



UNIVERSIDAD
AUSTRAL

Facultad de Ciencias Biomédicas

**EXPRESIÓN DEL FACTOR ESTIMULANTE DE
COLONIAS DE MACRÓFAGOS Y GRANULOCITOS EN
CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES
MEDIANTE ARNm TRANSCRIPTO *IN VITRO*. UNA
ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA EL
HEPATOCARCINOMA CELULAR**

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Biomédicas por la
Universidad Austral

Lic. María José Cantero

Directora: Dra. Mariana García

Co- directores: Dra. Mariana Malvicini, Dr. Juan Bayo

**Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT)
CONICET – Universidad Austral Pilar, Buenos Aires, Argentina**

Año 2024

Agradecimientos

A Mariana Garcia por haber confiado en mí, por brindarme oportunidades de crecimiento y desempeño, sin dejar de acompañarme en todo momento, especialmente en las singularidades de los años de pandemia. Sin una dirección con tu presencia, responsabilidad y calidez, este trabajo no sería posible.

A Esteban, Juan, Mariana M., Cata. Siempre dispuestos a ayudar y, más importante aún, a contener frustraciones y brindarse a los becarios. Sus palabras de aliento, su buena onda, sus ideas, su atención y preocupación por el trabajo de cada miembro del equipo, su apertura a recibir ideas y críticas. Volvería a elegir Terapia Génica (o, mejor dicho, el Programa de Hepatología experimental y Terapia Génica). La calidad humana del equipo de trabajo hace también a la calidad en lo académico y es el valor más grande de este grupo.

A Guillermo, por siempre haber estado atento a mi trabajo, facilitarme los medios para realizarlo, sus aportes en cada seminario, su confianza en mi labor, el incentivo a trabajar y superar dificultades.

A las mejores compañeras de trabajo diario que podría tener. Las nombro en orden de aparición a lo largo del doctorado: Mailin, Pau, Barbi y Lu. También Maxi y Mariel, quienes son becarios embajadores de sus laboratorios en el entre piso.

A los becarios y ex becarios del IIMT. Puedo decir que de todos aprendí algo, no siempre cuestiones académicas, pero siempre aprendí algo que me enriqueció en lo académico y lo personal.

Al staff del bioterio, quienes absolutamente siempre me recibieron con buena onda y dispuestos a ayudar.

A la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral, que contribuyó a esta instancia de mi formación, ofreciéndome sus espacios, recursos y la calidad académica que la caracteriza.

Finalmente, a las personas más importantes de mi vida. A mi hermana y a mis padres, que no tienen mucha idea de lo que hago, pero me apoyan y acompañan incondicionalmente. A mis amigas y amigos, quienes siempre me incentivan a buscar nuevos horizontes.

¡Gracias!

**EXPRESIÓN DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE MACRÓFAGOS Y
GRANULOCITOS EN CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES MEDIANTE ARNm
TRANSCRIPTO *IN VITRO*. UNA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA EL
HEPATOCARCINOMA CELULAR**

Resumen

Las células estromales mesenquimales (MSC) se han utilizado como transportadoras de agentes antitumorales debido a su capacidad de migrar y anclarse a tumores. El ARNm transcripto *in vitro* (ARNm IVT) es una herramienta prometedora para una expresión de proteínas transitoria, eficaz y sin riesgos mutagénicos. También se ha demostrado que el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) reduce el crecimiento tumoral al favorecer un aumento de la circulación de células presentadoras de antígenos y subsecuentemente el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral. Este trabajo tuvo como objetivo expresar GM-CSF en MSC mediante el uso de ARNm IVT y evaluar el efecto terapéutico de las MSC que expresan GM-CSF (MSC/GM-CSF) en combinación con dosis bajas de doxorubicina (Dox), en un modelo murino de carcinoma hepatocelular (HCC).

Se generaron ARNm IVT de DsRed (proteína fluorescente utilizada como control de expresión) o GM-CSF a partir de un molde de ADN copia diseñado con cebadores específicos seguidos de transcripción inversa. Se usó lipofectamina para transfectar a las MSC con el ARNm IVT de DsRed (MSC/DsRed) o de GM-CSF (MSC/GM-CSF). La expresión génica y los niveles de marcadores de superficie celular se determinaron mediante citometría de flujo. La secreción de GM-CSF se determinó mediante ELISA. Para probar la función de GM-CSF, se utilizaron la línea de macrófagos J774 y monocitos de médula ósea de ratones. Se desarrolló un modelo de HCC mediante inoculación subcutánea (s.c.) de células Hepa129 singénicas de ratones C3H/HeN. Los animales con tumor palpable se dividieron aleatoriamente en grupos. Se evaluó la administración de MSC/GM-CSF, Dox o su combinación, estudiando el crecimiento del tumor y la supervivencia del ratón, a lo largo de un mes. Se recogieron muestras de los tumores para el análisis de citoquinas y diversas proteínas a través de la expresión del ARNm y además se identificaron células del sistema inmune por citometría de flujo.

La expresión de DsRed se observó 2 h después de la transfección con el ARNm IVT DsRed y no se registraron cambios significativos en el crecimiento del tumor *in vivo* de animales administrados con MSC/DsRed en comparación con el grupo control (administrados con el vehículo). Para las pruebas realizadas con ARNm IVT GM-CSF, se observó que las MSC/GM-CSF mantuvieron la expresión de los marcadores de superficie, sugiriendo que la transfección no genera cambios fenotípicos en estas células. Por ELISA se detectó GM-CSF en el sobrenadante de cultivo de las MSC/GM-CSF (MC, medio condicionado), confirmando que las células eran capaces de producir la proteína y secretarla adecuadamente. Por otro lado, el MC de las MSC/GM-CSF, indujo la diferenciación de monocitos murinos en células dendríticas y promovió un fenotipo proinflamatorio en células J774. *In vivo*, la aplicación de MSC/GM-CSF en combinación con Dox, redujo significativamente el crecimiento del tumor subcutáneo de HCC en ratones C3H/HeN y extendió la supervivencia de los mismos en comparación con los tratamientos individuales y el grupo control (administrado con solución fisiológica). Además, los tumores en el grupo tratado con MSC/GM-CSF + Dox, exhibieron niveles elevados de genes proinflamatorios y una mayor infiltración de células T CD8⁺ y macrófagos.

Nuestros resultados demostraron que la transfección con ARNm IVT es una estrategia adecuada para obtener MSC modificadas para fines terapéuticos. Las MSC/GM-CSF en combinación con dosis bajas de Dox produjo un efecto sinérgico al aumentar el microambiente tumoral proinflamatorio, lo que a su vez mejoró la respuesta antitumoral en el HCC.

Abstract

Mesenchymal stromal cells (MSC) have been used as carriers of antitumoural agents due to their capacity to home to tumours. *In vitro* transcribed mRNA (IVT mRNA) is a promising tool for effective transient expression without immunogenic risks. It has also been demonstrated that granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) reduces tumour growth by increasing the anti-tumour immune response. This work aimed to express GM-CSF in MSCs by using IVT mRNA and evaluate the therapeutic effect of MSCs that express GM-CSF (MSC/GM-CSF) in combination with low doses of doxorubicin (Dox) in a murine model of hepatocellular carcinoma (HCC).

DsRed or GM-CSF IVT mRNAs were generated from a cDNA template designed with specific primers followed by reverse transcription. Lipofectamine was used to transfect MSCs with DsRed (MSC/DsRed) or GM-CSF (MSC/GM-CSF) IVT mRNA. Gene expression and cell surface marker levels were determined by flow cytometry. GM-CSF secretion was determined by ELISA. For *in vitro* experiments, the J774 macrophage line and bone marrow monocytes from mice were used to test GM-CSF function. An HCC model was developed by subcutaneous inoculation (s.c.) of Hepa129 cells into C3H/HeN mice. After s.c. injection of MSC/GM-CSF, Dox, or their combination, tumour size and mouse survival were evaluated. Tumour samples were collected for mRNA analysis and flow cytometry.

DsRed expression was observed at 2 h after IVT transfection and did not affect tumour growth *in vivo*. MSC/GM-CSF maintained the surface markers unmodified, secreted GM-CSF, induced the differentiation of murine monocytes to dendritic cells and promoted a proinflammatory phenotype in J774 cells. *In vivo*, MSC/GM-CSF in combination with Dox strongly reduced HCC tumour growth in C3H/HeN mice and extended mouse survival in comparison with individual treatments. In addition, the tumours in the MSC/GM-CSF + Dox-treated group exhibited elevated levels of proinflammatory genes and increased infiltration of CD8⁺ T cells and macrophages.

Our results demonstrated that transfection with IVT mRNA is a suitable strategy for obtaining engineered MSCs for therapeutic purposes. MSC/GM-CSF in combination with low doses of Dox led to a synergistic effect by increasing the proinflammatory tumour microenvironment, which in turn enhanced the antitumoural response in HCC.

Publicaciones relacionadas con la presente tesis

- ***The Role of the Tumor Microenvironment in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma.*** Sevic I, Spinelli FM, **Cantero MJ**, Reszegi A, Kovalszky I, García MG, Alaniz L. In: Tirnitz-Parker JEE, editor. Hepatocellular Carcinoma. Brisbane (AU): Codon Publications; 2019 Oct 24. Capítulo 2. PMID: 31664802.
- ***Modified mesenchymal stromal cells by in vitro transcribed mRNA: a therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma.*** María José Cantero, Barbara Bueloni, Lucrecia Gonzalez Llamazares, Esteban Fiore, Lucia Lameroli, Catalina Atorrasagasti, Guillermo Mazzolini, Mariana Malvicini, Juan Bayo, Mariana G. García. Stem Cell Research & Therapy. Aceptado, 18 de junio 2024.

Parte de los resultados obtenidos han sido premiados por la Sociedad Argentina de Investigación clínica con la siguiente distinción:

- Premio en la sección de Oncología, Irene Faryna y Roberto Raveglia, 17 de noviembre de 2023.

Asimismo, durante la realización del presente doctorado, la aspirante a Doctora ha participado como colaboradora en las siguientes publicaciones:

- Valenzuela Alvarez MJP, Gutierrez LM, Bayo JM, **Cantero MJ**, Garcia MG, Bolontrade MF. ***Osteosarcoma cells exhibit functional interactions with stromal cells, fostering a lung microenvironment conducive to the establishment of metastatic tumor cells.*** Mol Biol Rep. 2024 Mar 29;51(1):467. doi: 10.1007/s11033-024-09315-w. PMID: 38551765.
- Domínguez LM, Bueloni B, **Cantero MJ**, Albornoz M, Pacienza N, Biani C, Luzzani C, Miriuka S, García M, Atorrasagasti C, Yannarelli G, Bayo J, Fiore E, Mazzolini G. ***Chromatographic Scalable Method to Isolate Engineered Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Liver Fibrosis in Mice.*** Int J Mol Sci. 2023 May 31;24(11):9586. doi: 10.3390/ijms24119586. PMID: 37298538; PMCID: PMC10253331.
- Onorato AM, Lameroli Mauriz L, Bayo J, Fiore E, **Cantero MJ**, Bueloni B, García M, Lagües C, Martínez-Duarte P, Menaldi G, Paleari N, Atorrasagasti C, Mazzolini GD. ***Hepatic SPARC Expression Is Associated with Inflammasome Activation during the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Both Mice and Morbidly Obese Patients.*** Int J Mol Sci. 2023 Oct 2;24(19):14843. doi: 10.3390/ijms241914843. PMID: 37834291; PMCID: PMC10573696.

- Gutiérrez LM, Valenzuela Alvarez M, Yang Y, Spinelli F, Cantero MJ, Alaniz L, García MG, Kleinerman ES, Correa A, Bolontrade MF. ***Up-regulation of pro-angiogenic molecules and events does not relate with an angiogenic switch in metastatic osteosarcoma cells but to cell survival features.*** Apoptosis. 2021 Aug;26(7-8):447-459. doi: 10.1007/s10495-021-01677-x. Epub 2021 May 22. PMID: 34024019.
- Atorrasagasti C, Piccioni F, Borowski S, Tirado-González I, Freitag N, **Cantero MJ**, Bayo J, Mazzolini G, Alaniz LD, Blois SM, Garcia MG. ***Acceleration of TAA-Induced Liver Fibrosis by Stress Exposure Is Associated with Upregulation of Nerve Growth Factor and Glycopattern Deviations.*** Int J Mol Sci. 2021 May 11;22(10):5055. doi: 10.3390/ijms22105055. PMID: 34064584; PMCID: PMC8151393.
- Rodríguez MM, Onorato A, **Cantero MJ**, Domínguez L, Bayo J, Fiore E, García M, Atorrasagasti C, Canbay A, Malvicini M, Mazzolini GD. ***4-methylumbelliferone-mediated polarization of M1 macrophages correlate with decreased hepatocellular carcinoma aggressiveness in mice.*** Sci Rep. 2021 Mar 18;11(1):6310. doi: 10.1038/s41598-021-85491-0. PMID: 33737571; PMCID: PMC7973733.
- Bayo J, Fiore EJ, Dominguez LM, **Cantero MJ**, Ciarlantini MS, Malvicini M, Atorrasagasti C, Garcia MG, Rossi M, Cavasotto C, Martinez E, Comin J, Mazzolini GD. ***Bioinformatic analysis of RHO family of GTPases identifies RAC1 pharmacological inhibition as a new therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma.*** Gut. 2021 Jul;70(7):1362-1374. doi: 10.1136/gutjnl-2020-321454. Epub 2020 Oct 26. PMID: 33106353.
- Fiore E, Domínguez LM, Bayo J, Malvicini M, Atorrasagasti C, Rodriguez M, **Cantero MJ**, García M, Yannarelli G, Mazzolini G. ***Human umbilical cord perivascular cells-derived extracellular vesicles mediate the transfer of IGF-I to the liver and ameliorate hepatic fibrogenesis in mice.*** Gene Ther. 2020 Feb;27(1-2):62-73. doi: 10.1038/s41434-019-0102-7. Epub 2019 Sep 24. PMID: 31551525.

Abreviaturas empleadas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: copia del ácido desoxirribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNm IVT: ARNm transcrito *in vitro*

APC: alofococianina; del inglés, *allophycocyanin* (fluorocromo)

ATP: adenosín-5'-trifosfato

CAP: capuchón en el extremo 5' del ARNm

CDs: células dendríticas

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CPA: células presentadoras de antígenos

cpm: cuentas por minuto

CRT: calreticulina

CTLA-4: proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos; del inglés, *cytotoxic T-lymphocyte associated Protein 4*

DAMP: patrones moleculares asociados al daño; del inglés, *damage-associated molecular patterns*

Dox: doxorubicina

EGF: factor de crecimiento epidérmico; del inglés, *epidermal growth factor*

ELISA: análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HCC: hepatocarcinoma

HLA: antígeno leucocitario humano HLA

HMGB1: proteína del grupo B1 de alta movilidad; del inglés, *high mobility group box 1 protein*

h: horas

HSP: proteínas de choque térmico; del inglés, *heat shock proteins*

ICD: muerte celular inmunogénica; del inglés, *immunological cell death*

ICI: inhibidores de puntos de control inmunológicos; del inglés, *immune checkpoint inhibitors*

IFN- γ : interferón gamma

IL: interleuquina

IVT: transcritto *in vitro*; del inglés, *in vitro transcribed*

Kg: kilogramos

LPS: lipopolisacárido bacteriano

M: molar

MC: medio condicionado

mg: miligramos

min: minutos

MSCs: células madre/estromales mesenquimales; del inglés, *mesenchymal stem/stromal cells*

MSC/DsRed: células madre/estromales mesenquimales que han sido modificadas con ARN mensajero transcritto *in vitro* para producir la proteína DsRed

MSC/GM-CSF: células madre/estromales mesenquimales que han sido modificadas con ARN mensajero transcritto *in vitro* para producir el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos

N.D.: no detectable

NK: del inglés, *natural killer*

ns: no significativo

ORF: marco abierto de lectura; del inglés, *open reading frame*

PBS: buffer fosfato salino

PD-1/PD-1L: del inglés, *Programmed death-1/Programmed death-ligand 1*

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

seg: segundos

s.c.: subcutáneo

SFB: suero fetal bovino

TAMs: macrófagos asociados al tumor; del inglés, *tumoral-associated macrophages*

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta; del inglés, *transforming growth factor beta*

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; del inglés, *tumour necrosis factor alpha*

Treg: células T regulatorias

μ g: microgramos

μ l: microlitros

μ m: micrómetro

UI/ml: Unidad Internacional por mililitro

UTR: regiones no traducibles del ARNm; del inglés, *untranslated region*

vs.: versus

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

Índice

1. Introducción.....	14
1.1 Cáncer	15
1.2 Microambiente tumoral.....	17
1.3 Hepatocarcinoma.....	18
1.3.1 Microambiente hepático.....	19
1.3.2 Tratamientos para el HCC.....	21
1.4 Células estromales mesenquimales.....	26
1.4.1 Propiedades y caracterización	26
1.4.2 Origen y fuentes de MSCs.....	27
1.4.3 Función fisiológica de las MSCs	28
1.4.4 Capacidad de las MSCs para la migración y anclaje a tumores	29
1.4.5 Utilización de MSCs en terapia celular adoptiva.....	29
1.5 Terapia Génica.....	30
1.5.1 Vectores utilizados en terapia génica	31
1.5.2 Uso de ARNm en terapia génica	32
1.6 Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos.....	36
1.6.1 Características generales y fuente celular	36
1.6.2 Rol de GM-CSF en el sistema inmune	36
1.6.3 GM-CSF en inmunoterapia.....	37
2. Hipótesis de trabajo y objetivos	40
2.1 Hipótesis de trabajo.....	41
2.2 Objetivos	41
3. Metodología	43
3.1 Aislamiento y cultivo de MSCs a partir de tejido perivascular de cordón umbilical... 44	
3.1.1 Procesamiento de las muestras y condiciones de cultivo.....	44
3.1.2 Caracterización de MSCs obtenidas de tejido perivascular de cordón umbilical humano.....	44
3.2 Diseño y producción del ARNm IVT	45
3.2.1 Plásmidos	45
3.2.2 Amplificación de plásmidos por transformación bacteriana de células competentes por tratamiento con CaCl ₂ y obtención de ADN plasmídico.....	45
3.2.3 Amplificación de la secuencia codificante	46
3.2.4 Transcripción <i>in vitro</i> del ARNm.....	48
3.3 Transfección de las MSCs.....	49

3.3.1	Transfección con el ARNm IVT	49
3.3.2	Transfección con plásmido conteniendo la secuencia de mCherry	49
3.4	Caracterización de las MSCs transfectadas con ARNm IVT	49
3.4.1	Evaluación de la eficiencia de transfección.....	49
3.4.2	Expresión de marcadores de superficie	50
3.4.3	Capacidad de migración <i>in vitro</i>	50
3.5	Líneas celulares.....	51
3.6	Estudios <i>in vitro</i>	52
3.6.1	Preparación del medio condicionado de las MSCs para ensayos <i>in vitro</i>	52
3.6.2	Preparación del medio condicionado de Hepa129 previamente tratadas con Dox para ensayos <i>in vitro</i>	52
3.6.3	Estimulación de línea de macrófagos utilizando MC de MSCs y Hepa129	52
3.6.4	Extracción del ARN y análisis de expresión de genes por PCR cuantitativa (qPCR)	53
3.7	Estudios <i>ex vivo</i>	54
3.7.1	Ensayo de proliferación de esplenocitos	54
3.7.2	Cultivo de células mononucleares de médula ósea de ratón	55
3.8	Estudios <i>in vivo</i>	56
3.8.1	Animales	56
3.8.2	Modelos experimentales	56
3.8.3	Evaluación de la acción antitumoral de los tratamientos individuales y combinados en animales	57
3.8.4	Estudio de poblaciones del sistema inmune presentes en muestras del tumor .	58
3.9	Análisis estadístico	59
4.	Resultados	60
4.1	Síntesis del ARNm IVT DsRed y transfección de MSCs.....	61
4.1.1	ARNm IVT DsRed	61
4.1.2	Optimización de la transfección de las MSCs y expresión de DsRed	61
4.2.	Efecto de MSC/DsRed sobre un modelo de tumor subcutáneo	65
4.3.	Síntesis del ARNm IVT GM-CSF y transfección de las MSCs.....	66
4.3.1.	ARNm IVT GM-CSF	66
4.3.2.	Producción de GM-CSF	67
4.3.3.	Funcionalidad de GM-CSF	67
4.3.4.	Efecto de MSC/GM-CSF sobre dos modelos de tumor subcutáneo	71
4.4.	Evaluación de la aplicación terapéutica de MSC/GM-CSF y Dox en un modelo de tumor: estudios <i>in vitro</i>	72

4.4.1. Efectos sobre J774.....	72
4.5. Evaluación de la aplicación terapéutica de MSC/GM-CSF y Dox en un modelo de tumor: estudios <i>in vivo</i>	75
4.5.1. El uso combinado de MSC/GM-CSF y doxorubicina tiene un efecto sinérgico sobre la inhibición sinérgica de la progresión tumoral.....	75
4.5.2. Efecto sobre la sobrevida	77
4.6. Estudio del microambiente tumoral	78
4.6.1. Expresión de factores y citoquinas	78
4.6.2. Identificación de células del sistema inmunológico	79
5. Discusión.....	82
6. Conclusión	92
7. Bibliografía	95

1. Introducción

1.1 Cáncer

El cáncer resulta de procesos de división de células que son capaces de sostener señales de proliferación. Normalmente, las células se dividen originando nuevas células que interactúan con su entorno, siendo este último importante en la regulación de los procesos de división celular para mantener la arquitectura y función normales del tejido. Las células cancerosas mantienen una proliferación crónica que conduce a la formación de tejido tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011). En el inicio del proceso tumoral y durante la progresión de este tejido particular, las células tumorales se diferencian de las normales por presentar alteraciones como la capacidad de crecer en ausencia de señales de crecimiento, la falta de respuesta frente a señales inhibitorias, la evasión de los programas de muerte celular programada o apoptosis, la capacidad ilimitada de replicación, la inducción de la vasculatura (angiogénesis), la capacidad de reprogramar su metabolismo energético, de evadir la destrucción por parte del sistema inmunitario y la capacidad de diseminación local y a distancia, este último proceso definido como metástasis (Hanahan, 2022). Además, recientemente se han incorporado a estas capacidades, la plasticidad fenotípica, la diferenciación alterada, la reprogramación epigenética no mutacional y la adquisición de capacidades distintivas que resultan de la interacción con el microbioma particular de cada individuo (Feinberg & Levchenko, 2023; Hanahan, 2022). El conjunto de algunas de estas características distintivas del cáncer se resume en la Figura 1.



Figura 1. Capacidades adquiridas por las células tumorales. Todas estas características permiten la progresión del tumor y la invasión a otros tejidos. Adaptado de Hanahan, 2022.

Existen diversos factores que pueden provocar cambios en el ADN y, eventualmente, estos cambios podrían conducir a mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de alguna o algunas de las características antes mencionadas contribuyendo a la carcinogénesis. Sin embargo, cambios en el ADN como mutaciones, son procesos que también pueden ocurrir naturalmente como consecuencia del proceso evolutivo. La carcinogénesis y la progresión maligna son parte del proceso darwiniano de evolución dinámica, que implica presiones selectivas observadas en células desreguladas y con una marcada capacidad proliferativa (Ciriello *et al.*, 2024). No todas las mutaciones conducen a la carcinogénesis, algunas mutaciones son neutrales y no alteran el comportamiento de las células que portan tal mutación. Otras mutaciones alteran las propiedades de las células. Si una mutación aumenta la aptitud competitiva de una célula mutante en relación con la población de tipo salvaje (*wild type*) tendrá una mayor probabilidad de generar un clon que persista y supere al tipo salvaje células. Tales mutaciones serán seleccionadas positivamente y los clones que las porten se expandirán, persistirán y potencialmente adquirir cambios genómicos subclonales que resultan en

transformación (Fowler & Jones, 2022). En este escenario, aquellos genes mutantes bajo selección que estén altamente enriquecidos en células tumorales en comparación con el tejido normal pueden considerarse oncogénico. Su prevalencia relativa en tejido normal y en tumores, sugiere que dichos genes mutantes tienen un papel en la promoción del cáncer (Herms & Jones, 2023).

1.2 Microambiente tumoral

El microambiente tumoral es un entorno complejo que incluye principalmente células tumorales, células inmunitarias, fibroblastos asociados a tumores, células endoteliales vasculares, y células mesenquimales, entre otras. De particular importancia en el microambiente tumoral son las células inmunitarias, tanto innatas como macrófagos, neutrófilos, células NK (del inglés, *natural killer*), células dendríticas (CD) y células mieloides supresoras, como células T y células B de la inmunidad adaptativa. Las interacciones entre todos estos tipos celulares presentes en el microambiente tumoral posibilitan tanto la supervivencia, como la capacidad de invadir y migrar de las células tumorales, así como también que éstas sean capaces de evadir la vigilancia inmunitaria. Dichas interacciones constituyen entonces el mecanismo que permite la progresión tumoral y la metástasis. La heterogeneidad de los tumores se basa en buena medida en la composición de su microambiente tumoral (Quail & Joyce, 2013). En este sentido es importante resaltar el papel de las células del sistema inmune en este microambiente ya que estas células pueden producir factores con funciones muy distintas, dependiendo del contexto fisiológico y la señalización celular. Las células del sistema inmune contribuyen al microambiente tumoral afectando la supervivencia y el desarrollo del tumor convirtiéndolo en un entorno protumoral o antitumoral. La presencia de las células inmunitarias innatas (macrófagos, neutrófilos, células NK, células dendríticas, células mieloides supresoras), y de las células inmunitarias adaptativas (células T y células B) como componentes importantes del microambiente tumoral ha sido ampliamente reportada. Por tal motivo, conocer el rol de estas células puede ayudar a mejorar enfoques terapéuticos dirigidos a dicho microambiente, aumentando la probabilidad de un pronóstico favorable (Lu *et al.*, 2023).

El reconocimiento y eliminación de las células tumorales por el sistema inmune, está dado principalmente por las células T efectoras y su capacidad de reconocimiento depende de la presentación antigénica. Para generar una respuesta antitumoral eficaz, la presentación del antígeno debe ser exitosa en dos eventos distintos: primero, las células presentadoras de antígenos (CPA) deben captar los antígenos del tumor y presentarlos a células T para activarlas. En segundo lugar, los antígenos deben ser presentados directamente por las células tumorales para que las células T activadas puedan reconocer y eliminar a las células tumorales, ejerciendo cierta presión selectiva que las células tumorales deben evadir para poder crecer (Jhunjhunwala *et al.*, 2021).

1.3 Hepatocarcinoma

El hepatocarcinoma (HCC) es el tumor primario de hígado más frecuente, el sexto cáncer más común en todo el mundo y la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer (Ferlay *et al.*, 2021). Generalmente, su desarrollo se asocia con patologías preexistentes como la cirrosis o fibrosis avanzada, que producen una inflamación prolongada. En hígados con estas patologías, las neoplasias progresan a través de una secuencia de fases histopatológicas bien definidas, comenzando con la aparición de nódulos displásicos que finalmente pueden transformarse en HCC. A su vez, estas patologías pueden tener distintas causas como la infección crónica por los virus de la hepatitis B o C (HBV o HCV), el abuso de alcohol y la enfermedad de hígado graso no alcohólico (Galle *et al.*, 2018). La patogenia del HCC a nivel molecular, resulta de la acumulación de alteraciones genómicas, epigenómicas y está determinada por el microambiente tumoral. A partir de los datos transcriptómicos y epigenómicos, se han identificado distintos subtipos moleculares e inmunes de HCC (Montironi *et al.*, 2023). La clasificación molecular más amplia comprende dos clases de HCC, los proliferativos y los no proliferativos. El HCC de la clase proliferativa representa alrededor del 50% de los casos, se asocia con niveles altos de alfa-fetoproteína y con etiología relacionada al virus de la hepatitis B. Este tipo de tumores presentan activación de las vías de señalización involucradas en la proliferación y la supervivencia celular. Por otro lado, el HCC de la clase no proliferativa se asocia con casos relacionados con el alcohol y el virus de la hepatitis C (Hoshida *et al.*,

2009). Otro criterio de clasificación se basa en el tipo de células inmunes presentes en microambiente hepático. Dentro de esta clase se denominan “tumores calientes” a aquellos con una gran infiltración inmune, un diverso repertorio de células T, alta actividad citolítica, niveles elevados de PD1/PD-L1, activación de la señalización del interferón y baja carga de alteraciones cromosómicas. En cambio, los tumores denominados “fríos” se caracterizan por la exclusión de células T y mutaciones del gen supresor tumoral p53 (TP53) (Montironi *et al.*, 2023; Sia *et al.*, 2017).

Tanto la mortalidad como la incidencia del HCC se encuentran en aumento en países occidentales y en nuestro país, es diagnosticado mayoritariamente en pacientes con cirrosis. Tanto la hepatitis crónica debido al virus de la hepatitis C, como la cirrosis alcohólica, son las etiologías principales y representan el 76% de los casos. Habitualmente, la edad de presentación es entre los 60 y 70 años, siendo 2,6 veces más frecuente en varones (Fassio *et al.*, 2009).

1.3.1 Microambiente hepático

El microambiente inflamatorio causado por las etiologías mencionadas puede facilitar o inducir la transformación de las células hepáticas normales, como hepatocitos, células madre, células inmunes y estrelladas al proporcionar un ambiente adecuado para el desarrollo y progresión de un tumor (Nishida & Kudo, 2017). El microambiente tumoral en el hígado contiene macrófagos asociados al tumor (TAMs; del inglés, *tumoral-associated macrophages*), o residentes (células de Kupffer), células estrelladas hepáticas, células dendríticas, células T, células T regulatorias (Treg) y células NK (Sevic *et al.*, 2019). Ha sido reportado que los cambios en el número y la función de estas células pueden contribuir no solo a la progresión del HCC como se mencionó anteriormente, sino también al desarrollo de la tolerancia inmune (Chen *et al.*, 2023). Los TAMs se caracterizan por ser el tipo de célula inmunitaria más importante que promueve la invasión y metástasis del tumor. Los macrófagos, como las células de Kupffer, secretan varios tipos de citoquinas y factores cruciales para la progresión del HCC, la metástasis y la resistencia a la quimioterapia (Figura 2).

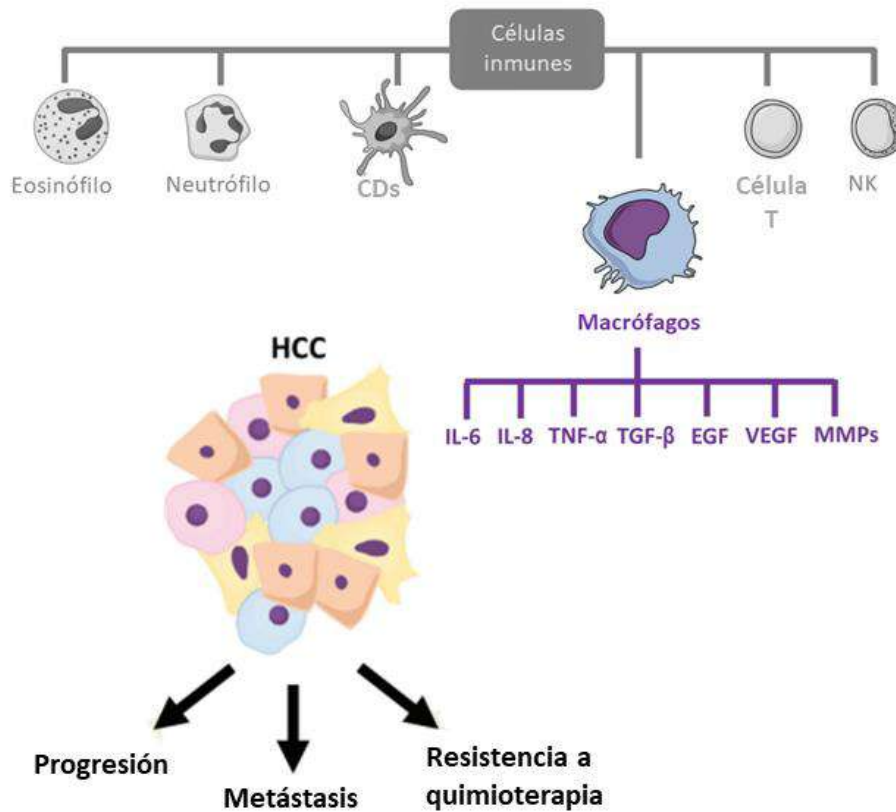


Figura 2. Células inmunes en el microambiente tumoral. CDs, células dendríticas; NK, células *natural killer*; IL, interleuquina; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α ; TGF- β , factor de crecimiento transformante- β ; EGF, factor de crecimiento epidérmico; VEGF, factor de crecimiento vascular endothelial; MMPs, metaloproteinasas de la matriz. Modificado de Sevic *et al.*, 2019.

El HCC conlleva un estado de inmunosupresión que suele manifestarse luego del tratamiento con la reactivación del tumor y la recurrencia de la enfermedad, por tal motivo, terapias que activen al sistema inmunológico constituyen un nuevo enfoque terapéutico para el HCC. La modificación de un microambiente inmunosupresor por otro más inmunogénico es uno de los principales desafíos de la inmunoterapia, por lo tanto, los esfuerzos se centran en superar este entorno desfavorable y generar una potente respuesta inmune (Llovet *et al.*, 2022).

1.3.2 Tratamientos para el HCC

Sólo una pequeña fracción de los pacientes diagnosticados en las primeras etapas de la enfermedad son elegibles para terapias curativas como la resección hepática, el trasplante o la ablación. Lamentablemente las principales opciones de tratamiento no son aplicables en la mayoría de los pacientes por deterioro en la función hepática o debido a que la enfermedad se encuentra muy avanzada al momento de ser diagnosticada. Para los pacientes en estadio avanzado, el tratamiento con sorafenib y regorafenib en primera y segunda línea ha demostrado un pequeño incremento en la supervivencia de los pacientes comparado con placebo (Singal *et al.*, 2023). Sin embargo, en general, el HCC es refractario a la quimioterapia como a otros tratamientos sistémicos, y las terapias loco-regionales (quimioembolización o radiofrecuencia) suelen tener solo un efecto paliativo (Llovet *et al.*, 2021, 2022). Las alternativas terapéuticas para el HCC han mejorado sustancialmente durante los últimos años. El tratamiento se asigna según el estadio tumoral y los beneficios esperados de las intervenciones mayores, según el estudio del Cáncer de Hígado de la Clínica Barcelona (BCLC). Este sistema de clasificación de los pacientes fue incorporado por las asociaciones americana y europea para el estudio de las enfermedades hepáticas, AASLD y EASL, respectivamente (Galle *et al.*, 2018; Singal *et al.*, 2023). En los pacientes que presentan cirrosis y han sido diagnosticados con HCC, la estrategia de tratamiento dependerá no sólo de la extensión tumoral, de la existencia de metástasis, y de la invasión vascular, sino también de la función hepática residual (Child-Pugh score) y del estado general del paciente (performance status). Esto se debe a que estos últimos índices condicionan en muchos casos la supervivencia y la aplicabilidad de los tratamientos. Así, para pacientes en estadio 0 (muy precoz) o A (precoz) se eligen opciones terapéuticas con intención curativa (trasplante, resección o técnicas de ablación) y su supervivencia varía entre el 50 % y el 70 % a los 5 años (Parikh *et al.*, 2020). En principio, para el caso de pacientes en estadio temprano se prefiere la resección quirúrgica, trasplante o ablación local. Estas opciones terapéuticas con intención curativa sólo son aplicables en una minoría de los pacientes debido a los estrictos criterios en la selección de los candidatos. Más aún, el trasplante hepático también es limitado por la disponibilidad de donantes. En los pacientes categorizados en etapas intermedias, la opción de tratamiento es el TACE (del

inglés, *transarterial chemoembolization*) y aquellos con enfermedad avanzada reciben principalmente terapias sistémicas como la administración de inhibidores de quinasas de tirosina o anticuerpos monoclonales dirigidos contra puntos de control inmunológico (Li *et al.*, 2021). Estas terapias han mejorado la historia natural reportada de casos no tratados en cada una de las etapas, con tiempos de supervivencia medios para HCC temprano, intermedio y avanzado de aproximadamente 36, 16 y 6 meses, respectivamente, en pacientes con función hepática conservada. Sin embargo, de las terapias sistémicas disponibles para HCC intermedio y avanzado, ninguna ofrece una resolución total de la enfermedad y en algunos casos los pacientes no responden a la terapia (Llovet *et al.*, 2021). La eficacia limitada de estos tratamientos probablemente se deba a una variedad de factores, como el entorno inmune antiinflamatorio en el hígado cuyo objetivo es tolerar antígenos extraños, la baja inmunogenicidad de las células malignas, una ineficaz presentación cruzada del antígeno por células dendríticas o el agotamiento de las células T citotóxicas, entre otros.

1.3.2.1 Terapias sistémicas

El ámbito de la terapia sistémica para el HCC está evolucionando rápidamente y abarca una variedad de tratamientos. Las terapias sistémicas aprobadas se dividen en términos generales en dos grupos: (1) las terapias dirigidas antiangiogénicas y (2) los inhibidores de puntos de control inmunológicos (ICI; del inglés, *immune checkpoint inhibitors*). Las terapias antiangiogénicas dirigidas incluyen los inhibidores de quinasas (sorafenib, lenvatinib, cabozantinib, regorafenib) y anticuerpos monoclonales antiangiogénicos (ramucirumab y bevacizumab). Actualmente, los ICI incluyen inhibidores de la muerte programada 1 (PD-1) (pembrolizumab y nivolumab) o su ligando (PD-L1) (durvalumab y atezolizumab), e inhibidores de la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) (tremelimumab e ipilimumab) (Singal *et al.*, 2023). Actualmente, la terapia de elección en primera línea es el uso de atezolizumab más bevacizumab o durvalumab más tremelimumab.

1.3.2.2 Inmunoterapias

La inmunoterapia en cáncer se ha convertido en un elemento básico de la oncología. Esta opción terapéutica se basa en utilizar componentes del sistema inmune del paciente para selectivamente eliminar las células cancerosas. Uno de los principales beneficios de la inmunoterapia es evitar los efectos adversos de las opciones tradicionales de tratamiento (Koury *et al.*, 2018). El sistema inmune es capaz de reconocer células tumorales de dos formas, ya sea reconociendo moléculas expresadas específicamente por las células tumorales (antígenos o mutaciones específicas del tumor), o bien por reconocimiento de moléculas que se expresan diferencialmente en células tumorales en comparación con células normales (antígenos asociados al tumor) (Finn, 2008). La inmunoterapia contra el cáncer mediante el uso de ICI, citoquinas activadoras de linfocitos, linfocitos T con receptor de antígeno quimérico (CART *cells*) y otras células, los virus oncolíticos y los anticuerpos biespecíficos, son algunos ejemplos de estrategias de tratamiento que permiten la activación del sistema inmune (Riley *et al.*, 2019; Zhang & Zhang, 2020). A pesar del rápido desarrollo y el gran potencial de la inmunoterapia contra el cáncer, sólo entre el 10 % y el 30 % de los pacientes han obtenido el beneficio terapéutico de ICI debido a respuestas insatisfactorias según informes clínicos (Sharma *et al.*, 2017). Los pacientes también experimentan graves efectos adversos relacionados con la sobre estimulación del sistema inmunológico, como tormenta de citoquinas, neumonitis y efectos neurotóxicos, que podría ser fatal debido a la distribución no deseada de ICI (Wang *et al.*, 2018).

1.3.2.3 Muerte celular inmunogénica como estrategia terapéutica

Un enfoque prometedor para activar el microambiente inmunológico de tumores es la inducción de la muerte celular inmunogénica (ICD, del inglés *immunological cell death*) en células tumorales (Figura 3). La ICD es un fenómeno de muerte celular regulada que se caracteriza por la liberación de antígenos y patrones moleculares asociados al daño (DAMP) incluida la calreticulina (CRT), en la superficie de las células tumorales. También se liberan otros factores como la proteína del grupo B1 de alta movilidad (HMGB1; del inglés, *high mobility group box 1 protein*), el adenosín-5'-trifosfato (ATP) y las proteínas

de choque térmico (HSP; del inglés, *heat shock proteins*) (Kroemer *et al.*, 2022). La calreticulina es una proteína soluble presente en el retículo endoplasmático que, ante condiciones de estrés, es capaz de trasladarse a la superficie de la célula tumoral (Gold *et al.*, 2010). Este proceso de translocación se desencadena mediante la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eucariótica (eIF2 α) a través de una quinasa del retículo endoplasmático y la activación de proteínas proapoptóticas a través de la proteína 31 asociada al receptor de células B mediada por caspasa 8 (BCAP31) (Garg *et al.*, 2012). La unión de calreticulina con el receptor CD91 actúa como una señal de "cómeme" para facilitar que las células presentadoras de antígenos reconozcan a los antígenos específicos liberados por las células tumorales (Michaud *et al.*, 2014). La muerte celular inmunogénica es precedida por la autofagia y cuando las células activan la autofagia, se produce la secreción de ATP que se une a los receptores P2X7 en los fagocitos (Galluzzi *et al.*, 2012), y este proceso de unión de ATP sirve como una señal de "encuéntrame" para reclutar fagocitos como células dendríticas, macrófagos y monocitos (Vigano *et al.*, 2019). Por otro lado, HMGB1 interactúa con el receptor tipo Toll 4 (TLR4) facilitando la maduración de las células dendríticas que liberan citoquinas proinflamatorias con potentes efectos inmunoestimulantes (Saenz *et al.*, 2014); y las HSP, incluida la HSP70, pueden atraer fagocitos y activar a las células NK.

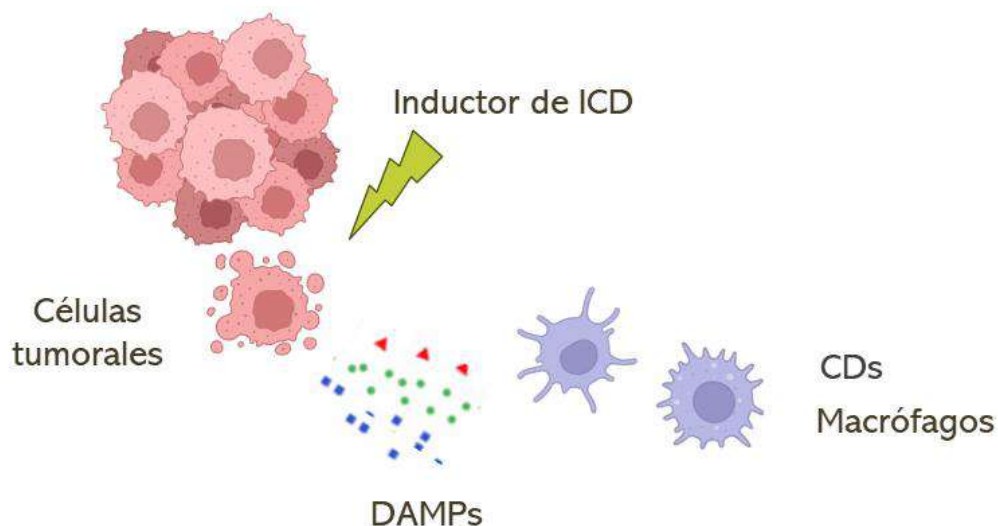


Figura 3. Representación esquemática de la ICD. En presencia de un inductor de ICD, se produce la liberación de DAMPs y antígenos tumorales que permiten el reclutamiento de CPA como macrófagos y células dendríticas.

En los últimos años, diversos estudios revelaron que algunos agentes quimioterapéuticos incluyendo doxorrubicina (Dox), paclitaxel y oxaliplatino podrían matar las células tumorales a través de la muerte celular inmunogénica, lo que podría activar respuestas inmunes antitumorales innatas y adaptativas (Li *et al.*, 2022). Un problema recurrente de la quimioterapia tradicional es que puede causar efectos secundarios graves, una alta tasa de recurrencia y un gran nivel de resistencia (Oliver *et al.*, 2018). Por este motivo, se ha propuesto a algunos quimioterapéuticos como inductores de muerte celular inmunogénica para ser combinados con otros agentes, para amplificar esta respuesta por una mayor liberación de antígenos y DAMP. A su vez, estos antígenos asociados a tumor y DAMP pueden *in situ* mejorar la antigenicidad para inducir una respuesta inmune innata y adaptativa más efectiva.

1.3.2.3.1 Doxorrubicina como inductor de muerte celular inmunogénica

Doxorrubicina es una antraquinona que inhibe la replicación del ADN y la síntesis del ARN a través de la activación subapoptótica de la caspasa 8, cuya función es desencadenar la vía apoptótica extrínseca, por medio de receptores de muerte (Mandal *et al.*, 2020). Se ha confirmado que induce muerte celular inmunogénica y se ha utilizado ampliamente como inductor de este tipo de muerte. Ríos-Doria y cols., informaron que la doxorrubicina encapsulada en liposomas aumentó la respuesta antitumoral después de que se combinara con varios inhibidores de puntos de control inmunológico diferentes, que incluyen anticuerpos monoclonales anti-PD-1/PD-L1, CTLA-4 y agonistas del receptor de TNF. Este estudio indicó que el tratamiento aumentó la infiltración de células T CD8+ y simultáneamente disminuyó la proporción de Tregs en los tumores (Rios-Doria *et al.*, 2015).

1.4 Células estromales mesenquimales

1.4.1 Propiedades y caracterización

Las células madre/estromales mesenquimales (MSCs; del inglés, *mesenchymal stem/stromal cells*) constituyen un cultivo heterogéneo de células multipotentes que pueden aislarse de diversos tejidos. Esta población de células progenitoras, residentes en el estroma de prácticamente todos los tejidos, tienen como rol fisiológico el soporte trófico durante la reparación y la regeneración tisular (Visvader & Clevers, 2016). Las MSCs se caracterizan por modular su entorno biológico: son capaces de inducir el reclutamiento de células endógenas, regular la actividad antiinflamatoria y remodelar el tejido. Además, son reclutadas ante eventos de injuria tisular, así como también en procesos tumorigénicos (Bernardo & Fibbe, 2013; Valfrè Di Bonzo *et al.*, 2008). Para poder definir a los cultivos de MSCs, la sociedad internacional de terapia celular (ISCT; del inglés, *International Society for Cellular Therapy*) (Dominici *et al.*, 2006), establecieron que los requisitos mínimos son:

- capacidad de adhesión al plástico,
- potencial para diferenciarse a adipocitos, osteocitos o condrocitos,
- expresar marcadores de superficie de origen mesenquimal (CD105, CD73 y CD90),
- ausencia de expresión de marcadores de linaje hematopoyético CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y el antígeno leucocitario humano (HLA) clase II

Por otra parte, también se ha reportado que las MSCs pueden diferenciarse en células de origen endodérmico (hepatocitos) o neuroectodérmico (oligodendrocitos, astrocitos, neuronas) aunque la tasa de diferenciación tanto *in vitro* como *in vivo*, es muy baja (Volarevic *et al.*, 2018). Todo lo descrito anteriormente da cuenta de la principal característica de las MSCs: la plasticidad. Concretamente, esta propiedad hace referencia a la capacidad que poseen las MSCs para adoptar distintos fenotipos y funciones de distintos tejidos. La plasticidad puede abarcar varios procesos, incluyendo verdadera pluripotencia (es decir, la capacidad de diferenciarse en tejidos derivados de otras capas germinales), transdiferenciación (y reprogramación) o incluso fusión celular (Prockop &

Youn Oh, 2012; Yan *et al.*, 2014). Cabe destacar, que la plasticidad de las MSCs es variable según su origen y fuente (Bolontrade & Garcia, 2017).

1.4.2 Origen y fuentes de MSCs

A fines de la década del '70, Friedenstein logró aislar por primera vez a partir de médula ósea células con capacidad de adherirse al plástico, morfología similar a fibroblastos y capacidad de autorenovación (Friedenstein *et al.*, 1968). Posteriormente se demostró que estas células además podían diferenciarse a osteocitos y adipocitos (Bennett *et al.*, 1991). Actualmente las MSCs pueden ser aisladas de diversos tejidos tales como sangre periférica, tejido adiposo, músculo esquelético, pulmón, hígado, páncreas, pulpa dental, cerebro, membrana sinovial, bazo y timo (M. Li & Ikehara, 2013). La aplicación posterior de las MSCs es un factor determinante en la elección de la fuente y algunos tejidos son preferidos frente a otros. Por ejemplo, en investigación clínica, tejidos como el adiposo y médula ósea son de preferencia debido a la cantidad de MSCs que se pueden obtener (da Silva Meirelles *et al.*, 2009), aunque la accesibilidad a dichos tejidos puede ser una limitante. En este sentido, cobran relevancia otras fuentes como algunos tejidos extraembrionarios, tales como la placenta (In 't Anker *et al.*, 2004), el amnios (Marcus *et al.*, 2008) y el cordón umbilical, tanto MSCs aisladas de la sangre del cordón (Hass *et al.*, 2011), como del tejido asociado (Majore *et al.*, 2011). La utilización de estos tejidos otorga una gran ventaja respecto a la disponibilidad y ausencia de cuestionamientos éticos ya que se utiliza un tipo de tejido que constituye un material de descarte. Se ha sugerido también que las MSCs obtenidas a partir de tejidos neonatales podrían tener una mayor capacidad proliferativa, vida útil y un mayor potencial de diferenciación en comparación con las obtenidas a partir de tejidos adultos (Bayo, *et al.*, 2014a; Hass *et al.*, 2011). Particularmente con el cordón umbilical, se han establecido cultivos a partir de todo el tejido (Majore *et al.*, 2011), del tejido conectivo mesenquimático o gelatina de Wharton (Karahuseyinoglu *et al.*, 2007) o de la sangre contenida en el cordón umbilical (Broxmeyer *et al.*, 2006) y de áreas perivasculares (Sarugaser *et al.*, 2005). Las MSCs aisladas de áreas perivasculares del cordón umbilical son de particular atención debido a que se ha reportado que tienen propiedades antitumorales en ciertos tipos de tumores (Christodoulou *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2009).

1.4.3 Función fisiológica de las MSCs

Las funciones primordiales que cumplen las MSCs *in vivo* están involucradas en la hematopoyesis y la reparación de tejidos dañados. En su función de hematopoyesis, las MSCs derivadas de médula ósea secretan numerosas moléculas tróficas, incluyendo glicoproteínas de la matriz extracelular, citoquinas y factores de crecimiento como factor derivado de las células del estroma 1 (SDF-1), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y angiopoyetina-1, entre otros (da Silva Meirelles *et al.*, 2009; Dorshkind, 1990; Hematti, 2008). Por otro lado, al incorporarse a tejidos dañados, las MSCs pueden diferenciarse en componentes del tejido conectivo, ayudando al proceso de vasculogénesis, o secretar citoquinas y factores de crecimiento lo que facilitaría el proceso de cicatrización (Aquino *et al.*, 2010). Numerosos estudios han demostrado que el principal efecto de las MSCs sobre la reparación de los tejidos ocurre a través de la secreción de moléculas bioactivas, es decir por un efecto paracrino y esta función se ve facilitada por la capacidad de estas células de migrar hacia sitios de injuria e inflamación (Volarevic *et al.*, 2014). En condiciones fisiológicas, se estima que estas células se encontrarían circulando en sangre periférica en muy bajas cantidades, mientras que la mayoría residiría en la médula ósea (Kuznetsov *et al.*, 2001; Mansilla *et al.*, 2006). Al producirse una injuria, una serie de señales como un aumento de la concentración del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor estimulante de granulocitos (G-CSF) en sangre periférica, induciría la movilización de MSCs en el torrente sanguíneo y migrarían al sitio de lesión para la regeneración del tejido dañado (Karp & Leng Teo, 2009; Tondreau *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008).

Es interesante destacar que las MSCs pueden comportarse en el entorno tumoral de manera similar que en el tejido dañado. Al igual que en los procesos de regeneración del tejido, estas células se pueden diferenciar tanto en fibroblastos como en pericitos y, posiblemente, también en células de tipo endotelial (Short *et al.*, 2003; Spaeth *et al.*, 2009). Por otra parte, las MSCs son capaces de secretar diversos componentes de la matriz extracelular y citoquinas como VEGF y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que pueden promover la proliferación y contribuir a la angiogénesis (Beckermann *et al.*, 2008).

1.4.4 Capacidad de las MSCs para la migración y anclaje a tumores

El establecimiento y desarrollo de un tumor es un proceso complejo que involucra el intercambio de señales entre -las células tumorales y su microambiente. Esta interacción tiene un rol crítico en el crecimiento, invasión, angiogénesis y metástasis tumoral, resultando en un proceso sostenido de destrucción y reparación que lleva a considerar a los tumores como heridas no resueltas (Flier *et al.*, 1986; Schrader *et al.*, 2011). El tropismo natural de las MSCs a los tumores ha sido demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* en diversos modelos tumorales (Hall *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2005; Studeny *et al.*, 2004), incluyendo glioma, melanoma, cáncer de colon y cáncer de mama, entre otros (Hall *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2005; Studeny *et al.*, 2004). Los mecanismos involucrados en el reclutamiento de las MSCs por los tumores, muestra numerosas similitudes con los que presentan para migrar y anclarse en los tejidos inflamados. Han sido reportados así numerosos factores solubles como el TNF- α , SDF-1, IL-8, IL-1 β , IL-6, PDGF y el factor de crecimiento hepático (HGF), entre otros, que son capaces de inducir la migración tanto *in vitro* como *in vivo* en diversos modelos tumorales (Birnbaum *et al.*, 2007; Carrero *et al.*, 2012; Forte *et al.*, 2006). Además, evidencias previas de nuestro laboratorio demuestran que la vía del factor de motilidad autocrina (AMF; del inglés, *autocrine motility factor*) y su receptor (AMFR; del inglés, *autocrine motility factor receptor*) tendrían un rol relevante en el reclutamiento de las MSCs hacia el hepatocarcinoma (Bayo *et al.*, 2014b). Por otra parte, también se ha demostrado que las MSCs derivadas de áreas perivasculares de cordón umbilical poseen una mayor capacidad migratoria a tumores hepáticos, en comparación con MSCs derivadas de médula ósea y esto sería, al menos en parte, debido a diferencias en la expresión de receptores de citocinas/quimiocinas (Bayo *et al.*, 2014a).

1.4.5 Utilización de MSCs en terapia celular adoptiva

Las MSCs son una fuente prometedora de células para aplicarlas en distintas estrategias de terapias celulares, como ser en medicina regenerativa, como vehículo de genes terapéuticos o inmunoestimulantes, o de virus oncolíticos (Hai *et al.*, 2012; Keshavarz *et al.*, 2020). La principal ventaja que fundamenta el uso de MSCs en este tipo de

estrategias terapéuticas es su característica de ser “inmunoprivilegiadas”. Esto se debe a que las MSCs carecen de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II y expresan bajos niveles de CMH de clase I; además carecen de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 esenciales para la activación del sistema inmune. Asimismo, pueden regular el sistema inmunológico mediante la secreción de citoquinas y factores tróficos que, en conjunto, también modulan el microambiente del tejido en que se encuentran (da Silva Meirelles *et al.*, 2009). Por esta característica, es que las MSCs pueden evitar el rechazo inmunitario al ser trasplantadas de forma alogénica (Fu *et al.*, 2019; Pittenger *et al.*, 2019). Por otra parte, la plasticidad funcional de las MSCs para sentir el microambiente inflamatorio en que se encuentran, es otra característica importante para su aplicación terapéutica. En este sentido, si el microambiente es levemente inflamatorio, las MSCs pueden tener un comportamiento pro-inflamatorio. Sin embargo, en un contexto altamente inflamatorio, desempeñan un importante efecto inmunoregulador (Kaundal *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2013). Esta característica es también explotada para modular su perfil funcional a través de la generación de condiciones especiales de cultivo *in vitro*; por ejemplo, la pre-incubación con TGF- β 1 reduce su capacidad inmunosupresora (Ghosh *et al.*, 2017) mientras que la incubación con INF- γ , TNF- α e IL-17 la aumentan (Han *et al.*, 2014). Por estas características mencionadas: la capacidad de migrar selectivamente al tumor, la factibilidad de obtenerlas *in vitro* en cantidad y calidad y el inmunoprivilegio, las MSCs constituyen una excelente herramienta para vehicular genes terapéuticos que puedan potenciar la respuesta inmune anti-tumoral.

1.5 Terapia Génica

Según el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano de Estados Unidos, la terapia génica se define como una técnica basada en la transferencia de material genético exógeno a células, tejidos u órganos con el fin de resolver un defecto genético u otro tipo de afecciones. El material genético que puede ser transferido es muy diverso. En los primeros ensayos en la historia de la terapia génica se utilizaron virus y ADN recombinante. A comienzos de la década del setenta, se utilizó el virus de papiloma con

la intención de introducir el gen de la arginasa en pacientes que padecían un trastorno en el ciclo de la urea (Mercola *et al.*, 1980; Terheggen *et al.*, 1975), aunque sin éxito en lograr la expresión del gen. En 1980, se logró la inserción de genes foráneos en células de médula ósea de ratón utilizando ADN recombinante (Mercola *et al.*, 1980), demostrando además que las células modificadas podían expresar los genes y repoblar parcialmente la médula (Mercola *et al.*, 1982). Sin embargo, no fue sino hasta principios de los años noventa que se llevó a cabo el primer ensayo clínico en humanos utilizando un gen terapéutico en dos pacientes que padecían la deficiencia de adenosina desaminasa (ADA-SCID), una enfermedad monogénica que conduce a una inmunodeficiencia grave (Blaese *et al.*, 1995). El campo de la terapia génica continúa en vías de desarrollo dentro de las ciencias básicas para el tratamiento de distintas enfermedades y en términos de ensayos clínicos, al presente, este enfoque terapéutico está dirigido principalmente a patologías tumorales (Figura 4).

Indicaciones abordadas por los ensayos clínicos de terapia génica

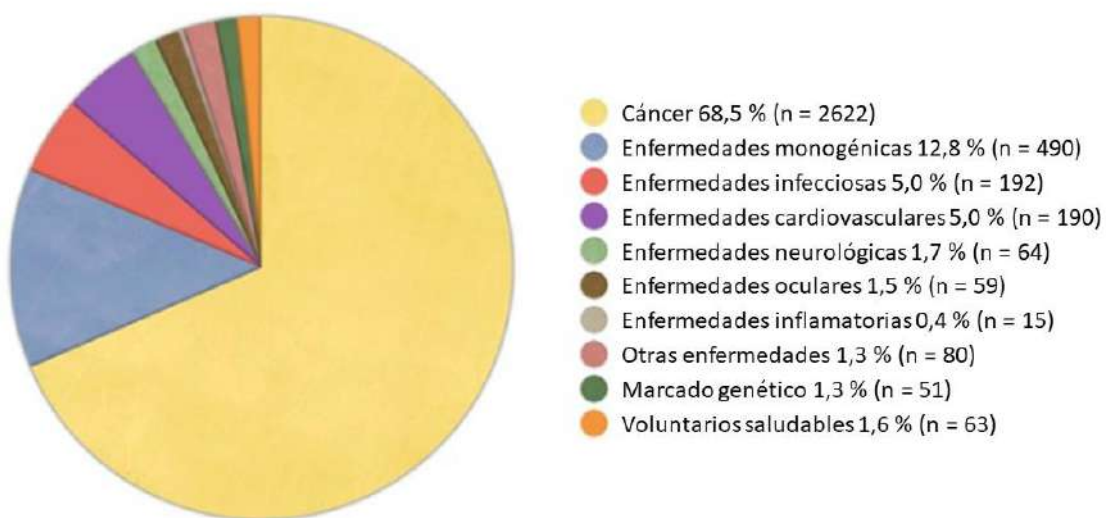


Figura 4. Indicaciones terapéuticas de ensayos clínicos registrados en la base de datos del Journal of Gene Medicine, Wiley and Sons. Adaptado de <http://www.abedia.com/wiley/index.html>.

1.5.1 Vectores utilizados en terapia génica

Para la transferencia de material genético se utilizan vectores que permiten la introducción del material de manera segura y específica (Prieto *et al.*, 2004). Los vectores

pueden clasificarse en vectores virales y no virales, siendo los primeros los más utilizados debido a su eficacia en cuanto al nivel de expresión génica. El diseño de vectores virales se realiza mediante la supresión de regiones implicadas en el proceso de replicación viral y la incorporación, en su lugar, del material genético de interés (Prieto *et al.*, 2004). De esta forma el nuevo virus es defectivo, lo que significa que mantiene la capacidad de infectar a las células, pero es incapaz de replicarse en ellas. Se utilizan diferentes virus para construir vectores, entre ellos los más utilizados son los adenovirus (Ad), los retrovirus (incluyendo lentivirus), virus adenoasociados (AAV), entre otros (Waehler *et al.*, 2007). Sin embargo, la aplicación de vectores virales recombinantes presenta algunas desventajas como la citotoxicidad intrínseca y, en algunos casos, la inmunogenicidad, lo que han limitado su amplio uso a nivel clínico. Por otro lado, los vectores no virales constituyen un grupo variado en el que se han desarrollado tecnologías que permitieron superar algunas desventajas de los vectores virales. Los vectores no virales más empleados son el ADN desnudo (ADN plasmídico) y los complejos ADN-proteína. Los vectores no virales se pueden clasificar en químicos y físicos según la metodología utilizada para la transferencia génica. Los métodos de transferencia de vectores no virales químicos, se basan en el uso de materiales naturales o sintéticos que pueden mantener la integridad del material genético, ya sea ADN o ARN, y transferir el material genético a las células diana (Dang & Leong, 2006; Luten *et al.*, 2008). En el caso de los métodos de transferencia de vectores no virales físicos, como la nanomicroinyección, la vibración molecular, el bombardeo de partículas, la sonoporación, la electroporación y la irradiación láser, permiten que el ADN plasmídico entre en las células. En comparación, los métodos químicos constituyen métodos más destructivos, aunque la transferencia física es más fácil y, a menudo, más eficiente para las células difíciles de transfectar (Jo & Tabata, 2008; Mehier-Humbert & Guy, 2005; Slivac *et al.*, 2017).

1.5.2 Uso de ARNm en terapia génica

En el grupo de vectores no virales se incluye el ARNm sintetizado *in vitro* (ARNm IVT; del inglés, *in vitro transcribed mRNA*) como otra forma de expresión de proteínas. La principal diferencia de esta alternativa en comparación con el ADN radica en que la molécula de ARNm codifica la proteína directamente en el citoplasma sin necesidad de

que sea traslocada al núcleo, por lo cual no se integra en el genoma y permite la expresión proteica en todas las células sin necesidad de que se encuentren en división. Esta diferencia le da al sistema una expresión extremadamente alta de la proteína, similar a lo obtenido con los sistemas virales, un tiempo de expresión más inmediato y a su vez permite tener control sobre la expresión de acuerdo con la demanda del efecto farmacológico (Smits *et al.*, 2004; Youn & Chung, 2015). Inicialmente, el uso de este sistema se vio restringido debido a la expresión transitoria de la proteína ya que, una vez traducido todo el ARNm disponible, cesa la expresión de proteínas. Además, el ARNm es una molécula de baja estabilidad química y a nivel intracelular, este hecho aumenta la probabilidad del reconocimiento por el sistema inmunológico que conduce a la degradación del mismo. Cabe destacar que inicialmente la síntesis *in vitro* del ARNm producía una molécula químicamente inestable (Angel & Yanik, 2010). Por tal motivo, se han desarrollado diversas estrategias para aumentar la estabilidad del ARNm, disminuir su inmunogenicidad y aumentar su eficiencia de traducción posterior (Andries *et al.*, 2015; Karikó *et al.*, 2008; Kormann *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016). Durante varios años y aún en la actualidad, se evalúa el uso del ARNm IVT para vacunas contra el cáncer, tanto a nivel experimental como en ensayos clínicos (Heiser *et al.*, 2002; Wilgenhof *et al.*, 2013). En el año 2023, el premio Nobel de medicina fue otorgado a los Dres. Drew Weissman y Katalin Karikó por sus aportes al diseño de ARNm sintético estable que permitieron el desarrollo de una vacuna contra el virus SARS-CoV-2, abriendo caminos para explorar su uso en otras patologías (Karikó *et al.*, 2005; Karikó *et al.*, 2008). En la reacción química de transcripción para generar el ARNm, se reemplaza al nucleósido uridina con pseudouridina. Como resultado, se observa que esta modificación química, aumenta la estabilidad, disminuye la inmunogenicidad del ARNm y aumenta la traducción en el citoplasma (Karikó, 2022). No obstante, es importante resaltar que el uso del ARNm sintético para el reemplazo de proteínas en diversas patologías aún se encuentra en fase pre-clínica (Cafri *et al.*, 2020; Karikó *et al.*, 2012; Zimmermann *et al.*, 2012).

1.5.2.1 Reacción de transcripción *in vitro*

Para la reacción de transcripción *in vitro* es fundamental el diseño adecuado de un molde o templado de ADN que permitirá la generación del ARNm sintetizado de manera

artificial. Para ello, es importante tener en cuenta aquellos aspectos que influyen en la naturaleza bioquímica de los ARNm. Los ARNm son largas moléculas de simple cadena que poseen 4 elementos estructurales esenciales (Figura 5): un nucleótido modificado conocido como capuchón en el extremo 5' (CAP), las regiones no traducibles (UTRs), el marco abierto de lectura (ORF) y la cola de poli(A) en el extremo 3'.

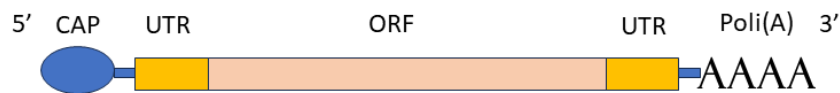


Figura 5. ARNm. Representación de la estructura de ARNm funcional. CAP, capuchón; UTR, regiones no traducibles; ORF, marco abierto de lectura; Poli(A), secuencia de nucleótidos de adenina.

El CAP es una estructura esencial para el proceso de la traducción del ARNm. En la naturaleza consiste de 7-metilguanósina (m7G) unida al extremo 5' del ARNm a través de un puente 5'-5'-trifosfato (ppp) (m7GpppN) (Ramanathan *et al.*, 2016). Para regular la traducción y degradación de los ARNm, las células eucariotas poseen una maquinaria enzimática de decapado (Dcp1, Dcp2, DcpS) que permiten la remoción del CAP según las necesidades de uso del ARNm (Liu *et al.*, 2002). El ARNm decapado es degradado rápidamente en sentido 5' a 3'. Es por eso, que en la reacción para generar ARNm IVT se le adiciona un análogo del CAP conocido como ARCA (3'-O-Me-m7G (5') ppp (5')G) (Jemielity *et al.*, 2003; Stepinski *et al.*, 2001). Este análogo posee una modificación en su extremo 3' de 3'-OH a 3'-O-Me que permite su incorporación en una única orientación, reduciendo la posibilidad de sintetizar ARNm no traducional. A su vez, otorga al ARNm mayor resistencia frente a las enzimas de decapado, aumentando la vida media de los ARNm IVT en el citoplasma de la célula, promoviendo su unión a la subunidad menor del ribosoma y por consiguiente aumentando el porcentaje de traducción de la proteína deseada (Grudzien-Nogalska *et al.*, 2013; Mockey *et al.*, 2006; Sonenberg & Gingras, 1998). Los UTRs son regiones no traducibles que regulan post transcripcionalmente la expresión génica. Los mismos presentan secuencias específicas que les permiten unirse

a proteínas regulatorias, tanto activando como inhibiendo la iniciación de la traducción e influyendo directamente en la actividad biológica de los ARNm (Sweeney *et al.*, 1996; Timchenko, 1999). A su vez, la longitud y las estructuras secundarias de los mismos también influyen en la eficiencia de traducción. Los UTR se encuentran ubicados en los extremos 5' y 3' del marco abierto de lectura, regulando los niveles de expresión del gen. El 5' UTR principalmente regula la iniciación de la traducción, uno de los pasos más complejos del proceso ya que requiere de la unión adecuada del ribosoma, así como el posterior reconocimiento de la secuencia de iniciación. Esta secuencia consta del codón de inicio (AUG) preferentemente en el contexto de la secuencia Kozak (+4 (G), -3 (A/G)), lo cual va a aumentar en gran medida la traducción (Kozak, 1987). Por otro lado, el 3' UTR juega un rol importante en la estabilización del ARNm y, en última instancia, permite una expresión génica más duradera en el tiempo (Matoulkova *et al.*, 2012). Debido a todo lo explicado previamente sobre estas regiones regulatorias, es de preferencia incluir los UTRs cuando se realice la síntesis de los ARNm IVT, para lograr una mayor eficiencia y estabilidad de la traducción. Se ha demostrado, por ejemplo, que la inserción de los UTRs de la β -globina es efectiva para aumentar la expresión de diversos genes por la naturaleza del efecto regulatorio de los UTRs (Crowley *et al.*, 2015). Respecto del ORF, si bien esta región no influye en la expresión del ARNm, su composición nucleotídica puede afectar la estabilidad del ARN y por consiguiente la actividad traduccional, ya que una mayor estabilidad del ARNm se correlaciona con mayores niveles de expresión de la proteína (Al-Saif & Khabar, 2012). Finalmente, la cola de poli(A) protege a los ARNm de la degradación por las nucleasas al unirse a las proteínas de unión a poli(A) (PABP) (Kahvejian *et al.*, 2005). Es por eso, que la longitud de la misma también influye en la estabilidad del ARNm IVT (Wang *et al.*, 1999). Se ha determinado que una longitud de 64 a 150 bases de adenina es lo recomendado para una traducción eficiente, sin embargo, esto puede variar según la célula en donde se quiera expresar dicho ARNm (Youn & Chung, 2015). Para que esta estructura esté presente en el ARNm sintético, se añade una cola de poli(T) al templado de ADN previo a la transcripción.

1.6 Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos

1.6.1 Características generales y fuente celular

El factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) es una citoquina polipeptídica de unos 140 aminoácidos (en ratón 141, en humano 144) incluida en una superfamilia de proteínas involucradas en la mielopoyesis de mamíferos, denominadas en su conjunto como factores estimulantes de colonias (CSF). Concretamente, GM-CSF funciona promoviendo la formación de colonias de macrófagos y granulocitos, a partir de precursores de médula ósea (Burgess & Metcalf, 1980) además de ejercer un efecto sobre células mieloides maduras (Hamilton *et al.*, 1980). Sin embargo, se ha reportado que en ratones carentes de GM-CSF o de su receptor, no se altera significativamente el sistema mieloide, aunque sí se observa una ausencia de macrófagos alveolares y una reducción de células dendríticas de tejidos no linfoides (Bogunovic *et al.*, 2009; Greter *et al.*, 2012; Guilliams *et al.*, 2013; Varol *et al.*, 2009).

En cuanto a la producción del GM-CSF, la fuente principal pueden ser tanto células hematopoyéticas como algunas no hematopoyéticas (fibroblastos, células endoteliales entre otras) aunque requieren un estímulo previo (Becher *et al.*, 2016; Sheih *et al.*, 2017).

1.6.2 Rol de GM-CSF en el sistema inmune

Como se mencionó anteriormente, el GM-CSF es importante en la formación de varios tipos celulares de tipo mieloide pero también sobre la maduración y activación de estas células. En este sentido, el GM-CSF es utilizado para la generación y maduración de células dendríticas a partir de monocitos de médula ósea. Esto lo convierte en una citoquina clave en distintos tipos de enfermedades, principalmente aquellas que involucran cuadros inflamatorios. Durante la inflamación, el GM-CSF actúa sobre macrófagos y células dendríticas para la liberación de otras citoquinas proinflamatorias que, en conjunto, afectan la respuesta inmune regulatoria y efectora (Chen *et al.*, 2021; Lacey *et al.*, 2012).

1.6.3 GM-CSF en inmunoterapia

El GM-CSF modula las funciones de células inmunes innatas que, a su vez, sirven como puente para activar respuestas inmunes adaptativas. En procesos tumorales, el GM-CSF puede tener funciones antagónicas dependiendo del microambiente tumoral como así también la concentración de esta citoquina en este entorno (Figura 6). Un factor crítico a tener en cuenta para considerar al GM-CSF en el desarrollo de una terapia dirigida al cáncer es la dosis. En trabajos realizados sobre distintos tipos de tumor se ha reportado que el GM-CSF puede promover la agresividad del tumor o inhibir su expansión, dependiendo de la dosis aplicada. Si bien bajas concentraciones de GM-CSF permiten la producción adecuada de células inmunes innatas y la posterior activación de respuestas inmunes adaptativas contra el cáncer, altas concentraciones GM-CSF pueden agotar a las células inmunes y promover el crecimiento del tumor (Hong, 2016; Kumar *et al.*, 2022; Serafini *et al.*, 2004). Estas consecuencias dependen en gran medida del tipo de cáncer y del microambiente tumoral. La utilización de GM-CSF para el tratamiento del cáncer aún sigue siendo un desafío debido a que sus efectos positivos ocurren cuando es administrado en forma intratumoral. Se ha reportado que la inyección intralesional de GM-CSF aumenta el número y activa las células T y DC en el microambiente tumoral. Sin embargo, su uso clínico ha sido limitado porque es difícil encontrar tumores que sean accesibles para una inyección localizada y lograr una respuesta inmune sistémica en estos pacientes (Kaufman *et al.*, 2014). Sin embargo, recientemente fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) el talimogén laherparepvec (T-VEC), una inmunoterapia que utiliza GM-CSF. Esta inmunoterapia está basada en un virus oncolítico que produce GM-CSF para el tratamiento del melanoma irreseccable en estadio avanzado. T-VEC es un virus de herpes simple (HSV-1) vivo, genéticamente modificado, que disminuye la infiltración de células T supresoras CD4⁺/FoxP3⁺ y CD8⁺/FoxP3⁺ en el microambiente tumoral (Ferrucci *et al.*, 2021). El GM-CSF además ha sido probado como coadyuvante en otras estrategias terapéuticas como las vacunas. Estas incluyen vacunas de células cancerosas secretoras de GM-CSF (Chen *et al.*, 2014; Dranoff *et al.*, 1993) y vacunas basadas en proteínas de antígenos asociados a tumores fusionadas con GM-CSF (Mashima *et al.*, 2020).

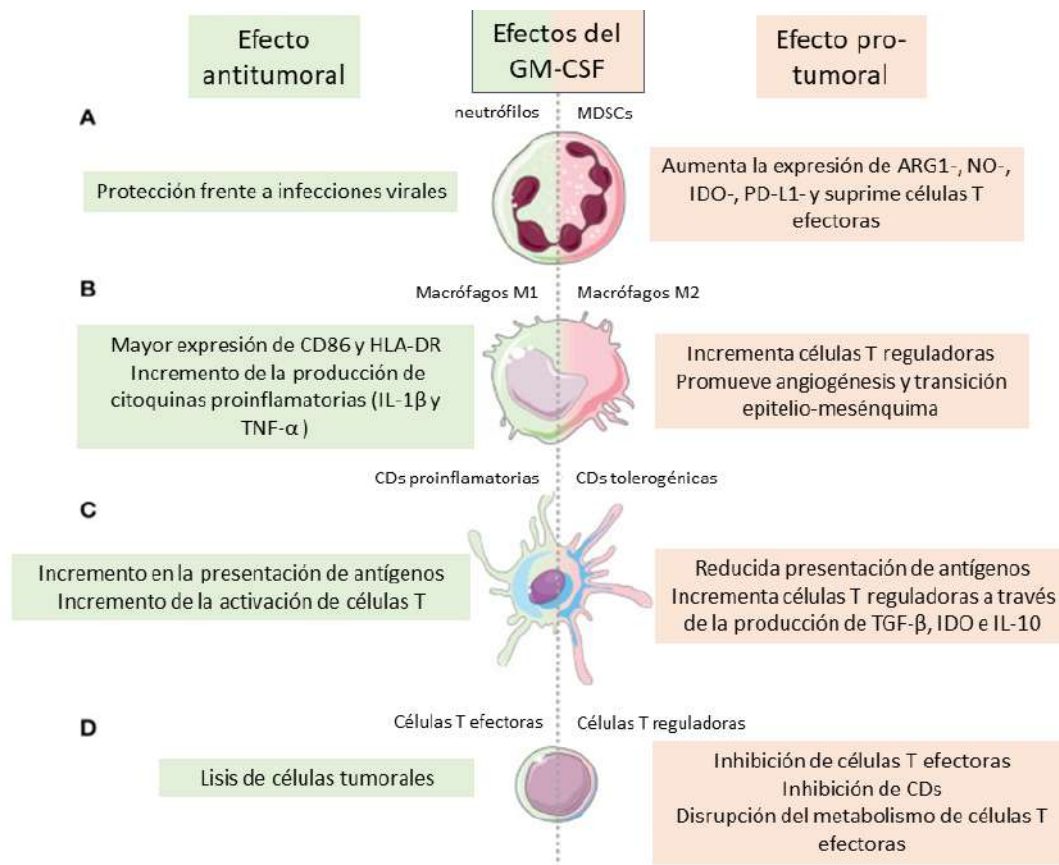


Figura 6. Efectos del GM-CSF en la inmunovigilancia y la supresión en cáncer. Esquema del comportamiento antagónico del GM-CSF dependiendo de su concentración, el tipo de cáncer y el microambiente inmunológico del tumor. El papel del GM-CSF en la mejora de la vigilancia inmune antitumoral se muestra en verde y su papel en la reprogramación de las células inmunes al fenotipo protumoral se muestra en rosa. (A) GM-CSF mejora la producción de neutrófilos al mismo tiempo que tiene el potencial de convertir los neutrófilos en células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) promotoras del cáncer, derecha. (B) Reprogramación de macrófagos: fenotipo M1 supresor de tumores (izquierda) o al fenotipo M2 promotor de tumores (derecha). (C) Conversión de células dendríticas al fenotipo proinflamatorio (izquierda) o al fenotipo tolerogénico que suprime las células T citotóxicas a expensas de las células reguladoras (derecha). (D) Al regular las células mieloides que unen las respuestas inmunes innatas y adaptativas como se describe en (A - C), GM-CSF puede mejorar la función de las células T efectoras (izquierda) o inducir células T reguladoras (derecha). Extraído y adaptado de Kumar *et al.*, 2022.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados sobre el uso del GM-CSF en distintos tumores y sus beneficios sobre el sistema inmune, en este trabajo se propone expresar esta citoquina en MSCs y diseñar una estrategia de tratamiento en un modelo de tumor de HCC. Actualmente las estrategias para el tratamiento del HCC apuntan a utilizar más

de un recurso terapéutico para el abordaje de la enfermedad. Es por esto que proponemos además del empleo de MSCs que expresen GM-CSF, combinar este tratamiento con la administración de doxorubicina. Este fármaco ha sido ampliamente utilizado en quimioterapia, especialmente en la quimiombolización transarterial para el tratamiento local del HCC en estadios intermedios. Aquí utilizaremos este fármaco en dosis que permitan producir los efectos de la muerte celular inmunogénica. En síntesis, se propone como estrategia terapéutica en un modelo de HCC el empleo de MSCs que producen GM-CSF mediante la tecnología de ARNm IVT, combinando dosis mínimas de doxorubicina como adyuvante. Este enfoque terapéutico que combina terapia celular y quimioterapia aún no ha sido explorado en modelos de HCC.

2. Hipótesis de trabajo y objetivos

2.1 Hipótesis de trabajo

La hipótesis de trabajo se basa en que las MSCs serían capaces de producir GM-CSF funcional mediante el uso de ARNm transcripto *in vitro* (ARNm IVT) y secretarlo en el microambiente del HCC. El tratamiento con MSCs que expresen GM-CSF favorecería el reclutamiento de linfocitos T, así como la maduración y presentación antigénica por parte de las células dendríticas. Esto, en un esquema combinado con doxorrubicina, que al inducir muerte celular inmunogénica (con la liberación de DAMPs y otros mediadores celulares) genera un mayor reclutamiento de células del sistema inmunitario, favorecería aún más el desarrollo de una respuesta inmune específica contra el HCC.

2.2 Objetivos

El objetivo general de este proyecto es **evaluar una nueva estrategia terapéutica para el hepatocarcinoma utilizando MSCs que expresan el GM-CSF mediante el uso de ARNm IVT en co-adyuvancia con el quimioterápico doxorrubicina** como inductor de muerte celular inmunogénica.

Para la verificación de la hipótesis propuesta, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Generar MSCs que expresen el GM-CSF (MSC/GM-CSF) utilizando la tecnología de ARNm IVT.
2. Evaluar el efecto *in vitro* de los factores secretados por MSC/GM-CSF sobre células del sistema inmune.
3. Evaluar el efecto *in vitro* de los factores secretados por células de HCC (línea celular Hepa129) pre-tratadas con doxorrubicina en una línea celular de macrófagos.
4. Evaluar el efecto *in vitro* de la combinación de medios condicionados provenientes de MSC/GM-CSF y de Hepa129 previamente tratadas con Dox en una línea celular de macrófagos.

5. Evaluar el efecto terapéutico de MSC/GM-CSF en combinación con Dox (MSC/GM-CSF + Dox) en un modelo animal de tumor.
6. Comparar la eficacia de los tratamientos de manera individual y combinada.

3. Metodología

3.1 Aislamiento y cultivo de MSCs a partir de tejido perivascular de cordón umbilical

3.1.1 Procesamiento de las muestras y condiciones de cultivo

Para este trabajo se generaron cultivos primarios a partir de células del tejido perivascular del cordón umbilical. Para generar estos cultivos, se utilizaron muestras obtenidas de donantes sanos del Hospital Universitario Austral (Pilar, Buenos Aires, Argentina), para lo cual, cada donante firmó un consentimiento informado, previa autorización del proyecto por el Comité Institucional de Evaluación del Centro Académico de Salud de la Universidad Austral (CIE N°12-019). El procedimiento para la obtención de los cultivos se realizó como se describe a continuación (Bayo, *et al.*, 2014a). Se realizó una disección de cada cordón hasta llegar a los vasos, incluyendo la gelatina de Warthon que los rodeaba. Se extrajo el tejido mesenquimatoso perivascular de los vasos mediante disgregación mecánica. Los fragmentos disgregados se colocaron en una placa con medio de cultivo α -MEM completo (suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (%v/v) (Internegocios S.A., Argentina), previamente inactivado a 56°C; 2 mM de glutamina; 100 μ g/ml estreptomycin y 100 UI/ml penicilina). Después de 7 días de cultivo, las células no adherentes y los fragmentos se eliminaron cambiando el medio de cultivo. Cuando el cultivo llegó a un 75-80% de confluencia, las MSCs adherentes se expandieron mediante pasajes sucesivos. En cada pasaje, las células se colocaron en placas con medio de cultivo a una densidad de 4000 células/cm². Se realizó un pool con los cultivos obtenidos en el pasaje 1 que, posteriormente fue expandido y utilizado entre los pasajes 5 y 7.

3.1.2 Caracterización de MSCs obtenidas de tejido perivascular de cordón umbilical humano

Las MSCs se caracterizaron según los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy, ISCT) (Dominici *et al.*, 2006). Las características fenotípicas de las MSCs se determinaron analizando la expresión de las moléculas de superficie de estas células utilizando anticuerpos específicos contra CD90

(conjugado a PE, BD Biosciences cat. 555596), CD44 (conjugado a PE, BD Biosciences cat. 550989), CD34 (conjugado a PE, BD Biosciences cat. 555822), HLA clase II (conjugado a FITC, BD Biosciences cat. 555811), CD80 (conjugado a PE, BD Biosciences cat. 557227), CD86 (conjugado a PE, BD Biosciences cat. 555658) y CD11b (conjugado a PE, BD Biosciences cat. 555388). Brevemente, la suspensión celular fue incubada en buffer FACS (Albúmina de suero bovino 1% en PBS) con el anticuerpo correspondiente durante 45 min a 4°C. Luego de dos lavados, se realizó la lectura de cada marcador en el citómetro BD Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences), y los resultados fueron analizados con el programa del mismo equipo (BD Accuri C6 plus software).

3.2 Diseño y producción del ARNm IVT

3.2.1 Plásmidos

Para la generación de los ARNm IVT se utilizó el plásmido pCR3.1 que contenía la secuencia codificante para GM-CSF murino (mGM-CSF; Addgene, cat#74465) y el plásmido pAAV-IRES-DsRed que contenía la secuencia codificante para DsRed, gentilmente cedido por el Dr. Rodolfo Goya (INIBIOLP, UNLP, La Plata, Argentina).

3.2.2 Amplificación de plásmidos por transformación bacteriana de células competentes por tratamiento con CaCl₂ y obtención de ADN plasmídico

Se realizó un cultivo de bacterias *Escherichia coli* DH5α en medio SOB (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,5% NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) y se incubó a 37°C en agitación hasta una DO₆₀₀ aproximada de 0,600. Se centrifugaron las células (2500 x g, 10 min), se resuspendieron en medio TB frío (10 mM Hepes, 15mM CaCl₂, 250 mM KCl) y se incubaron en frío por 10 min. Las células competentes obtenidas se transformaron con los plásmidos previamente descriptos, por separado. Para ello, la mezcla de bacterias y ADN plasmídico se mantuvo en hielo durante 30 min, luego se sometieron las células a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos y a continuación se colocaron de nuevo en hielo durante 2 min. Luego se incubaron en medio SOB con 20 mM glucosa durante 1 h a 37°C en agitación. Finalmente, se sembraron las células en

placas de LB agar (1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, 1,5% agar) con el antibiótico de selección (ampicilina) y se incubaron durante 24 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se observó el desarrollo de colonias en la placa, se repicaron las colonias observadas en medio líquido SOB para amplificar las colonias. Para este proceso, los cultivos se mantuvieron en agitación a 250 rpm y 37°C. Cuando los cultivos llegaron a una DO₆₀₀ entre 1,300 y 2,600, se colectaron las células por centrifugación (2500 x g, 15 min) y se realizó la extracción del DNA plasmídico de las bacterias amplificadas. Para ello, se utilizaron columnas comerciales (Illustra PlasmidPrep Midi Flow kit, GE) y luego se midió su concentración en NanoDrop.

3.2.3 Amplificación de la secuencia codificante

A partir del DNA plasmídico obtenido, conteniendo las secuencias de GM-CSF y DsRed, se llevó a cabo una PCR para amplificar cada inserto. El objetivo de este paso fue generar los moldes necesarios para luego llevar a cabo la transcripción *in vitro*. Por tal motivo, las secuencias amplificadas deben tener el promotor para la T7 Polimerasa, seguido del 5' UTR, el codón de inicio de la traducción en secuencia Kozak, el gen de interés (GM-CSF o DsRed), el codón de finalización de la traducción, el 3' UTR y, por último, una cola de poli(T) de 120 bases (Figura 7). Debido a que no todos los elementos previamente mencionados estaban presentes en las secuencias del plásmido, fue necesario el diseño de cebadores específicos, por un lado, para amplificar el gen de interés, pero también para agregar los elementos previamente descritos que faltaban en el ADN plasmídico (Tabla 1).



Figura 7. Representación del del ARNm IVT y las secuencias de relevancia. Las flechas rojas representan los cebadores específicos sentido y antisentido.

3.2.4 Transcripción *in vitro* del ARNm

Se realizó la transcripción *in vitro* (IVT) con el uso de un kit comercial (MEGAscript T7 Transcription Kit, Life Technologies, Darmstadt, Alemania). Brevemente, se incubó el producto de PCR junto con la enzima T7, inhibidor de RNAsas, los nucleótidos ATP, GTP y nucleótidos modificados: 5- metilcitosina-5'-trifosfato (Me-CTP, TriLink) y pseudouridina-5'-trifosfato (Pseudo-UTP, TriLink). Estos nucleótidos modificados confieren mayor estabilidad al ARNm, aumentando la probabilidad de transcripción y disminuyendo su eliminación por el sistema inmune. A su vez se adicionó un análogo del capuchón modificado (ARCA, TriLink), también importante para estabilizar el ARNm. La reacción de IVT se llevó a cabo a 37°C durante 4 h. Luego se realizó el tratamiento del ARNm con TURBO DNasa (MEGAscript T7 Transcription Kit) por 15 min a 37°C para remover restos de ADN y posteriormente, la desfosforilación mediante el tratamiento con fosfatasa antártica (New England Biolabs) a 37 °C durante 30 min. Finalmente, se purificó el ARNm obtenido por precipitación con acetato de sodio 5 M y se determinó la concentración con NanoDrop. La calidad y la pureza de los ARNm obtenidos fueron confirmadas por electroforesis en gel de agarosa al 1% y los ARNm fueron almacenados a -80°C para su posterior uso.

3.3 Transfección de las MSCs

3.3.1 Transfección con el ARNm IVT

En primer lugar, se generaron los complejos de lipofectamina (Lipofectamine 2000, Thermo Fisher Scientific) con los ARNm IVT de mGM-CSF o de DsRed. Se probaron dos dosis de ARNm IVT por cantidad de MSCs: 0,2 μg o 0,4 μg ARNm / 4×10^4 MSCs. Los complejos de ARNm IVT y lipofectamina fueron incubados con las MSCs en medio de transfección (OptiMEM con 10% SFB) durante 3 h a 37°C en 5% de CO₂ y agitación suave. Posteriormente, las MSCs transfectadas con ARNm IVT de DsRed (MSC/DsRed) o mGM-CSF (MSC/GM-CSF) fueron sembradas en placa de multiwell con medio α -MEM/10% SFB.

3.3.2 Transfección con plásmido conteniendo la secuencia de mCherry

Similar a lo descrito en el apartado anterior, se generaron complejos de lipofectamina con el plásmido pN1-mCherry. Luego se realizó la incubación de los complejos de lipofectamina y pN1-mCherry durante 2 hs a 37°C en 5 % de CO₂ y agitación suave. Al finalizar el tiempo de incubación, las MSCs fueron sembradas en placa multiwell con medio α -MEM/10% SFB.

3.4 Caracterización de las MSCs transfectadas con ARNm IVT

3.4.1 Evaluación de la eficiencia de transfección

La expresión de la proteína DsRed en las MSCs se realizó por microscopia de fluorescencia a distintos tiempos post-transfección (24, 48, 72 h y 14 días). Además, se evaluó la expresión de DsRed y mCherry por citometría de flujo (BD Accuri C6 plus) a distintos tiempos (2, 4 y 24 h). Los datos fueron analizados con el programa BD Accuri C6.

Para evaluar la expresión de GM-CSF, se recolectó el sobrenadante de cultivo de las MSCs a distintos tiempos post-transfección (24, 48 y 72 h) y se utilizó un kit de ELISA (DuoSet

ELISA, R&D Systems) para cuantificar la concentración de GM-CSF presente en los sobrenadantes de cultivo.

3.4.2 Expresión de marcadores de superficie

Se analizó la expresión de las moléculas de superficie de las MSCs utilizando los anticuerpos descritos previamente para la caracterización de MSCs, siguiendo el mismo procedimiento para citometría de flujo.

3.4.3 Capacidad de migración *in vitro*

La capacidad de migración de las MSCs transfectadas se evaluó en cámaras de Boyden modificada de 48 pocillos (Neuroprobe, Inc.; Figura 8) como se describió previamente (Garcia *et al.*, 2011). Previo a la realización del ensayo de migración, las MSCs transfectadas con los ARNm IVT o sin transfectar fueron cultivadas durante 18 h en α -MEM sin SFB. Para el ensayo de migración, en los pocillos inferiores se colocó medio condicionado de tumor hepático o α -MEM como control, luego se colocó una membrana de policarbonato (poro de 8 μ m, Neuroprobe) y posteriormente en el pocillo superior, las MSCs transfectadas o sin transfectar (12.000 células/pocillo). La cámara se incubó a 37°C durante 4 h. Luego del ensayo se desmontó la membrana y las células del lado superior fueron cuidadosamente removidas por medio de una cuchilla. Aquellas que migraron, en el lado inferior de la membrana, se fijaron con 2% formol y se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich).

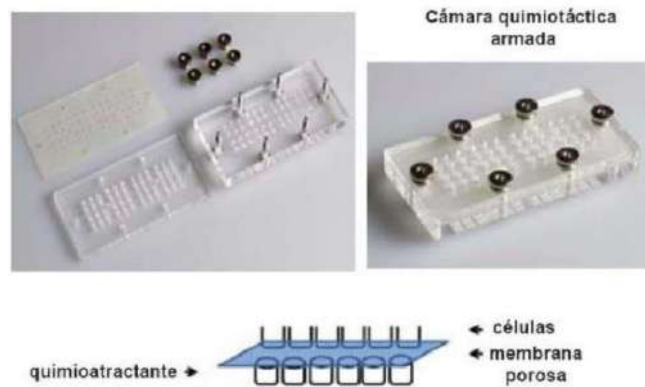


Figura 8. Ilustración de cámara de Boyden (superior) y esquema de siembra (inferior).

Finalmente, el número de células que migraron se determinó por microscopía de fluorescencia utilizando un objetivo de 10X. Las imágenes de tres campos representativos fueron capturadas y posteriormente se realizó el recuento celular utilizando el programa Scion Image (Scion Corporation). Se calculó el número de células promedio por campo y el error estándar de la media (SEM).

3.5 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes: Hepa129 (células de HCC singénicas con ratones C3H/HeN, cedidas amablemente por el Dr. Volker Schmitz de la Universidad de Bonn, Alemania), J774 (línea celular de macrófagos murinos) y CT-26 (células de cáncer de colon singénicas con ratones BALB/c).

Las líneas celulares fueron cultivadas en medios de cultivo completos (suplementados con 10% SFB, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomina) según la línea celular (RPMI 1640 para las líneas Hepa129 y J774, DMEM para la línea CT-26).

3.6 Estudios *in vitro*

3.6.1 Preparación del medio condicionado de las MSCs para ensayos *in vitro*

En el presente trabajo, el sobrenadante de cultivo de las MSCs sin transfectar (MC MSC) y MSCs transfectadas con ARNm IVT DsRed (MC MSC/DsRed) o ARNm IVT GM-CSF (MC MSC/GM-CSF) fue utilizado para distintos ensayos *in vitro* y *ex vivo*. Este sobrenadante fue colectado 24 h posteriores a la siembra de las células a una confluencia del 80 al 90%. Luego, cada sobrenadante colectado se centrifugó durante 10 min a 3500 r.p.m. para remover restos celulares y fue almacenado a -80 °C hasta su utilización. Cuando fue necesario, se realizó una cuantificación de GM-CSF como se describió en el apartado 3.4.1, para establecer la concentración de GM-CSF presente en cada sobrenadante.

3.6.2 Preparación del medio condicionado de Hepa129 previamente tratadas con Dox para ensayos *in vitro*

Se cultivaron células Hepa129 a una densidad de 2×10^5 células/cm² y se las expuso a 50 µM de Dox durante 24 h. Al finalizar el tiempo de incubación, se realizaron 5 lavados con solución fisiológica, se agregó medio de cultivo fresco y se cultivaron las células durante 24 h. Al finalizar la incubación, se centrifugó el sobrenadante de cultivo durante 10 min a 3500 r.p.m. y se almacenó a -80 °C en alícuotas para ser utilizado posteriormente.

3.6.3 Estimulación de línea de macrófagos utilizando MC de MSCs y Hepa129

La línea celular J774 fue cultivada en condiciones estándar de cultivo y para este ensayo, se utilizaron 5×10^5 células por pocillo de placa multiwell de 6 pocillos. En el día 1 del experimento, las células se sembraron a la densidad mencionada con medio de cultivo completo. En el día 2, se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado de las células con solución fisiológica y luego se agregó a cada pocillo el medio correspondiente a distintas condiciones experimentales que se detallan a continuación: medio RPMI, MC MSC/GM-CSF ajustado a una concentración de GM-CSF de 50 ng/ml, MC Hepa/Dox diluido al tercio

y MC MSC/GM-CSF combinado con MC Hepa/Dox; todo en ausencia de SFB, para las diluciones de los casos que lo requerían, se utilizó RPMI. El tiempo de incubación de los macrófagos fue de 30 h, al finalizar este tiempo, los sobrenadantes de cultivo fueron colectados y centrifugados a 3500 r.p.m por 10 min y almacenados en alícuotas. Por otro lado, las células se colectaron con TRIzol Reagent (Sigma-Aldrich Co.) para el posterior aislamiento del ARN y realización de PCR cuantitativa.

3.6.4 Extracción del ARN y análisis de expresión de genes por PCR cuantitativa (qPCR)

Para la extracción del ARN total en experimentos *in vivo*, se recolectaron 30 – 50 mg de tejido tumoral por muestra. Los tejidos se homogeneizaron con Polytron (Janke & Kunkel IKAWERK) y el ARN total se extrajo usando TRIzol Reagent® (Invitrogen), según las recomendaciones del fabricante.

En experimentos *in vitro*, el ARN total se extrajo directamente a partir de la placa de cultivo incubando 2 – 3 min las células (6×10^5), con TRIzol Reagent®. La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa y fue cuantificado con NanoDrop.

Para la síntesis de ADNc, en todos los casos el ARN fue tratado con ADNasa I (Thermo Scientific) previamente a la retrotranscripción. En un volumen final de 10 μ l se incubaron 2 μ g de ARN, solución buffer ADNasa 1X y ADNasa I (2U) durante 30 min a 37°C. Luego de agregar 0,5 μ l de EDTA 25 mM se inactivó durante 10 min a 65°C. Luego, la transcripción reversa se realizó con 200 U de transcriptasa inversa SuperScript II (Life Technologies, California, EE. UU.) utilizando 500 ng de Oligo (dT) como cebador, una mezcla de dNTPs e inhibidor de ARNasa RiboLock (Life Technologies, California, EE. UU). Finalmente, los niveles de expresión de los genes que se detallan en la Tabla 2 se analizaron a partir del ADNc mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) (Agilent Aria, California, EE. UU.). Se utilizó una mezcla de reacción comercial que contiene Taq ADN polimerasa Hot Start, los colorantes SYBR Green y ROX y dNTPS (Productos Bio-Lógicos, Argentina). Todas las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando un ciclo de 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 30 seg,

60°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. Al final de la reacción de PCR, la temperatura se incrementó a 95°C durante 1 min, luego 30 s a 55°C y, finalmente 30 seg a 95°C. La fluorescencia se midió cada 15 seg para construir la curva de disociación. Los valores se normalizaron a niveles del transcripto de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que fue utilizado como gen normalizador para evaluar el nivel de expresión de los genes de interés, utilizando el método de $\Delta\Delta Ct$. Para este método, los niveles de expresión se determinan en relación al nivel de expresión en las células o muestras control. Los ensayos se realizaron por triplicado, en dos o tres experimentos independientes.

Tabla 2. Secuencia de cebadores utilizados para qPCR

Genes	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
TNF- α	5'-GAC CCT CAC ACT CAG ATC ATC TTCT-3'	5'-CCA CTT GGT GTT TTG CTA CGA-3'
F4/80	5'-CTT TGG CTA TGG GCT TCC AGT C-3'	5'-GCA AGG AGG ACA GAG TTT ATC GTG-3'
IL-1 β	5'-TGA CAG TGA TGA GAA TGA CCT GTT C-3'	5'-TTG GAA GCA GCC CTT CAT CT-3'
GAPDH	5'-GGG GCT GCC CAG AAC ATC AT-3'	5'-GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG -3'
CD8	5'-CCG TTG ACC CGC TTT CTG T-3'	5'-CGG CGT CCA TTT TCT TTG GAA-3'
ERp57	5'-ATG CGC TTC AGC TGC CTA G-3'	5'-AGA ACT CGA CCA GCA TGA GC-3'
Tapasina	5'-CTG GTT CGT GGA GGA TGC AG-3'	5'-GCT TTG GGT CAA GAT CTG GC-3'

3.7 Estudios *ex vivo*

3.7.1 Ensayo de proliferación de esplenocitos

Se utilizaron esplenocitos provenientes de los bazo de animales C3H/HeN sanos. Para la obtención de la suspensión celular, los bazo fueron disgregados y se utilizó un filtro de 70 μm (BD) para la separación de los agregados celulares. Posteriormente se lisaron los glóbulos rojos con buffer de lisis (acetato de potasio, 3 ml por bazo) durante 5 min. Las células fueron centrifugadas y sembradas en placa de 96 pocillos (1×10^6 células por pocillo) en medio RPMI 1640 completo. A un grupo experimental se le administró el sobrenadante de cultivo de MSC/GM-CSF a una concentración final de GM-CSF de 20

ng/ml. Como grupos control, se utilizaron esplenocitos a los que se les administró sobrenadante de cultivo de MSC/DsRed en cantidades iguales a las utilizadas para el tratamiento con sobrenadante de MSC/GM-CSF y otro grupo de esplenocitos que solo fue cultivado con medio de cultivo completo. Los tratamientos se realizaron durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se pulsaron las células con timidina tritiada 1 μ Ci/ml (actividad específica 20 Ci/ml; Perkin Elmer) durante 18 h. Posteriormente se lisaron las células y se traspasó a un papel de filtro. Finalmente se lavó el ADN con ácido tricloroacético 10% y luego con etanol 100%. Se midió la incorporación radioactiva utilizando un contador de centelleo (BeckmanLS 6500).

3.7.2 Cultivo de células mononucleares de médula ósea de ratón

Para la generación de este cultivo, se utilizaron tibias y fémures de animales machos con un máximo de 7 semanas de vida. Las muestras se recogieron en solución fisiológica fría. En flujo laminar, se descarnaron los huesos, obteniéndose la médula ósea mediante una jeringa cargada de medio de cultivo RPMI y una aguja 27G. La médula ósea fue filtrada para obtener una suspensión celular que posteriormente se trató con buffer de lisis para lisar los glóbulos rojos. Las células de médula ósea se sembraron en placas a una densidad de 2×10^6 células/ml. Para inducir la diferenciación de los monocitos a células dendríticas, a un grupo experimental se le administró el sobrenadante de las MSC/GM-CSF a una concentración final de 20 ng/ml de GM-CSF; otro grupo experimental, además de sobrenadante de las MSC/GM-CSF, fue estimulado con LPS a concentración final de 1 μ g/ml (18 h de incubación) y otro grupo fue tratado con el sobrenadante de MSC/DsRed (control); durante una semana. Al finalizar este tiempo de estimulación, por citometría de flujo se evaluó la expresión simultánea de marcadores de superficie que permitieron identificar células dendríticas maduras. Para la citometría de flujo se utilizaron anticuerpos anti CD11c (conjugado a PE, BD Biosciences cat. 553802), anti CD86 (conjugado a APC, BD Biosciences cat. 558703) y anti CMHII (conjugado a FITC, BD Biosciences cat. 553623). Las células fueron analizadas como se describió en el apartado 3.1.2.

3.8 Estudios *in vivo*

3.8.1 Animales

En los estudios realizados se utilizaron ratones C3H/HeN y BALB/c comprados en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. La edad de los animales utilizados fue de entre 5 y 7 semanas y fueron mantenidos en el bioterio de nuestra institución. El proyecto fue previamente aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del IIMT, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Pilar, Buenos Aires (N° 19-15). Los experimentos se han llevado a cabo de acuerdo a las normas indicadas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de la Salud (National Academy Press, Washington, D.C. 8° Ed 2010).

3.8.2 Modelos experimentales

Se utilizaron dos modelos de tumor subcutáneo. Para ambos modelos, el tumor se estableció mediante la inoculación directa de células tumorales en el flanco derecho de los animales. Para los animales C3H/HeN se utilizó la línea de HCC murino (Hepa129) inoculando un total de 1×10^6 por animal. Para el modelo con animales BALB/c, la línea celular utilizada fue de carcinoma de colon murino (CT-26) y se inoculó 5×10^5 células por animal. El tamaño tumoral fue registrado tres veces por semana mediante la medición del diámetro tumoral empleando calibre de precisión. El volumen tumoral fue calculado mediante la multiplicación entre el cuadrado del mayor diámetro (D) y el menor diámetro (d) del tumor ($V = \pi/6 \times D \times d^2$). Los distintos tratamientos fueron administrados cuando el tumor adquirió un tamaño entre 60 y 90 mm³ (tumor palpable). Respetando el punto final humanitario, se realizó la eutanasia de los animales cuando el tamaño tumoral alcanzó los 2000 mm³.

3.8.3 Evaluación de la acción antitumoral de los tratamientos individuales y combinados en animales

Se distribuyeron aleatoriamente los animales que presentaban tumor palpable en los diferentes grupos experimentales y ese día se comenzó con los tratamientos según correspondiera. Utilizando las medidas obtenidas con calibre se confeccionó una curva de crecimiento de tumor en el tiempo. Por otro lado, también se elaboró una curva de supervivencia de los animales (curva de Kaplan-Meier). Al grupo que fue considerado control, se le administró solución salina subcutánea peritumoral (vehículo).

3.8.3.1 Tratamiento con MSCs transfectadas con ARNm IVT GM-CSF o DsRed

Los grupos de animales para estos tratamientos, recibieron una única dosis s.c. de 2×10^5 MSC/DsRed (control de células conteniendo ARNm IVT) o 2×10^5 MSC/GM-CSF, en la región peritumoral.

3.8.3.2 Tratamiento con Dox

La Dox se disolvió en solución fisiológica estéril a una concentración de 20 mg/ml, y se administró inmediatamente después de ser reconstituida, vía inyección subcutánea, en ratones portadores de tumor a una dosis de 5 mg/Kg.

3.8.3.3 Tratamiento con MSC/GM-CSF y Dox

A este grupo, se le administró la Dox a una dosis de 5 mg/Kg y al día siguiente se administró la dosis de 2×10^5 MSC/GM-CSF (tratamiento combinado) como se muestra en la figura 9.

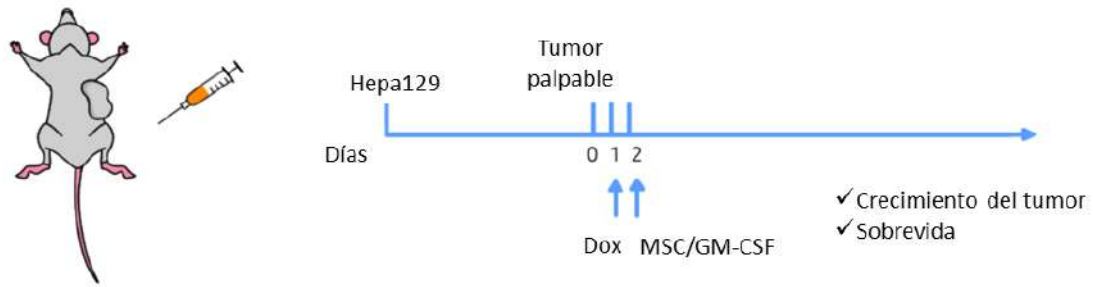


Figura 9. Esquema del modelo de tumor subcutáneo y aplicación del tratamiento.

3.8.3.4 Estudio de la interacción entre tratamientos

Para calcular el DEF300 (del inglés, *Dose Enhancement Factor to reach the tumour a volume of 300 mm³*) se utilizó la siguiente fórmula: (tiempo para alcanzar un volumen del tumor de 300 mm³ con el tratamiento combinado - tiempo para alcanzar los 300 mm³ con el tratamiento individual) / (tiempo para alcanzar 300 mm³ en tratamiento individual - tiempo para alcanzar 300 mm³ en el grupo control).

Para evaluar si existe un efecto sinérgico entre los tratamientos, se utilizó el método de la relación del volumen tumoral (RVT) (Yokoyama *et al.*, 2000) en el modelo de HCC. Para calcular el RVT se utilizó la siguiente fórmula: (volumen tumoral medio experimental) / (volumen tumoral medio control), considerando el día posterior al inicio del tratamiento; (RVT medio de MSC/GM-CSF) x (RVT medio de Dox). A partir de los valores obtenidos de RVT, se calcula el valor $R = [RVT \text{ esperado} / RVT \text{ observado}]$. Un valor de R mayor a 1, indica un efecto sinérgico entre tratamientos, mientras que un valor de R menor a 1, indica que el efecto de los tratamientos es menor a efectos aditivos.

3.8.4 Estudio de poblaciones del sistema inmune presentes en muestras del tumor

Los tumores extraídos de los animales al día 6 post-tratamiento. Los tumores (1 mg) fueron disgregados con 1 ml de colagenasa I (0.05%) (SIGMA, Aldrich), en agitación a 37°C por 30 min para obtener suspensiones celulares que posteriormente fueron tratadas con buffer de lisis de glóbulos rojos por 5 min a temperatura ambiente. Luego

fueron lavadas tres veces con albúmina 1% en PBS 1X a 4°C. Entre lavados las suspensiones fueron centrifugadas a 2500 rpm por 5 min a 4°C. Se incubó cada suspensión celular con anticuerpos anti F4/80 (conjugado a FITC, ABCAM cat. ab105155), anti CMHII (conjugado a FITC, BD Biosciences cat. 553623), anti CD3 (conjugado a FITC, BD Biosciences cat. 555274) y anti CD8 (conjugado a PE-Cy5, BD Biosciences cat. 553034). En todos los casos los anticuerpos se incubaron durante 45 min a 4°C. Se realizó el análisis como se describió en el apartado 3.4.2.

3.9 Análisis estadístico

Los gráficos muestran los valores promedio y el error de la media estándar (SEM). Se analizaron los datos obtenidos con las pruebas estadísticas apropiadas (Test t de Student, test de Mann Whitney, ANOVA, Two-Way ANOVA, Kruskal Wallis, Kaplan Meier) de acuerdo a la variable implicada. Se empleó el programa Prism (GraphPad) y se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

4. Resultados

4.1 Síntesis del ARNm IVT DsRed y transfección de MSCs

4.1.1 ARNm IVT DsRed

El primer paso para el desarrollo del ARNm IVT, fue el diseño de los cebadores para generar el molde de ADN a partir del vector pAAV-IRES-DsRed mediante PCR, para posteriormente realizar la reacción de transcripción *in vitro*. Como se mencionó en la metodología, el diseño de los cebadores debe asegurar la amplificación de la secuencia codificante de DsRed, incluyendo el promotor de la ARN polimerasa T7 en posición 5' y la cola poli(A) en posición 3'. A partir del producto purificado de PCR, se realizó la reacción de transcripción *in vitro*. Brevemente, el ARNm IVT se sintetizó utilizando el producto de la PCR junto con una mezcla de reacción que contenía la ARN polimerasa T7, nucleósidos trifosfato (ATP, GTP, nucleótidos modificados Me-CTP y Pseudo-UTP) y un capuchón modificado (ARCA), para aumentar la estabilidad y la eficiencia de la transcripción. Todos estos ensayos fueron realizados como se resume en la representación esquemática de la figura 10. Al finalizar la purificación del ARNm IVT se obtuvieron concentraciones aproximadas de 1,5 µg/µl.

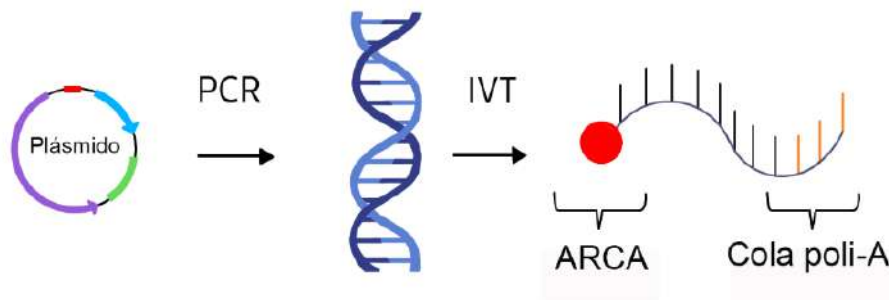


Figura 10. Representación del procedimiento a realizar para la generación del ARNm IVT

4.1.2 Optimización de la transfección de las MSCs y expresión de DsRed

Para determinar las condiciones óptimas de transfección, se probaron dos concentraciones de ARNm IVT: 0,2 µg o 0,4 µg para transfectar 4×10^4 MSCs. Por citometría de flujo, se encontró que al utilizar 0,2 µg/ 4×10^4 MSCs, 24 h post-transfección

el porcentaje de células positivas para fluorescencia en el canal de emisión de DsRed fue de un $57,9 \pm 1,8\%$, indicando un aumento significativo respecto de las MSCs sin transfectar. Por otro lado, al utilizar $0,4 \mu\text{g}/4 \times 10^4$ MSCs el porcentaje de células fluorescentes fue de $25,8 \pm 1,6\%$ (Figura 11A). Si bien este valor no fue significativamente menor con respecto a las MSCs transfectadas con $0,2 \mu\text{g}$, no fue un aumento significativo respecto de las MSCs no transfectadas, lo cual indica que la transfección utilizando $0,2 \mu\text{g}/4 \times 10^4$ MSCs es más eficiente que al utilizar $0,4 \mu\text{g}/4 \times 10^4$ MSCs.

Considerando que la utilización de las MSCs como vehículos de factores terapéuticos depende de su tropismo a tumores, se analizó si la incorporación del ARNm IVT a las células modificaba su capacidad migratoria. Para evaluarlo, se llevó a cabo un ensayo de migración *in vitro* como se detalló previamente utilizando MSCs sin transfectar y MSCs transfectadas con $0,2$ y $0,4 \mu\text{g}$ de ARNm IVT DsRed. Como se observa en la figura 11B, la capacidad migratoria expresada en cantidad de células que migran hacia el MC del tumor fue de 391 ± 33 ($p < 0,05$ vs α -MEM) para las MSC sin transfectar, 290 ± 22 ($p < 0,001$ vs α -MEM) para las MSC/DsRed transfectadas con $0,2 \mu\text{g}$ de ARNm IVT y de 148 ± 22 (n.s. vs α -MEM). Estos resultados demostraron que la transfección con $0,4 \mu\text{g}$ de ARNm IVT disminuyó la capacidad migratoria de las MSCs. Por tal motivo, se determinó que los siguientes experimentos fueran realizados con la dosis de $0,2 \mu\text{g}/4 \times 10^4$ MSCs que demostró, no solo buenos niveles de expresión, sino que además no alteró una propiedad importante, como es la migración, para el fin de vehicular factores terapéuticos.

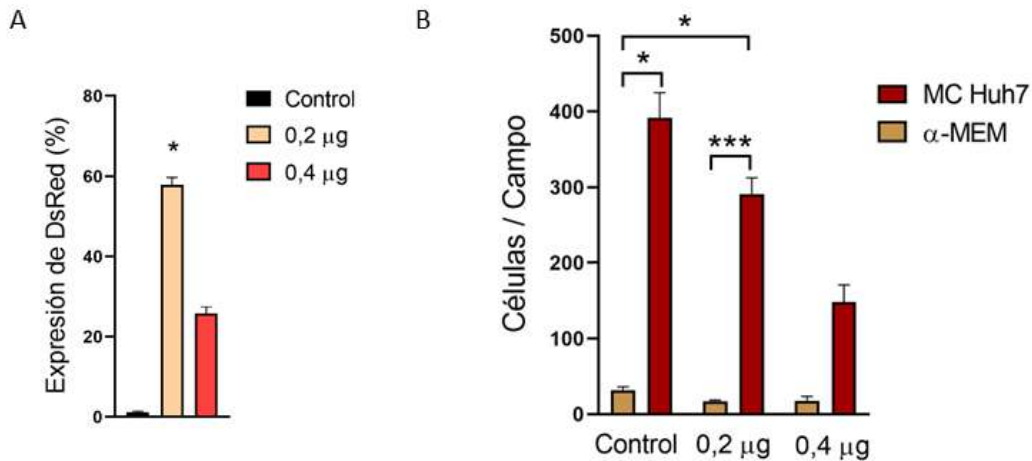


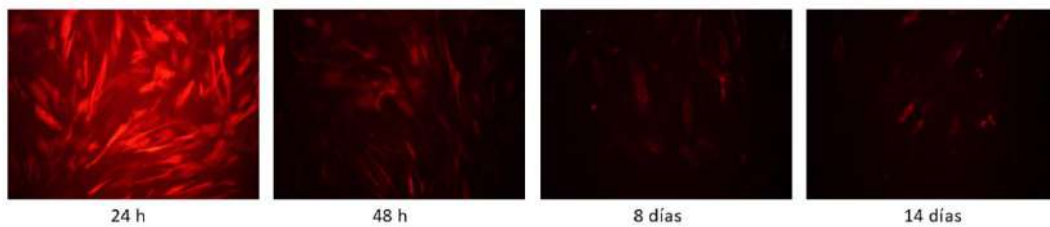
Figura 11. (A) MSCs que expresan DsRed analizadas mediante citometría de flujo utilizando diferentes cantidades de ARNm IVT (0,2 o 0,4 µg). Prueba de comparaciones múltiples de Dunn, * $p < 0,05$ vs control. (B) Se evaluó la migración de las MSCs no transfectadas (Control) o MSC/DsRed transfectadas con 0,2 o 0,4 µg de ARNm IVT hacia un medio condicionado derivado de Huh7 (MC Huh7) o α -MEM en una cámara Boyden modificada. Las barras representan el promedio de células/campo (10X) + SEM de 3 campos visuales representativos. Prueba de comparaciones múltiples de Dunn, * $p < 0,05$ y *** $p < 0,01$ vs α -MEM (migración basal).

Utilizando la dosis de 0,2 µg de ARNm IVT por todo lo anteriormente expuesto, se realizó una transfección para evaluar la expresión de DsRed en el tiempo. Por microscopía de fluorescencia se observó la expresión a 24 h, 48 h, 8 días y 14 días y se encontró que el máximo nivel de expresión fue a las 24 h (Figura 12A). Sin embargo, para todos los tiempos observados se detectó señal fluorescente, que fue disminuyendo con el paso del tiempo, demostrando el carácter transitorio de la expresión proteica utilizando ARNm IVT.

Para la planificación de los experimentos *in vivo*, se requería determinar el tiempo mínimo requerido por las MSCs para comenzar a expresar la proteína. Dado que la utilización de plásmidos para la expresión de proteínas es un método ampliamente utilizado, se comparó la eficiencia del nuevo método propuesto (ARNm IVT) con la metodología tradicional. Como previamente se observó que a las 24 h la mayoría de las MSCs expresan DsRed, se evaluó la expresión a tiempos más cortos. Para ello, mediante citometría de flujo, se estudió el porcentaje de células que expresaban DsRed a distintos tiempos post-transfección con ARNm IVT y también se transfectaron las MSCs utilizando

lipofectamina y un plásmido que contenía la proteína reportera mCherry. Se encontró que a las 2 h después de la transfección, alrededor de un 5% de MSC/DsRed ya expresaban la proteína (Figura 12B) mientras que la expresión en las MSCs con mCherry fue de 0,2%. A las 4 h, las MSCs con mCherry no modificaron los niveles de expresión (0,7%) mientras que las MSCs transfectadas con ARNm DsRed alcanzaban un 24,9% de células positivas para DsRed. Recién a las 24 h se detectó un 11% de células que expresaban mCherry, mientras que, a ese mismo tiempo, más del 90% de las MSCs transfectadas con ARNm IVT, expresaban DsRed, demostrando la velocidad remarcable de la tecnología de IVT para la expresión de proteínas.

A



B

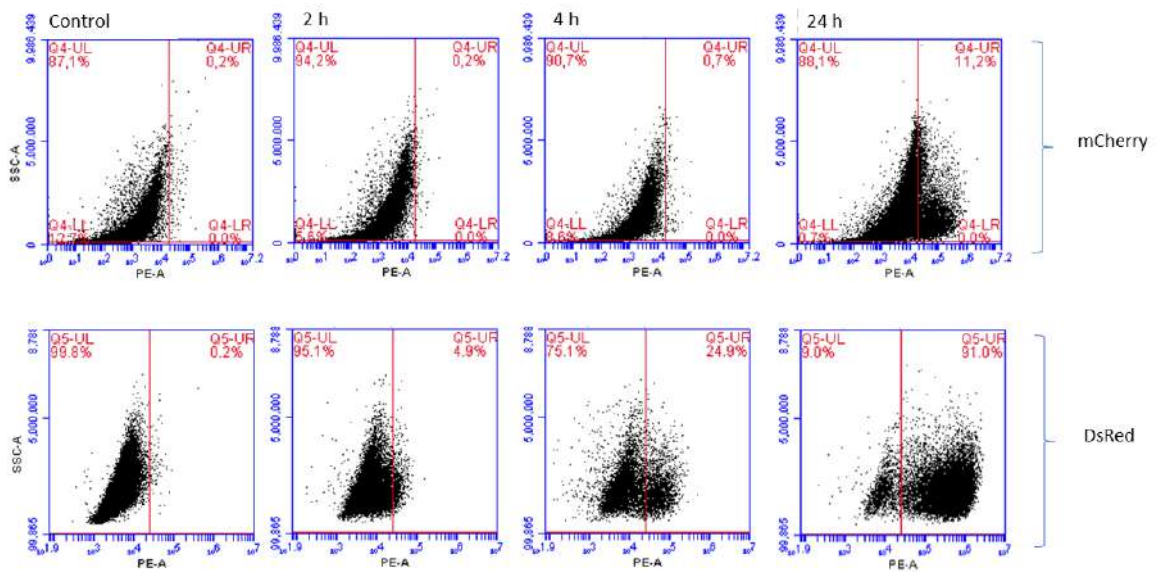


Figura 12. (A) Imágenes representativas por microscopía de fluorescencia de MSC/DsRed con 0,2 g de ARNm IVT a las 24 h, 48 h, 8 días y 15 días. (B) Cinética de la expresión del ARNm IVT mediante citometría de flujo utilizando un plásmido (mCherry) y utilizando ARNm IVT DsRed (2 h, 4 h y 24 h).

4.2. Efecto de MSC/DsRed sobre un modelo de tumor subcutáneo

Teniendo en cuenta que el objetivo principal del presente trabajo es utilizar MSCs portando ARNm IVT para el tratamiento del HCC, se evaluó si la administración de MSC/DsRed en animales con tumor alteraba el crecimiento del mismo. Para este experimento se utilizó el modelo de tumor subcutáneo detallado en la metodología, utilizando animales C3H inoculados con células Hepa129 singénicas con la cepa de animales. Una vez establecido el tumor, se administró una dosis de 2×10^5 MSCs expresando DsRed por la tecnología de IVT. Como se observa en la figura 13, los animales que recibieron una dosis de MSC/DsRed no presentaron cambios en la evolución del tumor respecto de los animales que recibieron solución fisiológica (control).

En conjunto, estos resultados sugieren que la tecnología de ARNm IVT incorporado por las MSCs, es un método efectivo para la expresión de proteínas en una estrategia terapéutica.

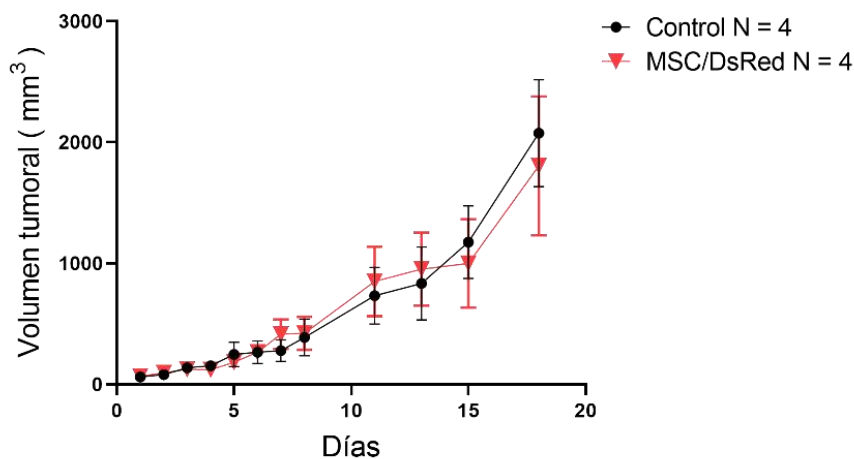


Figura 13. Crecimiento tumoral *in vivo* de Hepa129 s.c. La curva negra corresponde a los animales administrados con vehículo (control) y la curva roja con MSC/DsRed. Cada punto de las curvas representa el promedio del volumen tumoral + SEM de los animales de cada grupo experimental. Two-way ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Sidak.

4.3. Síntesis del ARNm IVT GM-CSF y transfección de las MSCs

4.3.1. ARNm IVT GM-CSF

Como se demostró previamente, las MSCs modificadas con ARNm IVT podrían ser utilizadas para la administración de factores terapéuticos. Por lo tanto, se evaluó este enfoque seleccionando al GM-CSF como factor terapéutico en el tratamiento de animales con tumor, con la intención de estimular una respuesta inmune antitumoral por reclutamiento de células presentadoras de antígenos. Para poner a prueba este enfoque, primero se sintetizó el ARNm IVT de GM-CSF de manera similar a como se llevó a cabo para el ARNm IVT de DsRed. Una vez obtenido el ARNm purificado, las MSCs fueron transfectadas con ARNm IVT GM-CSF (MSC/GM-CSF). Dado que la expresión de GM-CSF podría afectar el reconocimiento por parte del sistema inmunológico por modificar la expresión de marcadores de superficie en las MSCs, comprobamos la expresión de estos marcadores en MSC/GM-CSF comparado con MSCs sin transfectar. Como se muestra en la Figura 14 A y B, tanto las MSCs sin transfectar como las MSC/GM-CSF expresaron elevados niveles de las moléculas CD90 y CD44, mientras que no presentaron expresión de los marcadores CD34, CD11b, CD80, CD86 y HLA clase II. Estos resultados demuestran que la expresión del mRNA IVT no modificó la expresión de los marcadores fenotípicos ni de inmunogenicidad en las MSCs.

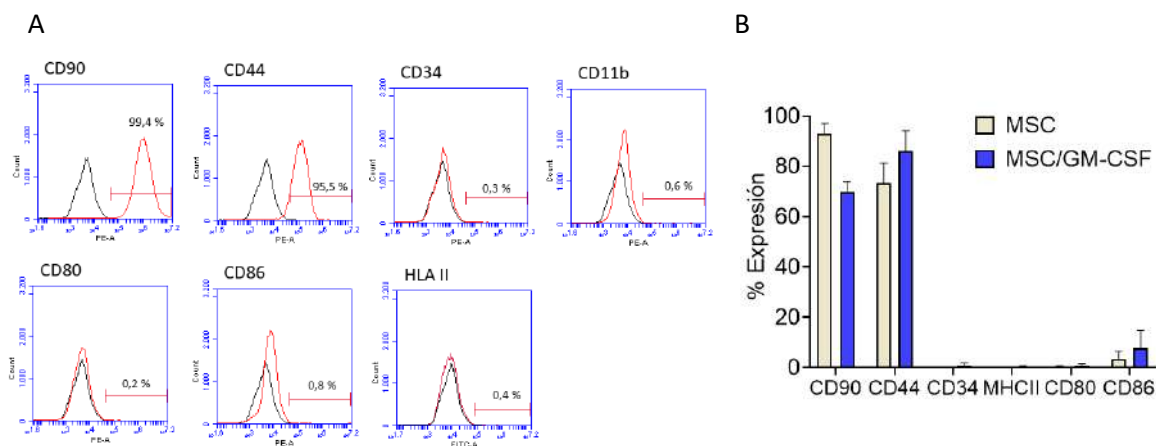


Figura 14. (A) Imágenes representativas de la expresión de los marcadores de superficie por citometría de flujo (B) Porcentaje de expresión de marcadores de superficie analizados mediante citometría de flujo en MSCs no transfectadas (MSCs) y MSC/GM-CSF transfectadas con 0,2 μ g de ARNm IVT/ 4×10^4 células. Las barras representan el promedio de porcentaje de células con marca fluorescente + SEM. La prueba de comparaciones múltiples de Sidak no fue significativa para ningún marcador.

4.3.2. Producción de GM-CSF

El paso siguiente, fue corroborar si las MSC/GM-CSF podrían producir y secretar GM-CSF. Confirmamos la expresión de GM-CSF en los sobrenadantes de cultivo (medio condicionado, MC) de MSC/GM-CSF utilizando un kit de ELISA. En las MSC/DsRed no se detectó la producción de GM-CSF en el sobrenadante de cultivo (N.D), sin embargo, en las MSC/GM-CSF los niveles detectados fueron $0,08 \pm 0,02$ $\mu\text{g/ml}$ a las 24 h, $0,10 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$ a las 48 h y $0,143 \pm 0,02$ $\mu\text{g/ml}$ 72 hs después de la transfección (Figura 15). Estos resultados verifican lo que se observó previamente con DsRed en términos de producción de proteína utilizando ARNm IVT, las MSC/GM-CSF son capaces de producir y secretar adecuadamente la proteína.

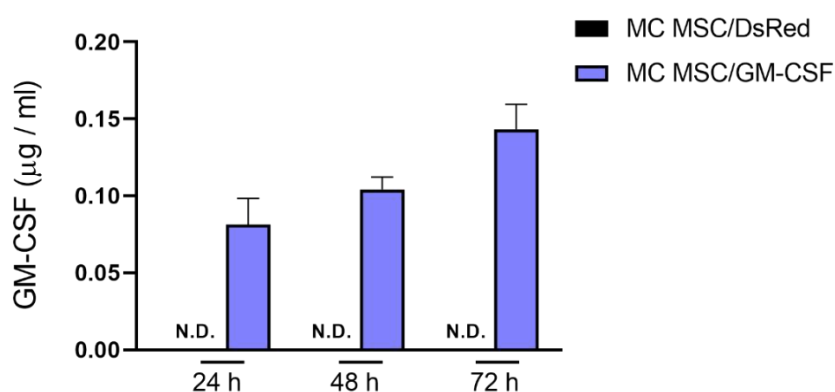


Figura 15. Niveles de producción de GM-CSF ($\mu\text{g/ml}$) en medios condicionados (MC) de MSC/DsRed o MSC/GM-CSF detectados por ELISA.

4.3.3. Funcionalidad de GM-CSF

El paso siguiente, fue evaluar la funcionalidad del GM-CSF producido por las MSC/GM-CSF. En diversos trabajos se ha reportado el rol del GM-CSF en respuestas celulares que involucran a las APC, siendo una de las funciones principales promover la diferenciación y proliferación de las CD4 (Hamilton, 2019). Por esto, primero se llevó a cabo un cultivo de células de médula ósea de ratón para diferenciar progenitores de médula ósea a células dendríticas como se describió en la metodología, utilizando el MC de las MSC/GM-CSF para inducir la diferenciación utilizando una concentración de 20 ng/ml.

Al finalizar el cultivo, se evaluaron marcadores de superficie de células dendríticas por citometría de flujo, expresados simultáneamente en las células del cultivo. Se encontró que los progenitores de médula ósea cultivados con MC de MSC/GM-CSF, pero no con MSC/DsRed aumentaron la expresión de CD11c⁺/CD86⁺/CMHII⁺ (Figura 16). Se observó que 39,83±4,95% de células expresaban simultáneamente los marcadores CD11c⁺/CD86⁺/CMHII⁺ en los cultivos que fueron incubados con el MC de MSC/GM-CSF, mientras que en los cultivos que fueron incubados con MC de MSC/DsRed se encontró el 8,0±4,95%. Además, se utilizó LPS, que al poseer en su estructura un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), puede interactuar con sus receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), presentes en la membrana de las CD y activarlas. El uso de LPS en combinación con MC de MSC/GM-CSF, aumentó significativamente el porcentaje de células CD11c⁺/CD86⁺/CMHII⁺ a un 63,5±4,85% (p<0,05 vs. MC de MSC/DsRed). Este resultado sugirió que el GM-CSF producido por las MSC/GM-CSF fue capaz de inducir la diferenciación de los monocitos a células dendríticas y su posterior maduración.

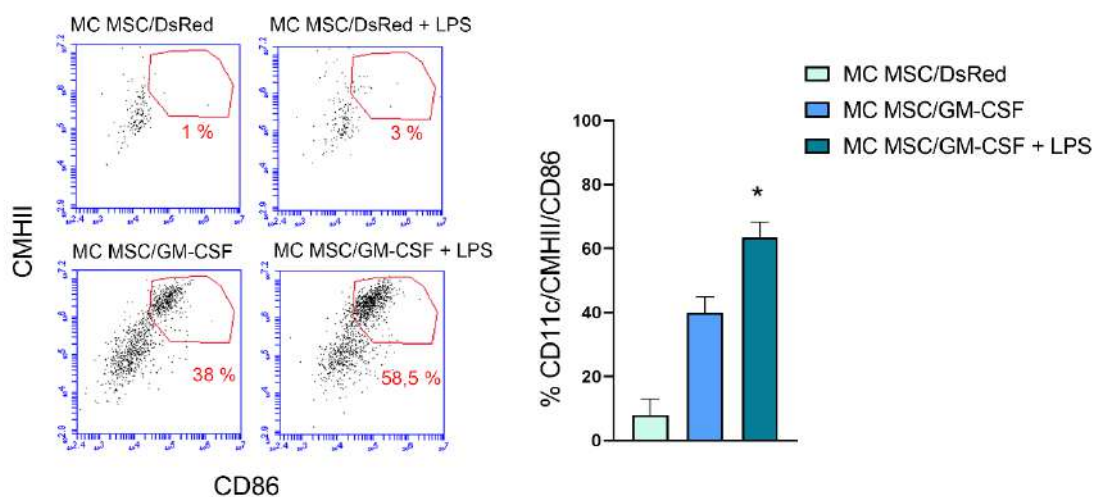


Figura 16. A la izquierda, citometría de flujo representativa de células de médula ósea de ratón positivas para CD11c. A la derecha, cuantificación de células positivas para los marcadores CD11c, CMHII y CD86. Las barras representan el promedio de 2 experimentos + SEM. ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Dunn *p<0,05 vs CM MSC/DsRed.

Además, se realizaron experimentos que permitieron evaluar otras funciones del GM-CSF, como su capacidad para promover la proliferación de esplenocitos (Hamilton, 2019). Para este experimento, se agregó MC de las MSC/GM-CSF al medio de cultivo de esplenocitos murinos, en una concentración de 20 ng/ml GM-CSF. Posteriormente, se evaluó la proliferación de esplenocitos por incorporación de timidina tritiada. En la figura 17 se observan los resultados de estos experimentos, donde se muestra un aumento de la proliferación cuando los esplenocitos se cultivaron con MC de MSC/GM-CSF, dando una media de $4838 \pm 534,2$ c.p.m ($p < 0,05$ vs control), en comparación con los valores de la media de c.p.m de los esplenocitos incubados con MC de MSC/DsRed ($1489 \pm 99,19$ c.p.m) o la media de c.p.m de los esplenocitos control ($2005 \pm 214,7$ c.p.m). Cabe destacar que no hubo diferencias significativas entre la media de c.p.m de los esplenocitos control y aquellos incubados con MC de MSC/DsRed. Respecto a este último resultado, consideramos que los factores liberados exclusivamente por las MSCs al medio extracelular no tendrían efecto en la proliferación de las estirpes celulares presentes en el bazo.

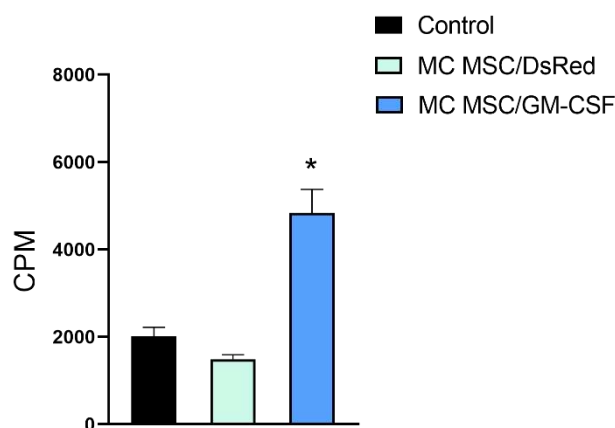


Figura 17. Proliferación *in vitro* de esplenocitos murinos cultivados con MC MSC/GM-CSF, MC MSC/DsRed o RPMI (control). La proliferación celular se evaluó mediante un ensayo de incorporación de timidina- H^3 . Las barras representan el promedio de CPM para cada condición ($n=4$ /condición) + SEM. ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Dunn * $p < 0,05$ vs control.

Otra de las funciones conocidas del GM-CSF es su capacidad para inducir macrófagos a un perfil proinflamatorio. Cabe destacar que en trabajos previos se ha reportado que las

MSCs se caracterizan por liberar factores que estimulan a los macrófagos hacia un perfil anti-inflamatorio y no pro-inflamatorio (Fiore *et al.*, 2016). Dado este antecedente y a fines de focalizar este trabajo en los objetivos planteados, en los siguientes experimentos se prescindió del análisis del MC de las MSC/DsRed. Para poner a prueba la actividad biológica del MC de las MSC/GM-CSF en su conjunto, se evaluó el efecto del MC de MSC/GM-CSF en una línea celular murina de macrófagos (células J774). Para esto, los macrófagos fueron incubados con MC de MSC/GM-CSF durante 30 h, luego se colectó el ARN total de los macrófagos y se generó el ADNc a partir de estas muestras para poder evaluar la expresión de citoquinas pro-inflamatorias por qPCR. Se encontró un aumento en la expresión de ARNm de TNF- α ($1,77\pm 0,13$, $p<0,05$) e IL-1 β ($1,95\pm 0,19$) después del tratamiento con MC de MSC/GM-CSF, lo que sugiere que el GM-CSF producido por las MSCs fue capaz de inducir un cambio en el perfil de expresión de ARNm de citoquinas pro-inflamatorias (Figura 18). En conjunto, todos los resultados de estos experimentos demostraron que las MSC/GM-CSF pueden producir y secretar GM-CSF adecuadamente manteniendo la variedad de funciones de esta proteína.

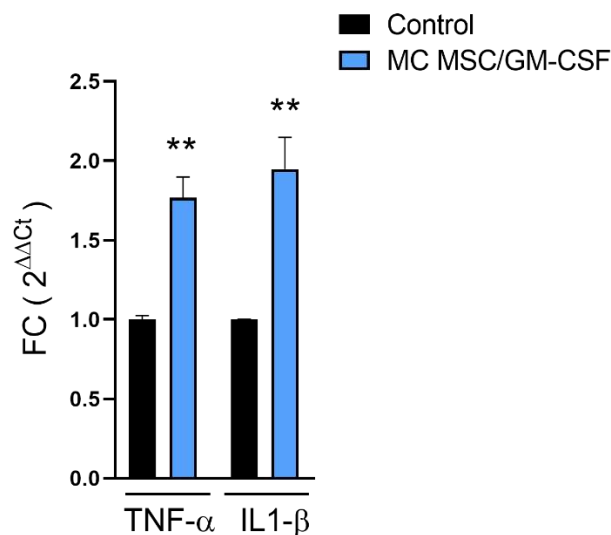


Figura 18. Análisis de la expresión de ARNm en células J774 de TNF- α e IL1- β después de 30 h de incubación con MC MSC/GM-CSF o RPMI, como control. Test de Mann Whitney ** $p<0,0001$ vs control.

4.3.4. Efecto de MSC/GM-CSF sobre dos modelos de tumor subcutáneo

Finalmente, se evaluó el efecto terapéutico de MSC/GM-CSF en modelos de tumores murinos tanto de HCC (células Hepa129) como de carcinoma colorrectal (células CT-26). Cabe destacar que estos modelos murinos son inmunocompetentes, lo que permite estudiar el impacto del tratamiento. Se ha informado anteriormente que dosis entre 0,04 y 0,3 μg de GM-CSF tienen un efecto terapéutico e indujeron una respuesta inmune antitumoral en el HCC (Chen *et al.*, 2013) . Teniendo esto en cuenta, se decidió utilizar una dosis de 2×10^5 MSC/GM-CSF que puede producir hasta 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de GM-CSF. Las células se aplicaron a ratones portadores de tumores Hepa129 o CT-26 mediante inyección peritumoral, y se sembró una dosis de células en una placa de cultivo para medir posteriormente la concentración de GM-CSF en el sobrenadante. Esta medición demostró que la concentración de GM-CSF en los sobrenadantes de 2×10^5 MSC/GM-CSF fue de 1,48 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a las 24 h. Los ratones tratados con MSC/GM-CSF presentaron un crecimiento tumoral significativamente reducido en ambos modelos de ratón (Figura 19). En el modelo de Hepa129, el tamaño tumoral a los 11 días para el grupo control fue de $1620 \pm 221 \text{ mm}^3$ mientras que para el grupo tratado con MSC/GM-CSF fue de $826,9 \pm 256,8 \text{ mm}^3$ ($p < 0,001$). En el modelo de CT-26, el tamaño tumoral fue significativamente diferente entre ambos grupos, tanto a los 14 como a los 16 días, siendo para el grupo control de $1738 \pm 208,3$ y $2177 \pm 211,7$, y para el grupo tratado con MSC/GM-CSF de $935,3 \pm 148,9$ y $1373 \pm 238,3$, respectivamente ($p < 0,001$). Estos resultados indican que las MSC/GM-CSF son capaces de producir suficiente GM-CSF funcional que, *in vivo*, indujo una reducción significativa en el volumen tumoral en dos modelos de tumores gastrointestinales.

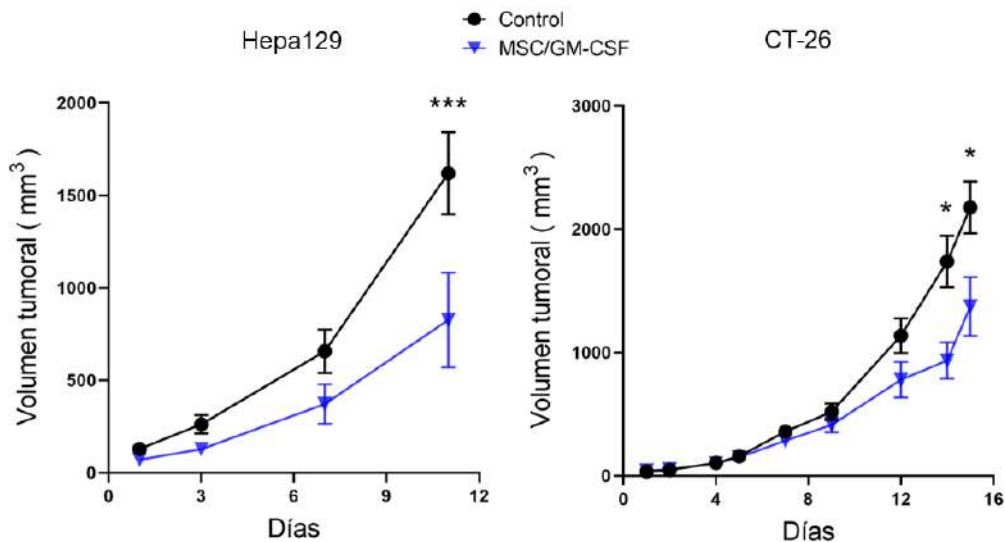


Figura 19. Crecimiento tumoral en modelo murino de HCC (izquierda, n=5, Control; n=6, MSC/GM-CSF) o modelo murino de carcinoma colorrectal (derecha, n= 8, Control; n=10, MSC/GM-CSF). Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 60 mm³, se realizó una inyección peritumoral de 2x10⁵ MSC/GM-CSF o PBS (control). Cada punto de las curvas representa el promedio del volumen tumoral + SEM de los animales de cada grupo experimental. Two-way ANOVA y prueba de comparación de Sidak, *p < 0,05 y ***p < 0,001 vs control.

4.4. Evaluación de la aplicación terapéutica de MSC/GM-CSF y Dox en un modelo de tumor: estudios *in vitro*.

4.4.1. Efectos sobre J774

Recientemente, se ha informado que dosis bajas de doxorrubicina (Dox) inducen la muerte celular inmunogénica (ICD) en células cancerosas (Zhu *et al.*, 2020). Este efecto se define como un tipo de muerte regulada en la que se activa una respuesta inmune antitumoral adaptativa mediante la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMP), como la exposición de calreticulina (CRT) en la superficie celular, la liberación de ATP y secreción de la proteína de caja 1 del grupo de alta movilidad (del inglés, *high mobility group box 1 protein*, HMGB1) (Solari *et al.*, 2020). Teniendo en cuenta que las células T CD8⁺ son las principales mediadoras de la inmunidad antitumoral y que la modulación de la respuesta de las células T CD8⁺ depende de las células presentadoras de antígenos (Jhunjunwala *et al.*, 2021), evaluamos el efecto de Dox en combinación con MSC/GM-CSF con el objetivo de potenciar el efecto de reducción en el crecimiento tumoral observado con la dosis de MSC/GM-CSF. Para ello,

primero se demostró que el tratamiento con Dox podría inducir la muerte celular inmunogénica en células Hepa129. Utilizando inmunofluorescencia, se demostró que la exposición de calreticulina *in vitro* es inducida por Dox a dosis de 20 y 30 μ M (Figura 20A). A continuación, se estudió si los DAMP liberados por el tratamiento con Dox en células Hepa129 podrían generar un perfil proinflamatorio en los macrófagos. Para probar esta hipótesis, se estimularon macrófagos J774 con medio condicionado de células Hepa129 previamente tratadas con Dox 30 μ M (MC Hepa/Dox), MC de MSC/GM-CSF (MC MSC/GM-CSF), o una combinación de ambos, tras lo cual se evaluó la expresión de TNF- α e IL-1 β . Como se muestra en la Figura 20B, las células J774 tratadas con MC de Hepa/Dox más MC de MSC/GM-CSF, expresaron niveles más altos de las citoquinas proinflamatorias que los macrófagos que fueron tratados con los medios condicionados administrados de manera independiente. En el caso de TNF- α , para el tratamiento con MC Hepa/Dox (dilución 1/3) hubo un aumento de $1,9 \pm 0,01$ respecto del control ($p < 0,001$), para el tratamiento con MC MSC/GM-CSF (concentración de GM-CSF, 20 ng/ml), un aumento de $2,05 \pm 0,05$ respecto del control y para el tratamiento con ambos medios condicionados en simultáneo, un aumento aún mayor; $3,44 \pm 0,14$ respecto del control ($p < 0,0001$). En cuanto a los niveles de IL-1 β , también se detectó un aumento de $7,91 \pm 0,44$ en el caso del tratamiento con MC Hepa/Dox respecto del control ($p < 0,0001$), un aumento menos pronunciado en el caso del tratamiento con MC MSC/GM-CSF (concentración de GM-CSF, 20 ng/ml) respecto del control ($p < 0,05$) y un aumento de $15,7 \pm 0,92$ en el tratamiento con ambos medios condicionados respecto del control ($p < 0,0001$).

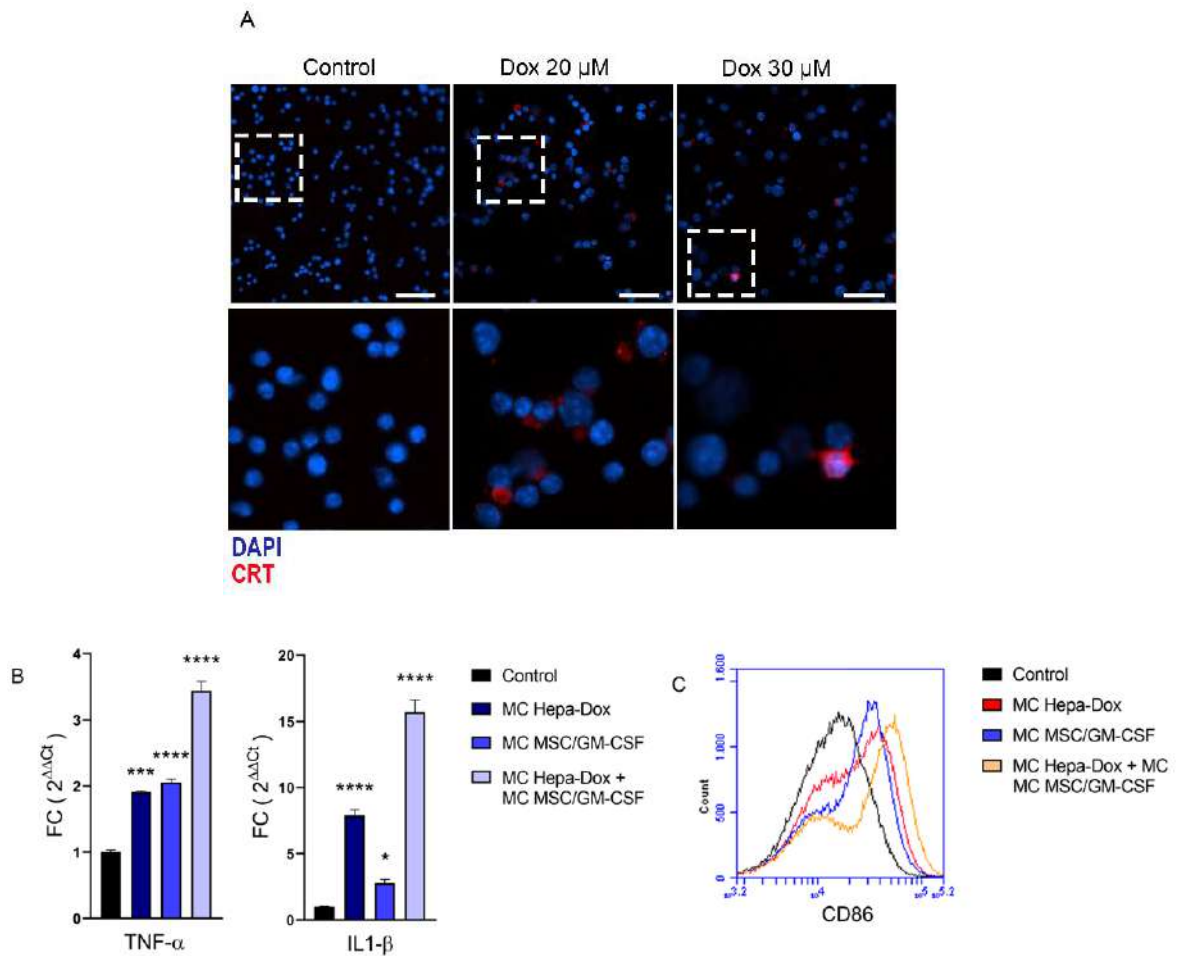


Figura 20. (A) Inmunofluorescencia de calreticulina (CRT, rojo) en Hepa129, después de incubación durante 48 h con 20 o 30 μ M de Dox o sin tratamiento (control). Barra de escala 100 μ m. (B) Análisis de la expresión de ARNm en células J774 de IL1- β y TNF- α después de 30 h de incubación con MC Hepa/Dox, MC MSC/GM-CSF, MC Hepa/Dox + MC MSC/GM-CSF o RPMI como control. ANOVA y post test de Tukey, * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$. (C) Citometría de flujo representativa de CD86 en J774 después de 30 h de incubación con MC Hepa/Dox, MC MSC/GM-CSF, MC Hepa/Dox + MC MSC/GM-CSF o RPMI como control.

Además, mediante citometría de flujo, se demostró que el marcador de maduración CD86 aumentó ligeramente en los macrófagos después de la incubación con MC de Hepa/Dox o MC de MSC/GM-CSF, y el mayor aumento se observó cuando los macrófagos fueron tratados con los medios condicionados en combinación (Figura 20C). Estos resultados observados tanto en el aumento de los niveles de expresión, a nivel de ARNm, de citoquinas proinflamatorias, así como el aumento de expresión del marcador CD86, sugieren que las células tratadas con Dox liberan señales proinflamatorias que actúan en

sinergismo con el GM-CSF secretado por las MSC/GM-CSF sobre la línea de macrófagos utilizada.

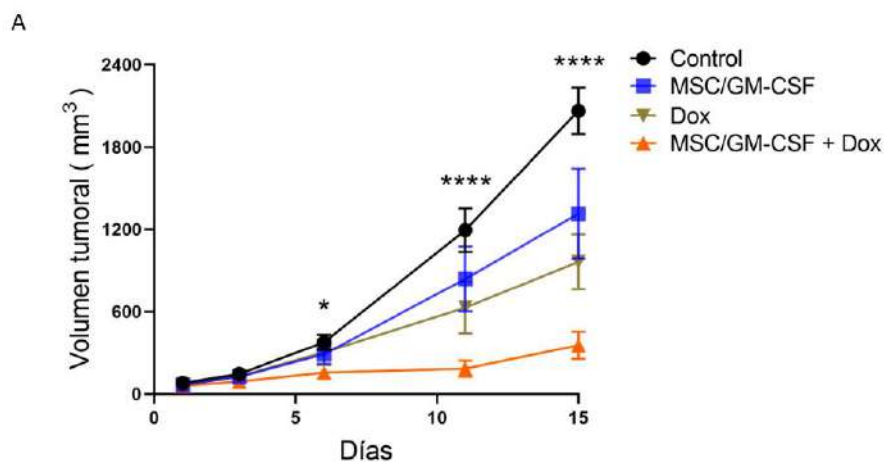
4.5. Evaluación de la aplicación terapéutica de MSC/GM-CSF y Dox en un modelo de tumor: estudios *in vivo*

4.5.1. El uso combinado de MSC/GM-CSF y doxorubicina tiene un efecto sinérgico sobre la inhibición sinérgica de la progresión tumoral

Finalmente, para evaluar el efecto de las MSC/GM-CSF más Dox *in vivo*, se generó un modelo murino de HCC mediante la inoculación de células Hepa129, y cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 60 mm³, los animales se trataron con Dox (5 mg/kg) para inducir la ICD y la liberación de DAMP. Al día siguiente, los ratones fueron inoculados con MSC/GM-CSF (Figura 9). Sorprendentemente, en comparación con los ratones tratados con vehículo o con un solo tratamiento, los animales que fueron tratados con la terapia combinada mostraron reducciones significativas en la progresión del tumor (Figura 21). Estas diferencias en el crecimiento del tumor en los animales, comenzaron a detectarse en el día 6 posterior a los tratamientos con las células y/o Dox y el vehículo (solución fisiológica) de los animales del grupo control. Estas diferencias también fueron observadas al día 11 y 15. Al día 6, el volumen tumoral en los animales del grupo control tenía un promedio de 377,4±56,42 mm³, mientras que los animales con el tratamiento combinado tenían un volumen de tumor promedio de 156,6±42,9 mm³ (p<0,05). Es decir que los animales que recibieron las MSC/GM-CSF (2x10⁵) y una dosis de 5 mg/Kg de Dox, tuvieron un volumen tumoral de un tamaño menor al 50% del volumen tumoral de los animales control. Al día 11, las diferencias se pronunciaron aún más, ya que el valor promedio del volumen tumoral de los animales del grupo control fue de 1194±159,6 mm³ demostrando una clara progresión de los tumores, mientras que para los animales que fueron tratados con la combinación el promedio del volumen tumoral fue de 184,7±58,3 mm³ (p<0,0001). Hacia el final del experimento, al día 15, el volumen promedio de los animales tratados con la combinación de MSC/GM-CSF y Dox fue de 355,2±99,25 mm³ mientras que los animales administrados con el vehículo

alcanzaron el máximo volumen tumoral determinado para el punto final humanitario, $2064 \pm 170,9 \text{ mm}^3$ ($p < 0,0001$).

Se utilizó un modelo matemático, explicado en la sección de Metodología, para analizar la interacción *in vivo*. El análisis mostró que, si bien los tumores tardaron un promedio de 5 a 6 días en alcanzar los 300 mm^3 con el vehículo o con los tratamientos individuales, los tumores en animales que recibieron la terapia combinada tardaron 14 días en alcanzar este tamaño. Estos datos revelan una fuerte sinergia entre los tratamientos mediante un factor de mejora de dosis (DEF) de 8 durante el tiempo necesario para alcanzar un volumen de 300 mm^3 . Además, esta sinergia también se observa en el análisis por el método del producto de fracciones (Tabla 3) (Yokoyama *et al.*, 2000). La tabla 1 resume el volumen tumoral relativo de los diferentes grupos en 4 puntos temporales diferentes. El día 3 después del tratamiento, en el grupo de terapia combinada, hubo una mejora de 1,2 veces en la eficacia antitumoral en comparación con el efecto aditivo esperado. El día 11, el grupo de terapia combinada mostró un aumento de 2,4 veces en la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control (relación volumen tumoral o RVT). Teniendo en cuenta que una relación > 1 indica efecto sinérgico, el valor obtenido muestra que este efecto de sinergismo es mucho más fuerte que los efectos de los tratamientos sin combinar.



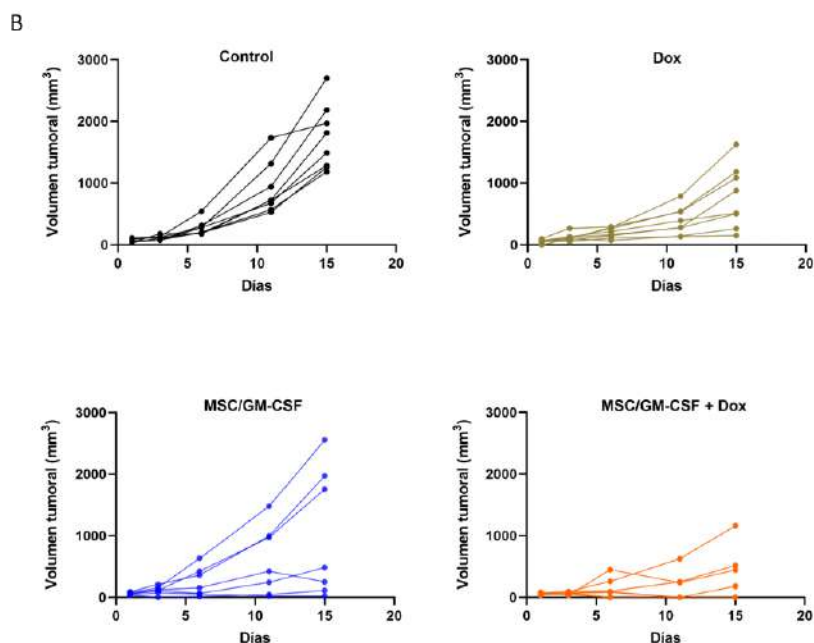


Figura 21. (A) Crecimiento tumoral de ratones portadores de tumores Hepa129. Two-way ANOVA * $p < 0,05$ vs. control y **** $p < 0,0001$ vs. control ($n = 7$ a 8 animales en cada grupo experimental). (B) Curvas de crecimiento tumoral de los animales de cada grupo experimental.

Tabla 3. Relación volumen tumoral (RVT)^a respecto a controles no tratados

Tratamiento combinado					
Días ^b	MSC/GM-CSF	Dox (5 mg/Kg)	Valor esperado ^c	Valor observado	R ^d
3	0,861	0,880	0,758	0,623	1,2
6	0,769	0,806	0,620	0,415	1,5
11	0,702	0,527	0,370	0,155	2,4
15	0,637	0,467	0,298	0,172	1,7

^a RVT = (media del volumen tumoral experimental / media del volumen tumoral control)

^b Días luego del inicio del tratamiento

^c (RVT media de MSC/GM-CSF) x (RVT media de Dox)

^d R = RVT esperado / RVT observado

La relación > 1 indica efecto sinérgico y < 1 ausencia de efecto sinérgico.

4.5.2. Efecto sobre la sobrevida

El efecto sinérgico reportado anteriormente fue acompañado por un aumento en la supervivencia global de los animales con tumores después de recibir el tratamiento combinado: los animales tratados con MSC/GM-CSF + Dox tuvieron un efecto antitumoral sostenido, con una mediana de supervivencia de 27,5 días en comparación con 15 días en el grupo con vehículo (control), 17 días con MSC/GM-CSF, o 22 días en el grupo Dox (Figura 22). Además, al final del experimento (día 37), 5 de los 14 animales

que recibieron la terapia combinada todavía estaban vivos, mientras que solo un animal que recibió MSC/GM-CSF estaba vivo entre los otros grupos.

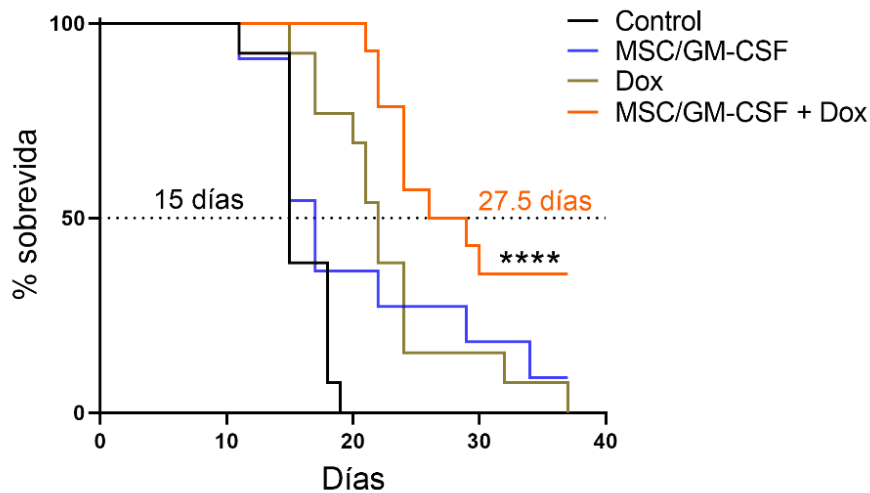


Figura 22. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia. **** $p < 0,0001$ vs. control (log rank test).

4.6. Estudio del microambiente tumoral

4.6.1. Expresión de factores y citoquinas

Posteriormente se llevó a cabo un experimento *ex vivo* para estudiar la expresión de marcadores relacionados con la respuesta inmunológica de los tumores al día 7 post-tratamiento. Los animales fueron sacrificados y se colectaron muestras para aislamiento de ARN o para citometría de flujo. Se investigaron los niveles intratumorales de ARNm de citoquinas implicadas en la respuesta citotóxica (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ) y proteínas implicadas en la presentación de antígenos (tapasina y ERp57). Se encontró un aumento significativo en los niveles de todas las citoquinas en los tumores de los ratones tratados con el tratamiento combinado en comparación con los de los controles (Figura 23A). El valor promedio del $\Delta\Delta Ct$ obtenido para IL-1 β fue de $0,714 \pm 0,203$, mientras que para el control fue un valor de cero ($p < 0,01$). Por otro lado, en el caso de TNF- α , el promedio del $\Delta\Delta Ct$ fue de $0,897 \pm 0,203$ ($p < 0,01$ vs control) y en cuanto a IFN- γ , el promedio del $\Delta\Delta Ct$ fue de $1,75 \pm 0,433$ mientras que el valor del $\Delta\Delta Ct$ control fue cercano a 0 ($p < 0,01$ vs control). Por otro lado, ERp57 forma un complejo con CRT que se expone en la superficie

celular, proporcionando una señal que promueve la fagocitosis por parte de las células dendríticas. Se demostró un aumento en la expresión de ARNm de Erp57 en muestras de tumores de ratones tratados con la terapia combinada en comparación con los del grupo de control (Figura 23B), el valor promedio para los animales tratados fue de $0,464 \pm 0,19$ mientras que el control fue cero ($p < 0,05$ vs control). Además, se encontró un aumento en la expresión del ARNm de tapasina, el valor promedio del $\Delta\Delta Ct$ de los animales tratados con el tratamiento de MSC/GM-CSF y Dox fue de $0,765 \pm 0,18$.

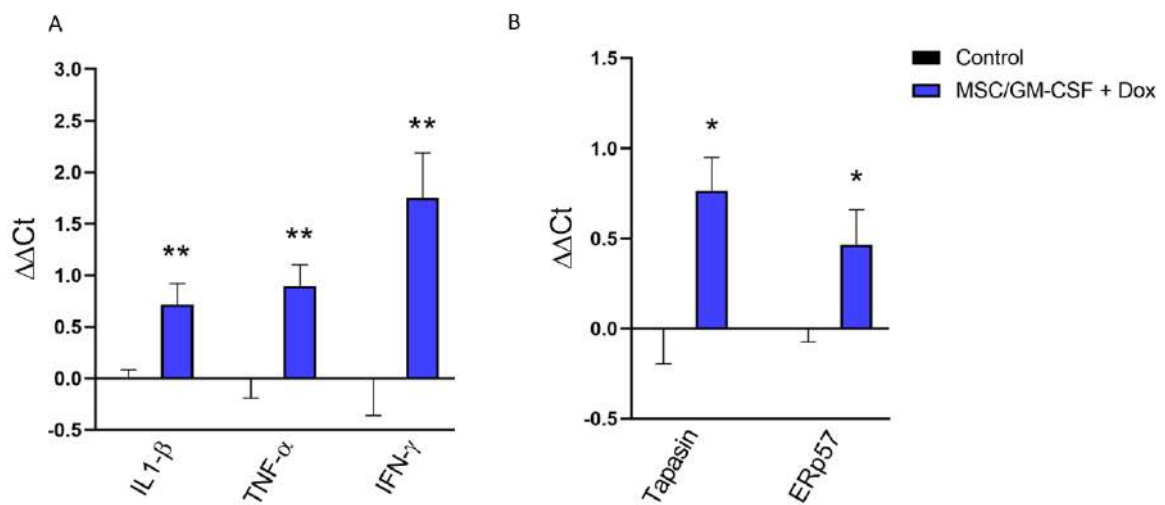


Figura 23. (A) Niveles de ARNm de IL1-β, TNF-α e IFN-γ (B) Tapasin y Erp57. Prueba t no apareada, *p < 0,05, **p < 0,01 vs. Control.

4.6.2. Identificación de células del sistema inmunológico

Como se mencionó previamente, con los tumores aislados a los 7 días post-tratamiento se realizó una citometría de flujo. Los marcadores que se evaluaron fueron F4/80 y CMHII en simultáneo, ambas moléculas presentes en la membrana de los fagocitos macrófagos. En la figura 24A, se puede observar que, un $8,3 \pm 1,44\%$ de células provenientes de los tumores de animales con el tratamiento combinado expresaban ambos marcadores (F480 y CMHII) mientras que, las células de los tumores de animales que recibieron el vehículo, fueron un $4,44 \pm 0,30\%$ ($p < 0,05$ vs control), lo que estaría indicando una mayor proporción de macrófagos en los tumores de animales tratados. Se evaluaron también

los marcadores CD3 y CD8 que se expresan en los linfocitos T efectores. Estos marcadores fueron detectados en un $12,4 \pm 3,3\%$ de células de los tumores de animales con el tratamiento combinado (Figura 24A), mientras que esos marcadores solo se expresaron en un $4,12 \pm 0,72\%$ de células provenientes de tumores de los animales que recibieron el vehículo ($p < 0,05$ vs control). Estos resultados indican un aumento del infiltrado de células inmunes en los tumores, validando los hallazgos previos en relación a los resultados obtenidos sobre los niveles de expresión de Erp57 y tapasina que indicarían un mayor procesamiento de antígenos. Este dato fue acompañado por los resultados obtenidos en los análisis de ARNm de CD8, F4/80 (Figura 24B). Ambos marcadores tuvieron una expresión elevada en los animales tratados. Para CD8 el valor de $\Delta\Delta Ct$ fue de $1,5 \pm 0,29$ en los tumores de animales tratados mientras que para el control el valor fue cero ($p < 0,001$ vs. Control). En cuanto a F4/80, el valor de $\Delta\Delta Ct$ fue de $2,04 \pm 0,47$ en los tumores de animales tratados mientras que para el control el valor fue cero ($p < 0,001$ vs. Control). Además, se observó un aumento del ARNm del marcador CD11c, que corresponde a uno de los marcadores típicos de células dendríticas ($\Delta\Delta Ct$ de $0,934 \pm 0,31$; $p < 0,05$ vs. Control). Este último dato indica que podría haber además un mayor reclutamiento de células dendríticas en el tumor. En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento combinado con MSC/GM-CSF + Dox propicia un microambiente tumoral más inmunogénico, con un aumento de las poblaciones de células presentadoras de antígeno, principalmente macrófagos y células dendríticas; pero además un aumento de linfocitos T CD8⁺.

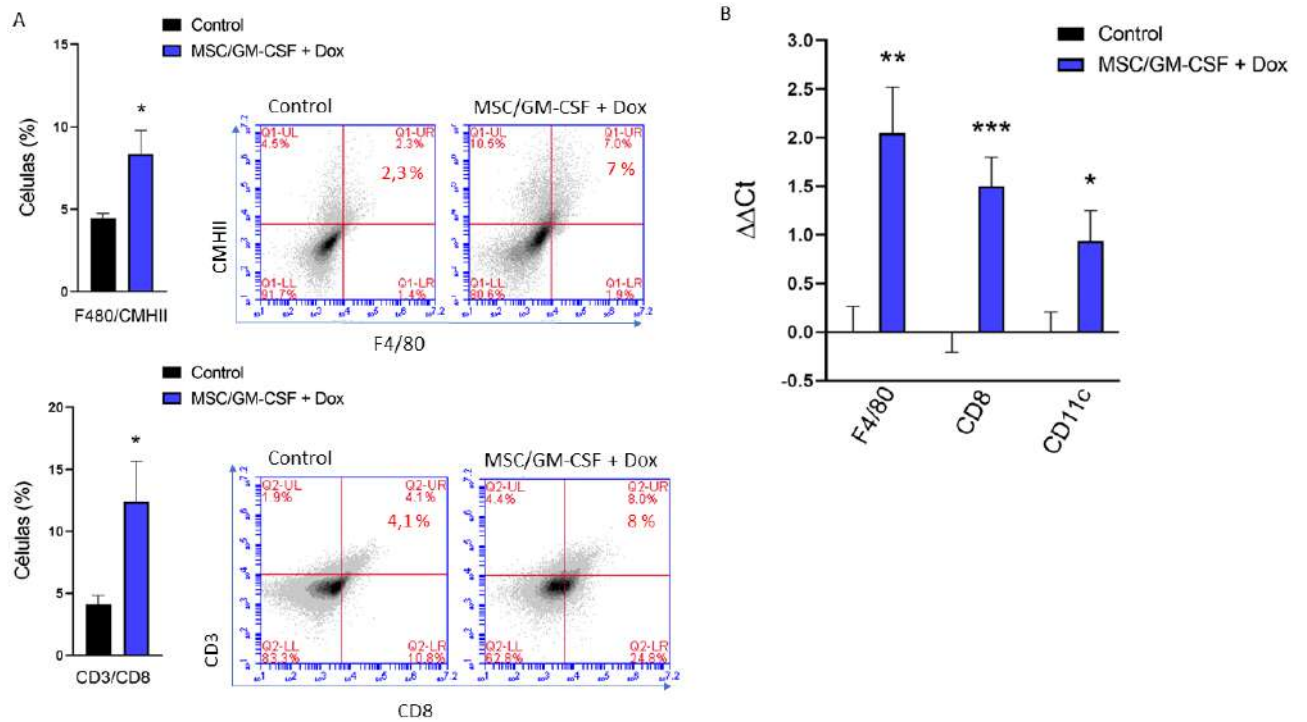


Figura 24. (A) Porcentaje de células F4/80⁺/CMHII⁺ y células CD3⁺/CD8⁺ analizados mediante citometría de flujo. Citometrías de flujo representativas de un animal de cada condición experimental. Prueba t no apareada, *p < 0,05 vs. control. (B) Niveles de ARNm de F4/80, CD8 y CD11c. Prueba t no apareada, *p < 0,05, **p < 0,01 y ***p < 0,001 vs control.

5. Discusión

En los últimos años, se han diseñado varias estrategias terapéuticas utilizando MSCs, principalmente en terapias regenerativas. Sin embargo, más recientemente, se han utilizado con el propósito de vehicular genes y en este sentido, se han empleado distintas técnicas que permiten modificarlas genéticamente para la expresión de un gen específico. En la mayoría de los casos, se ha utilizado la transfección como técnica de inserción de genes foráneos empleando plásmidos o vectores virales como retrovirus (Nitta *et al.*, 2020), lentivirus (Zhu *et al.*, 2021), adenovirus (Fiore *et al.*, 2015; Gopalakrishnan *et al.*, 2016) o virus adenoasociados (AAV) (Chen *et al.*, 2018) para modificar con éxito la expresión génica de las MSCs. Sin embargo, el potencial oncogénico debido al alto riesgo de mutagénesis por inserción es el principal inconveniente del uso de vectores basados en ADN. En este escenario, el uso de estrategias basadas en transfección con ARNm IVT no sólo evita este problema, sino que también permite una alta eficiencia. Los métodos de expresión basados en ARN tienen un gran potencial para la producción de vacunas y con fines terapéuticos tanto en medicina regenerativa como en oncología (Kwon *et al.*, 2018; Ramaswamy *et al.*, 2017; Steinle *et al.*, 2017; Vogel *et al.*, 2018). Las MSCs diseñadas con ARNm IVT para enfoques terapéuticos se han probado únicamente en el tratamiento de gliomas (Guo *et al.*, 2016) y como vehículo de factores inmunomoduladores para disminuir la inflamación (Levy *et al.*, 2013). En el presente trabajo, se propone el uso de ARNm IVT como una estrategia alternativa para obtener MSCs que expresen una proteína con fines terapéuticos en el HCC. Se sintetizaron dos ARNm IVT diferentes que codifican para una proteína reportera (DsRed) y un factor de crecimiento (GM-CSF) y se demostró que la transfección en las MSCs no afectó las propiedades de estas células. Las MSCs que incorporaron ARNm IVT no perdieron sus propiedades fenotípicas, incluyendo la ausencia de marcadores de inmunogenicidad y la capacidad de migrar a tumores, que son propiedades beneficiosas en el tratamiento del cáncer. Por otro lado, es importante señalar la facilidad y rapidez de la técnica empleando ARNm IVT dado que la intervención realizada a las células es de corta duración. Más aún, la traducción del ARN y la producción de proteínas comienzan en pocas horas (Zubkova *et al.*, 2021).

Uno de los principales obstáculos para diseñar construcciones de ARNm IVT para terapias basadas en ARN es la alta renovación del ARNm en las células vivas. El ambiente

intracelular posee diversos tipos de nucleasas que regulan la presencia de ARNm en el citoplasma por lo que es importante que el ARNm a sintetizar contenga las modificaciones químicas necesarias para mantener su integridad en el citosol y su estabilidad química. En el desarrollo de la síntesis química de los ARNm IVT, se utilizaron varias estrategias que aumentan la vida media de los ARNm de IVT, incluida la adición de una cola poli(A) al extremo 3', la adición de un análogo de capuchón sintético (ARCA, 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G) al extremo 5' y la incorporación de nucleósidos modificados como 5-metilcitidina (m5C) y pseudouridina (Ψ) (Anderson *et al.*, 2010; Karikó *et al.*, 2008). El valor de estas modificaciones radica en asegurar, por un lado, que el ARNm IVT sea reconocido por las células como propio evitando generar toxicidad y, además, que el ARNm sintetizado sea captado por la maquinaria de traducción celular para la producción eficiente de proteínas foráneas. En este trabajo, durante la puesta a punto de la utilización de los ARNm IVT sintetizados, se encontró que dosis de 0,4 μg de ARNm IVT para 4×10^4 MSCs afectaba la producción de proteínas mientras que la dosis de 0,2 μg de ARNm IVT para 4×10^4 MSCs permitía una producción sostenida de las mismas. Esto favoreció el rendimiento del ARNm IVT sintetizado. Por otro lado, es importante destacar el valor de la técnica relacionado con los tiempos de producción: encontramos que las MSCs transfectadas con ARNm IVT de DsRed expresaron la proteína reportera en tan solo 3 h y hasta 14 días post-transfección. Es importante tener en cuenta que otro método de expresión de proteínas transitoria, como los virus adenoasociados, requiere incubación durante varios días para una expresión adecuada de la proteína, mientras que con el ARNm IVT solo se necesitan unas pocas horas. Esta gran ventaja permite realizar un tratamiento biológicamente seguro durante el mismo día de la transfección.

El presente trabajo es el primero en demostrar que las MSCs modificadas con ARNm IVT podrían usarse para estimular una respuesta antitumoral en el HCC, aprovechando la capacidad de migración y anclaje a tumores de estas células. Se sabe que las MSCs desempeñan funciones complejas en el entorno tumoral según la fuente de origen del cultivo de MSCs y el tipo de tumor (Galland & Stamenkovic, 2020). Concretamente, el efecto antitumoral de las MSCs aisladas del cordón umbilical humano se ha probado tanto *in vitro* como *in vivo* en varias células cancerosas, como las de vejiga, mama y melanoma, con resultados prometedores (Christodoulou *et al.*, 2018). Sin embargo, es

interesante remarcar que trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que las MSCs aisladas de muestras perivasculares del cordón umbilical humano no modificaron el crecimiento de tumores de HCC (Bayo, *et al.*, 2014a) por lo cual no se esperaba que estas células tuvieran un efecto terapéutico *per se* en HCC. Considerando que no hay reportes previos en relación a si las MSCs modificadas con ARNm IVT podrían tener un efecto sobre el crecimiento tumoral, demostramos al inicio del trabajo que la aplicación de MSC/DsRed no generó diferencias respecto a los animales controles. Este resultado indica que las MSCs modificadas con esta tecnología no tendrían, por sí mismas, un efecto terapéutico. Luego, se puso a prueba la capacidad de las MSCs para expresar GM-CSF como estrategia inmunoterapéutica en un modelo de HCC. La elección de esta citoquina se basó en su función estimuladora sobre los macrófagos. Además, este tipo celular es particularmente abundante en el microambiente del HCC, por lo que se esperaba que su modulación por el GM-CSF secretado por las MSCs modificadas con su ARNm IVT, resultara en su polarización hacia un perfil antitumoral que contribuya a la inhibición del crecimiento en animales con tumor. En los experimentos *in vivo* realizados, efectivamente se observó una disminución significativa en el crecimiento tumoral.

Para estudiar si este efecto era acotado solo a HCC, se utilizó un modelo murino de carcinoma colorrectal en el que, de manera similar, se observó una disminución significativa en el crecimiento del tumor. Estos resultados sugieren que las MSCs que expresan GM-CSF podrían usarse en otros tumores gastrointestinales. Una de las limitaciones de este resultado es que el empleo de MSC/DsRed no fue evaluado en este ultimo modelo murino.

En relación a la vía de administración de las células, en este trabajo inyectamos las MSCs en forma s.c. en la región peritumoral, pero en el futuro se podría probar la aplicación sistémica (inyección intravenosa), probablemente preestimulando las MSCs con el factor de motilidad autocrina (AMF), un tratamiento que previamente hemos demostrado que aumenta la migración de MSCs hacia el HCC (Bayo *et al.*, 2014b).

Las terapias que buscan potenciar la respuesta inmune antitumoral en favor del reconocimiento y la eliminación de las células malignas, conocidas como inmunoterapias, se han convertido en el tratamiento en primera línea para diferentes tipos de tumores tanto sólidos como de células de la sangre. Las principales estrategias

para mejorar la respuesta inmune antitumoral están dirigidas a modular la activación de las células efectoras de la inmunidad celular adquirida, como los linfocitos T CD8, bloqueando, por ejemplo, ejes de inhibición, mediados por la interacción de moléculas de superficie como el receptor de muerte celular programada 1 (PD-1) o su ligando, PD-1L. La inhibición o el bloqueo de estos puntos de control se lleva a cabo, en la práctica clínica, mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas como PD-1/PD-L1. De esta manera, se espera recuperar la activación de las células que infiltran el tumor. Para el HCC avanzado, el uso de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 (pembrolizumab o nivolumab) o PD-1L (durvalumab o atezolizumab) se han convertido en el tratamiento de elección, en combinación con agentes antiangiogénicos (bevacizumab) (Singal *et al.*, 2023). A pesar de la capacidad de desarrollar respuestas antitumorales más duraderas y beneficios en la supervivencia para un número sustancial de pacientes (Sangro *et al.*, 2021), las evidencias experimentales y clínicas, mostraron que hay, al menos, dos grandes obstáculos para el éxito de las estrategias basadas en la inmunoterapia contra el cáncer: (i) la capacidad de las células tumorales para evadir la respuesta inmune, conocida como *immunoescape* y, (ii) la reducción del infiltrado o “*homing*” de las células inmunes dentro de los tumores. En este sentido, los mecanismos que median el rechazo de la respuesta inmunitaria se originan principalmente dentro del microambiente del tumor (Bruno *et al.*, 2020; Cristescu *et al.*, 2018; Duffy *et al.*, 2017; Fridman *et al.*, 2017; Sangro *et al.*, 2021).

Otros enfoques de la inmunoterapia se basan en mejorar la inmunogenicidad, es decir la capacidad de que las células tumorales sean detectadas por el sistema inmune y este desarrolle una respuesta específica. En un tumor se producen mutaciones génicas que conducen a la expresión aberrante de polipéptidos atípicos. Estos polipéptidos atípicos no están presentes en las células de los tejidos normales y cumplen funciones únicas, principalmente en la activación del sistema inmunológico para eliminar las células tumorales (Shang *et al.*, 2022; Smith *et al.*, 2019). Estos péptidos que se producen por mutaciones no sinónimas y otras variaciones genéticas específicas del genoma de las células tumorales, se denominan neoantígenos (Shang *et al.*, 2022). Los neoantígenos son presentados por el CMH y reconocidos por células T endógenas. Las células T con especificidad por estos neoantígenos pueden llevar a la generación de un repertorio de

células T específico y, en consecuencia, inducir una respuesta antitumoral. Tapasina y Erp57 forman parte del complejo de carga de péptidos, un complejo proteico de membrana que se encuentra en el retículo endoplasmático y dirige la translocación y selección de péptidos por moléculas del CMHI. Los complejos estables de péptido-CMHI se expresan en la superficie celular para promover la respuesta de las células T contra células tumorales o infectadas (Hulpke & Tampé, 2013). Tapasina participa en la interacción entre las moléculas recién ensambladas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMHI) y el transportador asociado con el procesamiento de antígenos, necesario para el transporte de péptidos antigénicos. En el presente trabajo encontramos un aumento en los niveles de ARNm de esas dos proteínas involucradas en la carga de péptidos en el CMHI, tapasina y Erp57. Considerando el rol que tienen ambas proteínas en la presentación antigénica, estos resultados sugieren que en los tumores de los animales tratados con las MSC/GM-CSF y Dox, en los cuales hubo un aumento de ARNm de tapasina y Erp57, hubo una mayor capacidad de las células de exponer sus antígenos y, por lo tanto, una mayor inmunogenicidad, es decir, la posibilidad de inducir una respuesta inmunitaria más efectiva que en los animales que solo recibieron el vehículo. Considerando que un aumento de la expresión de tapasina y Erp57 resulta en un aumento de la actividad de carga de péptidos, se esperaba que la estrategia terapéutica analizada en este trabajo permitiera un aumento en la antigenicidad. El aumento de Erp57 y tapasina sugiere, un aumento de la actividad de la maquinaria de carga de péptidos, lo cual que permitiría una mayor presentación antigénica a células T por parte de distintas fuentes celulares. Estos eventos descritos traen como resultado un aumento de las células T que es lo que también se observó en las muestras de tumores de animales con el tratamiento combinado, los cuales además tuvieron un retraso en el crecimiento tumoral y un aumento de su supervivencia, por lo que podemos concluir que la mayor respuesta antitumoral podría ser explicada en parte, porque la utilización de doxorubicina permite, además de la generación de ICD por liberación de DAMPs, un aumento de la antigenicidad del tumor por los factores liberados durante la ICD y que son procesados en el CMH de las células cercanas. Cabe remarcar que el CMHI no es una molécula exclusiva de las células del sistema inmune, sino que está presente en todas las células nucleadas y, presenta los péptidos procesados a través de la interacción del receptor CD8 de células T y las regiones de unión con el

CMHI (MacNabb *et al.*, 2022). Por otro lado, cabe resaltar el papel fundamental de las células presentadoras de antígenos para la correcta carga de antígenos y la presentación antigénica, ya que una vez que las células tumorales son detectadas en una primera instancia, la respuesta específica se desarrolla a partir de la interacción entre los receptores CD80 y/o CD86 en una célula presentadora de antígenos y el receptor CD28 en una célula T, para finalizar la activación de esta últimas. En el presente trabajo se seleccionó el GM-CSF para estimular principalmente a las células dendríticas y a los macrófagos, que son células que se encuentran en el microambiente tumoral en el HCC. En algunos trabajos se ha utilizado la aplicación intratumoral de GM-CSF para melanoma y cáncer de mama como estrategia para el reclutamiento y estimulación de células dendríticas con buenos resultados (Dranoff *et al.*, 1993; Ferrucci *et al.*, 2021; Toda *et al.*, 2000); sin embargo, otros trabajos han reportado que el GM-CSF puede tener efectos inmunosupresores sobre el HCC (Lurje *et al.*, 2021). Para superar esta limitación, se ha probado el uso de GM-CSF en combinación con IL-12 o la secuencia de GM-CSF insertada en un vector de virus oncolítico para lograr efectos antitumorales sinérgicos en modelos de HCC (Chang *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008). En este trabajo se plantea el uso de dosis bajas de doxorubicina para inducir la liberación de DAMPs, que por unión a los receptores de células dendríticas y en presencia de GM-CSF, se produciría una mayor presentación antigénica en el microambiente del HCC. La disponibilidad de GM-CSF en el microambiente del tumor determina su eficacia y este aspecto es muy importante en el diseño de una terapia. En este sentido, existen varias estrategias que pueden localmente concentrar la citoquina. Con respecto a los vectores virales, la dosis de GM-CSF podría ser más difícil de determinar dado que, las proteínas expresadas por este método se expresan de manera constitutiva y por tiempos prolongados. Sin embargo, utilizando ARNm IVT, verificamos mediante varios experimentos independientes que la producción de GM-CSF por las MSCs estaba dentro de un rango específico (1,48-2,09 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 2×10^5 MSCs) y que en condiciones determinadas la producción de GM-CSF era reproducible, lo cual tiene sentido dado que las cantidades de proteína producida pueden limitarse a la cantidad inicial de ARNm IVT. La posibilidad de controlar los niveles de producción de la proteína permitió en el modelo *in vivo* utilizado en este trabajo una inhibición significativa del crecimiento tumoral. El tratamiento con GM-CSF ha sido previamente utilizado en modelos subcutáneos de tumores gastrointestinales (Chen *et*

al., 2013; Chen *et al.*, 2021; Martínez *et al.*, 2012; Mashima *et al.*, 2020). En el trabajo de Martínez y cols., se ha demostrado en un ensayo clínico que la administración de GM-CSF en pacientes con cáncer colorectal metastásico, aumenta significativamente la circulación de células dendríticas y permite una disminución de células T reguladoras, que promueven un ambiente inmunosupresor (Martínez *et al.*, 2012). En el trabajo de Chen y cols., se describe un retraso en el crecimiento tumoral en animales que previamente habían sido administrados con células que producían GM-CSF, en la forma de una vacuna. En este trabajo, la aplicación de una dosis de MSC/GM-CSF una vez establecido el tumor, tuvo un efecto sobre el desarrollo del mismo resultando en un retraso del crecimiento del tumor en animales que recibieron las MSC/GM-CSF respecto de los animales control (Chen *et al.*, 2013).

En los últimos años, se ha demostrado que ciertos fármacos utilizados para quimioterapia, como las antraciclinas, desencadenan la muerte celular inmunogénica (ICD). Después del tratamiento con estos fármacos, las células tumorales expresan DAMPs, que incluyen HMGB1 liberada desde el núcleo, la translocación de calreticulina desde el retículo endoplásmico a la superficie celular y ATP secretado al medio extracelular, lo que promueve su reconocimiento por parte de las células inmunes (Garg *et al.*, 2015). En este sentido, la administración de agentes que puedan promover el daño de las células tumorales y su eliminación mediante ICD constituye una buena estrategia para mejorar la eficacia de los tratamientos contra el cáncer. Además, las células malignas que comienzan un proceso de muerte, que son eliminadas por las células T, inician una respuesta inmune específica del tumor que puede contribuir al reconocimiento de las células tumorales vivas (Yuan *et al.*, 2021). Esta respuesta antitumoral podría inducir posteriormente beneficios clínicos a largo plazo en pacientes iniciados con quimioterapia citotóxica y mejorados por un plus inmunológico (Galluzzi *et al.*, 2015). Particularmente para el HCC, estudios recientes han demostrado que las inmunoterapias disponibles pueden mejorarse mediante la modulación de células del sistema inmunológico innato, como los neutrófilos y los macrófagos (Hao *et al.*, 2022; Leslie *et al.*, 2022). Teniendo en cuenta estos hallazgos, utilizamos dosis bajas de Dox para potenciar el efecto de MSC/GM-CSF. En este trabajo, demostramos que el medio condicionado de la línea celular Hepa129 previamente tratada con Dox tuvo un potente

efecto *in vitro* sobre la línea celular de macrófagos J774, aumentando los niveles de ARNm de citoquinas proinflamatorias y la expresión de las moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86). Es importante resaltar, que los macrófagos asociados a tumores (TAM) se encuentran entre las células inmunitarias más abundantes que infiltran el microambiente tumoral y están presentes en todas las etapas de la progresión del cáncer de hígado (Cheng *et al.*, 2022); por lo tanto, la eficacia del enfoque terapéutico puesto a prueba en este trabajo permite la estimulación de los macrófagos a un perfil proinflamatorio por dos vías, por un lado a través del GM-CSF y por otro, el efecto de los DAMPs y la exposición y carga de neoantígenos por parte de las células presentadoras de antígenos inducidos por la Dox. De esta forma se aprovecha la presencia de los TAM en el hígado estimulando su perfil proinflamatorio, sumado a la contribución por parte de otras células presentadoras de antígenos que son reclutadas a la zona del tumor. Precisamente, en el modelo *in vivo* estudiado en este trabajo, se demostró que dosis bajas de Dox en combinación con MSC/GM-CSF aumentaban el número de macrófagos (F4/80⁺), el número de células T citotóxicas (CD3⁺/CD8⁺) y los niveles de citoquinas proinflamatorias a nivel intratumoral, resultados que sugieren el desarrollo de una respuesta específica o la activación de células T.

En este trabajo no se realizaron experimentos que permitan demostrar un aumento de células dendríticas maduras en el modelo *in vivo*, sin embargo, se encontró a nivel de ARNm un aumento del marcador CD11c en animales a los que se les administró el tratamiento combinado de MSC/GM-CSF + Dox. El marcador CD11c se encuentra presente en células dendríticas con lo cual, este resultado confirmaría al menos un aumento de la proporción de células dendríticas dentro del tumor y sumando esto a un aumento de la presentación antigénica. En su conjunto estos resultados sugieren que la estrategia utilizada en este trabajo podría favorecer el desarrollo de una respuesta específica, ya que la función del CMHI es presentar fragmentos de proteínas producidas en el interior de las células a los linfocitos T y posteriormente desarrollar una respuesta específica y que un aumento de la presencia de células dendríticas otorgaría una mayor especificidad a esa respuesta.

Una limitación del trabajo consiste en que al analizar los mecanismos subyacentes al efecto terapéutico observado, no se evaluaron los tratamientos individuales (MSC/GM-

CSF y Dox), con lo cual, no se puede discernir cuál sería el aporte de cada tratamiento individual al efecto global observado. A pesar de las limitaciones mencionadas, nuestro tratamiento, que es la combinación de MSC/GM-CSF y Dox tiene un efecto demostrado sobre la evolución de los tumores y la supervivencia de los animales. Para dilucidar el impacto de cada tratamiento individual en el efecto obtenido, destacamos que son necesarios experimentos adicionales para confirmar estos fenómenos. Finalmente, aunque el modelo murino utilizado se eligió debido a la similitud intrínseca del sistema inmunológico con el humano, enfatizamos que sería de gran interés reproducir estos experimentos en modelos de ratón humanizado.

6. Conclusión

En este trabajo demostramos que la transfección utilizando ARNm IVT es efectiva para una rápida y sostenida expresión de proteínas, que presenta una ventaja crucial en el diseño de terapias celulares en comparación con los vectores. La naturaleza de esta técnica que se fundamenta en el uso de la maquinaria de traducción celular para la producción de factores es el principal aporte a la bioseguridad. Este trabajo muestra claramente que las MSCs que producen GM-CSF por la incorporación de ARNm IVT, podrían usarse para estimular una respuesta antitumoral en el HCC aprovechando las propiedades de tropismo de las MSCs. Además, proporcionamos pruebas sólidas de que la secreción de GM-CSF por las MSCs diseñadas con ARNm IVT en combinación con dosis bajas de Dox disminuyen significativamente el crecimiento del HCC. Tanto la droga (Dox) como las células (MSC/GM-CSF), actúan de manera sinérgica retrasando el crecimiento tumoral. Se propone que estos efectos probablemente sean el resultado de un aumento de la inmunogenicidad del microambiente tumoral por activación y reclutamiento de células presentadoras de antígenos y por otro lado, el establecimiento de un mayor repertorio antigénico, dados los resultados obtenidos sobre el aumento de la expresión de moléculas relacionadas a la presentación antigénica. Los cambios en el microambiente tumoral por la liberación de factores a nivel local de las MSC/GM-CSF y la aplicación de una dosis mínima de Dox, propician el escenario para una mayor circulación de células T que posibilita una respuesta específica, aunque en este trabajo no se ha demostrado el establecimiento de este tipo de respuesta. En conclusión, las MSCs diseñadas con ARNm IVT podrían ser una herramienta novedosa para mejorar las estrategias actuales de tratamiento del HCC.

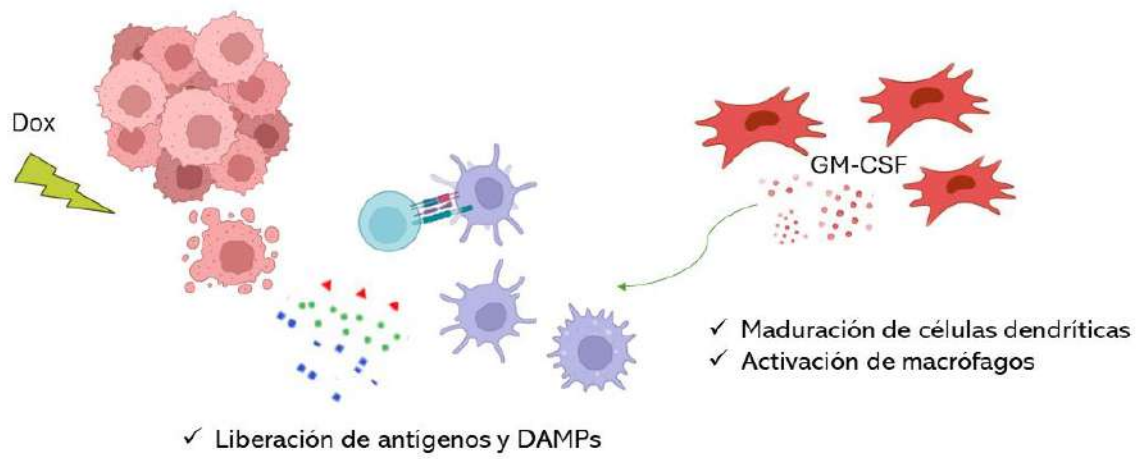


Figura 24. Representación esquemática de los posibles eventos desencadenados por el tratamiento combinando MSC/GM-CSF y Dox dentro de los tumores.

7. Bibliografía

- Al-Saif, M., Khabar, K. S. A. (2012). UU/UA dinucleotide frequency reduction in coding regions results in increased mRNA stability and protein expression. *Molecular Therapy*, 20(5):954–959. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.29>
- Anderson, B. R., Muramatsu, H., Nallagatla, S. R., Bevilacqua, P. C., Sansing, L. H., Weissman, D., Karikó, K. (2010). Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Research*, 38(17):5884–5892. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq347>
- Andries, O., Mc Cafferty, S., De Smedt, S. C., Weiss, R., Sanders, N. N., Kitada, T. (2015). N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *Journal of Controlled Release*, 217:337–344. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.051>
- Angel, M., Yanik, M. F. (2010). Innate immune suppression enables frequent transfection with RNA encoding reprogramming proteins. *PLoS ONE*, 5(7):1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011756>
- Aquino, J. B., Bolontrade, M. F., García, M. G., Podhajcer, O. L., Mazzolini, G. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutic tools and gene carriers in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Gene Therapy* 17(6): 692–708. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.10>
- Bayo, J., Fiore, E., Aquino, J. B., Malvicini, M., Rizzo, M., Peixoto, E., Alaniz, L., Piccioni, F., Bolontrade, M., Podhajcer, O., Garcia, M. G., Mazzolini, G. (2014a). Human Umbilical Cord Perivascular Cells Exhibited Enhanced Migration Capacity towards Hepatocellular Carcinoma in Comparison with Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: A Role for Autocrine Motility Factor Receptor. *BioMed Research International*, 2014:837420. <https://doi.org/10.1155/2014/837420>
- Bayo, J., Fiore, E., Aquino, J. B., Malvicini, M., Rizzo, M., Peixoto, E., Andriani, O., Alaniz, L., Piccioni, F., Bolontrade, M., Podhajcer, O., Garcia, M. G., Mazzolini, G. (2014b). Increased migration of human mesenchymal stromal cells by autocrine motility factor (amf) resulted in enhanced recruitment towards hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, 9(4):e95171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095171>
- Becher, B., Tugues, S., Greter, M. (2016). GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity*, 45(5):963–973. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.026>
- Beckermann, B. M., Kallifatidis, G., Groth, A., Frommhold, D., Apel, A., Mattern, J., Salnikov, A. V., Moldenhauer, G., Wagner, W., Diehlmann, A., Saffrich, R., Schubert, M., Ho, A. D., Giese, N., Büchler, M. W., Friess, H., Büchler, P., Herr, I. (2008). VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *British Journal of Cancer*, 99(4):622–631. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604508>
- Bennett, J. H., Joyner, C. J., Triffitt, J. T., Owen, M. E. (1991). Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *Journal of Cell Science*, 99(1):131–139. <https://doi.org/10.1242/jcs.99.1.131>

- Bernardo, M. E., Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 13(4):392–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>
- Birnbaum, T., Roeder, J., Schankin, C. J., Padovan, C. S., Schichor, C., Goldbrunner, R., Straube, A. (2007). Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *Journal of Neuro-Oncology*, 83(3):241–247. <https://doi.org/10.1007/s11060-007-9332-4>
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A., Anderson, W. F. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 270(5235):475-80.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Kang, L., Jakubzick, C., Ingersoll, M. A., Leboeuf, M., Stanley, R., Nussenzweig, M., Lira, S. A., Randolph, G., Merad, M. (2009). Origin of the Lamina Propria Dendritic Cell Network. *Immunity*, 31(3):513–525. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.010>
- Bolontrade, M., Garcia, M. G. (ed) (2016). *Mesenchymal Stromal Cells as Tumor Stromal Modulators*. Elsevier, Academic Press. ISBN: 9780128031025
- Broxmeyer, H. E., Srour, E., Orschell, C., Ingram, D. A., Cooper, S., Plett, P. A., Mead, L. E., Yoder, M. C. (2006). Cord Blood Stem and Progenitor Cells. *Methods in Enzymology*, 419:439–473. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)19018-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)19018-7)
- Bruno, S., Melero, I., Wadhawan, S., Finn, R. S., Abou-Alfa, G. K., Cheng, A.-L., Yau, T., Furuse, J., Park, J.-W., Boyd, Z., Tang, H. T., Shen, Y., Tschaika, M., Neely, J., El-Khoueiry, A. (2020). Association of inflammatory biomarkers with clinical outcomes in nivolumab-treated patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 73(6):1460–1469. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.07.026>
- Burgess, A. W., Metcalf, D. (1980). The nature and action of granulocyte - macrophage colony stimulating factors. *Blood*, 56(6):947–958. <https://doi.org/10.1182/blood.v56.6.947.947>
- Cafri, G., Robbins, P. F., Rosenberg, S. A. (2020). mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(11):5976-5988. <https://doi.org/10.1172/JCI134915>
- Carrero, R., Cerrada, I., Lledó, E., Dopazo, J., García-García, F., Rubio, M. P., Trigueros, C., Dorransoro, A., Ruiz-Sauri, A., Montero, J. A., Sepúlveda, P. (2012). IL1 β Induces Mesenchymal Stem Cells Migration and Leucocyte Chemotaxis Through NF- κ B. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(3):905–916. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9364-9>
- Chang, C. J., Chen, Y. H., Huang, K. W., Cheng, H. W., Chan, S. F., Tai, K. F., Hwang, L. H. (2007). Combined GM-CSF and IL-12 gene therapy synergistically suppresses the growth of orthotopic liver tumors. *Hepatology*, 45(3):746–754. <https://doi.org/10.1002/hep.21560>
- Chen, B., Chen, X., Liu, C., Li, J., Liu, F., Huang, Y. (2018). Co-expression of Akt1 and Wnt11 promotes the proliferation and cardiac differentiation of mesenchymal stem cells and attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108:508–514. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.047>

- Chen, C., Hou, J., Lin, Z., Yao, M., Jiang, R., Wang, Y., Gao, Y., Shao, Q., Deng, L., Chen, Y., Sun, B. (2013). A bystander cell-based GM-CSF secreting vaccine synergized with a low dose of cyclophosphamide presents therapeutic immune responses against murine hepatocellular carcinoma. *Cellular and Molecular Immunology*, 10(4):349–359. <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.20>
- Chen, C., Wang, Z., Ding, Y., Qin, Y. (2023). Tumor microenvironment-mediated immune evasion in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Immunology*, 14:1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1133308>
- Chen, G., Gupta, R., Petrik, S., Laiko, M., Leatherman, J. M., Asquith, J. M., Daphtary, M. M., Garrett-Mayer, E., Davidson, N. E., Hirt, K., Berg, M., Uram, J. N., Dausers, T., Fetting, J., Duus, E. M., Atay-Rosenthal, S., Ye, X., Wolff, A. C., Stearns, V., Jaffee, E. M., Emens, L. A. (2014). A feasibility study of cyclophosphamide, trastuzumab, and an allogeneic GM-CSF-secreting breast tumor vaccine for HER2+ metastatic breast cancer. *Cancer Immunology Research*, 2(10):949–961. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0058>
- Chen, L., Imamichi, S., Tong, Y., Sasaki, Y., Onodera, T., Nakamura, S., Igaki, H., Itami, J., Masutani, M. (2021). A Combination of GM-CSF and Released Factors from Gamma-Irradiated Tumor Cells Enhances the Differentiation of Macrophages from Bone Marrow Cells and Their Antigen-Presenting Function and Polarization to Type 1. *Medicines*, 8(7):35. <https://doi.org/10.3390/medicines8070035>
- Chen, Z., Zhang, S., Han, N., Jiang, J., Xu, Y., Ma, D., Lu, L., Guo, X., Qiu, M., Huang, Q., Wang, H., Mo, F., Chen, S., Yang, L. (2021). A Neoantigen-Based Peptide Vaccine for Patients With Advanced Pancreatic Cancer Refractory to Standard Treatment. *Frontiers in Immunology*, 12:1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.691605>
- Cheng, K., Cai, N., Zhu, J., Yang, X., Liang, H., Zhang, W. (2022). Tumor-associated macrophages in liver cancer: From mechanisms to therapy. *Cancer Communications*, 42(11):1112–1140. <https://doi.org/10.1002/cac2.12345>
- Christodoulou, I., Goulielmaki, M., Devetzi, M., Panagiotidis, M., Koliakos, G., Zoumpourlis, V. (2018). Mesenchymal stem cells in preclinical cancer cytotherapy: A systematic review. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1):1–38. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1078-8>
- Ciriello, G., Magnani, L., Aitken, S. J., Akkari, L., Behjati, S., Hanahan, D., Landau, D. A., Lopez-Bigas, N., Lupiáñez, D. G., Marine, J.-C., Martin-Villalba, A., Natoli, G., Obenauf, A. C., Oricchio, E., Scaffidi, P., Sottoriva, A., Swarbrick, A., Tonon, G., Vanharanta, S., Zuber, J. (2024). Cancer Evolution: A Multifaceted Affair. *Cancer Discovery*, 14(1):36-48. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-23-0530>
- Cristescu, R., Mogg, R., Ayers, M., Albright, A., Murphy, E., Yearley, J., Sher, X., Liu, X. Q., Lu, H., Nebozhyn, M., Zhang, C., Lunceford, J. C., Joe, A., Cheng, J., Webber, A. L., Ibrahim, N., Plimack, E. R., Ott, P. A., Seiwert, T. Y., Ribas, A., Mcclanahan, T. K., Tomassini, J. E., Loboda, A., Kaufman, D. (2018). Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science* 362(6411):eaar3593. <https://doi.org/10.1126/science.aar3593>
- Crowley, S. T., Poliskey, J. A., Baumhover, N. J., Rice, K. G. (2015). Efficient expression of stabilized mRNA PEG-peptide polyplexes in liver. *Gene Therapy*, 22(12):993–999. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.68>

- da Silva Meirelles, L., Fontes, A. M., Covas, D. T., Caplan, A. I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(5–6):419–427. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.002>
- Dang, J. M., Leong, K. W. (2006). Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(4):487–499. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.03.001>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dorshkind, K. (1990). Regulation of Hemopoiesis by Bone Marrow Stromal Cells and Their Products. *Annu Rev Immunol*, 8:111–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.08.040190.000551>
- Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., Mulligan, R. C. (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8):3539–3543. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3539>
- Duffy, A., Ulahannan, S., Makorova-Rusher, O., Rahma, O., Wedemeyer, H., Pratt, D., Davis, J., Hughes, M., Heller, T., ElGindi, M., Uppala, A., Korangy, F., Kleiner, D., Figg, W., Venzon, D., Steinberg, S., Venkatesan, A., Krishnasamy, V., Abi-Jaoudeh, N., Levy, E., Wood, B. J., Greten, T. (2017). Tremelimumab in combination with ablation in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 66(3):545–551. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.10.029>
- Fassio, E., Míguez, C., Soria, S., Palazzo, F., Gadano, A., Adrover, R., Landeira, G., Fernández, N., García, D., Barbero, R., Perelstein, G., Ríos, B., Isla, R., Civetta, É., Ravier, R. P., Barzola, S., Curciarello, J., Colombato, L. A., Jmeniltzky, A. (2009). Etiology of hepatocellular carcinoma in Argentina: Results of a multicenter retrospective study. *Acta Gastroenterologica Latinoamericana*, 39(1):47–52.
- Feinberg, A. P., Levchenko, A. (2023). Epigenetics as a mediator of plasticity in cancer. *Science*, 379(6632):eaaw3835. <https://doi.org/10.1126/science.aaw3835>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4):778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Ferrucci, P. F., Pala, L., Conforti, F., Cocorocchio, E. (2021). Talimogene Laherparepvec (T-VEC): An Intralesional Cancer Immunotherapy for Advanced Melanoma. *Cancers*, 13(6):1383. <https://doi.org/10.3390/cancers13061383>
- Finn, O. J. (2008). Cancer immunology. *New England Journal of Medicine*, 358(25):2704–2715. <https://doi.org/10.1056/NEJMra072739>

- Fiore, E. J., Bayo, J. M., Garcia, M. G., Malvicini, M., Lloyd, R., Piccioni, F., Rizzo, M., Peixoto, E., Sola, M. B., Atorrasagasti, C., Alaniz, L., Camilletti, M. A., Enguita, M., Prieto, J., Aquino, J. B., Mazzolini, G. (2015). Mesenchymal stromal cells engineered to produce IGF-I by recombinant adenovirus ameliorate liver fibrosis in mice. *Stem Cells and Development*, 24(6):791–801. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0174>
- Fiore, E., Malvicini, M., Bayo, J., Peixoto, E., Atorrasagasti, C., Sierra, R., Rodríguez, M., Gómez Bustillo, S., García, M.G., Aquino, J.B., Mazzolini, G. (2016) Involvement of hepatic macrophages in the antifibrotic effect of IGF-I-overexpressing mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1):172. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0424-y>
- Flier, J. S., Underhill, L. H., Dvorak, H. F. (1986). Tumors: Wounds That Do Not Heal. *New England Journal of Medicine*, 315(26):1650–1659. <https://doi.org/10.1056/nejm198612253152606>
- Forte, G., Minieri, M., Cossa, P., Antenucci, D., Sala, M., Gnocchi, V., Fiaccavento, R., Carotenuto, F., De Vito, P., Baldini, P. M., Prat, M., Di Nardo, P. (2006). Hepatocyte Growth Factor Effects on Mesenchymal Stem Cells: Proliferation, Migration, and Differentiation. *Stem Cells*, 24(1):23–33. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0176>
- Fowler, J. C., Jones, P. H. (2022). Somatic Mutation: What Shapes the Mutational Landscape of Normal Epithelia? *Cancer Discovery*, 12(7):1642–1655. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-22-0145>
- Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C., Kroemer, G. (2017). The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(12):717–734. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.101>
- Friedestein, A., Petrakova, K., Kurolesova, A., Frolova, G. (1968). Heterotopic transplants of bone marrow. *Transplantation*, 6:230–247.
- Fu, X., Liu, G., Halim, A., Ju, Y., Luo, Q., Song, G. (2019). Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*, 8(8):784. <https://doi.org/10.3390/cells8080784>
- Galland, S., Stamenkovic, I. (2020). Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *Journal of Pathology*, 250(5):555–572. <https://doi.org/10.1002/path.5357>
- Galle, P. R., Forner, A., Llovet, J. M., Mazzaferro, V., Piscaglia, F., Raoul, J. L., Schirmacher, P., Vilgrain, V. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 69(1):182–236. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., Kroemer, G. (2015). Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell*, 28(6):690–714. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.10.012>
- Galluzzi, L., Kepp, O., Kroemer, G. (2012). Enlightening the impact of immunogenic cell death in photodynamic cancer therapy. *EMBO Journal*, 31(5):1055–1057. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.2>

- Garcia, M. G., Bayo, J., Bolontrade, M. F., Sganga, L., Malvicini, M., Alaniz, L., Aquino, J. B., Fiore, E., Rizzo, M. M., Lorenti, A., Andriani, O., Podhajcer, O., Mazzolini, G. (2011). Hepatocellular Carcinoma Cells and Their Fibrotic Microenvironment Modulate Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell Migration in Vitro and in Vivo. *Molecular Pharmaceutics*, 8(5):1538–1548.
- Garg, A. D., Galluzzi, L., Apetoh, L., Baert, T., Birge, R. B., Bravo-San Pedro, J. M., Breckpot, K., Brough, D., Chaurio, R., Cirone, M., Coosemans, A., Coulie, P. G., De Ruyscher, D., Dini, L., Witte, P. de, Dudek-Peric, A. M., Faggioni, A., Fucikova, J., Gaipl, U. S., Golab, J., Gougeon, M. L., Hamblin, M. R., Hemminki, A., Herrmann, M., Hodge, J. W., Kepp, O., Kroemer, G., Krysko, D. V., Land, W. G., Madeo, F., Manfredi, A. A., Mattarollo, S. R., Maueroeder, C., Merendino, N., Multhoff, G., Pabst, T., Ricci, J. E., Riganti, C., Romano, E., Rufo, N., Smyth, M. J., Sonnemann, J., Spisek, R., Stagg, J., Vacchelli, E., Vandenabeele, P., Vandenberk, L., Van den Eynde, B. J., Van Gool, S., Velotti, F., Zitvogel, L., Agostinis, P. (2015). Molecular and translational classifications of DAMPs in immunogenic cell death *Frontiers in Immunology*, 6:588. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00588>
- Garg, A. D., Krysko, D. V., Verfaillie, T., Kaczmarek, A., Ferreira, G. B., Marysael, T., Rubio, N., Firczuk, M., Mathieu, C., Roebroek, A. J. M., Annaert, W., Golab, J., De Witte, P., Vandenabeele, P., Agostinis, P. (2012). A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO Journal*, 31(5):1062–1079. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.497>
- Ghosh, D., McGrail, D. J., Dawson, M. R. (2017). TGF- β 1 Pretreatment Improves the Function of Mesenchymal Stem Cells in the Wound Bed. *Frontiers in Cell Developmental Biology*, 5:28. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00028>
- Gold, L. I., Eggleton, P., Sweetwyne, M. T., Van Duyn, L. B., Greives, M. R., Naylor, S., Michalak, M., Murphy-Ullrich, J. E. (2010). Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *The FASEB Journal*, 24(3):665–683. <https://doi.org/10.1096/fj.09-145482>
- Gopalakrishnan, A. R. K., Pandit, H., Metkari, S. M., Warty, N., Madan, T. (2016). Adenoviral vector encoding soluble Flt-1 engineered human endometrial mesenchymal stem cells effectively regress endometriotic lesions in NOD/SCID mice. *Gene Therapy*, 23(7):580–591. <https://doi.org/10.1038/gt.2016.30>
- Greter, M., Helft, J., Chow, A., Hashimoto, D., Mortha, A., Agudo-Cantero, J., Bogunovic, M., Gautier, E. L., Miller, J., Leboeuf, M., Lu, G., Aloman, C., Brown, B. D., Pollard, J. W., Xiong, H., Randolph, G. J., Chipuk, J. E., Frenette, P. S., Merad, M. (2012). GM-CSF Controls Nonlymphoid Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity*, 36(6):1031–1046. <https://doi.org/doi:10.1016/j.immuni.2012.03.027>
- Grudzien-Nogalska, E., Kowalska, J., Su, W., Kuhn, A. N., Slepencov, S. V., Darzynkiewicz, E., Sahin, U., Jemielity, J., Rhoads, R. E. (2013). Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties. *Methods in Molecular Biology*, 969:55–72. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-260-5_4

- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., Lambrecht, B. N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *Journal of Experimental Medicine*, 210(10):1977–1992. <https://doi.org/10.1084/jem.20131199>
- Guo, X. R., Hu, Q. Y., Yuan, Y. H., Tang, X. J., Yang, Z. S., Zou, D. D., Bian, L. J., Dai, L. J., Li, D. S. (2016). PTEN-mRNA engineered mesenchymal stem cell-mediated cytotoxic effects on U251 glioma cells. *Oncology Letters*, 11(4):2733–2740. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4297>
- Hai, C., Jin, Y. M., Jin, W. B., Han, Z. Z., Cui, M. N., Piao, X. Z., Shen, X. H., Zhang, S. N., Sun, H. H. (2012). Application of mesenchymal stem cells as a vehicle to deliver replication-competent adenovirus for treating malignant glioma. *Chinese Journal of Cancer*, 31(5):233-240.
- Hall, B., Dembinski, J., Sasser, A. K., Studeny, M., Andreeff, M., Marini, F. (2007). Mesenchymal stem cells in cancer: Tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles. *International Journal of Hematology*, 86(1):8–16. <https://doi.org/10.1532/IJH97.06230>
- Hamilton, J. A. (2019). GM-CSF-Dependent Inflammatory Pathways. *Frontiers in Immunology*, 10:2055. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02055>
- Hamilton, J. A., Stanley, E. R., Burgess, A. W., Shadduck, R. K. (1980). Stimulation of macrophage plasminogen activator activity by colony-stimulating factors. *Journal of Cellular Physiology*, 103(3):435–445. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041030309>
- Han, X., Yang, Q., Lin, L., Xu, C., Zheng, C., Chen, X., Han, Y., Li, M., Cao, W., Cao, K., Chen, Q., Xu, G., Zhang, Y., Zhang, J., Schneider, R. J., Qian, Y., Wang, Y., Brewer, G., Shi, Y. (2014). Interleukin-17 enhances immunosuppression by mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 21(11):1758–1768. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.85>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1):31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5):646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hao, X., Zheng, Z., Liu, H., Zhang, Y., Kang, J., Kong, X., Rong, D., Sun, G., Sun, G., Liu, L., Yu, H., Tang, W., Wang, X. (2022). Inhibition of APOC1 promotes the transformation of M2 into M1 macrophages via the ferroptosis pathway and enhances anti-PD1 immunotherapy in hepatocellular carcinoma based on single-cell RNA sequencing. *Redox Biology*, 56:102463. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102463>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9:12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- Heiser, A., Coleman, D., Dannull, J., Yancey, D., Maurice, M. A., Lallas, C. D., Dahm, P., Niedzwiecki, D., Gilboa, E., Vieweg, J. (2002). Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *Journal of Clinical Investigation*, 109(3):409–417. <https://doi.org/10.1172/JCI0214364>
- Hematti, P. (2008). Role of mesenchymal stromal cells in solid organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*, 22(4):262–273. <https://doi.org/doi:10.1016/j.trre.2008.05.002>

- Hermes, A., Jones, P. H. (2023). Somatic Mutations in Normal Tissues: New Perspectives on Early Carcinogenesis. *Annual Review of Cancer Biology*, 7(1):189–205.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-061421-012447>
- Hong, I. S. (2016). Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Experimental and Molecular Medicine*, 48(7):e242-8.
<https://doi.org/10.1038/emm.2016.64>
- Hoshida, Y., Nijman, S., Kobayashi, M., Chan, J., Brunet, J.-P., Chiang, D., Villanueva, A., Newell, P., Ikeda, K., Hashimoto, M., Watanabe, G., Gabriel, S., Friedman, S., Kumada, H., Llovet, J. M., Golub, T. (2009). Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, 69(18):7385–7392.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1089>
- Hulpke, S., Tampé, R. (2013). The MHC I loading complex: A multitasking machinery in adaptive immunity. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(8):412–420.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.06.003>
- Hung, S. C., Deng, W. P., Yang, W. K., Liu, R. S., Lee, C. C., Su, T. C., Lin, R. J., Yang, D. M., Chang, C. W., Chen, W. H., Wei, H. J., Gelovani, J. G. (2005). Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clinical Cancer Research*, 11(21):7749–7756.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0876>
- In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M. J. S., Claas, F. H. J., Fibbe, W. E., Kanhai, H. H. H. (2004). Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. *Stem Cells*, 22(7):1338–1345.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0058>
- Jemielity, J., Fowler, T., Zuberek, J., Stepinski, J., Lewdorowicz, M., Niedzwiecka, A., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., Rhoads, R. E. (2003). Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties. *RNA*, 9(9):1108–1122. <https://doi.org/10.1261/rna.5430403>
- Jhunjhunwala, S., Hammer, C., Delamarre, L. (2021). Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion. *Nature Reviews Cancer*, 21(5):298–312.
<https://doi.org/10.1038/s41568-021-00339-z>
- Jo, J. I., Tabata, Y. (2008). Non-viral gene transfection technologies for genetic engineering of stem cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(1):90–104.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.04.021>
- Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M. N., Sonenberg, N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes and Development*, 19(1):104–113.
<https://doi.org/10.1101/gad.1262905>
- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. Ö., Tukun, A., Uckan, D., Can, A. (2007). Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells*, 25(2):319–331. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0286>
- Karikó, K. (2022). Developing mRNA for Therapy. *Keio Journal of Medicine*, 71(1):31.
<https://doi.org/10.2302/kjm.71-001-ABST>

- Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H., Weissman, D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 23(2):165–175. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>
- Karikó, K., Muramatsu, H., Keller, J. M., Weissman, D. (2012). Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. *Molecular Therapy*, 20(5):948–953. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.7>
- Karikó, K., Muramatsu, H., Welsh, F. A., Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., Weissman, D. (2008). Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Molecular Therapy*, 16(11):1833–1840. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.200>
- Karp, J. M., Leng Teo, G. S. (2009). Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. *Cell Stem Cell*, 4(3):206–216. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.001>
- Kaufman, H. L., Ruby, C. E., Hughes, T., Slingluff, C. L. (2014). Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2:11. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-2-11>
- Kaundal, U., Bagai, U., Rakha, A. (2018). Immunomodulatory plasticity of mesenchymal stem cells: A potential key to successful solid organ transplantation. *Journal of Translational Medicine*, 16(1):31. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1403-0>
- Keshavarz, M., Ebrahimzadeh, M. S., Miri, S. M., Dianat-Moghadam, H., Ghorbanhosseini, S. S., Mohebbi, S. R., Keyvani, H., Ghaemi, A. (2020). Oncolytic Newcastle disease virus delivered by Mesenchymal stem cells-engineered system enhances the therapeutic effects altering tumor microenvironment. *Virology Journal*, 17(1):64. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01326-w>
- Kormann, M. S. D., Hasenpusch, G., Aneja, M. K., Nica, G., Flemmer, A. W., Herber-Jonat, S., Huppmann, M., Mays, L. E., Illenyi, M., Schams, A., Griese, M., Bittmann, I., Handgretinger, R., Hartl, D., Rosenecker, J., Rudolph, C. (2011). Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nature Biotechnology*, 29(2):154–159. <https://doi.org/10.1038/nbt.1733>
- Koury, J., Lucero, M., Cato, C., Chang, L., Geiger, J., Henry, D., Hernandez, J., Hung, F., Kaur, P., Teskey, G., Tran, A. (2018). Immunotherapies: Exploiting the immune system for cancer treatment. *Journal of Immunology Research*, 2018:9585614. <https://doi.org/10.1155/2018/9585614>
- Kozak, M. (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*, 196(4):947–950. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90418-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90418-9)
- Kroemer, G., Galassi, C., Zitvogel, L., Galluzzi, L. (2022). Immunogenic cell stress and death. *Nature Immunology*, 23(4):487–500. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01132-2>
- Kumar, A., Taghi Khani, A., Sanchez Ortiz, A., Swaminathan, S. (2022). GM-CSF: A Double-Edged Sword in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 13:901277. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.901277>

- Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., Robey, P. G. (2001). Circulating skeletal stem cells. *Journal of Cell Biology*, 153(5):1133–1139. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.1133>
- Kwon, H., Kim, M., Seo, Y., Moon, Y. S., Lee, H. J., Lee, K., Lee, H. (2018). Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials*, 156:172–193. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.034>
- Lacey, D. C., Achuthan, A., Fleetwood, A. J., Dinh, H., Roiniotis, J., Scholz, G. M., Chang, M. W., Beckman, S. K., Cook, A. D., Hamilton, J. A. (2012). Defining GM-CSF– and Macrophage-CSF–Dependent Macrophage Responses by In Vitro Models. *The Journal of Immunology*, 188(11):5752–5765. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103426>
- Leslie, J., Mackey, J. B. G., Jamieson, T., Ramon-Gil, E., Drake, T. M., Fercoq, F., Clark, W., Gilroy, K., Hedley, A., Nixon, C., Luli, S., Laszczewska, M., Pinyol, R., Esteban-Fabrá, R., Willoughby, C. E., Haber, P. K., Andreu-Oller, C., Rahbari, M., Fan, C., Pfister, D., Raman, S., Wilson, N., Müller, M., Collins, A., Geh, D., Fuller, A., McDonald, D., Hulme, G., Filby, A., Cortes-Lavaud, X., Mohamed, H. E., Ford, C. A., Raffo Iraolagoitia, X. L., McFarlane, A. J., McCain, M. V., Ridgway, R. A., Roberts, E. W., Barry, S. T., Graham, G. J., Heikenwälder, M., Reeves, H. L., Llovet, J. M., Carlin, L. M., Bird, T. G., Sansom, O. J., Mann, D. A. (2022). CXCR2 inhibition enables NASH-HCC immunotherapy. *Gut*, 71(10):2093–2106. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326259>
- Levy, O., Zhao, W., Mortensen, L. J., LeBlanc, S., Tsang, K., Fu, M., Phillips, J. A., Sagar, V., Anandakumaran, P., Ngai, J., Cui, C. H., Eimon, P., Angel, M., Lin, C. P., Yanik, M. F., Karp, J. M. (2013). mRNA-engineered mesenchymal stem cells for targeted delivery of interleukin-10 to sites of inflammation. *Blood*, 122(14):e23–e32. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-495119>
- Li, B., Luo, X., Dong, Y. (2016). Effects of Chemically Modified Messenger RNA on Protein Expression. *Bioconjugate Chemistry*, 27(3):849–853. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00090>
- Li, M., Ikehara, S. (2013). Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem Cells International*, 2013:132642. <https://doi.org/10.1155/2013/132642>
- Li, X., Wang, Y., Ye, X., Liang, P. (2021). Locoregional Combined With Systemic Therapies for Advanced Hepatocellular Carcinoma: An Inevitable Trend of Rapid Development. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8:635243. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.635243>
- Li, Z., Lai, X., Fu, S., Ren, L., Cai, H., Zhang, H., Gu, Z., Ma, X., Luo, K. (2022). Immunogenic Cell Death Activates the Tumor Immune Microenvironment to Boost the Immunotherapy Efficiency. *Advanced Science (Weinh)*, 9(22):e2201734. <https://doi.org/10.1002/ADVS.202201734>
- Liu, H., Rodgers, N. D., Jiao, X., Kiledjian, M. (2002). The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO Journal*, 21(17):4699–4708. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf448>

- Llovet, J. M., De Baere, T., Kulik, L., Haber, P. K., Greten, T. F., Meyer, T., Lencioni, R. (2021). Locoregional therapies in the era of molecular and immune treatments for hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 18(5):293–313. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00395-0>
- Llovet, J. M., Pinyol, R., Kelley, R. K., El-Khoueiry, A., Reeves, H. L., Wang, X. W., Gores, G. J., Villanueva, A. (2022). Molecular pathogenesis and systemic therapies for hepatocellular carcinoma. *Nature Cancer*, 3(4):386–401. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00357-2>
- Lu, C., Liu, Y., Ali, N. M., Zhang, B., Cui, X. (2023). The role of innate immune cells in the tumor microenvironment and research progress in anti-tumor therapy. *Frontiers in Immunology*, 13:1039260. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1039260>
- Lurje, I., Werner, W., Mohr, R., Roderburg, C., Tacke, F., Hammerich, L. (2021). In Situ Vaccination as a Strategy to Modulate the Immune Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Immunology*, 12:650486. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.650486>
- Luten, J., van Nostrum, C. F., De Smedt, S. C., Hennink, W. E. (2008). Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 126(2):97–110. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.10.028>
- MacNabb, B. W., Tumuluru, S., Chen, X., Godfrey, J., Kasal, D. N., Yu, J., Jongsma, M. L. M., Spaapen, R. M., Kline, D. E., Kline, J. (2022). Dendritic cells can prime anti-tumor CD8+ T cell responses through major histocompatibility complex cross-dressing. *Immunity*, 55(6):982–997.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.04.016>
- Majore, I., Moretti, P., Stahl, F., Hass, R., Kasper, C. (2011). Growth and Differentiation Properties of Mesenchymal Stromal Cell Populations Derived from Whole Human Umbilical Cord. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(1):17–31. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9165-y>
- Mandal, R., Barrón, J. C., Kostova, I., Becker, S., Strebhardt, K. (2020). Caspase-8: The double-edged sword. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1873(2):188357. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2020.188357>
- Mansilla, E., Marín, G. H., Drago, H., Sturla, F., Salas, E., Gardiner, C., Bossi, S., Lamonega, R., Guzmán, A., Nuñez, A., Gil, M. A., Piccinelli, G., Ibar, R., Soratti, C. (2006). Bloodstream Cells Phenotypically Identical to Human Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells Circulate in Large Amounts Under the Influence of Acute Large Skin Damage: New Evidence for Their Use in Regenerative Medicine. *Transplantation Proceedings*, 38(3):967–969. <https://doi.org/10.1016/J.TRANSPROCEED.2006.02.053>
- Marcus, A. J., Coyne, T. M., Rauch, J., Woodbury, D., Black, I. B. (2008). Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation*, 76(2):130–144. <https://doi.org/10.1111/J.1432-0436.2007.00194.X>
- Martinez, M., Ono, N., Planutiene, M., Planutis, K., Nelson, E. L., Holcombe, R. F. (2012). Granulocyte-macrophage stimulating factor (GM-CSF) increases circulating dendritic cells but does not abrogate suppression of adaptive cellular immunity in patients with metastatic colorectal cancer receiving chemotherapy. *Cancer Cell International*, 12(1):2. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-12-2>

- Mashima, H., Zhang, R., Kobayashi, T., Hagiya, Y., Tsukamoto, H., Liu, T., Iwama, T., Yamamoto, M., Lin, C., Nakatsuka, R., Mishima, Y., Watanabe, N., Yamada, T., Senju, S., Kaneko, S., Idiris, A., Nakatsura, T., Ohdan, H., Uemura, Y. (2020). Generation of GM-CSF-producing antigen-presenting cells that induce a cytotoxic T cell-mediated antitumor response. *Oncolmmunology*, 9(1):1814620. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1814620>
- Matoulkova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., Hrstka, R. (2012). The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biology*, 9(5):563–576. <https://doi.org/10.4161/rna.20231>
- Mehier-Humbert, S., Guy, R. H. (2005). Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(5):733–753. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.12.007>
- Mercola, K. E., Bar-Eli, M., Stang, H. D., Slamon, D. J., Cline, M. J. (1982). Insertion of New Genetic Information Into Bone Marrow Cells of Mice: Comparison of Two Selectable Genes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 397(1):272–280. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1982.tb43434.x>
- Mercola, K. E., Stang, H. D., Browne, J., Salser, W., Cline, M. J. (1980). Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice. *Science*, 208(4447):1033–1035.
- Michaud, M., Sukkurwala, A. Q., Di Sano, F., Zitvogel, L., Kepp, O., Kroemer, G. (2014). Synthetic induction of immunogenic cell death by genetic stimulation of endoplasmic reticulum stress. *Oncolmmunology*, 3:e28276. <https://doi.org/10.4161/onci.28276>
- Mockey, M., Gonçalves, C., Dupuy, F. P., Lemoine, F. M., Pichon, C., Midoux, P. (2006). mRNA transfection of dendritic cells: Synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(4):1062–1068. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.105>
- Montironi, C., Castet, F., Haber, P. K., Pinyol, R., Martin, M. T., Torrens, L., Wang, H., Puigvehi, M., Maeda, M., Leow, W. Q., Harrod, E., Taik, P., Chinburen, J., Taivanbaatar, E., Chinbold, E., Arqués, M. S., Donovan, M., Thung, S., Neely, J., Mazzaferro, V., Anderson, J., Roayaie, S., Schwartz, M., Villanueva, A., Friedman, S. L., Uzilov, A., Sia, D., Llovet, J. M. (2023). Inflamed and non-inflamed classes of HCC: A revised immunogenomic classification. *Gut*, 72(1):129–140. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-325918>
- Nishida, N., Kudo, M. (2017). Oncogenic Signal and Tumor Microenvironment in Hepatocellular Carcinoma. *Oncology (Switzerland)*, 93(1):160–164. <https://doi.org/10.1159/000481246>
- Nitta, S., Kusakari, Y., Yamada, Y., Kubo, T., Neo, S., Igarashi, H., Hisasue, M. (2020). Conversion of mesenchymal stem cells into a canine hepatocyte-like cells by Foxa1 and Hnf4a. *Regenerative Therapy*, 14:165–176. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.01.003>
- Olver, I., Carey, M., Boyes, A., Hall, A., Noble, N., Bryant, J., Walsh, J., Sanson-Fisher, R. (2018). The timeliness of patients reporting the side effects of chemotherapy. *Supportive Care in Cancer*, 26(10):3579–3586. <https://doi.org/10.1007/s00520-018-4225-y>
- Parikh, N., Singal, A., Huton, D., Tapper, E. (2020). Cost Effectiveness of Hepatocellular Carcinoma Surveillance: An Assessment of Benefits and Harms. *American Journal of Gastroenterol*, 115(10):1642–1649. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000715>

- Park, B. H., Hwang, T., Liu, T. C., Sze, D. Y., Kim, J. S., Kwon, H. C., Oh, S. Y., Han, S. Y., Yoon, J. H., Hong, S. H., Moon, A., Speth, K., Park, C., Ahn, Y. J., Daneshmand, M., Rhee, B. G., Pinedo, H. M., Bell, J. C., Kirn, D. H. (2008). Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *The Lancet Oncology*, 9(6):533–542. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70107-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70107-4)
- Pittenger, M. F., Discher, D. E., Péault, B. M., Phinney, D. G., Hare, J. M., Caplan, A. I. (2019). Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *Npj Regenerative Medicine*, 4:22. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>
- Prieto, J., Quian, C., Hernandez-Alcoceba, R., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Mazzolini, G., Sangro, B., Kramer, G. (2004). Gene Therapy of Liver Diseases. *Expert Opinion on Biology Therapy*, 4(7):1073–1091. <https://doi.org/10.1517/14712598.4.7.1073>
- Prockop, D. J., Youn Oh, J. (2012). Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): Role as guardians of inflammation. *Molecular Therapy*, 20(1):14–20. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.211>
- Quail, D. F., Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11):1423–1437. <https://doi.org/10.1038/NM.3394>
- Ramanathan, A., Robb, G. B., Chan, S. H. (2016). mRNA capping: Biological functions and applications. *Nucleic Acids Research*, 44(16):7511–7526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>
- Ramaswamy, S., Tonnu, N., Tachikawa, K., Limphong, P., Vega, J. B., Karmali, P. P., Chivukula, P., Verma, I. M. (2017). Systemic delivery of factor IX messenger RNA for protein replacement therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(10):E1941–E1950. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619653114>
- Riley, R. S., June, C. H., Langer, R., Mitchell, M. J. (2019). Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(3):175–196. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z>
- Rios-Doria, J., Durham, N., Wetzel, L., Rothstein, R., Chesebrough, J., Holoweckyj, N., Zhao, W., Leow, C. C., Hollingsworth, R. (2015). Doxil Synergizes with Cancer Immunotherapies to Enhance Antitumor Responses in Syngeneic Mouse Models. *Neoplasia (United States)*, 17(8):661–670. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2015.08.004>
- Saenz, R., Futralan, D., Leutenez, L., Eekhout, F., Fecteau, J. F., Sundelius, S., Sundqvist, S., Larsson, M., Hayashi, T., Minev, B., Carson, D., Esener, S., Messmer, B., Messmer, D. (2014). TLR4-dependent activation of dendritic cells by an HMGB1-derived peptide adjuvant. *Journal of Translational Medicine*, 12:211. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-211>
- Sangro, B., Sarobe, P., Hervás-Stubbs, S., Melero, I. (2021). Advances in immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 18(8):525–543. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00438-0>
- Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M. M., Davies, J. E. (2005). Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells*, 23(2): 220–229. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0166>

- Sato, H., Kuwashima, N., Sakaida, T., Hatano, M., Dusak, J. E., Fellows-Mayle, W. K., Papworth, G. D., Watkins, S. C., Gambotto, A., Pollack, I. F., Okada, H. (2005). Epidermal growth factor receptor-transfected bone marrow stromal cells exhibit enhanced migratory response and therapeutic potential against murine brain tumors. *Cancer Gene Therapy*, 12(9):757–768. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700827>
- Schrader, J., Gordon-Walker, T. T., Aucott, R. L., van Deemter, M., Quaas, A., Walsh, S., Benten, D., Forbes, S. J., Wells, R. G., Iredale, J. P. (2011). Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*, 53(4):1192–1205. <https://doi.org/10.1002/hep.24108>
- Serafini, P., Carbley, R., Noonan, K. A., Tan, G., Bronte, V., Borrello, I. (2004). High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Research*, 64(17): 6337–6343. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0757>
- Sevic, I., Spinelli, F. M., Cantero, M. J., Reszegi, A., Kovalszky, I., García, M.G., Alaniz, L. (2019). The Role of the Tumor Microenvironment in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma. In *Hepatocellular Carcinoma*. Tirnitz-Parker JEE (Ed.). Brisbane (AU): Codon Publications. <https://doi.org/https://doi.org/10.15586/hepatocellularcarcinoma.2019>
- Shang, S., Zhao, Y., Qian, K., Qin, Y., Zhang, X., Li, T., Shan, L., Wei, M., Xi, J., Tang, B. (2022). The role of neoantigens in tumor immunotherapy. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 151:113118. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113118>
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, 168(4):707–723. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>
- Sheih, A., Parks, W. C., Ziegler, S. F. (2017). GM-CSF produced by the airway epithelium is required for sensitization to cockroach allergen. *Mucosal Immunology*, 10(3):705–715. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.90>
- Short, B., Brouard, N., Occhiodoro-Scott, T., Ramakrishnan, A., Simmons, P. J. (2003). Mesenchymal stem cells. *Archives of Medical Research*, 34(6):565–571. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2003.09.007>
- Sia, D., Jiao, Y., Martinez-Quetglas, I., Kuchuk, O., Villacorta-Martin, C., Castro de Moura, M., Putra, J., Camprecios, G., Bassaganyas, L., Akers, N., Losic, B., Waxman, S., Thung, S. N., Mazzaferro, V., Esteller, M., Friedman, S. L., Schwartz, M., Villanueva, A., Llovet, J. M. (2017). Identification of an Immune-specific Class of Hepatocellular Carcinoma, Based on Molecular Features. *Gastroenterology*, 153(3):812–826. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.06.007>
- Singal, A. G., Llovet, J. M., Yarchoan, M., Mehta, N., Heimbach, J. K., Dawson, L. A., Jou, J. H., Kulik, L. M., Agopian, V. G., Marrero, J. A., Mendiratta-Lala, M., Brown, D. B., Rilling, W. S., Goyal, L., Wei, A. C., Taddei, T. H. (2023). AASLD Practice Guidance on prevention, diagnosis, and treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 78(6):1922. <https://doi.org/10.1097/hep.0000000000000466>

- Slivac, I., Guay, D., Mangion, M., Champeil, J., Gaillet, B. (2017). Non-viral nucleic acid delivery methods. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(1):105–118. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1248941>
- Smith, C. C., Selitsky, S. R., Chai, S., Armistead, P. M., Vincent, B. G., Serody, J. S. (2019). Alternative tumour-specific antigens. *Nature Reviews Cancer*, 19(8):465–478. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0162-4>
- Smits, E., Ponsaerts, P., Lenjou, M., Nijs, G., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N., Van Tendeloo, V. F. I. (2004). RNA-based gene transfer for adult stem cells and T cells. *Leukemia*, 18(11):1898–1902. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403463>
- Solari, J. I. G., Filippi-Chiela, E., Pilar, E. S., Nunes, V., Gonzalez, E. A., Figueiró, F., Andrade, C. F., Klamt, F. (2020). Damage-associated molecular patterns (DAMPs) related to immunogenic cell death are differentially triggered by clinically relevant chemotherapeutics in lung adenocarcinoma cells. *BMC Cancer*, 20(1):474. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-06964-5>
- Sonenberg, N., Gingras, A. (1998). The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(2):268-75.
- Spaeth, E. L., Dembinski, J. L., Sasser, A. K., Watson, K., Klopp, A., Hall, B., Andreeff, M., Marini, F. (2009). Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE*, 4(4):e4992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004992>
- Steinle, H., Behring, A., Schlensak, C., Wendel, H. P., Avci-Adali, M. (2017). Concise Review: Application of In Vitro Transcribed Messenger RNA for Cellular Engineering and Reprogramming: Progress and Challenges. *Stem Cells*, 35(1): 68–79. <https://doi.org/10.1002/stem.2402>
- Stepinski, J., Waddell, C., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., Rhoads, R. E. (2001). Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG. *Rna*, 7(10):1486–1495.
- Studený, M., Marini, F. C., Dembinski, J. L., Zompetta, C., Cabreira-Hansen, M., Bekele, B. N., Champlin, R. E., Andreeff, M. (2004). Mesenchymal stem cells: Potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(21):1593–1603. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh299>
- Sweeney, R., Fan, Q., Yao, M. C. (1996). Antisense ribosomes: rRNA as a vehicle for antisense RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(16):8518–8523. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8518>
- Terheggen, H. G., Lowenthal, A., Lavinha, F., Colombo, J. P., Rogers, S. (1975). Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency. *Zeitschrift Für Kinderheilkunde*, 119(1):1–3. <https://doi.org/10.1007/BF00464689>
- Timchenko, L. T. (1999). Human genetics '99: Trinucleotide repeats: Myotonic dystrophy: The role of RNA CUG triplet repeats. *American Journal of Human Genetics*, 64(2):360–364. <https://doi.org/10.1086/302268>

- Toda, M., Martuza, R. L., Rabkin, S. D. (2000). Tumor growth inhibition by intratumoral inoculation of defective herpes simplex virus vectors expressing granulocyte - Macrophage colony-stimulating factor. *Molecular Therapy*, 2(4):324–329. <https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0130>
- Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., Mortier, C., Bron, D., Lagneaux, L. (2005). Mesenchymal Stem Cells Derived from CD133-Positive Cells in Mobilized Peripheral Blood and Cord Blood: Proliferation, Oct4 Expression, and Plasticity. *Stem Cells*, 23(8):1105–1112. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0330>
- Valfrè Di Bonzo, L., Ferrero, I., Cravanzola, C., Mareschi, K., Rustichell, D., Novo, E., Sanavio, F., Cannito, S., Zamara, E., Bertero, M., Davit, A., Francica, S., Novelli, F., Colombatto, S., Fagioli, F., Parola, M. (2008). Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: Engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut*, 57(2):223–231. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.111617>
- Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H. J., Hardt, W. D., Shakh, G., Jung, S. (2009). Intestinal Lamina Propria Dendritic Cell Subsets Have Different Origin and Functions. *Immunity*, 31(3):502–512. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.025>
- Vigano, S., Alatzoglou, D., Irving, M., Ménétrier-Caux, C., Caux, C., Romero, P., Coukos, G. (2019). Targeting adenosine in cancer immunotherapy to enhance T-Cell function. *Frontiers in Immunology*, 10:925. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00925>
- Visvader, J. E., Clevers, H. (2016). Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nature Cell Biology*, 18(4):349–355. <https://doi.org/10.1038/ncb3332>
- Vogel, A. B., Lambert, L., Kinnear, E., Busse, D., Erbar, S., Reuter, K. C., Wicke, L., Perkovic, M., Beissert, T., Haas, H., Reece, S. T., Sahin, U., Tregoning, J. S. (2018). Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Molecular Therapy*, 26(2):446–455. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.11.017>
- Volarevic, V., Markovic, B. S., Gazdic, M., Volarevic, A., Jovicic, N., Arsenijevic, N., Armstrong, L., Djonov, V., Lako, M., Stojkovic, M. (2018). Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *International Journal of Medical Sciences*, 15(1):36–45. <https://doi.org/10.7150/ijms.21666>
- Volarevic, V., Nurkovic, J., Arsenijevic, N., Stojkovic, M. (2014). Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis. *Stem Cells*, 32(11):2818–2823. <https://doi.org/10.1002/stem.1818>
- Waehler, R., Russell, S. J., Curiel, D. T. (2007). Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 8(8):573–587. <https://doi.org/10.1038/nrg2141>
- Wang, C. H., Cherg, W. J., Yang, N. I., Kuo, L. T., Hsu, C. M., Yeh, H. I., Lan, Y. J., Yeh, C. H., Stanford, W. L. (2008). Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(1):54–60. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.147256>

- Wang, D. Y., Salem, J. E., Cohen, J. V., Chandra, S., Menzer, C., Ye, F., Zhao, S., Das, S., Beckermann, K. E., Ha, L., Rathmell, W. K., Ancell, K. K., Balko, J. M., Bowman, C., Davis, E. J., Chism, D. D., Horn, L., Long, G. V., Carlino, M. S., Lebrun-Vignes, B., Eroglu, Z., Hassel, J. C., Menzies, A. M., Sosman, J. A., Sullivan, R. J., Moslehi, J. J., Johnson, D. B. (2018). Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncology*, 4(12), 1721–1728. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.3923>
- Wang, L., Li, J., Liu, H., Li, Y., Fu, J., Sun, Y., Xu, R., Lin, H., Wang, S., Lv, S., Chen, L., Zou, Z., Li, B., Shi, M., Zhang, Z., Wang, F. S. (2013). A pilot study of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transfusion in patients with primary biliary cirrhosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 28(1):85–92. <https://doi.org/10.1111/jgh.12029>
- Wang, Z., Day, N., Trifillis, P., Kiledjian, M. (1999). An mRNA Stability Complex Functions with Poly(A)-Binding Protein To Stabilize mRNA In Vitro. *Molecular and Cellular Biology*, 19(7):4552–4560. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.7.4552>
- Wilgenhof, S., Van Nuffel, A. M. T., Benteyn, D., Corthals, J., Aerts, C., Heirman, C., Van Riet, I., Bonehill, A., Thielemans, K., Neyns, B. (2013). A phase IB study on intravenous synthetic mRNA electroporated dendritic cell immunotherapy in pretreated advanced melanoma patients. *Annals of Oncology*, 24(10):2686–2693. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt245>
- Yan, C., Yang, M., Li, Z., Li, S., Hu, X., Fan, D., Zhang, Y., Wang, J., Xiong, D. (2014). Suppression of orthotopically implanted hepatocarcinoma in mice by umbilical cord-derived mesenchymal stem cells with sTRAIL gene expression driven by AFP promoter. *Biomaterials*, 35(9):3035–3043. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.037>
- Yokoyama, Y., Dhanabal, M., Griffioen, A. W., Sukhatme, V. P., Ramakrishnan, S. (2000). Synergy between angiostatin and endostatin: Inhibition of ovarian cancer growth. *Cancer Research*, 60(8):2190–2196.
- Youn, H., Chung, J. K. (2015). Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15(9):1337–1348. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1057563>
- Yuan, J., Yuan, X., Wu, K., Gao, J., Li, L. (2021). A Local and Low-Dose Chemotherapy/Autophagy-Enhancing Regimen Treatment Markedly Inhibited the Growth of Established Solid Tumors Through a Systemic Antitumor Immune Response. *Frontiers in Oncology*, 11:658254. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.658254>
- Zhang, Y., Zhang, Z. (2020). The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular and Molecular Immunology*, 17(8):807–821. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6>
- Zhu, H., Zhou, W., Wan, Y., Ge, K., Lu, J., Jia, C. (2020). Nanomedicine-mediated induction of immunogenic cell death and prevention of PD-L1 overexpression for enhanced hepatocellular carcinoma therapy. *Cancer Nanotechnology*, 11(1):15. <https://doi.org/10.1186/s12645-020-00072-6>

- Zhu, Y., Sun, Z., Han, Q., Liao, L., Wang, J., Bian, C., Li, J., Yan, X., Liu, Y., Shao, C., Zhao, R. C. (2009). Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia*, 23(5):925–933. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.384>
- Zhu, Z., Xing, X., Huang, S., Tu, Y. (2021). NAT10 Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Mediating N4-Acetylcytidine Modification of Gremlin 1. *Stem Cells International*, 2021:8833527. <https://doi.org/10.1155/2021/8833527>
- Zimmermann, O., Homann, J. M., Bangert, A., Müller, A. M., Hristov, G., Goeser, S., Wiehe, J. M., Zittrich, S., Rottbauer, W., Torzewski, J., Pfitzer, G., Katus, H. A., Kaya, Z. (2012). Successful use of mRNA-nucleofection for overexpression of interleukin-10 in murine monocytes/macrophages for anti-inflammatory therapy in a murine model of autoimmune myocarditis. *Journal of the American Heart Association*, 1(6):e003293. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.003293>
- Zubkova, E. S., Beloglazova, I. B., Ratner, E. I., Dyikanov, D. T., Dergilev, K. V., Menshikov, M. Y., Parfyonova, Y. V. (2021). Transduction of rat and human adipose-tissue derived mesenchymal stromal cells by adeno-associated viral vector serotype DJ. *Biology Open*, 10(9):bio058461. <https://doi.org/10.1242/bio.058461>