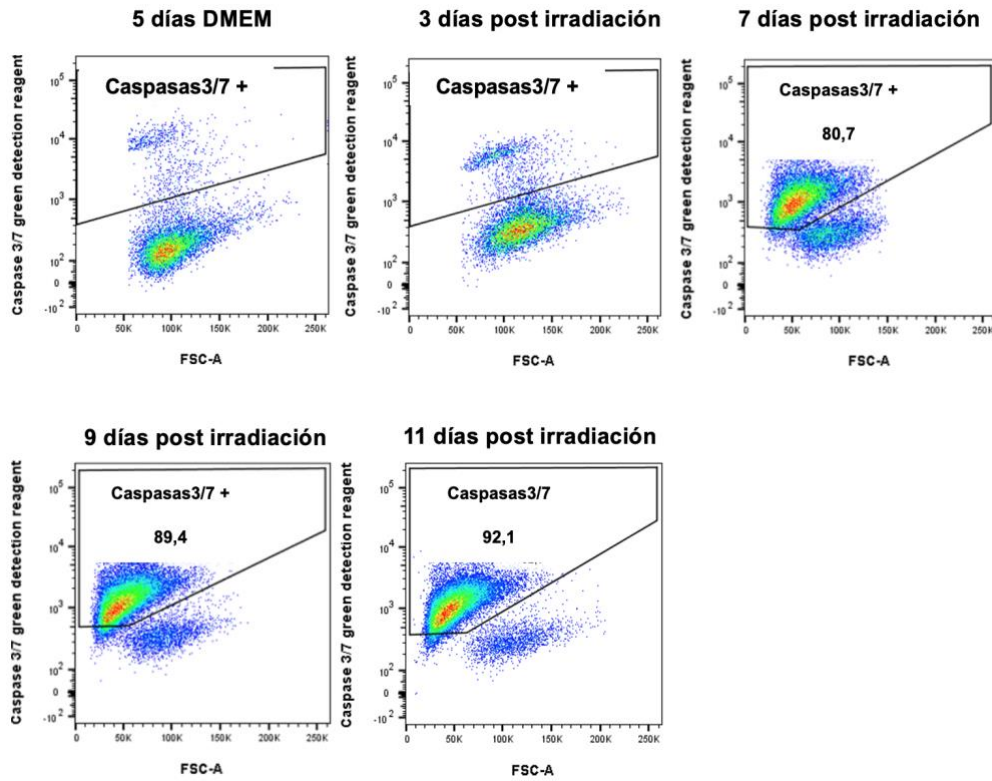


Figura 11. Respuesta de la fragmentación del DNA en CEM irradiadas. Las CEM fueron sometidas a 2 ciclos completos de irradiación a una dosis de 25Gy. Teniendo en cuenta que al día 5 post irradiación no se evidencio un alto grado de fragmentación, se evaluó la respuesta en los días 8,10 y 11 post irradiación mediante la tinción con PI y la técnica TUNEL (A) y (B). n=3-4 donantes CEM. *p<0.0304; ***p<0.0002; ****p<0.0001

Por último y como signo propio de una muerte celular por apoptosis, se determinó mediante citometría de flujo la activación de las caspasas efectoras 3 y 7. La activación de las endonucleasas y la consecuente fragmentación del DNA depende de la activación de las caspasas efectoras, motivo por el cual, se evaluó la activación de estas proteasas en días intermedios en los que se había analizado la integridad del DNA. Es decir, para los días 3, 7, 9, 11 post irradiación se realizó una curva de activación de caspasas. La actividad enzimática basal de las caspasas se determinó en un cultivo de CEM de 5 días en medio DMEM completo. A partir del día 3 post irradiación se evidenció un aumento de la actividad enzimática de las caspasas, sin embargo, solo un aumento significativo fue determinado desde el día 7 post irradiación. Así mismo, desde el día 9 post irradiación el aumento de la actividad enzimática dejó de ser relevante y en algunos casos empezó a disminuir (Fig 12 A). Adicionalmente, se logró evidenciar que la dinámica y velocidad de muerte de los donantes no es igual en todos los casos. El donante CEM-GW- 195 respondió de forma más lenta a la irradiación mostrando una menor cantidad de células con caspasas activadas. Sin embargo, cuando se normalizaron los datos mediante el MFI se evidenció que la actividad enzimática era muy similar entre todos los donantes (Fig. 12 B).

A



B

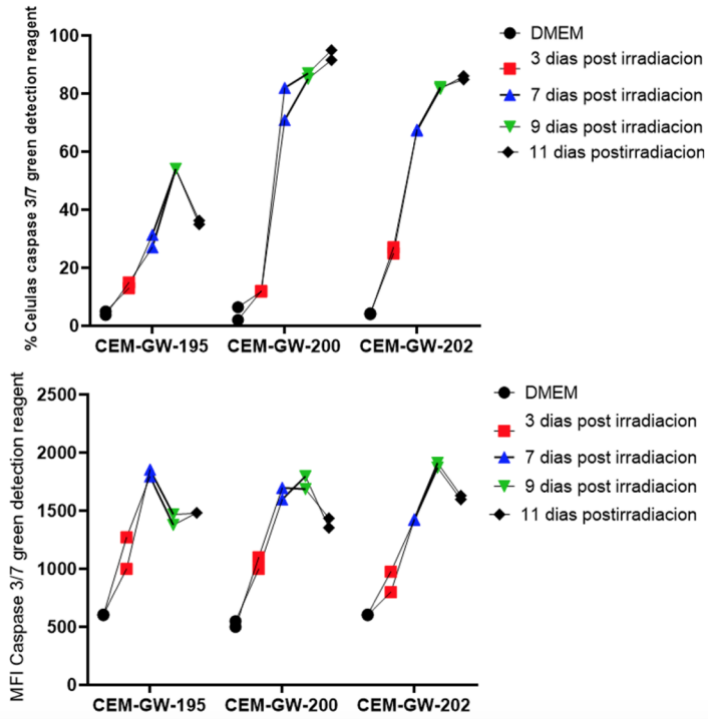


Figura 12. Curva de respuesta de la fragmentación del DNA en CEM irradiadas.

Las CEM fueron sometidas a 2 ciclos completos de irradiación a una dosis de 25Gy. Se cuantificó la activación de las caspasas 3/7 como signo distintivo de una muerte celular por apoptosis mediante el uso del sustrato fluorogénico caspase detection green reagent en los días 3, 7, 9 y 11 post irradiación (A). La actividad enzimática se normalizo mediante el MFI (B). n=3-4 donantes CEM.

Con base en los resultados generados para las células irradiadas, se estableció un modelo *in vitro* de apoptosis que permitió conocer el comportamiento de muerte por irradiación en las CEM. El modelo permitió establecer la siguiente dinámica de muerte celular para las CEM en respuesta a la irradiación; Las CEM viables son sometidas a 2 ciclos completos de irradiación a una dosis de 25Gy, al día 5 post irradiación empieza a verse alterada la morfología celular con un encogimiento de la membrana, una permeabilidad celular baja, translocación de fosfatidilserina significativa y la actividad de las caspasas 3/7 reducida. Al día 7 post irradiación los signos y marcadores apoptóticos son significativos; se aumenta la permeabilidad celular y la consecuente pérdida de la integridad de la membrana, se mantiene una translocación significativa de la fosfatidilserina, se fragmenta el DNA y la actividad de las caspasas 3/7 aumenta. Con lo anterior, de forma teórica se estimó que el empaquetamiento y liberación de los AB-CEM debía estar a partir del día 8 post irradiación (Fig. 13).

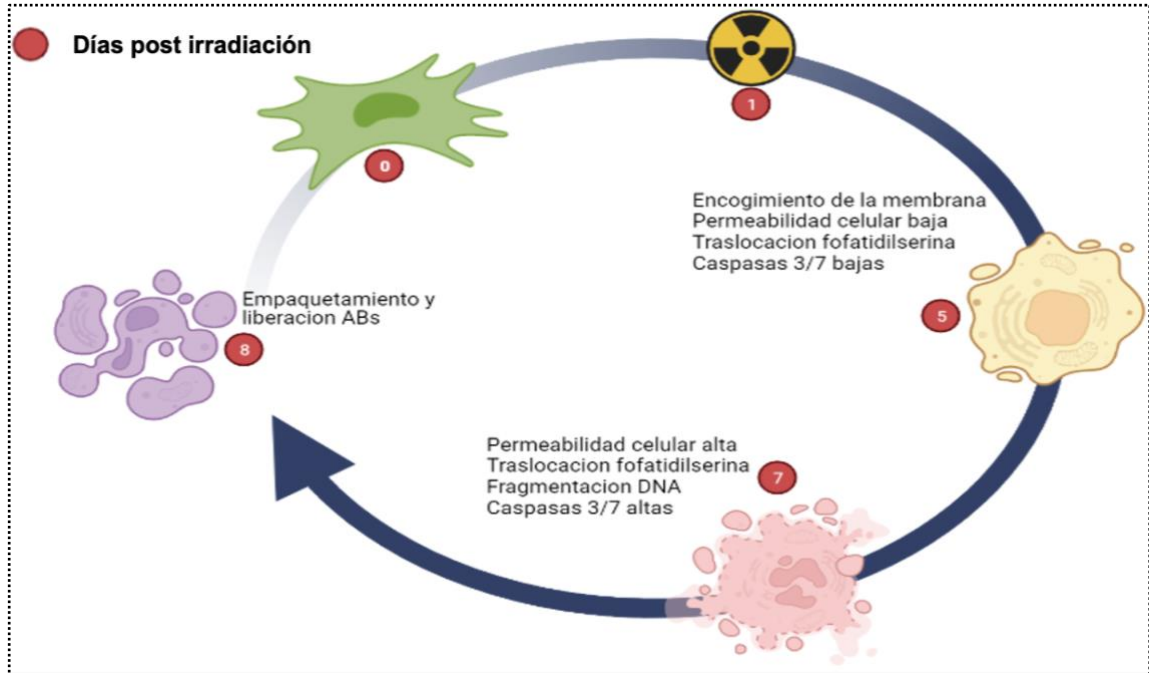
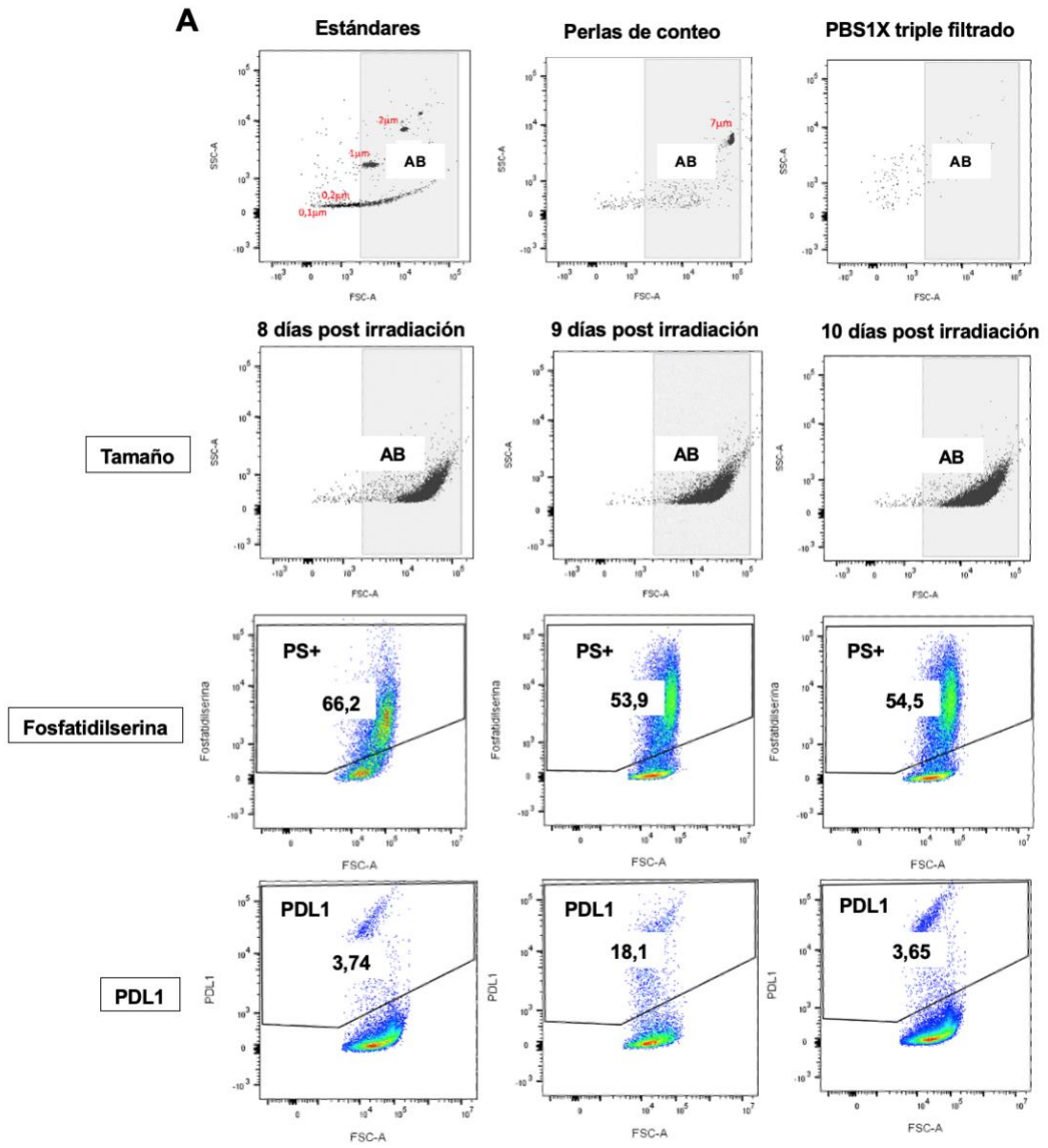


Figura 13. Modelo *in-vitro* de apoptosis. Se utilizó la irradiación gama como estímulo para la generación de un modelo *in-vitro* de apoptosis que permitió enriquecer y caracterizar los cuerpos apoptóticos.

3.2 Las células estromales mesenquimales secretan cuerpos apoptóticos de 1000-5000nm que expresan marcadores funcionales.

Una vez estandarizado el modelo para la generación y evaluación de apoptosis en las CEM, se enriquecieron y caracterizaron los AB-CEM a partir de los sobrenadantes de cultivo de células irradiadas en los días 8, 9 y 10 post irradiación (Fig. 14). Con este propósito, se obtuvo la fracción de AB-CEM mediante un protocolo de centrifugación diferencial clásico que permitió enriquecer fracciones de tamaños de 1000-5000nm. Los cuerpos apoptóticos se concentraron 100x en DMEM completo de acuerdo con su volumen inicial para su conteo y caracterización. Para el conteo, inicialmente se determinó el tamaño de la fracción enriquecida por medio de estándares de tamaño específico (100nm, 200nm, 1000nm, 2000nm, 7000nm) y PBS1X triple filtrado para la correcta limpieza del equipo (Fig. 14A). Una vez caracterizado el tamaño de la fracción se realizó el conteo por medio de citometría de flujo con la ayuda de perlas de conteo. Los conteos demostraron que a partir del día 8 post irradiación la generación de AB-CEM se aumentó de forma

considerable respecto a células cultivadas durante 5 días en DMEM completo. A pesar de que en el día 10 post irradiación también se logró cuantificar una cantidad considerable de AB-CEM, el promedio de los conteos entre donantes no demostró una diferencia significativa respecto a los días 8 y 9 post irradiación (Fig. 14B). Sin embargo, para la realización de los ensayos inmunes se utilizaron los cuerpos apoptóticos obtenidos de células cultivadas durante 10 días post irradiación de acuerdo con los datos obtenidos en el modelo *in-vitro* y en que la respuesta a la irradiación de algunos donantes fue más lenta. Para la caracterización, primero se evaluó la expresión de fosfatidilserina (PS+) en la superficie de los AB-CEM mediante la tinción con un anticuerpo ya que este es más sensible que la tinción con Anexina V (Fig. 14A). Dentro de la fracción de AB-CEM obtenida se pudo evidenciar un porcentaje significativo que expresaba fosfatidilserina respecto a el control de células cultivadas en DMEM completo, sin embargo, esta expresión fue heterogénea entre los donantes en cuanto al número de cuerpos PS+, no obstante, el porcentaje de cuerpos PS+ se mantuvo entre el 20-66% del total (Fig. 14C). Adicional a la fosfatidilserina, se determinó si los AB-CEM podían expresar marcadores funcionales que ya han sido descritos como potentes inmunosupresores en las CEM, para lo cual se estimó la expresión de PDL-1 sobre los AB-CEM. Al igual que la fosfatidilserina, la expresión de PDL-1 fue enriquecida en los AB para las células irradiadas en contraste con las células cultivadas en DMEM durante 5 días, sin embargo, a pesar de ser una expresión heterogénea, el porcentaje de AB PDL-1+ estuvo alrededor del 20%. Estos conteos y caracterizaciones se realizaron en todas las fracciones obtenidas previo a los ensayos funcionales (Fig. 14D).



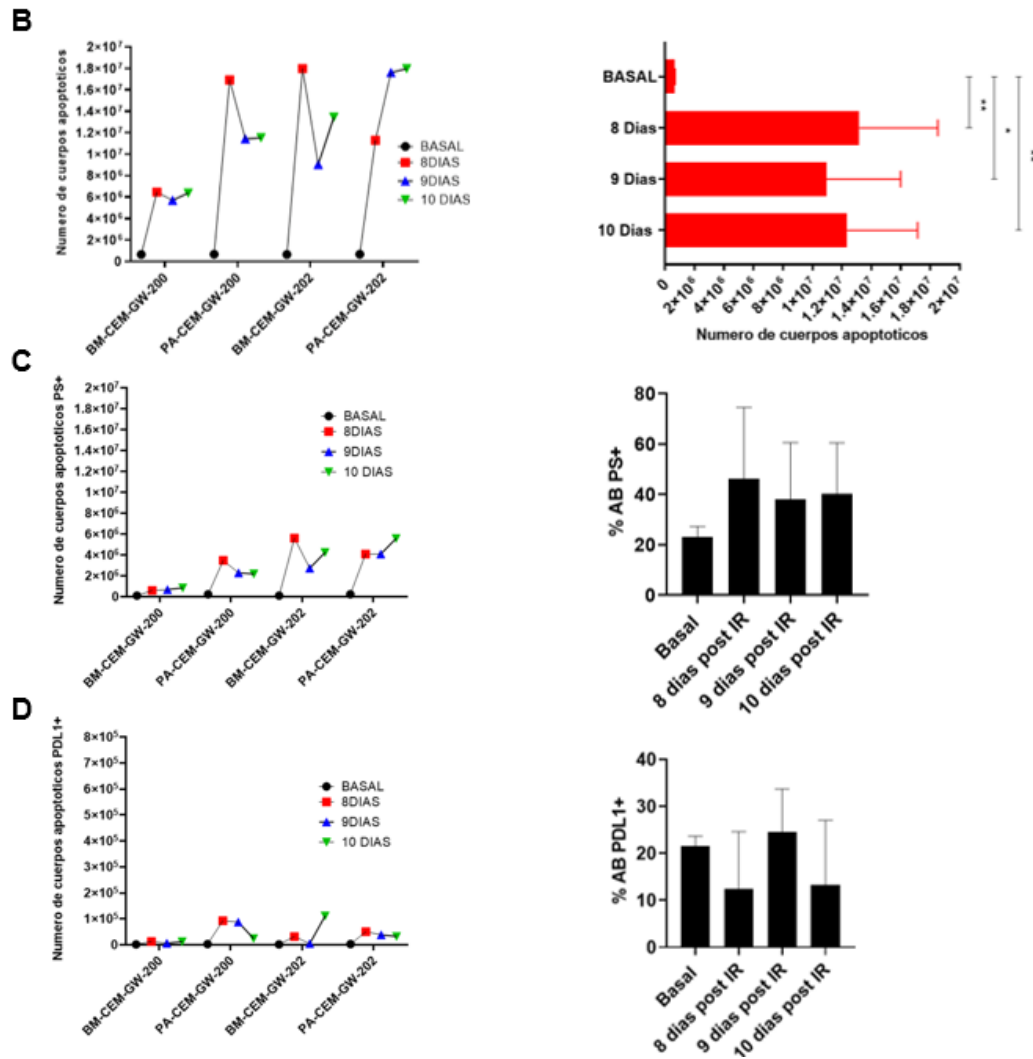


Figura 14. Conteo y caracterización cuerpos apoptóticos CEM (AB-CEM). Los AB-CEM se obtuvieron a partir del sobrenadante de cultivos de CEM irradiados a los 8, 9 y 10 días post irradiación. La fracción enriquecida mediante un protocolo de centrifugación diferencial convencional logró enriquecer AB de 1000nm-5000nm. Adicionalmente, se determinó que los CEM-AB expresaban fosfatidilserina y PDL-1 en la superficie (A). Se encontró diferencias del número de CEM-AB entre los donante (B). El conteo de CEM-AB que expresaban fosfatidilserina (C) y PDL-1 (D) fue heterogéneo y no representó toda la fracción obtenida. n=4 donantes CEM. *p<0.0304; **p<0.0010.

3.3 Los cuerpos apoptóticos de células estromales mesenquimales inducen la reprogramación de monocitos/macrófagos CD14+ e inducen un fuerte fenotipo inmunomodulador.

La fracción de cuerpos apoptóticos obtenida demostró tener un potencial inmunomodulador de acuerdo con las moléculas de superficie determinadas; por su parte la fosfatidilserina promueve la fagocitosis por parte de fagocitos profesionales como los macrófagos y PDL-1 puede inducir un efecto inmunosupresor directo en células T. Adicionalmente, dada la capacidad reguladora de las CEM, los cuerpos apoptóticos son vesículas extracelulares que pueden transmitir su efecto inmunomodulador. En ese sentido, se investigó el efecto inmunomodulador de los cuerpos apoptóticos mediante ensayos inmunes *in-vitro* determinando su acción directa en células CD3+ y por otro lado su efecto sinérgico con células del linaje monocito/macrófago CD14+ humanas.

La capacidad de los cuerpos apoptóticos para empaquetar y cargar en la superficie moléculas funcionales les confiere la posibilidad de tener un efecto directo en la célula mediante el contacto AB-célula (Fig. 15). Los co-cultivos en relación 3:1 de AB-CEM y PBMCs activadas con perlas α CD3/ α CD28 demostraron que los cuerpos apoptóticos no tuvieron la capacidad de inhibir la proliferación de células CD3+ de forma directa, en relación con CEM viables. Este efecto no cambió aumentando la cantidad de AB-CEM en relación 10:1, por el contrario, la consecuencia fue estimular la proliferación en relación con la activación de PBMCs.

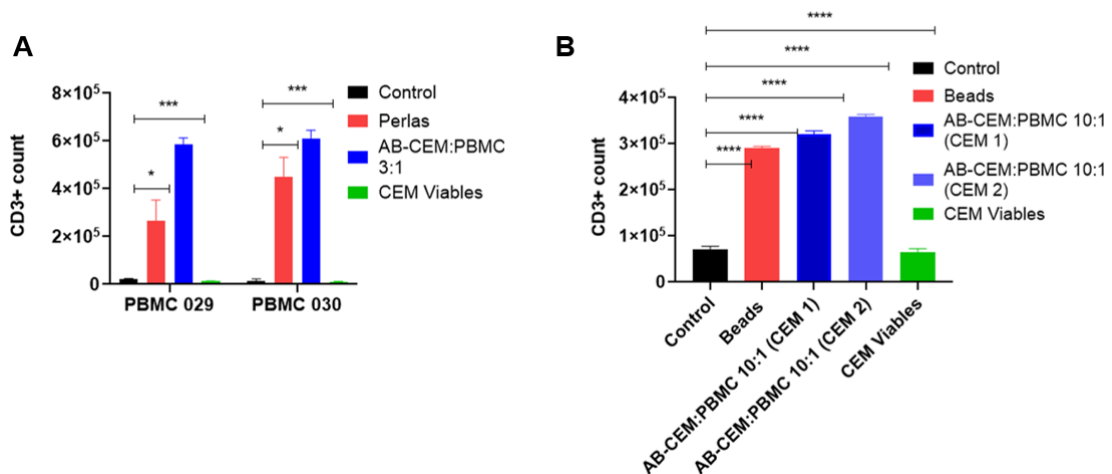
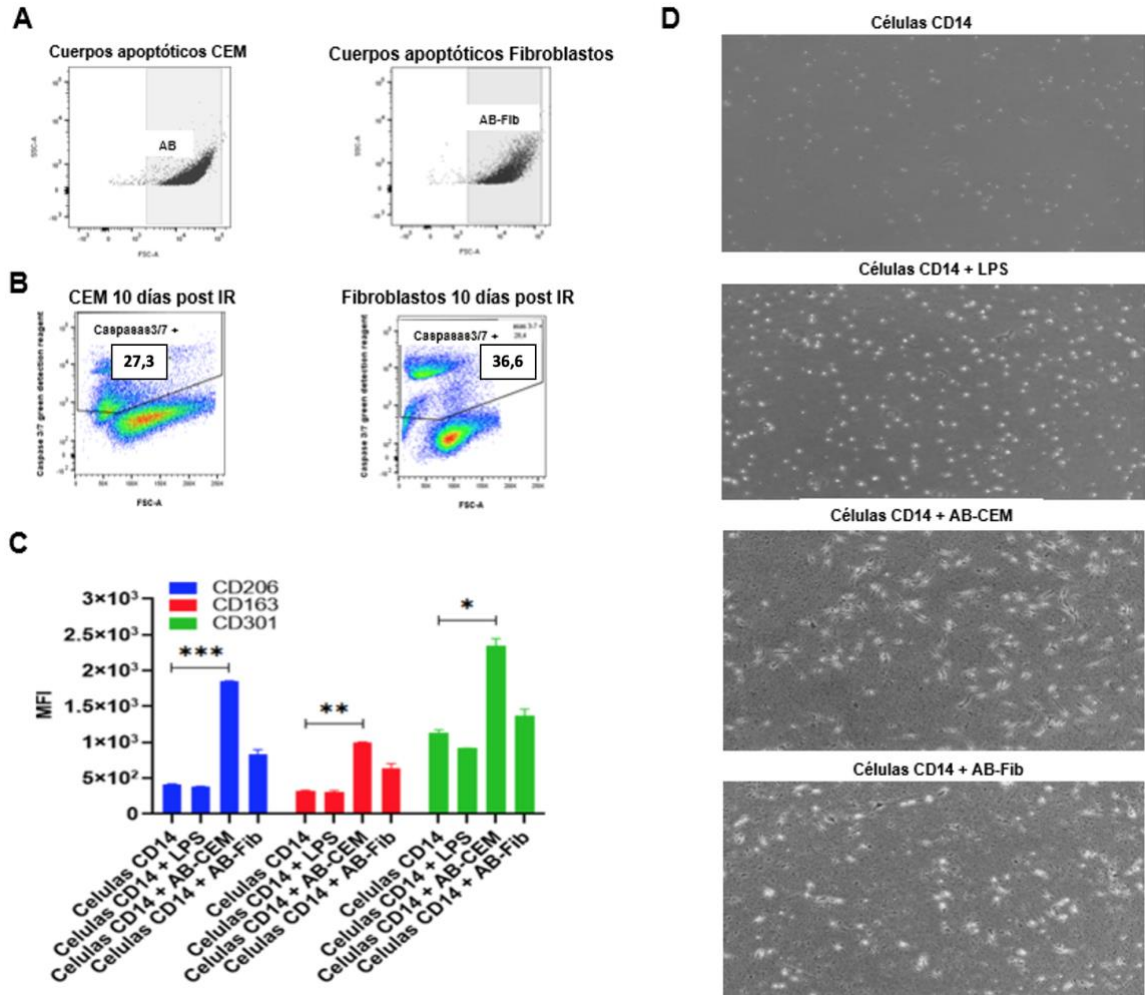


Figura 15. Evaluación del efecto inmunomodulador de los AB-CEM sobre PBMCs. Se evaluó el efecto directo en células T de la fracción de AB-CEM. El co-cultivo de AB-CEM con PBMCs activadas (α CD3/ α CD28) evidenció que los cuerpos apoptóticos no tuvieron la capacidad de inhibir la proliferación de poblaciones CD3+ mediante el contacto directo en relación 3:1 (A) y 10:1 (B). El conteo de poblaciones CD3+ totales se realizó mediante perlas de conteo en citometría, realizando un conteo de solo las poblaciones CD3+ y su efecto en cada grupo experimental * $p < 0.0304$; *** $p < 0.0002$; **** $p < 0.0001$.

Estos resultados preliminares indicaron que un potencial efecto inmuno-modulador de AB derivados de CEM no estaría asociado con la inhibición directa de linfocitos T activados. Previamente hemos hipotetizado que las CEM pueden generar señales moleculares que podrían reprogramar la función de otros tipos celulares, principalmente monocitos/macrófagos. En este sentido estas células pueden generar un efecto amplificador de regulación de respuestas inmunes generado a partir de CEM. En línea con lo anterior, se generó un modelo de inmunosupresor sinérgico de los cuerpos apoptóticos con células fagocíticas basadas en el pre-condicionamiento de células CD14+ humanas con AB. De interés, se generaron AB de la línea de fibroblasto de pulmón humano MRC-5, con el fin de constatar la actividad biológica de AB-CEM con un tipo de AB derivado de linaje mesenquimal (fibroblastoide). De este modo AB-CEM y AB-Fib generados de cultivos sometidos a IR fueron enriquecidos y cuantificados (Fig. 16. A y B). Posteriormente, las células CD14+ seleccionadas con microperlas magnéticas se co-cultivaron junto con AB-CEM y AB-Fib en relación 10:1 durante 5 días. Los AB-CEM indujeron la reprogramación de monocitos/macrófagos CD14+ humanos modificando su morfología hacia un tipo macrófago y aumentaron la expresión de marcadores tipo M2 como CD206, CD163, CD301 (Fig. 16. C y D). Esta polarización fue solo significativa en el tratamiento con AB-CEM, los AB-Fib y el LPS no lograron inducir el aumento en la expresión de los marcadores de las células CD14+ al nivel de los cuerpos apoptóticos de CEM. Teniendo en cuenta la capacidad de los AB-CEM para inducir la reprogramación de las células CD14+ hacia un fenotipo más regulador tipo M2, se evaluó si estas células condicionadas eran funcionales y tenían la capacidad de inhibir la proliferación de poblaciones CD3+. Con este propósito, las células CD14+ condicionadas con AB se retaron con PBMCs activadas con α CD3/ α CD28. De forma interesante, los monocitos/macrófagos condicionados con AB-CEM tuvieron la capacidad de inhibir la proliferación de células CD3+ activadas (>90%) en comparación con

monocitos/macrófagos solos (25%), condicionados con AB-Fibroblatos (50%) y activados con LPS (20%) (Fig. 16. E y F). Adicionalmente, se demostró que el perfil regulador adquirido por los monocitos/macrófagos después del acondicionamiento con AB-CEM también incluyó la sobreexpresión de puntos de control inmunológicos como PDL-1 (Fig. 16. G).



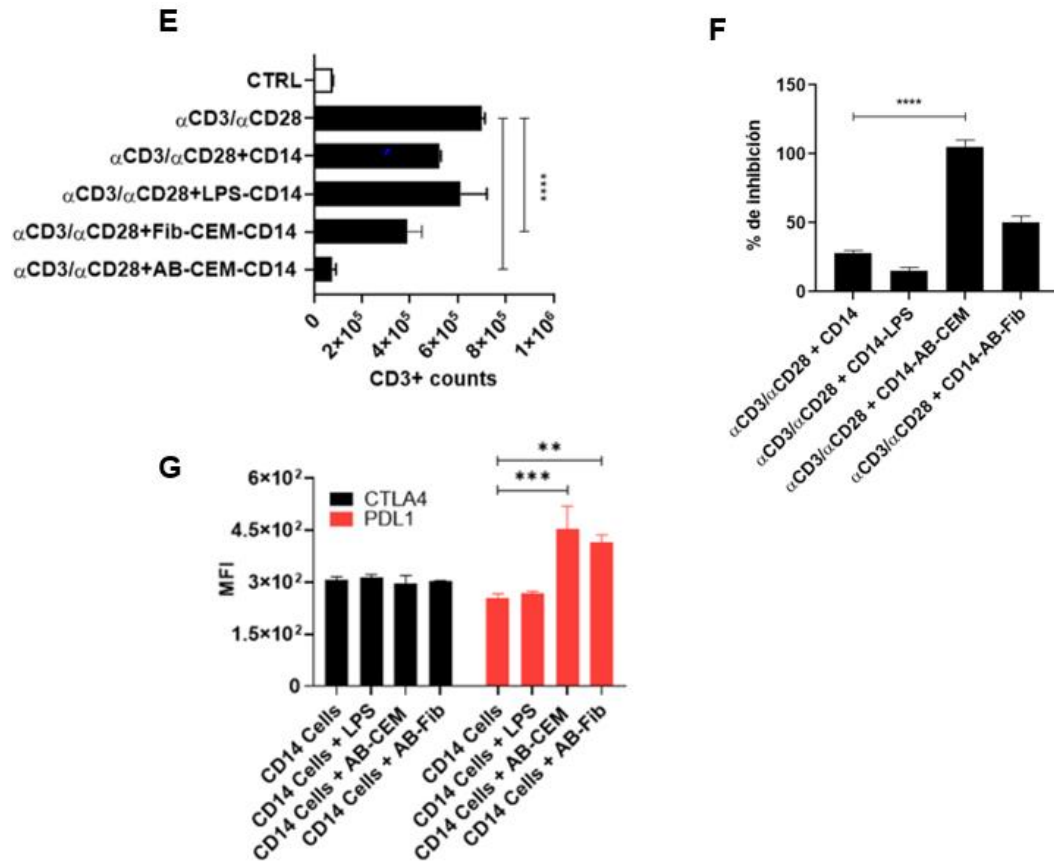


Figura 16. Evaluación del efecto inmunomodulador de los AB-CEM en monocitos/macrófagos humanos. Se enriquecieron AB-CEM y AB-Fib (A) del sobrenadante de cultivos irradiados (B) para evaluar su acción sinérgica. El acondicionamiento de monocitos/macrófagos CD14+ humanos con AB-CEM demostró la capacidad de los cuerpos apoptóticos para inducir un fenotipo regular en las células CD14+ en términos de expresión de marcadores tipo M2 (C). Adicionalmente, se observó cambios en la morfología caracterizado por un encogimiento del citoplasma y una disminución del tamaño celular (D). La capacidad inmunosupresora de las células CD14+ condicionadas con AB-CEM fue evaluada mediante la inhibición de la proliferación de células CD3+ (E y F). Por último, se determinó la expresión de moléculas funcionales como CTLA4 y PDL-1 en los monocitos/macrófagos condicionados con AB-CEM (G). * $p < 0.0304$; ** $p < 0.0010$; *** $p < 0.0002$; **** $p < 0.0001$

La secreción de citocinas anti-inflamatorias y factores de crecimiento es una de las respuestas de las células fagocíticas a los cuerpos apoptóticos. De forma similar, la secreción de citocinas anti-inflamatorias también representa uno de los mecanismos de las CEM viables para la inmunomodulación. En ese sentido, inicialmente se caracterizó el perfil del secretoma para CEM viables durante un proceso de inmunomodulación como un control del ensayo y del efecto de células vivas. Las CEM viables (CEM) secretan un pool

de citocinas anti-inflamatorias y se diferencian del perfil de células mononucleares solas (CTRL) y activadas con beads (BEADS) (Fig. 17 A y B). Durante la inmunomodulación las CEM secretaron factores anti-inflamatorios como IL-4, IL- 10, IL-13, entre otros. Así mismo, se enriqueció la expresión de factores de crecimiento como GM-CSF, FGFb, G-CSF, VEGF (Fig. 17 C).

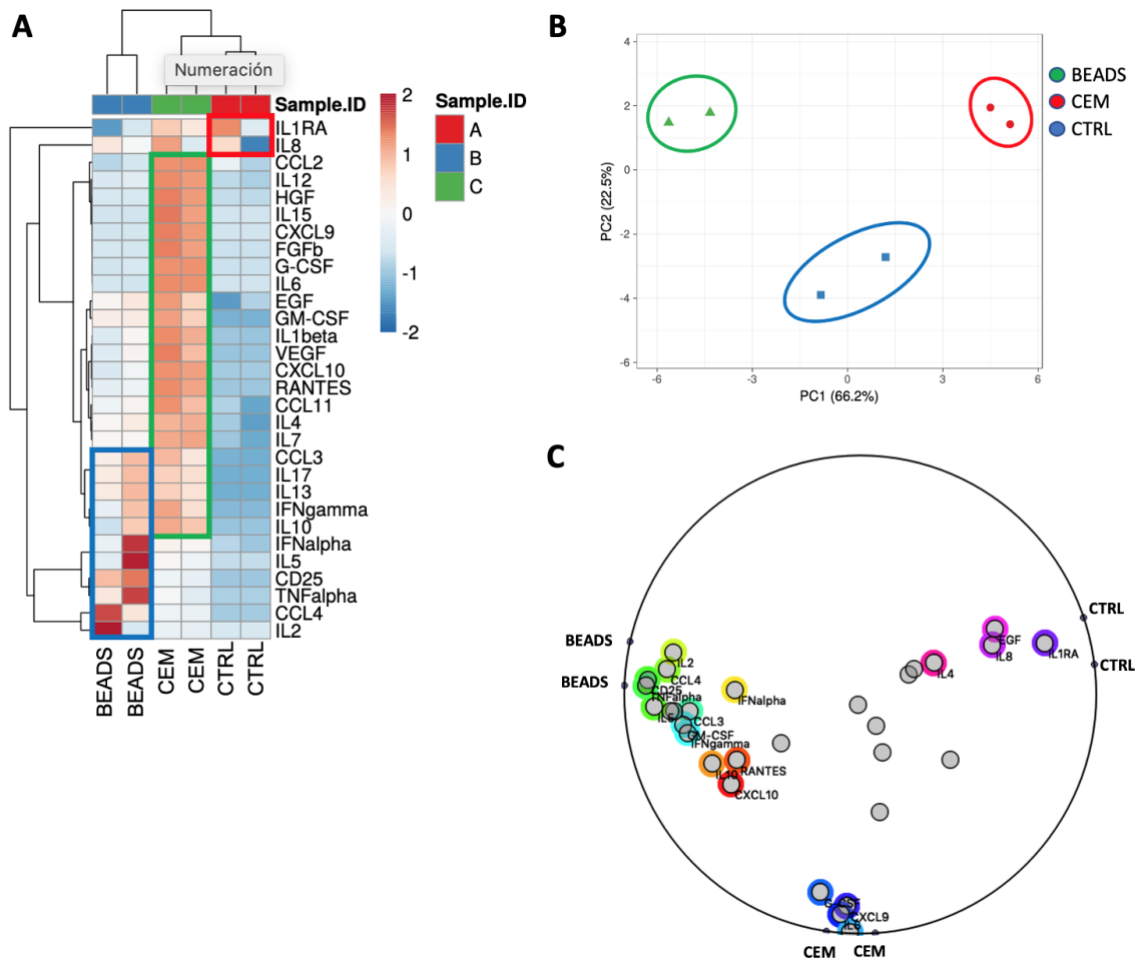


Figura 17. Secretoma CEM viables durante inmunomodulación. Se determinó el secretoma de CEM viables durante un ensayo de inmunomodulación como control del efecto biológico y del ensayo. Las CEM viables (CEM) secretan citocinas anti-inflamatorias y factores de crecimiento cuando son co-cultivadas con PBMCs activadas (A y B). El perfil de secretoma diferencia de forma clara a las PBMCs activadas + CEM (CEM), respecto a PBMCs no activadas (CTRL) y PBMCs activadas (BEADS). El grupo experimental con CEM distribuye de forma diferencial algunos factores y citocinas (C).

Por otro lado, se determinó si las CEM en respuesta a la IR adquieren un perfil de secretoma propio en comparación con otras células de origen similar como los fibroblastos y células viables, enriqueciendo factores que posteriormente pudieron ser empaquetados y entregados en forma de AB-CEM a las células CD14+ humanas (Fig. 18). La IR logró promover la secreción y acumulación de factores en el grupo de células irradiadas en relación con células cultivadas en condiciones basales (BF y BC), tanto en CEM (IC) como en Fibroblastos (IF). Sin embargo, la respuesta de las CEM a la IR demostró ser heterogénea y dependiente del donante. Como se evidenció en el modelo de apoptosis, no todas las CEM responden de la misma forma a un estímulo apoptótico y la tasa de muerte también varía entre donantes, con lo cual la acumulación de factores fue diferente entre lotes. Sin embargo, se observó una clara agrupación entre clusters (dendrograma) que denota una marcada segregación del grupo de CEM irradiadas, con respecto a los fibroblastos post-IR (Fig. 18 A). Una vez se homogenizó el grupo de las CEM, se evidenció que la IR promovió una respuesta en términos de secreción de moléculas diferente para las CEM en comparación con Fibroblastos (Fig. 18 B). Las CEM en respuesta a la IR aumentaron significativamente la secreción de factores como CD25, G-CSF, IFN-alpha, CCL4, GM-CSF, entre otros. En el caso de los Fibroblastos solo se observó una acumulación de CXCL10, diferenciando de forma clara el perfil de secreción de las CEM en respuesta a la IR (Fig. 18 C).

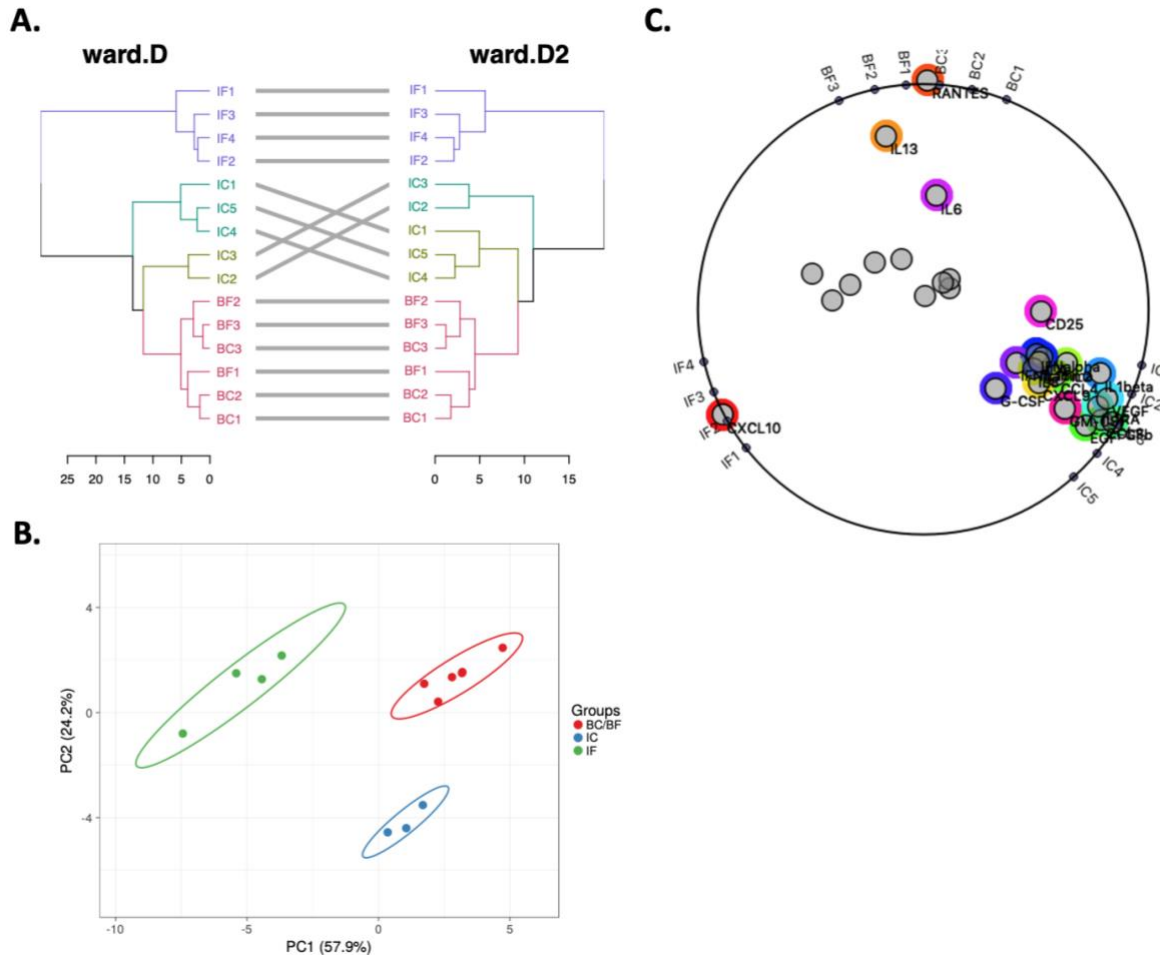


Figura 18. Impacto de la IR sobre el secretoma de CEM. Se determinó la secreción diferencial de citocinas y factores de crecimiento de CEM en respuesta a la IR. Inicialmente, se evaluó el impacto de la IR en CEM (IC) y fibroblastos (IF) mediante el Dendograma comparativo de los algoritmos ward.D y ward.D2, en comparación con CEM (BC) y Fibroblastos (BF) viables (A). Posteriormente, se homogenizaron los grupos CEM y se evaluó la diferencia a partir del análisis de componentes principales PCA (B). Finalmente, se evaluó por separado la distribución de las diferentes moléculas entre cada uno de los grupos experimentales mediante el algoritmo RadViz (C).

Una vez caracterizado el impacto de la IR sobre las CEM, se evaluó si el secretoma de los monocitos/macrófagos humanos condicionados con AB-CEM presentaría una diferencia con respecto a las células condicionadas con AB-Fib o LPS. Nuevamente el perfil de expresión de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento derivados de monocitos/macrófagos tratados con AB-CEM (AB-Cem) fue distinto al observado en las células tratadas con LPS (LPS) o AB-Fib (AB-Fib) (Fig. 19 A). El condicionamiento con AB-CEM promovió una secreción representativa de moléculas como IL1beta, RANTES, FGFB,

HGF, lo cual no se logró observar en las células tratadas con AB-Fib y LPS (Fig. 19 B). Con el análisis lineal pareado (LDA) se estimó la probabilidad de que una observación, es decir cada uno de los factores significativos del RadViz pertenezca a cada una de las clases o grupos experimentales, lo que valida la significancia de los factores asociados al tratamiento con AB-CEM (AB-Cem). Cada color representa una región de clasificación acorde al modelo (es decir, cada grupo experimental), se muestra el centroide de cada región y el valor real de las observaciones (Fig. 19 C). De este modo, los AB-CEM inducen un fenotipo de monocito/macrófago distintivo, que de acuerdo con su perfil de expresión de marcadores y de secreción de factores solubles correspondientes con respuestas inmuno-moduladoras y de homeostasis tisular del tipo II

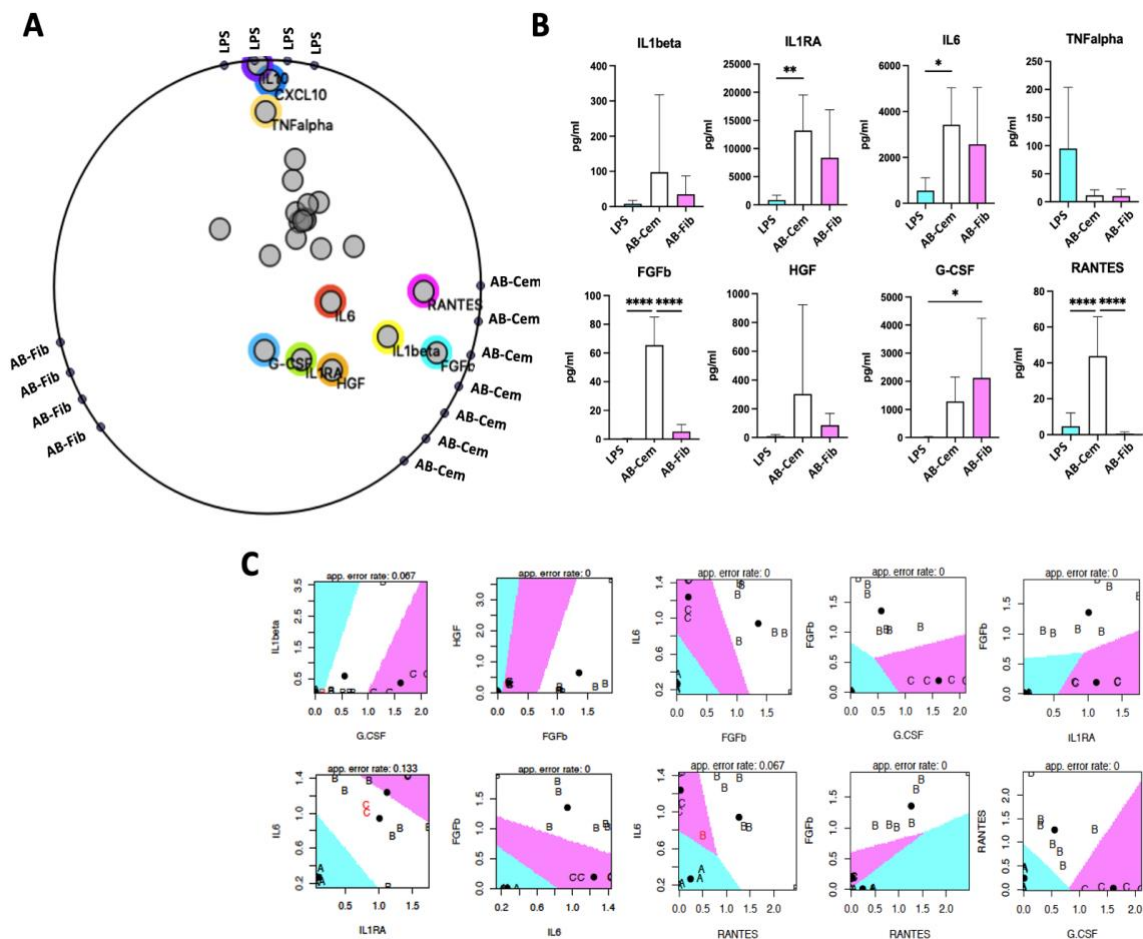


Figura 19. Secretoma de células CD14+ condicionadas con AB-CEM. Se evaluó si los AB-CEM tuvieron la capacidad de promover la secreción diferencial de citocinas y factores de crecimiento en las células CD14+ humanas condicionadas. El algoritmo RadViz demostró que la distribución de algunas moléculas es propia del tratamiento con

AB-CEM (AB-Cem), en comparación con AB-Fib (AB-Fib) y LPS (LPS) (A). De acuerdo con lo anterior, se evaluó la concentración diferencial del set de citoquinas más representativo: IL1beta, IL1RA, IL6, RANTES, FGFb, G-CSF, HGF, TNF- α (B). Finalmente, se realizó un análisis discriminante lineal pareado según el set de citoquinas más representativo para determinar la probabilidad de pertenecer a cada grupo experimental (C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Dado que los monocitos/macrófagos humanos condicionados tuvieron la capacidad de inhibir la proliferación de células CD3+ por encima del 90%, se determinó si este efecto inhibitorio estuvo acompañado de un perfil diferencial en el secretoma (Fig. 20). Se evidenció que los monocitos/macrófagos condicionados con AB-CEM (AB-Cem) lograron una distribución diferencial de algunos factores de crecimiento en comparación con el tratamiento de AB-Fib (AB-Fib) y LPS (LPS) (Fig. 20 A). En los sobrenadantes de cocultivos donde se evidenció una inhibición de células CD3+ mediante monocitos/macrófagos condicionados con AB-CEM, se promovió una secreción de IL1RA, G-CSF, CCL3, IL6, TNF- α , IL1beta, en comparación con los AB-Fib y LPS (Fig. 20 B). El tratamiento con LPS y AB-Fib no tuvo un efecto inhibitorio sobre la proliferación de células T, efecto que se trasladó al secretoma debido a que no se observó una acumulación diferencial significativa de factores y citocinas respecto al tratamiento con AB-CEM. Finalmente, el (LDA) ayudo a determinar de forma más robusta los factores que bajo un modelo estadístico están más probablemente asociados al tratamiento con AB-CEM (Fig. 20 C).

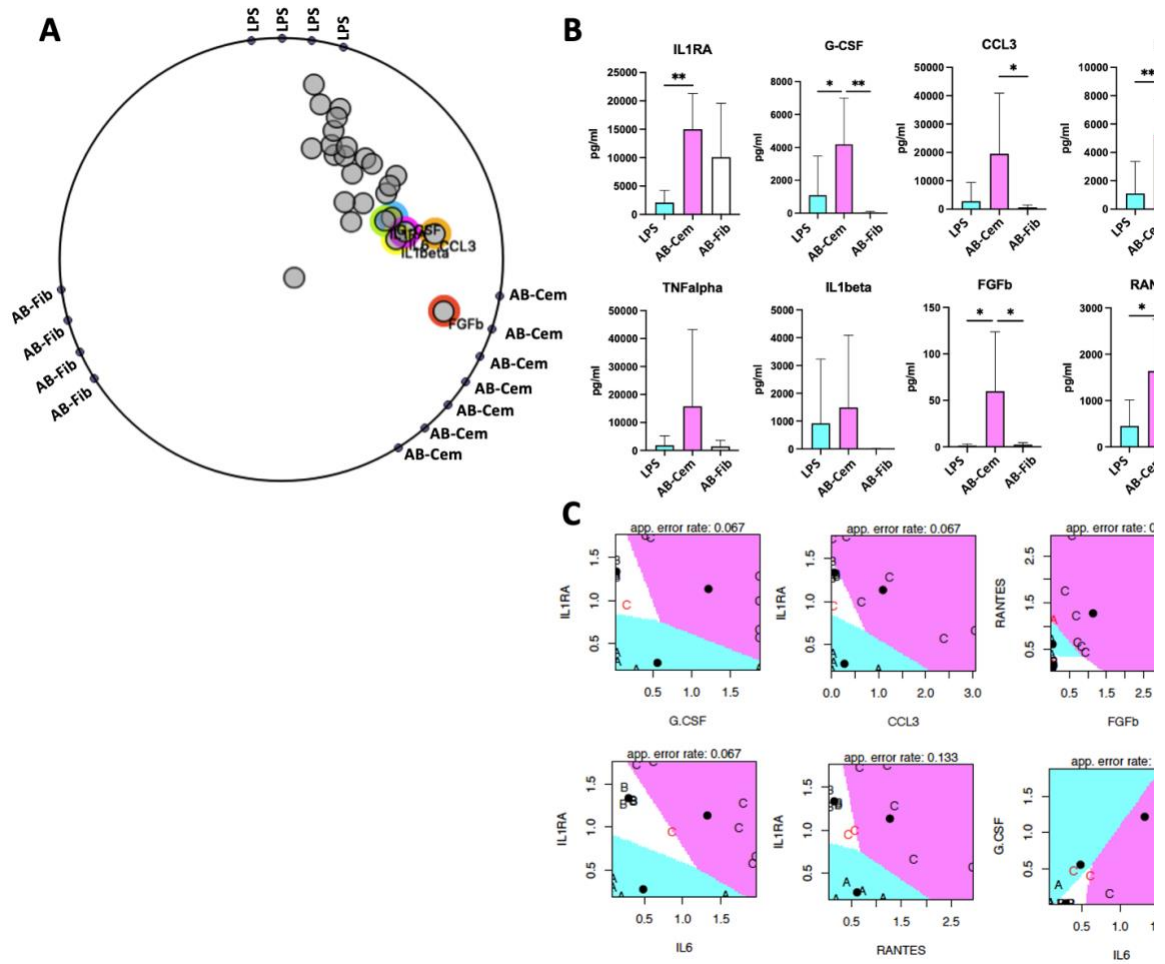


Figura 20. Secretoma de células CD14+ tipo M2 asociado a inmunomodulación. El efecto de los monocitos/macrófagos reprogramados hacia un fenotipo M2 después del tratamiento con AB-CEM fue inhibir la proliferación de células CD3+, motivo por el cual se determinó el perfil del secretoma de estas células durante el proceso de inmunomodulación. La distribución de los factores en las células CD14+ condicionadas con AB-CEM (AB-Cem) fue diferencial (A) para algunos de ellos como: IL1RA, G-CSF, CCL3, IL6, TNF- α , IL1beta, en relación con células CD14+ que habían sido condicionadas con AB-Fib (AB-Fib) y LPS (LPS) (B). Mediante un análisis discriminante lineal pareado según el set de citoquinas anterior, se verificó el rendimiento operativo y se muestran los binomios con menores tasas de errores aparentes (C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4. DISCUSIÓN

Este proyecto aporta nuevo conocimiento sobre el estudio de muerte celular por apoptosis en las células estromales mesenquimales y propone un mecanismo que contribuye a dar claridad sobre el impacto de supervivencia de las CEM en el contexto de terapia celular. En los últimos años las investigaciones sobre muerte celular han ido aumentando de forma significativa, revelando nuevos mecanismos e implicaciones fisiopatológicas en el contexto de diversas enfermedades y su terapéutica. Los esfuerzos de los investigadores han estado dirigidos a generar modelos experimentales que permitan de manera controlada inducir y regular estos procesos con el objetivo de entender procesos patológicos subyacentes y generar nuevas herramientas moleculares aplicadas al diagnóstico, tratamiento y pronóstico de diversos trastornos inmunes. Desde su descubrimiento, la muerte celular ha estado estrechamente relacionada con procesos fisiológicos y patológicos, como la inflamación, trastornos autoinmunes y el cáncer (Anderton et al., 2020). Por lo tanto, el estudio de los procesos de muerte celular y su relación con el sistema inmunológico representa una gran oportunidad para el descubrimiento de nuevas dinámicas celulares y moleculares que puedan trasladarse al campo diagnóstico y terapéutico. Sin embargo, el avance en el conocimiento de este proceso ha sido afectado por la complejidad inherente a la dificultad de distinguir los diversos tipos de muerte celular (Hu et al., 2021). Todos los avances en el estudio de procesos de muerte celular regulada requieren implementar modelos que permitan identificar con precisión los cambios morfológicos, bioquímicos, funcionales y de expresión génica subyacentes. Con base en lo anterior, en este proyecto se generó un modelo que probó ser eficiente para la inducción de muerte celular por apoptosis en CEM y fibroblastos a partir de la irradiación ionizante, generando puntos de control claves en el flujo apoptótico y caracterizando la respuesta celular particular de las CEM en el tiempo.

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se descubrió desde 1951 cuando Glucksmann planteó la hipótesis de que la muerte celular sería un requisito indispensable para el desarrollo normal del organismo. Desde entonces, se ha determinado que este tipo de muerte celular no solo es crucial para mantener la homeostasis celular, sino también se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes y el cáncer. La apoptosis es un mecanismo de muerte celular desencadenado

por una serie de condiciones extrínsecas e intrínsecas al organismo. Sin embargo, este proceso depende en gran medida del nivel o intensidad del estímulo, convirtiéndolo en un proceso altamente regulado y dependiente del microambiente en el cual se genere. Cabe señalar que cada célula puede poseer estímulos propios que pueden desencadenar este tipo de muerte (Obeng, 2020). La radiación ionizante es un estímulo altamente utilizado en el tratamiento del cáncer, sin embargo, sus efectos no son específicos del tumor y puede afectar a otras células, activando programas de muerte celular como la apoptosis. En las CEM demostramos que la irradiación gamma a una dosis de 25Gy puede desencadenar un programa de muerte por apoptosis de forma progresiva. La respuesta celular a la IR comienza con signos característicos de una apoptosis temprana, como la translocación de la fosfatidilserina y la expresión de caspasas. Días después, a partir del día 7 es detectable la fragmentación del DNA y el aumento progresivo de la actividad de caspasas 3/7. Este comportamiento particular en respuesta a la IR representa una ventaja si se desea disminuir la probabilidad de una necrosis temprana secundaria. En el organismo las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas por fagocitos profesionales como los macrófagos, interactuando de forma sinérgica para evitar procesos necróticos e inflamatorios. A nivel in-vitro no existe una señal de células fagocíticas que rescate a las células de una necrosis secundaria, con lo cual, la mejor forma de evitarlo es seleccionar un estímulo que genere una muerte de forma progresiva y esto lo evidenciamos en las CEM irradiadas, en comparación con el tipo de muerte inducida por agentes químicos como la puromicina.

La radiación ionizante (IR) es un tipo de energía liberada por los átomos que viaja en forma de ondas electromagnéticas (rayos gamma o X) o partículas (neutrones, beta o alfa) (Organization, n.d.). La IR tiene la capacidad de alterar directamente la estructura atómica de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Adicionalmente, el daño celular está mediado de forma indirecta por los subproductos generados como radicales libres. Tras la exposición a la irradiación, las células sufren una serie de alteraciones que pueden activar diferentes mecanismos de muerte celular, entre ellos: apoptosis, necrosis, autofagia y muerte inmunogénica, entre otros. El tipo de muerte inducida en la célula depende de varios factores como: el tipo de célula, la dosis, calidad de la irradiación, tensión de oxígeno, estado de mutación de p53, capacidad de reparación del ADN, estado redox y la fase del ciclo celular en la cual fueron irradiadas. Algunos modelos pre-clínicos han demostrado

que la IR induce una respuesta antitumoral. Sin embargo, aún se desconoce mucho sobre la comprensión de su efecto biológico de la IR y la activación inmunológica. Actualmente se sabe que la muerte no solo es un proceso de recambio celular, por el contrario, en muchos modelos la liberación de factores asociados a la muerte puede tener un efecto terapéutico desencadenando una respuesta inmune benéfica, lo que se conoce como muerte celular inmunogénica (MCI). La MCI ha sido un tema de discusión actual que ha tratado de explicar el vínculo entre la IR y la respuesta inmune. Entender estos mecanismos resultará benéfico para dilucidar los principales actores responsables de la respuesta inmunológica y para optimizar el beneficio clínico (Golden et al., 2012).

La IR puede desencadenar muerte por apoptosis de formas distintas, dependiendo del tipo celular y la dosis. La inducción de muerte puede ser a través de la vía intrínseca (liberación de citocromo C) y la vía extrínseca (activación de caspasas), sin embargo, su toxicidad está mediada principalmente por la vía intrínseca. La apoptosis a través de esta la vía intrínseca está mediada por las rupturas de cadena simple (SSB) y de cadena doble (DSB) del ADN. Los DSB forman complejos Mre11/Rad50/Nbs1 y reclutan a ATM que se autofosforilan, para posteriormente fosforilar a la proteína quinasa 2 (Chk2). Por otro lado, los SSB forman complejos Rad1/Rad9/Hus1 - Rad17/RFC que reclutan a ATR para su posterior autofosforilación y fosforilación de la proteína quinasa de punto de control 1 (Chk1). Chk1 y Chk2 activados bloquean la progresión del ciclo celular regulando proteínas como p53. La IR provoca eventos de fosforilación de p53 que terminan en la acumulación nuclear de p53 transcripcionalmente activo quien es el responsable de activar la transcripción de los genes pro apoptóticos PUMA, Bax y NOXA. Adicionalmente, p53 libre en el citoplasma se une al complejo Bcl2/Bax y libera la proteína pro apoptótica BAX, la cual permeabiliza la membrana mitocondrial externa y libera el citocromo C. Finalmente, se forma el apoptosoma y se activa la caspasa 9 iniciando así la cascada de señalización de muerte celular. Por otro lado, la IR puede inducir apoptosis por medio de la vía extrínseca través de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). El p53 activado por la IR puede provocar la transactivación de CD95/Fas ligando y la unión a su receptor. Esta unión ligando-receptor recluta la pro-caspasa-8 y forma el complejo de señalización inductora de la muerte (DISC). La pro-caspasa 8 conduce a la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 que inician toda la cascada enzimática de degradación proteica. De forma interesante, las estrategias enfocadas a aumentar la apoptosis y sus efectos benéficos son

un área de investigación común en oncología. Sin embargo, p53 está mutado en el 50% de los tipos de cáncer y algunos presentan maquinaria apoptótica defectuosa, lo que ha influido en el avance del conocimiento sobre la respuesta a la irradiación (Golden et al., 2012).

La muerte celular inmunogénica ha sido tradicionalmente asociada a la liberación de 3 factores: translocación y liberación de calreticulina (CRT), liberación de HMGB1 y ATP. Estos factores promueven la fagocitosis, procesamiento antigénico y la presentación cruzada a los linfocitos CD8 LCT. A pesar de que la apoptosis es un tipo de muerte que no genera inflamación, ni tampoco liberación de contenido citoplasmático debido a que al final del proceso todo queda empaquetado en cuerpos apoptóticos, este mecanismo de muerte ha sido asociado a procesos de muerte celular inmunogénica y a la liberación selectiva de factores solubles. La exposición de calreticulina implica la activación coordinada de 3 módulos específicos: estrés de retículo, apoptosis y translocación de CRT/ERp57. El módulo apoptótico requiere la activación de la caspasa 8, la escisión de Bap31 y la activación de Bax/Bak. Estudios recientes demuestran que la translocación de CRT en la superficie celular se produce en células tumorales expuestas a IR. De igual forma, se ha demostrado que células tumorales sometidas a IR liberan de forma pasiva HMGB1 cuando entran en un estado de apoptosis tardía. Por último, la liberación de ATP también ha sido demostrada en modelos de irradiación a través de mecanismo de muerte celular (Golden et al., 2012).

Poco se conoce del secretoma generado por las CEM en respuesta a la irradiación. En este estudio demostramos que las CEM exhiben un secretoma característico después de ser irradiadas y se diferencian de otras células como los fibroblastos. Lo anterior demuestra que el proceso apoptótico en las CEM inducido por la IR está relacionado con la generación y liberación de factores específicos. Este comportamiento en particular va en concordancia con todos los estudios que han demostrado el potencial terapéutico de las CEM apoptóticas (Galleu et al., 2017). De forma interesante, en este proyecto demostramos que la IR induce la secreción diferencial de citoquinas y factores de crecimiento en las CEM como CD25, GM-CSF, VEGF, EGF, CCL4, entre otros. Esta respuesta a la IR de las CEM es propia y se diferencia de la respuesta de los fibroblastos, los cuales tienden a acumular menos factores solubles. De acuerdo con esto, a pesar de compartir origen mesenquimal,

el potencial inmunoregulador de las CEM al responder a la IR está por encima del que tienen los fibroblastos, confirmando una vez más el potencial terapéutico de esta población celular.

Por otro lado, las vesículas extracelulares, desde hace unos años han despertado el interés de la comunidad científica debido a su potencial para transferir información biológica entre células y tejidos. Los cuerpos apoptóticos representan un campo de estudio reciente que ha demostrado tener un potencial particular como posibles responsables de muchos procesos biológicos y, por lo tanto, en excelentes candidatos para el desarrollo de agentes terapéuticos. Hasta hace unos años fueron considerados como debris celulares, sin embargo, actualmente se sabe que los AB contienen información valiosa de células muertas que puede ser entregada a una diversidad de células receptoras. A diferencia de los exosomas y las microvesículas, los AB debido a su origen, tienen características particulares que les confiere ventajas biológicas; la generación de estas microvesículas no desencadena un proceso inflamatorio, reclutan fagocitos de forma eficiente promoviendo una eliminación rápida y debido a su tamaño tienen la capacidad de incorporar mayor cantidad y diversidad de biomoléculas (Battistelli & Falcieri, n.d.).

A pesar del potencial que tienen los cuerpos apoptóticos, la complejidad de su formación y la falta de conocimiento asociado a su biología ha impuesto una serie de dificultades técnicas y científicas que son motivo actual de discusión. La formación de estas microvesículas ha demostrado ser dependiente del tipo celular y es un proceso que implica una remodelación compleja del citoesqueleto, como resultado, existe una alta diversidad en el tamaño de los AB. Adicionalmente, en comparación con los exosomas y las microvesículas, existen componentes de membrana característicos de los AB, como el marcador de apoptosis fosfatidilserina (PS) y C1q, así como un proteoma y un perfil de RNAs único en función de la célula que los genere. Estas características particulares representan una ventaja técnica y pueden ser utilizadas para la identificación, aislamiento y purificación de AB. Actualmente se utilizan un conjunto de metodologías que se basan en estas propiedades y han facilitado el estudio de estas microvesículas, como la centrifugación en gradiente, la proteómica de escopeta y el análisis con citometría de flujo (Fu et al., 2021). Asociado a esta dificultad, la cuantificación de las fracciones en la mayoría de los casos se hace de forma indirecta de acuerdo con el contenido proteico o lipídico, lo

cual tiende a variar entre células. Por este motivo, el desarrollo de estrategias más reproducibles y eficientes para el estudio de AB son de gran valor.

El avance en los equipos de citometría de flujo ha sido una ayuda sustancial para el análisis de microvesículas. Los AB debido a su tamaño permiten una visualización y marcaje con anticuerpos de forma eficiente por citometría de flujo, facilitando su conteo y caracterización (Jiang et al., 2017). En este proyecto desarrollamos una técnica por medio de citometría de flujo para el análisis de AB que resultó ser eficiente y reproducible. El tamaño es una de las principales características de los cuerpos apoptóticos y la utilización de estándares de tamaño específico es una estrategia eficiente para caracterizar este parámetro. De igual forma, el conteo indirecto mediante perlas de conteo añade precisión a los datos y permite tener un control más eficiente a la hora de utilizar estas fracciones en ensayos inmunes.

A pesar de la heterogeneidad, los AB están empezando a ser considerados importantes reguladores fisiológicos, cuya función se extiende más allá de la eliminación de células muertas. Estudios recientes han demostrado que los AB de diferentes orígenes celulares contribuyen a la inmunomodulación y a la regeneración de tejidos. En un modelo de aterosclerosis se demostró que los AB derivados de células endoteliales inducen la expresión y secreción de CXCL12, lo que resulta en la protección de los vasos (Zernecke et al., 2009). De forma similar, los AB provenientes de células estromales mesenquimales han demostrado ser factores claves que participan en la migración de CEM distantes en un modelo murino de parabiosis (D. Liu et al., 2018). Así mismo, el efecto de los AB no ha sido solo demostrado en células fagocíticas, también se ha evidenciado que los AB tumorales promueven la respuesta de Tregs CD4+ y logran un efecto inmunosupresor en células T citotóxicas CD8+ (Xie et al., 2009). En conjunto, estos descubrimientos ponen a los AB como importantes actores en múltiples contextos fisiológicos, lo que puede contribuir a la generación y aplicación de terapias regenerativas e inmunoreguladoras.

Desde hace una década las CEM han sido consideradas herramientas terapéuticas eficaces para muchos trastornos inflamatorios. Su efecto sobre varias células del sistema inmune ha sido comprobado y se han utilizado como potentes agentes inmunosupresores y regenerativos. En la UTA del IDCBIS se ha avanzado a profundidad en el estudio de estas propiedades inmunomoduladoras y se han determinado diferentes mecanismos de

acción, entre los cuales se destaca la secreción de citoquinas antiinflamatorias y la expresión diferencial de genes (Cruz-Barrera et al., 2020). El perfil de secreción de factores solubles y de expresión génica obtenido en este estudio, soporta una vez más que las CEM obtenidas a partir de la gelatina de Wharton son agentes celulares con un potencial inmunomodulador significativo y se caracterizan por la secreción de factores solubles de carácter antiinflamatorio como CD25 y IL-10. Estos resultados preliminares han servido de soporte para hipotetizar que el componente extracelular de las CEM podría tener efectos inmunosupresores sobre diversas poblaciones celulares inmunes. Los AB derivados de CEM no serían la excepción. Adicionalmente, desde que se observó que las CEM infundidas in vivo podrían estar sujetas a apoptosis activa, se ha incrementado el interés por el estudio del potencial efecto terapéutico de las CEM apoptóticas en inmunorregulación en el contexto de inflamación. Teniendo en cuenta que la mayoría de los ensayos que utilizan CEM apoptóticas no incluyeron procesos de purificación, sus efectos terapéuticos podrían atribuirse a la existencia de cuerpos apoptóticos en las formulaciones. En ese sentido, los AB-CEM emergen como adyuvantes biológicos que podrían complementar el efecto terapéutico de las CEM apoptóticas. Recientemente se ha demostrado que la infusión de AB-CEM induce la polarización de macrófagos, lo que facilita la migración y proliferación de fibroblastos, promoviendo la cicatrización de heridas cutáneas (J. Liu et al., 2020a). En esta misma área, se ha evidenciado que los AB derivados de CEM promueven la curación de heridas gingivales (Kou et al., 2018). Así mismo, los AB-CEM promueve la activación de autofagia en células endoteliales, potenciando la angiogénesis y mejorando la función cardíaca (H. Liu et al., 2020).

En cuanto a sus propiedades inmunoregulatoras, los AB-CEM han demostrado tener efectos principalmente sobre la polarización y función de macrófagos. La PtdSer expuesta en la membrana de los AB-CEM induce en los macrófagos la producción del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y reduce el nivel de FOXO3 (Chen et al., 2019). Incluso los AB-CEM quiméricos generados a partir de cargar los AB con nano partículas y agentes antiinflamatorios logran promover una polarización hacia un fenotipo M2 de macrófagos, mejorando así el curso de la enfermedad (Dou et al., 2020). Los efectos de los AB-CEM sobre el sistema inmune dependen principalmente de las células fagocíticas receptoras y su respuesta. Al igual que una célula apoptótica, estas microvesículas biológicamente están diseñadas para ser fagocitadas y representan un mecanismo de

inmunomodulación que se ejecuta a través de la respuesta de las células receptoras. Existe poca evidencia asociada al efecto directo de los AB sobre las células, en parte porque el material contenido en estas microvesículas se encuentra empaquetado y restringido de formas diversas, así mismo la entrega está diseñada para ser procesada por una célula fagocítica. De forma interesante, nosotros demostramos que los AB generados por CEM no tienen un efecto directo sobre la proliferación de células CD3, su efecto depende de la acción sinérgica de una célula CD14+ como los monocitos/macrófagos humanos. La respuesta de los macrófagos a los AB-CEM es compleja y puede depender de algunos factores como como la célula generadora de AB, el contenido de los AB, el microambiente en el cual fagociten los AB y el sub-tipo de macrófago. Particularmente nosotros demostramos que la respuesta de los monocitos/macrófagos a los AB-Fib no fue tan significativa en términos de inhibición de células T y la secreción de factores solubles fue diferente, respecto a la respuesta a AB-CEM. Se ha demostrado que células fagocíticas responden de forma diferentes a AB de acuerdo con el origen, teniendo así una preferencia para fagocitar cuerpos apoptóticos de una célula determinada. En un modelo murino de cicatrización de heridas cutáneas se demostró que la sensibilidad de los fibroblastos a los AB-CEM es limitada. La respuesta en términos de proliferación y migración no es significativa cuando se tratan con AB-CEM, respecto a la respuesta que tienen los macrófagos (J. Liu et al., 2020a). Sin embargo, es importante considerar que en modelos in-vivo se ha demostrado que la comunicación entre macrófagos y fibroblastos es crucial para promover la angiogénesis.

Adicionalmente, en este proyecto demostramos que los monocitos/macrófagos condicionados con AB-CEM acumularon de forma significativa factores de crecimiento como IL6, FGFb, G-CSF y HGF, a diferencia del tratamiento con AB-Fib y LPS. Liu et al, demostraron que los sobrenadantes de cultivo de macrófagos tratados con cuerpos apoptóticos de células estromales mesenquimales promovieron la proliferación y migración de fibroblastos. En cuanto al mecanismo, no se especificó el origen de esta estimulación, sin embargo, lo macrófagos tratados con AB-CEM demostraron un fenotipo claro hacia un perfil regulador M2. En ese sentido, es probable que los sobrenadantes de estos macrófagos condicionados tipo M2 estuviesen caracterizados por un secretoma altamente enriquecido de factores de crecimiento que favoreció el crecimiento de los Fibroblastos, como lo demostramos en este proyecto (J. Liu et al., 2020b). En conjunto, estos resultados

demuestran que los AB-CEM son mediadores claves del efecto de las CEM apoptóticas y su estudio podría mejorar notablemente esta terapia celular.

De forma similar, el perfil de secreción de citocinas de las células CD14+ cuando se retan con PBMCs activadas es diferente al que se genera cuando las células se condicionan con AB-Fib. A pesar de contar con un perfil tipo inflamatorio en el secretoma, estos monocitos/macrófagos condicionados con AB-CEM lograron inhibir la proliferación de células T. En el sobrenadante, determinamos un incremento de IL1RA, G-CSF, CCL3, IL6, TNF- α , IL1beta para los monocitos que tuvieron un efecto inmunomodulador. Actualmente se sabe que la polarización M2 de los macrófagos va más allá de la expresión de marcadores de superficie y se pueden clasificar de acuerdo con el estímulo y las citoquinas que liberan. De igual forma, dependiendo del subtipo de macrófago M2, los mecanismos de inmunosupresión pueden variar. Los macrófagos M2b son inducidos por la estimulación con complejos inmunes, ligandos TLR o por agonistas del IL-1R. Este subtipo de macrófagos se caracteriza porque tiene la capacidad de producir citoquinas tanto pro-inflamatorias y anti-inflamatorias como: la IL-10, IL-1 β , IL-6 y TNF- α . A pesar de su perfil de citoquinas, este tipo de macrófago se reconoce como antiinflamatorio y tiene la capacidad de inhibir la proliferación de células T por medio de la Arginasa 1 y la sedoheptulosa quinasa CARL. Los macrófagos M2b se han asociado a la regresión del tumor, a inmunorregulación y a promover una respuesta de tipo Th2 (Viola et al., 2019).

Por último, la respuesta de las células CD14+ condicionadas con AB-CEM puede variar de acuerdo con el microambiente en el cual sean expuestos, motivo por el cual, los análisis genómicos podrían proporcionar una idea más profunda y clara de blancos moleculares con funciones inmunomoduladoras en estas células. Este proyecto continuará con el análisis de los monocitos/macrófagos condicionados con AB-CEM a nivel de expresión génica (transcriptoma), sobre la base de aportar y mejorar el entendimiento de la terapia a base de CEM. Confiamos en que el conocimiento alrededor de los AB-CEM y su interacción con células del linaje monocito/macrófago humanas ayudará en los próximos años a mejorar sustancialmente los problemas asociados a la supervivencia de las CEM.

5. CONCLUSIÓN

La terapia basada en CEM hoy en día sigue planteando muchos interrogantes sobre la viabilidad del producto celular *in vivo* y su interacción con el microambiente tisular del receptor. En este proyecto demostramos que los cuerpos apoptóticos originados por CEM de gelatina Wharton reprograman los monocitos/macrófagos humanos y les confiere la capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos T, acompañado de un perfil de secretoma diferencial. Adicionalmente, técnicamente se generó un aporte al estudio de cuerpos apoptóticos, el avance en la comprensión de estas vesículas extracelulares es una necesidad actual y cualquier aporte a este campo representa un avance significativo. El modelo de apoptosis estandarizado en este proyecto proporciona una metodología eficiente y reproducible para continuar los estudios en cuerpos apoptóticos de CEM y otras líneas celulares.

Por otra parte, la respuesta de los monocitos/macrófagos a los AB-CEM requiere de análisis más profundos que permitan identificar blancos moleculares con propiedades inmunomoduladoras que puedan ser utilizados para mejorar sustancialmente la terapia celular basada en CEM. De igual forma, la interacción entre los cuerpos apoptóticos y los fagocitos profesionales como los macrófagos es altamente específica y eficiente en términos de una respuesta inmune, motivo por el cual los AB son una plataforma para dirigir una terapia hacia células del linaje monocito/macrófago. Por último, la respuesta de las células fagocíticas como los macrófagos a cuerpos apoptóticos puede estar influenciada de forma considerable por el microambiente en donde las células sean comprometidas a desempeñar una respuesta inmune. En ese sentido, es necesario evaluar células del linaje monocito/macrófago CD14+ en otros contextos inmunes como procesos de reparación de tejidos, donde seguramente la respuesta de las células condicionadas con AB-CEM podría modificar su perfil de respuesta.

6.CONFLICTOS DE INTERÉS.

El estudiante de tesis del presente proyecto y el investigador principal no presentamos conflictos de interés durante su realización. De igual forma, los investigadores involucrados no manifestaron ningún conflicto con los datos generados.

7.RECONOCIMIENTOS Y EVENTOS.

Los resultados de este proyecto fueron presentados en la modalidad de poster científico de forma presencial en la décimo tercera (13ª) versión del congreso de autoinmunidad 2022 celebrado en Atenas, Grecia del 10 – 13 de junio de 2022. Se anexa certificado de la participación.

8.PUBLICACIONES.

Además de lo enunciado, el conocimiento técnico y científico generado durante el desarrollo del proyecto contribuyo a participar como investigador en la realización, escritura y publicación de los siguientes artículos:

-
- Cañas-Arboleda M, Beltrán K, Medina C, Camacho B, Salguero G. Human Platelet Lysate Supports Efficient Expansion and Stability of Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells via Active Uptake and Release of Soluble Regenerative Factors. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 31;21(17):6284. doi: 10.3390/ijms21176284. PMID: 32877987; PMCID: PMC7503902.
 - Ramos-Murillo AI, Rodríguez E, Beltrán K, Ricaurte C, Camacho B, Salguero G, Godoy-Silva RD. Efficient Non-Viral Gene Modification of Mesenchymal Stromal Cells from Umbilical Cord Wharton's Jelly with Polyethylenimine. *Pharmaceutics.* 2020 Sep 22;12(9):896. doi: 10.3390/pharmaceutics12090896. PMID: 32971730; PMCID: PMC7559368.

9. TRABAJOS CITADOS

- Almeida-Porada, G., Atala, A. J., & Porada, C. D. (2020). Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells for Immunotherapy and for Gene and Drug Delivery. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 16(March), 204–224. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.01.005>
- Behar, S. M., Martin, C. J., Booty, M. G., Nishimura, T., Zhao, X., Gan, H. X., Divangahi, M., & Remold, H. G. (2011). Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunology*, 4(3), 279–287. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.3>
- Brock, C. K., Wallin, S. T., Ruiz, O. E., Samms, K. M., Mandal, A., Sumner, E. A., & Eisenhoffer, G. T. (2019). Stem cell proliferation is induced by apoptotic bodies from dying cells during epithelial tissue maintenance. *Nature Communications*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09010-6>
- Cañas-Arboleda, M., Beltrán, K., Medina, C., Camacho, B., & Salguero, G. (2020). Human platelet lysate supports efficient expansion and stability of wharton's jelly mesenchymal stromal cells via active uptake and release of soluble regenerative factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21176284>
- Caplan, H., Olson, S. D., Kumar, A., George, M., Prabhakara, K. S., Wenzel, P., Bedi, S., Toledano-Furman, N. E., Triolo, F., Kamhieh-Milz, J., Moll, G., & Cox, C. S. (2019). Mesenchymal Stromal Cell Therapeutic Delivery: Translational Challenges to Clinical Application. *Frontiers in Immunology*, 10(July), 1645. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01645>
- Cassatella, M. A., Mosna, F., Micheletti, A., Lisi, V., Tamassia, N., Cont, C., Calzetti, F., Pelletier, M., Pizzolo, G., & Krampera, M. (2011). Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells*, 29(6), 1001–1011. <https://doi.org/10.1002/stem.651>
- Chiesa, S., Morbelli, S., Morando, S., Massollo, M., Marini, C., Bertoni, A., Frassoni, F., Bartolomé, S. T., Sambuceti, G., Traggiai, E., & Uccelli, A. (2011). Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(42), 17384–17389. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103650108>
- Cruz-Barrera, M., Flórez-Zapata, N., Lemus-Díaz, N., Medina, C., Galindo, C. C., González-Acero, L. X., Correa, L., Camacho, B., Gruber, J., & Salguero, G. (2020). Integrated Analysis of Transcriptome and Secretome From Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Reveal New Mechanisms for the Modulation of Inflammation and Immune Activation. *Frontiers in Immunology*, 11(September), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575488>
- de Witte, S. F. H., Luk, F., Sierra Parraga, J. M., Gargasha, M., Merino, A., Korevaar, S. S., Shankar, A. S., O'Flynn, L., Elliman, S. J., Roy, D., Betjes, M. G. H., Newsome, P.

- N., Baan, C. C., & Hoogduijn, M. J. (2018). Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. *Stem Cells*, 36(4), 602–615. <https://doi.org/10.1002/stem.2779>
- Del Papa, B., Sportoletti, P., Cecchini, D., Rosati, E., Balucani, C., Baldoni, S., Fettucciari, K., Marconi, P., Martelli, M. F., Falzetti, F., & Di Ianni, M. (2013). Notch1 modulates mesenchymal stem cells mediated regulatory T-cell induction. *European Journal of Immunology*, 43(1), 182–187. <https://doi.org/10.1002/eji.201242643>
- Desch, A. N., Randolph, G. J., Murphy, K., Gautier, E. L., Kedl, R. M., Lahoud, M. H., Caminschi, I., Shortman, K., Henson, P. M., & Jakubzick, C. V. (2011). CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *Journal of Experimental Medicine*, 208(9), 1789–1797. <https://doi.org/10.1084/jem.20110538>
- EMA. (2009). EPAR summary for the public, ChondroCelect, INN-characterised viable autologous cartilage cells expanded ex vivo expressing specific marker proteins. *European Medicines Agency*. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000878/WC500026033.pdf
- Fournel, S., Neichel, S., Dali, H., Farci, S., Maillère, B., Briand, J.-P., & Muller, S. (2003). CD4 + T Cells from (New Zealand Black x New Zealand White)F1 Lupus Mice and Normal Mice Immunized Against Apoptotic Nucleosomes Recognize Similar Th Cell Epitopes in the C Terminus of Histone H3. *The Journal of Immunology*, 171(2), 636–644. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.2.636>
- Fujita, H., Yamamoto, M., Ogino, T., Kobuchi, H., Ohmoto, N., Aoyama, E., Oka, T., Nakanishi, T., Inoue, K., & Sasaki, J. (2014). Necrotic and apoptotic cells serve as nuclei for calcification on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biochemistry and Function*, 32(1), 77–86. <https://doi.org/10.1002/cbf.2974>
- Gabr, M. M., Zakaria, M. M., Refaie, A. F., Abdel-Rahman, E. A., Reda, A. M., Ali, S. S., Khater, S. M., Ashamallah, S. A., Ismail, A. M., Ismail, H. E. D. A., El-Badri, N., & Ghoneim, M. A. (2017). From Human Mesenchymal Stem Cells to Insulin-Producing Cells: Comparison between Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Cells. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3854232>
- Galleu, A., Riffo-Vasquez, Y., Trento, C., Lomas, C., Dolcetti, L., Cheung, T. S., Von Bonin, M., Barbieri, L., Halai, K., Ward, S., Weng, L., Chakraverty, R., Lombardi, G., Watt, F. M., Orchard, K., Marks, D. I., Apperley, J., Bornhauser, M., Walczak, H., ... Dazzi, F. (2017). Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Science Translational Medicine*, 9(416). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam7828>
- Gao, S., Mao, F., Zhang, B., Zhang, L., Zhang, X., Wang, M., Yan, Y., Yang, T., Zhang, J., Zhu, W., Qian, H., & Xu, W. (2014). Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor- κ B and signal transducer and activator of transcription 3 pathways. *Experimental Biology and*

- Medicine*, 239(3), 366–375. <https://doi.org/10.1177/1535370213518169>
- Gao, W. X., Sun, Y. Q., Shi, J., Li, C. L., Fang, S. Bin, Wang, D., Deng, X. Q., Wen, W., & Fu, Q. L. (2017). Effects of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells on differentiation, maturation, and function of dendritic cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0499-0>
- Ghahremani Piraghaj, M., Soudi, S., Ghanbarian, H., Bolandi, Z., Namaki, S., & Hashemi, S. M. (2018). Effect of efferocytosis of apoptotic mesenchymal stem cells (MSCs) on C57BL/6 peritoneal macrophages function. *Life Sciences*, 212(September), 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.09.052>
- Hyvärinen, K., Holopainen, M., Skirdenko, V., Ruhanen, H., Lehenkari, P., Korhonen, M., Käkelä, R., Laitinen, S., & Kerkelä, E. (2018). Mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles enhance the anti-inflammatory phenotype of regulatory macrophages by downregulating the production of interleukin (IL)-23 and IL-22. *Frontiers in Immunology*, 9(APR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00771>
- Iglesias-López, C., Agustí, A., Obach, M., & Vallano, A. (2019). Regulatory framework for advanced therapy medicinal products in Europe and United States. *Frontiers in Pharmacology*, 10(JULY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00921>
- International, R., Report, A., & No, P. (2005). *Al Pr Od Uc T N O Lo Ng Er Ho*. 44(June 2004), 2005.
- James, R., Haridas, N., & Deb, K. D. (2019). Clinical applications of mesenchymal stem cells. In *Biointegration of Medical Implant Materials*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102680-9.00005-6>
- Joshua M. Hare, Joel E. Fishman, A. W. H. (2017). Comparison of Allogeneic vs Autologous Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells Delivered by Transendocardial Injection in Patients With Ischemic Cardiomyopathy. *J Autism Dev Disord*, 47(3), 549–562. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.25321.Comparison>
- Lee, D. S., Yi, T. G., Lee, H. J., Kim, S. N., Park, S., Jeon, M. S., & Song, S. U. (2014). Mesenchymal stem cells infected with Mycoplasma arginini secrete complement C3 to regulate immunoglobulin production in b lymphocytes. *Cell Death and Disease*, 5(4), 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.147>
- Liu, H., Liu, S., Qiu, X., Yang, X., Bao, L., Pu, F., Liu, X., Li, C., Xuan, K., Zhou, J., Deng, Z., Liu, S., & Jin, Y. (2020). Donor MSCs release apoptotic bodies to improve myocardial infarction via autophagy regulation in recipient cells. *Autophagy*, 16(12), 2140–2155. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1717128>
- Liu, S., Jiang, L., Li, H., Shi, H., Luo, H., Zhang, Y., Yu, C., & Jin, Y. (2014). Mesenchymal stem cells prevent hypertrophic scar formation via inflammatory regulation when undergoing apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(10), 2648–2657. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.169>
- Lufkin, S. V. and T. (2013). Bridging the gap: understanding embryonic IVD. *Cellular and Developmental Biology*, 10(2), 54–56. <https://doi.org/10.1002/stem.68.Mesenchymal>

- Ma, Q., Liang, M., Wu, Y., Ding, N., Duan, L., Yu, T., Bai, Y., Kang, F., Dong, S., Xu, J., & Dou, C. (2019). Mature osteoclast- derived apoptotic bodies promote osteogenic differentiation via RANKL-mediated reverse signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 294(29), 11240–11247. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007625>
- MACI (Autologous Cultured Chondrocytes on a Porcine Collagen Membrane) | FDA. (n.d.). Retrieved March 24, 2021, from <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/maci-autologous-cultured-chondrocytes-porcine-collagen-membrane>
- Mahmoudi, M., Taghavi-Farahabadi, M., Rezaei, N., & Hashemi, S. M. (2019). Comparison of the effects of adipose tissue mesenchymal stromal cell-derived exosomes with conditioned media on neutrophil function and apoptosis. *International Immunopharmacology*, 74(June), 105689. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105689>
- Mansnerus, J. (2017). Commercialisation of Advanced Therapies : - A Study of the EU Regulation on Advanced Therapy Medical Products. In *Regulatory Rapporteur* (Vol. 14, Issue 6). www.topra.org
- Medication, A., Mellitus, D., & Reply, S. (2005). Etters to the. *Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes*, March, 395–401.
- Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S. T., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R. A., & Mezey, É. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E 2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine*, 15(1), 42–49. <https://doi.org/10.1038/nm.1905>
- Petrenko, Y., Vackova, I., Kekulova, K., Chudickova, M., Koci, Z., Turnovcova, K., Kupcova Skalnikova, H., Vodicka, P., & Kubinova, S. (2020). A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61167-z>
- Phan, T. K., Ozkocak, D. C., & Poon, I. K. H. (2020). Unleashing the therapeutic potential of apoptotic bodies. *Biochemical Society Transactions*, 48(5), 2079–2088. <https://doi.org/10.1042/BST20200225>
- PROVENGE (sipuleucel-T) | FDA. (n.d.). Retrieved March 24, 2021, from <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/provenge-sipuleucel-t>
- Radrizzani, M., Soncin, S., Cicero, V. Lo, Andriolo, G., Bolis, S., & Turchetto, L. (2016). Quality control assays for clinical-grade human mesenchymal stromal cells: Methods for ATMP release. *Methods in Molecular Biology*, 1416, 313–337. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_19
- Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., Ottonello, L., & Pistoia, V. (2008). Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche. *Stem Cells*,

- 26(1), 151–162. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0416>
- Reis, M., Mavin, E., Nicholson, L., Green, K., Dickinson, A. M., & Wang, X. N. (2018). Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate dendritic cell maturation and function. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02538>
- Saas, P., Daguindau, E., & Perruche, S. (2016). Concise Review: Apoptotic Cell-Based Therapies-Rationale, Preclinical Results and Future Clinical Developments. *Stem Cells*, 34(6), 1464–1473. <https://doi.org/10.1002/stem.2361>
- Sacchetti, B., Funari, A., Remoli, C., Giannicola, G., Kogler, G., Liedtke, S., Cossu, G., Serafini, M., Sampaolesi, M., Tagliafico, E., Tenedini, E., Saggio, I., Robey, P. G., Riminucci, M., & Bianco, P. (2016). No identical “mesenchymal stem cells” at different times and sites: Human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels. *Stem Cell Reports*, 6(6), 897–913. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.05.011>
- Sarkar, P., Redondo, J., Kemp, K., Ginty, M., Wilkins, A., Scolding, N. J., & Rice, C. M. (2018). Reduced neuroprotective potential of the mesenchymal stromal cell secretome with ex vivo expansion, age and progressive multiple sclerosis. *Cytotherapy*, 20(1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.08.007>
- Shin, J. Y., Park, H. J., Kim, H. N., Oh, S. H., Bae, J. S., Ha, H. J., & Lee, P. H. (2014). Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase β -amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy*, 10(1), 32–44. <https://doi.org/10.4161/auto.26508>
- Song, N., Scholtemeijer, M., & Shah, K. (2020). Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(9), 653–664. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009>
- Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N., & Papamichail, M. (2006). Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. *Stem Cells*, 24(1), 74–85. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0359>
- Sung, P. H., Chang, C. Lo, Tsai, T. H., Chang, L. T., Leu, S., Chen, Y. L., Yang, C. C., Chua, S., Yeh, K. H., Chai, H. T., Chang, H. W., Chen, H. H., & Yip, H. K. (2013). Apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy protects against lung and kidney injury in sepsis syndrome caused by cecal ligation puncture in rats. *Stem Cell Research and Therapy*, 4(6), 9–15. <https://doi.org/10.1186/scrt385>
- ten Ham, R. M. T., Hoekman, J., Hövels, A. M., Broekmans, A. W., Leufkens, H. G. M., & Klungel, O. H. (2018). Challenges in Advanced Therapy Medicinal Product Development: A Survey among Companies in Europe. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 11(December), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.10.003>
- Therapies, A. (2012). Reflection paper on classification of advanced therapy medicinal products Reflection paper on classification of Advanced Therapy Medicinal Products Table of contents. *Therapy*, 44(April), 1–19.

- Ugurlu, B., & Karaoz, E. (2020). Comparison of similar cells: Mesenchymal stromal cells and fibroblasts. *Acta Histochemica*, 122(8), 151634. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151634>
- Vamvakas, S., Martinalbo, J., Pita, R., & Isaac, M. (2011). On the edge of new technologies (advanced therapies, nanomedicines). *Drug Discovery Today: Technologies*, 8(1), e21–e28. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2011.04.001>
- Wang, G., Zhang, S., Wang, F., Li, G., Zhang, L., & Luan, X. (2013). Expression and biological function of programmed death ligands in human placenta mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, 37(2), 137–148. <https://doi.org/10.1002/cbin.10024>
- Weiss, D. J., English, K., Krasnodembskaya, A., Isaza-Correa, J. M., Hawthorne, I. J., & Mahon, B. P. (2019). The necrobiology of mesenchymal stromal cells affects therapeutic efficacy. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01228>
- Wobma, H., & Satwani, P. (2021). Mesenchymal stromal cells: Getting ready for clinical primetime. *Transfusion and Apheresis Science*, January, 103058. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2021.103058>
- Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1), 1–17. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>
- Yamaguchi, H., Maruyama, T., Urade, Y., & Nagata, S. (2014). Immunosuppression via adenosine receptor activation by adenosine monophosphate released from apoptotic cells. *ELife*, 2014(3), 1–15. <https://doi.org/10.7554/eLife.02172>
- Yan, Z., Zhuansun, Y., Chen, R., Li, J., & Ran, P. (2014). Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. *Experimental Cell Research*, 324(1), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.03.013>
- Yang, S., Mao, Y., Zhang, H., Xu, Y., An, J., & Huang, Z. (2019). The chemical biology of apoptosis: Revisited after 17 years. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 177, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.019>
- Zhao, Q., Ren, H., & Han, Z. (2016). Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*, 2(1), 3–20. <https://doi.org/10.1016/j.jocit.2014.12.001>
- Zheng, Z. H., Li, X. Y., Ding, J., Jia, J. F., & Zhu, P. (2008). Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 47(1), 22–30. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kem284>