

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES  
 OBTENIDAS DE MÉDULA OSEA HUMANA**

**Leidy Vanessa Hernández Suta**

**Autora**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial para optar al título de**

**Bacterióloga**

**Pontificia Universidad Javeriana  
 Facultad de Ciencias  
 Carrera de Bacteriología  
 Bogotá D.C  
 Diciembre de 2012**

### **NOTA DE ADVERTENCIA**

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus tesis degradado. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica, y por qué las tesis no contengan ataques o polémicas puramente personales, antes bien, se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

**Artículo 23 de la resolución número 13 de Julio de 1946.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Inicialmente quisiera agradecer a Dios, a mis padres, Pedro y Amanda, por que han sido el pilar de mi vida, por brindarme oportunidades tan maravillosas y las bases necesarias para ser una persona con buenos principios.

A la Doctora Viviana Rodríguez y el Doctor Alfonso Barreto por su disponibilidad, enseñanzas, comprensión y colaboración en el desarrollo de este trabajo; por brindarme día a día nuevos conocimientos que me permitieron dar mis primeros pasos en investigación que se convirtieron en una base sólida de hábitos de trabajo con los cuales afrontar el futuro.

A Diana Bautista y Viviana Wilches por su apoyo y colaboración en el análisis de las muestras y aportes en la realización del proyecto.

Igualmente a Vicerrectoría Académica por el financiamiento del proyecto, al Grupo de Inmunología y Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. A los pacientes y Departamento de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario San Ignacio en el proceso de obtención de muestras de médula ósea.

A mis hermanos, Andrés Herrera, Haidy Moreno y amigos que me apoyaron en el plano personal y fueron ejemplo de lucha constante.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>PAG</b>
<b>1. Introducción</b>	8
<b>2. Justificación</b>	9
<b>3. Marco teórico</b>	10
3.1 Características generales de células estromales mesenquimales	10
3.2 Generalidades de exosomas	12
3.3 Relación entre células estromales mesenquimales y exosomas	16
<b>4. Objetivos</b>	18
4.1 General	18
4.2 Específicos	18
<b>5. Metodología</b>	19
5.1 Aislamiento de células estromales mesenquimales de médula ósea humana	19
5.2 Caracterización e inmunotipificación de células estromales mesenquimales	19
5.3 Diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica de células estromales mesenquimales	20
5.3.1 Diferenciación adipogénica	20
5.3.2 Diferenciación condrogénica	20
5.3.3 Diferenciación osteogénica	21
5.4 Aislamiento de exosomas de células estromales mesenquimales	21
5.5 Caracterización de exosomas aislados de las células estromales mesenquimales	22
5.5.1 Cuantificación de proteínas por método de Bradford	22
5.5.2 Determinación de Acetil Colinesterasa	22
5.5.3 Evaluación de proteínas asociadas con exosomas	22
5.5.4 Caracterización de la densidad de exosomas aislados	23
<b>6. Resultados</b>	24
6.1 Establecimiento y caracterización de células estromales mesenquimales	24
6.1.1 Evaluación morfológica de células estromales mesenquimales	24
6.1.2 Inmunofenotipo de células estromales mesenquimales	25
6.1.3 Diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica de células estromales mesenquimales	26
6.2 Aislamiento y caracterización de exosomas derivados de células estromales mesenquimales.	27
<b>7. Discusión</b>	30
<b>8. Conclusiones</b>	33
<b>9. Bibliografía</b>	34
<b>10. Anexos</b>	39

## TABLA DE ABREVIATURAS

ARN	Ácido ribonucleico
CEM	Células estromales mesenquimales
MO	Médula ósea
SITC	Sociedad Internacional de Terapia Celular
AChE	Acetilcolinesterasa
Hsc70	<i>Heat shock cognate protein 70</i>
MFG-E8	<i>Milk fat globule epidermal growth factor 8</i>
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMVs	Cuerpos multivesiculares
CDs	Células dendríticas
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
CPA	Células presentadora de antígeno
INF – $\gamma$	Interferon $\gamma$
NK	<i>Natural killer cell</i>
LTC	Linfocitos T citotóxicos
LTh1	Linfocitos T helper 1
IL- 4	Interleucina 4
LTh2	Linfocitos T helper 2
IL-12	Interleucina 12
ON	Óxido nítrico
TGF – $\beta$	<i>Transforming growth factor - <math>\beta</math></i>
IDO	Indoleamina 2 -3 dioxigenasa
UFC-F	Unidades formadoras de colonia – Fibroblásticas
PPAR – $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor - <math>\gamma</math></i>
AMP	Adenosin monofosfato
SFB	Suero Fetal Bovino
IL-11	Interleucina 11
ATP	Adenosin trifosfato
PS	<i>Phosphatidylserine</i>
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
CMNs	Células mononucleares
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
HRP	<i>Horseradich Peroxidase</i>

## RESUMEN

**Introducción.** Los exosomas son un grupo de vesículas de membrana, compuestos por proteínas y ácido ribonucleico (ARN); que pueden ser aislados de diferentes células, entre ellas células estromales mesenquimales (CEM). Este grupo de vesículas aisladas de CEM se han caracterizado por poseer un efecto cardioprotector y promover el crecimiento tumoral *in vivo*. **Objetivo.** Aislar y caracterizar exosomas a partir de células estromales mesenquimales aisladas de médula ósea. **Metodología.** Se realizó un aislamiento de CEM de médula ósea (MO) humana de donantes voluntarios del Hospital Universitario San Ignacio en (Bogotá, Colombia). La caracterización de CEM se realizó según los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (SITC): morfología, inmunofenotipo y diferenciación. Posteriormente se realizó el aislamiento de exosomas por ultracentrifugación diferencial y caracterización por cuantificación de proteínas totales, niveles de acetilcolinesterasa (AChE), perfil de proteínas asociadas a exosomas (CD63, Hsc70, MFG-E8, y CMH-I) y flotación sobre gradiente de sacarosa. **Resultados.** Se recolectaron 3 muestras de MO humana a partir de las cuales se establecieron cultivos de CEM con morfología fibroblastide, presencia de antígenos mesenquimales CD105 y CD73, en ausencia de antígenos hematopoyéticos CD45 y CD34. Las tinciones para evaluar diferenciación a linaje adipogénico, condrogénico y osteogénico fueron positivas en comparación a los controles negativos. A partir de CEM cultivadas se obtuvieron concentraciones de proteína totales entre 18,46 y 90 µg, actividad de AChE (promedio 14,82 mU de AChE), expresión de proteínas asociadas a exosomas como CD63, Hsc70 y MFG-E8. La expresión de CD63 se detectó en fracciones de alta densidad (1,12 – 1,30 g/mL) en el gradiente de sacarosa. **Conclusión.** El aislamiento de exosomas de CEM por ultracentrifugación diferencial requiere un escalonamiento de la estrategia de expansión de CEM. Los exosomas aislados de CEM expresan proteínas asociadas a exosomas como CD63, Hsc70 y MFG-E8, y flotan sobre gradiente de sacarosa en fracciones de alta densidad.

## **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES OBTENIDAS DE MÉDULA OSEA HUMANA**

### **1. INTRODUCCIÓN**

Los exosomas son vesículas de membrana que se originan dentro de la célula en compartimentos endosomales llamados cuerpos multivesiculares (CMVs) y se caracterizan por tener un diámetro entre 40 – 100 nm. Su morfología es redonda en forma de copa y pueden tener una densidad en gradiente de sacarosa que oscila entre 1,13 – 1,19 g/mL; estas vesículas pueden ser obtenidas a 100.000 g por ultracentrifugación diferencial [1]. Sus membranas están enriquecidas en colesterol, esfingomielina y ceramida, tienen fosfatidilserina (*Phosphatidylserine*, PS) expuesta y se considera que pueden tener moléculas de ARN [2]. Debido a su origen endosomal, los exosomas expresan proteínas como tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82), proteínas de choque térmico (Hsc70, Hsp90), y proteínas involucradas en la biogénesis de CMVs (Alix, Tsg101) [3].

Los exosomas son secretados por las células al ambiente extracelular donde pueden interactuar con otras células; existen diferentes mecanismos por los que se genera ésta interacción. En un estudio sobre células tumorales de melanoma, *Parolini et al* encontraron que los exosomas liberados por estas células pueden fusionarse con la membrana celular de células tumorales a través de la interacción lípido a lípido bajo condiciones específicas de pH [4]; además se ha demostrado la expresión de diferentes proteínas en exosomas que permiten la interacción con otras células por la unión de receptores específicos con la superficie celular [5].

La secreción de exosomas ha sido reportada por varios tipos de células, incluyendo líneas celulares tumorales, células neuronales y células madre, además se ha detectado en algunos fluidos biológicos como sangre y orina [6]. Dentro de las células madre se encuentran las CEM, células madre adultas adherentes al plástico, definidas por su capacidad de diferenciación en células como adipocitos, condrocitos y osteoblastos, y por la expresión de CD105, CD73, y CD90, en ausencia de la expresión de marcadores hematopoyéticos [7]; y entre sus principales funciones se encuentran propiedades regenerativas e inmunomoduladoras [8].

Los estudios de investigación sobre las funciones que tienen los exosomas derivados de las CEM hasta ahora reportan que estas vesículas de membrana, poseen un efecto cardioprotector [9] y promueven *in vivo* la progresión del tumor de forma similar a las CEM [10].

## 2. JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que las células madre ayudan significativamente en la regeneración de tejidos y terapias modificadoras de enfermedades [11]. Sin embargo los resultados obtenidos hasta el momento son muy heterogéneos, por lo tanto la comprensión acerca de las interacciones de estas células con el microambiente del receptor es primordial para su aplicación clínica. Las mayores complicaciones en la implementación de la terapia celular alogénica son la respuesta inmune que se genera y la búsqueda de donantes compatibles [12]; por lo tanto es necesario buscar alternativas en terapia celular; por ejemplo, la búsqueda de componentes de células madre con funciones reguladoras, como los exosomas.

Los exosomas han sido aislados de diferentes células como plaquetas, linfocitos B (LB), células epiteliales intestinales, células tumorales, células dendríticas (CDs) [13, 14]. Se ha demostrado que los exosomas son capaces de modular la respuesta inmune y sus efectos varían fuertemente dependiendo del estado fisiológico de las células que los secretan [15, 16], por ejemplo, los exosomas aislados de células epiteliales intestinales poseen propiedades inmunoreguladoras sobre los linfocitos T (LT), ya que pueden inhibir su proliferación y disminuir su viabilidad cuando son estimulados policlonalmente [14]; otro estudio reportó que los exosomas de CDs expresan CMH de clase I y II que estimulan la proliferación de LT [13]; por lo tanto es fundamental realizar estudios acerca de las propiedades que poseen los exosomas específicos de cada grupo de células.

Por otro lado se ha observado que las CEM también poseen propiedades inmunoreguladoras como la inhibición de la proliferación de LT, LB, CDs y células asesinas naturales (NK), entre otras [17], pero no es claro si los exosomas producidos por CEM también tienen esta función; por esta razón en este trabajo se pretende aislar y caracterizar exosomas producidos por CEM de MO humana aisladas en cultivo mediante ultracentrifugación y Western Blot respectivamente, con el fin de evaluar en un futuro si los exosomas producidos por las CEM pueden promover mecanismos de tolerancia inmunológica y regeneración tisular.



### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Características generales de células estromales mesenquimales

Las CEM son células madre adultas, capaces de autorenovarse, generar diversos tejidos mesodérmicos y sustentar el proceso de la hematopoyesis. La SITC ha propuesto tres criterios para la caracterización *in vitro* de CEM; primero, las CEM deben ser adherentes al plástico; segundo, las CEM deben expresar antígenos como CD105, CD73, y CD90, en ausencia en la expresión de marcadores hematopoyéticos (CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79, CD19 y HLA-DR); y tercero, las CEM deben diferenciarse hacia linaje adipogénico, condrogénico y osteogénico, *in vitro* [7].

Existen diferentes fuentes de aislamiento de CEM, como médula ósea, tejido adiposo o sangre periférica; o de tejidos asociados al nacimiento como la placenta, cordón umbilical, sangre de cordón, líquido amniótico o membrana coriónica; aunque existen diferencias en las características de las CEM derivadas de estos tejidos en cuanto a la capacidad de proliferación y la capacidad de diferenciación [18]. También se han logrado aislar CEM de hueso trabecular, músculo esquelético, páncreas, hígado [19], membrana sinovial [20], pulpa dental y ligamento periodontal [21].

Varios estudios han demostrado que las CEM tienen la capacidad de regenerar, hueso [22], cartílago [23], tendón [24] y músculo esquelético [25]. Además de las propiedades regenerativas, se ha reportado que las CEM pueden desempeñar funciones específicas en el mantenimiento de la tolerancia periférica, la tolerancia del trasplante, la autoinmunidad, la evasión del tumor y la tolerancia materno-fetal [26].

*Rastegar et al* han demostrado la capacidad de las CEM para modular la respuesta inmune, encontrando que pueden mejorarla o suprimirla [27]. Las CEM pueden promover la respuesta inmune actuando como células presentadoras de antígeno (CPA) a través de una vía dependiente de interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ); sin embargo, cuando los niveles de INF- $\gamma$  incrementan, se inhibe directamente la presentación de antígeno y promueve la inmunosupresión [28].

El mecanismo de inmunosupresión de las CEM se basa principalmente en la capacidad de inhibir la proliferación de LT, LB, CDs, y células asesinas naturales (*Natural killer cell*, NK) induciendo un arresto de la división celular en la fase G0 – G1 del ciclo celular asociada con la inducción de la expresión de ciclina D2 [29]. El efecto inmunomodulador ejercido por las CEM en los LT, afecta la expresión de marcadores de activación, la formación de linfocitos T citotóxicos (LTC), la producción de INF- $\gamma$  por los linfocitos T helper 1 (LTh1) y la producción de interleucina-4 (IL-4) por linfocitos T helper 2 (LTh2) [17]. Además, se ha reportado que las CEM afectan las funciones de las CDs, ya que inhibe la maduración de las CDs mieloides disminuyendo la expresión de CD11c, CD83, CMH II y moléculas co-estimuladoras, así como la producción de interleucina - 12 (IL-12) [30]. Igualmente se ha demostrado que la función de las células NK se ve afectada por las CEM, donde éstas disminuyen su secreción de INF- $\gamma$  [31].

*Sato et al* han expuesto que el efecto inmunosupresor de las CEM puede ser ejercido por la secreción de factores solubles, ya que las CEM producen óxido nítrico (ON) en presencia de LT CD4+ y CD8+, resultando en la supresión de la proliferación de LT [32].

También se ha reportado que las CEM secretan TGF- $\beta$  regulando procesos de diferenciación, crecimiento y oncogénesis, e inhibe la activación de LB. Además la indoleamina 2-3 dioxigenasa (IDO) secretada por CEM cataliza la conversión de triptófano a quinurenina, y este agotamiento de triptófano suprime la proliferación de LT [18, 33].

### **3.1.1 Morfología de CEM**

Las CEM observadas bajo microscopía invertida presentan morfología fibroblastoide y algunos cultivos tienen la capacidad de formar unidades formadoras de colonia fibroblastoide (UFC-F). Estas células evaluadas mediante la técnica citológica *Cytospin* y coloreadas con tinción de Wright presentan un núcleo redondo excéntrico, con cromatina parcialmente condensada y algunos nucleólos, el citoplasma es ligeramente basófilo, agranular y desprovisto de inclusiones.

### **3.1.2 Inmunofenotipo de CEM**

La caracterización inmunofenotípica está basada en la determinación de un extenso panel de antígenos, incluyendo la expresión de proteínas como CD105 también conocido como endogлина (proteína transmembrana homodimérica de 180 KDa), CD105 es un componente del complejo receptor del TGF- $\beta$  una citoquina que modula angiogénesis por la regulación de diferentes funciones celulares incluyendo proliferación, diferenciación y migración [34].

Además del antígeno CD105, también se ha encontrado que las CEM expresan la proteína CD73. La proteína CD73 (ecto- 5'-nucleotidasa) es una proteína de 70 KDa unida a una molécula de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) en la membrana celular [35]; la función principal de la ecto-5'-nucleotidasa es metabolizar el 5'- adenosin monofosfato (AMP) en adenosina [36].

### **3.1.3 Diferenciación de CEM**

Otra de las características importantes que definen a las CEM, es su capacidad de diferenciación hacia múltiples linajes, lo que ha permitido estudios sobre las condiciones de cultivo para inducir la diferenciación y las diferentes vías relacionadas en cada linaje. La diferenciación adipogénica de las CEM inicia con la aparición gradual de pequeñas vacuolas lipídicas en el citoplasma, seguido de un redondeamiento de la célula mientras las vacuolas lipídicas se van agrandando para fusionarse y formar una sola vacuola, formando así adipocitos; se ha encontrado que el receptor activador de proliferación de los peroxisomas –  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) actúa como sintetizador de ácidos grasos y juega un papel importante en la regulación de la función de genes específicos de adipocitos [37]. Esta diferenciación se genera mediante la exposición a factores exógenos o por medios de cultivo que contienen isobutildexametasona, insulina y dexametasona [27]; la isobutamildexametasona es un inductor de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) el cual inicia la adipogénesis mediante la activación temprana de C/EBP (Proteína de unión a un elemento de respuesta a cAMP) que

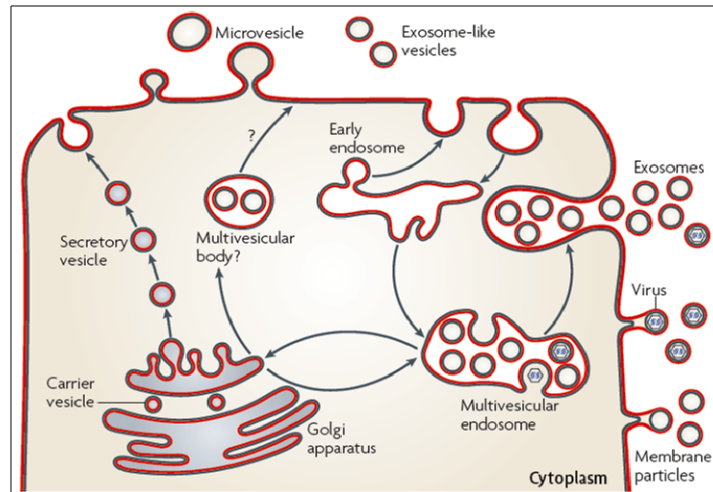
participa en la inducción de la expresión del factor de transcripción C/EBP $\beta$  necesario para el proceso de diferenciación; la insulina promueve la adipogénesis por supresión de la actividad inhibitoria del factor de transcripción *Protein box forkhead O1* (FoxO1) [38] y la dexametasona es un estimulante, que actúa a nivel celular sobre el factor de transcripción C/EBP $\delta$  que induce la expresión de C/EBP $\alpha$  y PPAR- $\gamma$ , los cuales permanecen elevados durante el proceso de diferenciación promoviendo la expresión de marcadores de diferenciación adipogénica [39].

La diferenciación condrogénica ocurre cuando las CEM crecen bajo condiciones que incluyen un medio libre de suero y la adición de un miembro de la súper familia de TGF- $\beta$ ; en presencia de estas condiciones las células rápidamente pierden su morfología fibroblastoide e inician la expresión de componentes de matriz extracelular específicas de cartílago, incluyendo la biosíntesis de glicosaminoglicanos [40]; también se ha estudiado la sobre-expresión de genes como SRY-box 9 (Sox9) que coopera con proteínas como Sox5 y Sox6 para promover la proliferación condrocítica, la maduración y la formación de matriz [41].

La diferenciación osteogénica es inducida por factores como dexametasona,  $\beta$ -glicerol-fosfato, ácido ascórbico y suero fetal bovino (SFB), las CEM en presencia de estos suplementos adquieren una morfología osteoblastica con sobre regulación de la actividad fosfatasa alcalina y formación de una matriz extracelular mineralizada enriquecida en depósitos de calcio [40]. La dexametasona regula la fosforilación de un residuo de serina de la proteína Runt 2 (Runx2), un gen regulador de la diferenciación osteogénica temprana que actúa sinérgicamente con TGF- $\beta$ , regulando la expresión de la interleucina 11 (IL-11) que reduce la adipogénesis, mientras promueve la diferenciación osteogénica y condrogénica[42]; el  $\beta$ -glicerol-fosfato es utilizado como suplemento por la capacidad de estimular la calcificación de las células *in vivo*, induciendo la formación de calcio [43] y el ácido ascórbico estimula la hidroxilación de aminoácidos para la formación de las fibras de colágeno en triple hélice que permite mantener la estructura de los tejidos [44]; otro inductor osteogénico es *osterix*, que suprime la condrogenesis y promueve la diferenciación osteoblástica en una etapa posterior [45].

### **3.2 Generalidades de exosomas**

En los últimos años se ha estudiado que las células tienen la capacidad de secretar distintos tipos de vesículas de membrana. Las vesículas de membrana son estructuras esféricas que están limitadas por una bicapa lipídica y contienen componentes hidrofílicos solubles. Las células pueden formar vesículas de membrana que son secretadas al espacio extracelular, estas vesículas pueden formarse por desprendimiento directo de la membrana plasmática o se pueden originar a partir de compartimentos internos (Figura 1) [46].



**FIGURA 1. Diferentes tipos de vesículas de membrana secretadas.** Tomado de: Thery, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9** (8): p. 581-93.

Existen varios tipos de vesículas de membrana que se caracterizan por su estructura y propiedades bioquímicas dependiendo de su lugar de origen. Vesículas de membrana grandes (Diámetro > 100 nm) que son secretadas por desprendimiento de la membrana plasmática, tales vesículas se han definido como microvesículas, ectosomas, micropartículas y exovesículas. Otro tipo de vesículas de membrana más pequeñas (Diámetro < 100 nm) también secretadas por la membrana plasmática, incluyen virus envueltos como el VIH y exosomas [46].

En el año de 1983, en un estudio sobre reticulocitos de ovejas, se observó que la formación de exosomas es una vía para la eliminación de proteínas tales como el receptor de transferrina o integrinas, durante su maduración eritroide [47]. Hacia 1996, *Raposo et al* demostraron que los exosomas están involucrados en la presentación de antígenos, encontrando que las CPA contienen compartimentos endocíticos tardíos enriquecidos con CMH-II que contienen en su interior vesículas de membrana llamadas exosomas con las mismas características en su membrana, estos compartimentos pueden fusionarse con la membrana plasmática resultando en la liberación de exosomas que contienen CMH-II [48].

Los exosomas se han caracterizado por microscopía electrónica como vesículas de 40 – 100 nm de diámetro con estructura redonda en forma de copa [1], una flotación sobre gradiente de sacarosa entre las fracciones de 1,14 – 1,18 g/mL [48] y por poseer una composición de proteínas particular que puede variar en función de las células de origen.

Varios estudios han demostrado que los exosomas se encuentran en el medio de cultivo de varios tipos de células, incluyendo células de origen hematopoyético [49, 50], células tumorales [51], células neuronales [52], células de epitelio intestinal [53], y de fluidos biológicos como orina [54], plasma [55], fluido de lavado bronquial [56] y fluido sinovial [57].

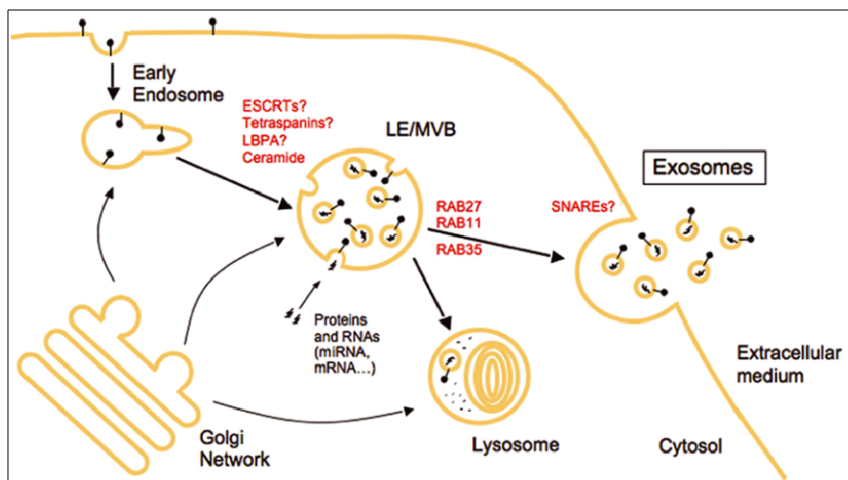
Dependiendo de la célula o tejido de origen, diferentes funciones han sido atribuidas a los exosomas. Estudios recientes han demostrado que los exosomas pueden interactuar de forma específica con un receptor de la célula diana, lo que permite la comunicación intercelular [6]. Además se cree que la presencia de mRNAs y miRNAs en exosomas de mastocitos indica una nueva función para la comunicación célula a célula, y la transferencia de material genético [58].

También se ha demostrado el papel de los exosomas sobre la respuesta inmune, encontrando que los exosomas tienen la capacidad de estimular la respuesta inmune, así como de inhibirla. *They et al* han expuesto que los exosomas de CD4<sup>+</sup> contienen en su membrana varias proteínas que involucran la estimulación de LT, incluyendo CMH de clase I y II y moléculas coestimuladoras como CD86; encontrando que estos exosomas inducen la estimulación de LT CD4<sup>+</sup> vírgenes *in vitro*, ya que las CD4<sup>+</sup> maduras utilizan los exosomas de CD4<sup>+</sup> como fuente de antígeno incrementando el número de CD4<sup>+</sup> que llevan un péptido particular, amplificando la respuesta inmune adaptativa [59].

La inhibición de la respuesta inmune por exosomas fue demostrada en exosomas derivados de células tumorales de mesotelioma que tienen la capacidad de disminuir la respuesta proliferativa a IL-2 en poblaciones de linfocitos [60]. Del mismo modo recientemente se ha demostrado en la Universidad Javeriana que durante la infección por rotavirus de células epiteliales intestinales se produce una población de vesícula de membrana entre las cuales se encuentran exosomas, que podrían asociarse con mecanismos de tolerancia frente al virus debido a que pueden inhibir tanto la proliferación como disminuir la viabilidad de LT estimulados policlonalmente [14].

### **3.2.1 Biogénesis de exosomas**

Dentro del extenso grupo de vesículas de membrana, los CMVs se han definido como los precursores de exosomas; por que posiblemente la maquinaria de formación de CMVs está relacionada con la producción de exosomas. En un modelo de formación de CMVs se propusieron dos pasos secuenciales, el primero involucra la selección de proteínas hacia la membrana límite y el segundo la formación de vesículas hacia el interior con la incorporación simultánea de proteínas seleccionadas [61]. Se ha observado que los exosomas se originan dentro de estos compartimentos multivesiculares internos por lo tanto diferentes estudios se han enfocado en identificar los mecanismos moleculares implicados en la formación de vesículas intracelulares y la fusión de estos con la membrana plasmática (Figura 2) [62].



**FIGURA 2. Moléculas involucradas en la biogénesis y secreción de exomas.** Tomado de: Bobrie, A., et al., *Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses*. Traffic, 2011. **12**(12): p. 1659-68.

Algunas proteínas involucradas en la biogénesis de vesículas como exomas, son los complejos de proteínas ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) ya que se requieren para la formación de CMVs y la clasificación de proteínas endosomales en las vesículas [63]; también se ha demostrado que pequeñas guanosin trifosfatasas (GTPasas) de la familia de las Rab están involucradas, encontrando que Rab 11 se requiere para la secreción de exomas dependientes de calcio en la línea celular eritroleucemia K562 [64], Rab 35 está involucrada en la secreción de exomas enriquecidos de proteínas proteolípídicas en células oligodendrogiales [65], Rab27a y Rab27b juegan un papel complementario en la secreción espontánea de exomas que llevan CMH-II en células HeLa [66]. En cuanto al mecanismo molecular de la fusión de CMVs con la membrana plasmática se ha reportado que las proteínas SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein*) están implicadas ya que se encuentran involucradas en varios eventos de exocitosis regulada por calcio [62].

### 3.2.2 Proteínas asociadas a exomas

Existen diferentes proteínas que se han utilizado para la caracterización de exomas, entre ellas encontramos el CMH-I, un antígeno conformado por una cadena pesada unida no covalentemente a la  $\beta$ 2- microglobulina y que se expresa en la superficie de la mayoría de las células. En un estudio se reportó que los exomas derivados de CDs expresan CMH-I sustituyendo a los expresados en la membrana plasmática de CDs maduras [67].

También se ha identificado un grupo de proteínas que al parecer son comunes en todos los exomas; por ejemplo, Hsc70 una proteína de choque térmico de 73 KDa, que se ha encontrado en exomas purificados de LB humanos [68]. La proteína Hsc70 en su estructura básica incluye tres dominios uno amino-terminal de la adenosina trifosfatasa (ATPasa) de 44 KDa, un péptido dominio de unión de 18 KDa, y un dominio carboxilo-terminal de 10 KDa. Hsc70 es una chaperona que puede

proteger las células del daño causado por agresiones físicas o químicas, también es una molécula de unión a adenosina trifosfato (ATP) y tiene una actividad intrínseca ATPasa ya que puede hidrolizar el ATP en ADP [69]. A partir de estas funciones, *Geminard et al* determinaron la relación entre Hsc70 y el receptor de transferrina liberado en exosomas durante la maduración de reticulocitos, encontrando que el antígeno Hsc70 se une al receptor de transferrina exosomal con una interacción chaperona/péptido que es necesaria durante la maduración [70].

MFG-E8, también llamada lactaderina, es una proteína que se une de forma no covalente a fosfolípidos aniónicos en la superficie de los glóbulos de grasa de leche a través del factor VIII, además se une a integrinas  $\alpha\text{v}\beta 3$  y  $\alpha\text{v}\beta 5$  a través de una secuencia Arg- gly- Asp en su primer dominio y a las células apoptóticas que poseen fosfolípidos aniónicos, como la PS [71]. El antígeno MFG-E8 se ha descrito como una molécula multifuncional que participa en varios eventos regulados mediante la superficie celular involucrando diferentes células y tejidos; entre sus funciones está el mantenimiento de la homeostasis del epitelio intestinal y promover la reparación de la mucosa, en otros tejidos tiene funciones de remodelación tisular y angiogénesis por unión a receptores de integrina [72]. En un estudio sobre exosomas de CDs de MO se identificó la expresión de MFG-E8, encontrando en ensayos de estimulación a LT CD4 que exosomas de CDs deficientes de MFG-E8 son menos eficientes que los exosomas que lo llevan en su membrana [71].

En la caracterización de exosomas también se encuentra involucrada la proteína CD63 que pertenece a la familia de las tetraspaninas, localizada dentro del sistema endosomal y en la superficie celular. En su estructura posee 4 dominios transmembrana hidrofóbicos, con un loop pequeño, uno grande y 2 colas intracelulares amino y carboxilo. La mayoría de las funciones descritas de CD63 tienen lugar en la superficie celular, tales como la endocitosis de proteínas y la motilidad de células tumorales [73]. Diferentes autores han demostrado que la tetraspanina CD63 se expresa en exosomas liberados por LB humanos [74], CDs [75] y plaquetas [76]. Hasta el momento este es uno de los mejores marcadores de exosomas.

### **3.2.3 Cuantificación de acetilcolinesterasa como parámetro para caracterización de exosomas**

Además de las anteriores proteínas descritas en la caracterización de exosomas, otro parámetro utilizado para su caracterización es la determinación de la actividad de la AChE; ésta es una enzima reguladora que controla la transmisión de los impulsos nerviosos a través de la sinapsis colinérgica por hidrólisis del transmisor excitador acetilcolina [77]. *Cantin et al* demostraron que los exosomas son similares a los retrovirus en términos de tamaño, densidad y capacidad de activar células inmunes; por lo que determinó que la AChE es un marcador de exosomas ya que la fracción que contenía AChE incluye exosomas, mientras que la fracción sin AChE contenía solo viriones infectados, confirmando que para obtener una preparación altamente purificada de exosomas es útil determinar la actividad de AChE [78].

### **3.3 Relación entre células estromales mesenquimales y exosomas**

En estudios previos, han identificado que las CEM tienen acciones paracrinas, que pueden ser explicadas por la liberación de vesículas de membrana llamadas exosomas que pueden ser

potenciales reguladores de los procesos inflamatorios e inmunológicos [79]; estos exosomas logran actuar como vehículos para la transferencia de información ya que contienen proteínas y ARN, desempeñando un papel fundamental en la comunicación célula a célula [80].

Sobre estudios de exosomas derivados de CEM se ha reportado en un modelo de ratón con lesión de isquemia de miocardio, que las CEM poseen un efecto cardioprotector a través de partículas de 50 – 100 nm, que pueden ser visualizadas por microscopía electrónica y coinmunoprecipitan con proteínas asociadas a exosomas como CD81, CD9 y Alix, lo que sugiere que estas partículas son exosomas; este efecto representa un cambio en la comprensión de la reparación de tejidos, ya que estos exosomas representarían un vehículo ideal para efectuar una respuesta fisiológica inmediata para reparar lesiones a través de la rápida entrega de proteínas funcionales [9].

*Zhu et al* demostraron que los exosomas derivados de CEM promueven *in vivo* la progresión del tumor de forma similar a las CEM, ya que facilitan la angiogénesis y la proliferación de células tumorales [10]. Otro estudio sugiere que los exosomas de CEM podrían ser un vehículo para la administración de fármacos, debido a que estudios anteriores han sugerido que las CEM producen una gran cantidad de exosomas no inmunogénicos, lo que permitiría la administración intravenosa bien tolerada, facilitando una dosificación más exacta de la carga del fármaco [81].



## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 General**

Aislar y caracterizar exosomas a partir de células estromales mesenquimales aisladas de médula ósea humana.

### **4.2 Específicos**

**4.2.1** Aislar y caracterizar células estromales mesenquimales a partir de médula ósea de donantes voluntarios.

**4.2.2** Aislar y caracterizar exosomas de células estromales mesenquimales mediante la expresión de proteínas de exosomas y su capacidad de flotación en gradiente de sacarosa.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Aislamiento de células estromales mesenquimales de médula ósea humana

Las muestras de MO se recolectaron de pacientes sometidos a proceso quirúrgico de remplazo total de cadera con previa aceptación del consentimiento informado (**ANEXO 1**), que asistían al departamento de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, DC. (Colombia). Durante el procedimiento, se recolectaron muestras de rimado acetabular de fémur y/o aspirado de MO en un tubo estéril con anticoagulante EDTA 0.25%, y posteriormente las muestras se llevaron al laboratorio de Hematología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, donde fueron procesadas.

A partir de la muestra de MO recolectada, se realizó una centrifugación a 800 g durante 20 minutos para obtener el *buffy coat*, seguido de la separación de células mononucleares (CMNs) por gradiente de densidad con Ficoll- Hypaque (Histopaque d=1.077 g/cm<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich®) con una relación de 1:3 y se determinó la viabilidad celular mediante el uso del colorante de exclusión de azul de tripano 0.025%. Las CMNs obtenidas, fueron cultivadas en cajas de T175 cm<sup>2</sup> (160.000 células por cm<sup>2</sup>) con medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco) suplementado con SFB al 10% (Cat. 10-bio-100-B, LGC Biotecnología®), 1% de aminoácidos no esenciales (M7145-MEM 100X, Sigma-Aldrich®), 1% de piruvato de sodio (S8636, Sigma-Aldrich®), 0.5% de penicilina-estreptomicina (N° SV30079.01, Hyclone) y 0.1% de ciprofloxacina (L.CI1011171, Corpaul), y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células no adherentes fueron removidas, realizando cambios de medio al día 3, 6, 9 y 12, se dejaron en cultivo hasta que las células alcanzaron una confluencia de 75% para realizar los correspondientes pases celulares por medio de tripsinización (tripsina 0,25% y EDTA 1mM).

Para aislar exosomas de CEM, fue necesario realizar un escalonamiento celular, para esto se cultivaron aproximadamente entre 9 – 12 cajas de 175 cm<sup>2</sup> cada una con 30 mL de medio de cultivo IMDM. Para realizar la caracterización de la población de CEM y aislamiento de exosomas se tomaron 2 muestras en segundo pase (MO63 – MO68) y 1 muestra en tercer pase (MO70).

### 5.2 Caracterización e Inmunotipificación de células estromales mesenquimales

La caracterización de CEM se realizó según los criterios de la SITC, inicialmente por su adherencia al plástico y morfología fibroblastoide *in vitro* con el microscopio invertido Olympus, seguido del inmunofenotipo para el que se utilizaron CEM cultivadas, para evaluar la expresión de antígenos como CD105 y CD73 en ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos como CD34 y CD45 (Tabla 1: Anticuerpos y fluorocromos utilizados en la caracterización *in vitro* de las CEM) por citometría de flujo.

**TABLA 1: Anticuerpos y fluorocromos utilizados en la caracterización *in vitro* de las CEM.**

<b>ANTICUERPO</b>	<b>CLONA</b>	<b>FLUOROCROMO</b>	<b>REFERENCIA COMERCIAL</b>
CD34 (IgG2a)	AC 136	Alofocianina (APC)	MiltenyBiotec MACS (130-090-954)
CD45 (IgG1)	2 D1	Proteína clorofila peridina (PerCP)	BD Biosciences (347464)
CD105 (IgG1)	SN6	Ficoeritrina (PE)	Invitrogen (MHCD10504)
CD73 (IgG1)	AD 2	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	BD Biosciences (561254)

### **5.3 Diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica de células estromales mesenquimales**

La diferenciación de las células madre mesenquimales en adipoblastos, condroblastos, y/o osteoblastos se realizó en el segundo pase (MO63 – MO68) y tercer pase (MO70).

#### **5.3.1 Diferenciación adipogénica**

La adipogénesis fue inducida cultivando 4.000 CEM en un pozo de 2 cm<sup>2</sup> con un volumen de 1 mL de medio de cultivo STEMPRO® Adipogenesis Differentiation Kit Ref. A1007001 (InvitroGen, 2008) (**ANEXO 2**), se realizaron cambios de medio cada 4 días hasta completar 14 días en diferenciación, la diferenciación fue evaluada mediante la tinción de Sudan negro un colorante liposoluble básico, que se combina con los grupos ácidos del material lipídico de la célula, tiñendo una amplia variedad de lípidos, incluyendo fosfolípidos, grasas neutras y esteroides. Para el procedimiento de la tinción las CEM fueron fijadas con formalina por 30 minutos, luego se realizaron lavados con agua destilada y un lavado con propilenglicol al 100% durante 3 minutos, seguido de una incubación con sudan negro durante 5 minutos, después se realizó un lavado con propilenglicol al 85% por 2 minutos y con agua destilada y luego se realizó una incubación con rojo neutro 1% durante 2 minutos y un lavado con agua destilada, después de este procedimiento se observaron las células en el microscopio invertido identificando las vacuolas lipídicas teñidas de azul dentro de las células.

#### **5.3.2 Diferenciación condrogénica**

La diferenciación condrogénica se realizó cultivando 10.000 CEM en un pozo de 2 cm<sup>2</sup> con un volumen de 1ml de medio de cultivo, STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit Ref. A1007101, (InvitroGen, 2008) (**ANEXO 3**), se realizaron cambios de medio cada 3 días hasta completar 14 días en diferenciación celular, luego se realizó una evaluación de la diferenciación mediante la tinción de Safranina "O" un colorante catiónico que se une a los grupos carboxilo y sulfato de los glucosaminoglicanos, los cuales son estructuras terminales de los proteoglicanos como el agregano un componente esencial del cartílago. Para el procedimiento de la tinción de Safranina "O" las CEM

se fijaron con formalina al 10% durante 5 minutos seguido de tres lavados con *Phosphate Buffered Saline* (PBS1X), se incubaron con safranina "O" al 1% durante 3 minutos y finalmente se realizó tres lavados con PBS1X, se retiró el exceso. Después de este procedimiento se observaron las células al microscopio invertido identificando los proteoglicanos de color rojo intenso.

### **5.3.3 Diferenciación osteogénica**

La diferenciación osteogénica se realizó cultivando 10.000 CEM en un pozo de 2 cm<sup>2</sup> con un volumen de 1 mL de medio de cultivo STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit Ref. A1007201 (InvitroGen, 2008) (**ANEXO 4**), se realizaron cambios de medio cada 4 días hasta completar 21 días en diferenciación celular, luego se realizó una evaluación de la diferenciación mediante la tinción de Von Kossa en la que hay una sustitución del calcio por plata, ya que el nitrato de plata brinda fosfato de plata o carbonato de plata los que se unen a la parte aniónica de las sales de calcio (fosfatos o carbonatos) formando compuestos de color amarillo que en presencia de luz adquieren color negro por reducción de la plata. Para el procedimiento de la tinción de Von Kossa las CEM se incubaron con nitrato de plata al 1% durante 20 minutos en luz ultravioleta seguido de un lavado con agua destilada, luego se realizó una incubación con tiosulfato sódico 5% durante 5 minutos y un lavado con agua destilada y finalmente una incubación con nuclear fast red 0,1% durante 5 minutos y un lavado con agua destilada. Después de este procedimiento se observaron las células en el microscopio invertido identificando los depósitos de calcio de color amarillo.

### **5.4 Aislamiento de exosomas de las células estromales mesenquimales**

El aislamiento de exosomas se realizó a partir de CEM en cultivo, utilizando medio para producción de exosomas que fue previamente depletado de los exosomas presentes en el SFB por centrifugación a 100.000 gravedades durante 15 horas. Las CEM se lavaron tres veces con medio de cultivo IMDM sin SFB y después se les adicionó el medio para producción de exosomas. Luego de 48 horas de cultivo, se recuperaron los sobrenadantes para el aislamiento de exosomas que se realizó a partir de una centrifugación diferencial. Primero se centrifugo a 1.200 gravedades durante 10 minutos para remover las células desprendidas, luego se realizaron centrifugaciones diferenciales de los sobrenadantes a 4.000 gravedades por 20 minutos para eliminar cuerpos apoptóticos y 10.000 gravedades por 40 minutos para eliminar microvesículas. Los sobrenadantes finales se ultracentrifugaron a 100.000 gravedades por 100 minutos (rotor 70Ti, BeckmanCoulter) para obtener pequeñas vesículas que corresponde a exosomas. El precipitado se resuspendió en PBS1X para realizar el lavado por ultracentrifugación a 100.000 gravedades durante 100 minutos. El precipitado final se reconstituyó para realizar cuantificación de proteínas por método de Bradford y caracterización por expresión de marcadores asociados a exosomas y actividad de AchE. También se almacenaron los precipitados de 4000 gravedades y 10.000 gravedades para su caracterización por Western Blot con marcadores de exosomas.

## 5.5 Caracterización de exosomas aislados de las células estromales mesenquimales

### 5.5.1 Cuantificación de proteínas por método de Bradford

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método de Bradford, una técnica que mide el cambio en el espectro visible del colorante azul de Coomassie G-250 (Cat 500-0006, Bio-rad Protein Assay) cuando interacciona con aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas, a través de grupos ionizados. Para la determinación del contenido proteico, se realizó una curva patrón con un stock de albúmina 5% y la dilución de las muestras a cuantificar, finalmente se adicionó el reactivo de Bradford, se incubó durante 5 minutos y se realizó la lectura de absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro (Multiskan FC, Thermo Scientific).

### 5.5.2 Determinación de acetilcolinesterasa

La determinación de la actividad de la AChE se realizó con el kit Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit (A12217), que proporciona un método ultrasensible para monitorear continuamente la actividad de AChE indirectamente, usando 10- acetil 3,7-dihidroxifenoxazina (Reactivo Amplex Red) una sonda fluorogénica para peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El ensayo se basa en la capacidad de la AChE para convertir el sustrato de acetilcolina en colina, que será oxidado por la colina oxidasa a betaína y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual en presencia de *Horseradich Peroxidase* (HRP) reacciona con el reactivo Amplex Red en una estequiometría 1:1 para generar un compuesto final *resorufin*, un producto con alta fluorescencia. El procedimiento se llevó a cabo según el protocolo de la casa comercial (**ANEXO 5**), se utilizaron diluciones seriadas del stock de acetilcolina 100mM para realizar una curva estándar de concentraciones. Las muestras fueron leídas en un fluorómetro (530 excitación – 560 emisión).

### 5.5.3 Evaluación de proteínas asociadas a exosomas

La caracterización de los exosomas aislados se realizó con la técnica de Western Blot para la detección de proteínas CMH-I, Hsc70, MFG-E8 y CD63. Las muestras fueron resuspendidas en buffer Laemmli reductor, 0.1 M de *Dithiothreitol* (DTT), excepto para la identificación de CD63 en las muestras, las cuales se prepararon con buffer Laemmli no reductor (Sin DTT). Se inició la separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (Geles 10%), para el corrido se conectó la cámara a 100 voltios durante 10 minutos y se aumentó a 200 voltios durante aproximadamente una hora.

Después de la electroforesis de proteínas se realizó la transferencia a membranas de polifluoruro de vinilideno a 350 mA durante 2 horas. Una vez terminada la transferencia, las membranas de polifluoruro de vinilideno se bloquearon en agitación constante durante una hora con una solución Tris-HCl (pH 7,5) que contiene leche descremada al 5% y Tween 20 al 0,05% . Luego las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios apropiadamente titulados (Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados en la caracterización de exosomas por Western Blot).

**TABLA 2: Anticuerpos primarios utilizados en la caracterización de exosomas por Western Blot**

ANTICUERPO	CLONA	REFERENCIA COMERCIAL
CMH-I (IgG policlonal de conejo)	H-300	Santa Cruz Biotechnology (SC- 25619)
Hsc70 (IgG2a monoclonal de ratón)	B6	Santa Cruz Biotechnology (SC-7298)
MFG-E8 (IgG policlonal de conejo)	H-60	Santa Cruz Biotechnology (SC-33545)
CD63 (IgG1 monoclonal de ratón)	H5C6	BD Biosciences Pharmingen (556019)

En seguida de la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas de polifluoruro de vinileno se incubaron por 50 minutos con anticuerpos policlonales contra IgG de ratón o conejo conjugados con HRP (Tabla 3: Anticuerpos de cabra policlonales contra IgG). Finalmente, las membranas se revelaron usando el sustrato quimioluminiscente *Supersignal West Dura Extended Duration* (Pierce Biotechnology) y la señal se capturó a través de películas *CL-X Posure* (Pierce Biotechnology, Inc, Rockford, IL). Es importante resaltar que el anticuerpo monoclonal disponible para identificar la proteína CD63 solamente reconoce la forma no reducida de la proteína, produciendo una banda difuminada y alargada verticalmente [53].

**TABLA 3: Anticuerpos de cabra policlonales contra IgG.**

ANTICUERPO	CONJUGADO	REFERENCIA COMERCIAL
Goat Anti- Mouse IgG	<i>Horseradish Peroxidase</i> (HRP)	ThermoScientific (31430)
Goat Anti- RabbitIgG	<i>Horseradish Peroxidase</i> (HRP)	Santa Cruz Biotechnology (SC-2004)

#### 5.5.4 Caracterización de la densidad de exosomas aislados

La flotación de los exosomas secretados por CEM sobre un gradiente de sacarosa, se llevó a cabo resuspendiendo los exosomas en 1 mL de solución 2,5 M de sacarosa en un buffer HEPES 20mM/NaOH, pH 7.2. Luego el gradiente de sacarosa se colocó sobre la suspensión de exosomas en un tubo de ultracentrifuga. La muestra se ultracentrifugó a 100.000g durante 15 horas (Rotor SW41, Beckman Instruments, Inc). Se recolectaron fracciones de 1 mL desde el fondo del tubo; la densidad de cada fracción se determinó usando un refractómetro (ausJENA, Germany). Las fracciones se diluyeron con PBS1X y se ultracentrifugaron a 100.000 gravedades durante 100 minutos a 4°C (Rotor SW41, Beckman Instrument, Inc). Los precipitados se resuspendieron en PBS1X y luego en buffer Laemmli no reductor para análisis de CD63 por Western Blot.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Establecimiento y caracterización de células estromales mesenquimales de médula ósea humana

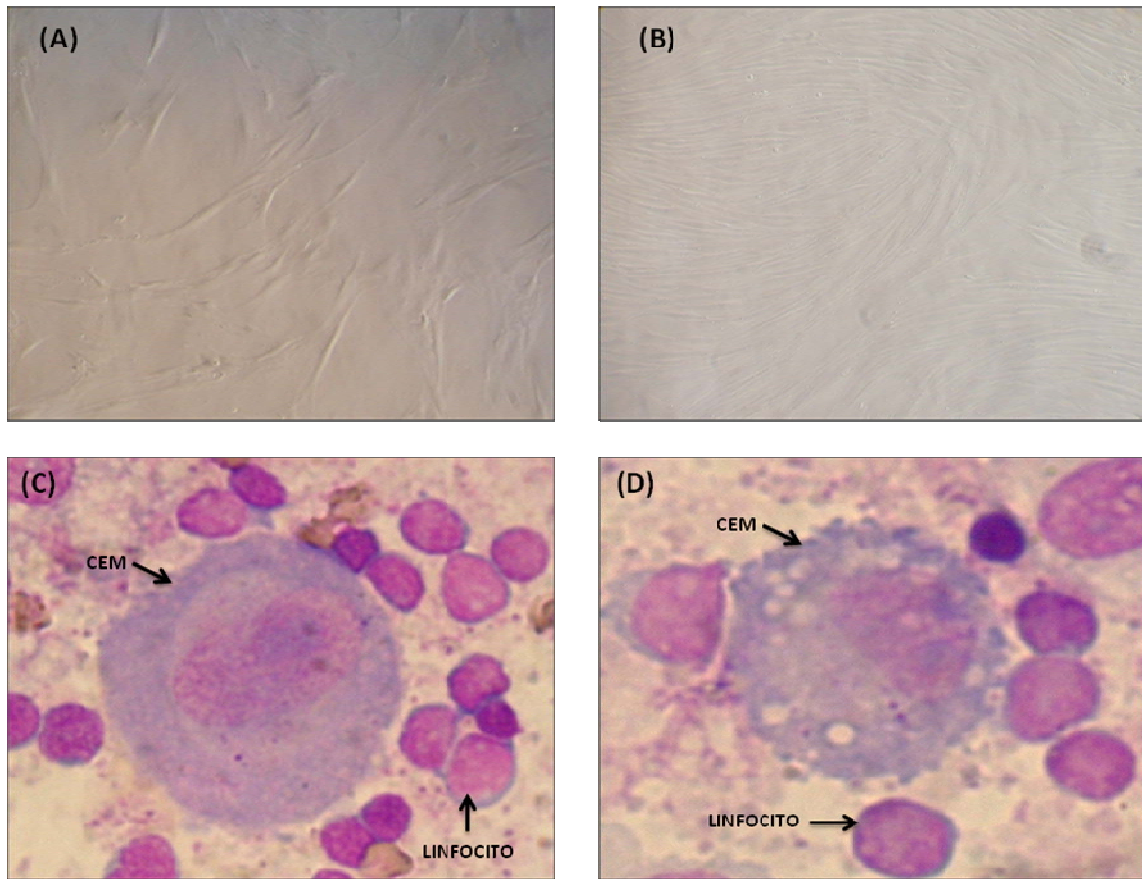
Con la colaboración de los médicos del departamento de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario San Ignacio, en Bogotá DC. (Colombia), se recolectaron 3 muestras de MO humana de donantes voluntarios con edades entre 36 - 53 años; de las muestras recolectadas dos corresponden a donantes de sexo masculino y una de sexo femenino, con un volumen de muestra de recolección promedio de 43 mL que incluyen MO y/o rimado acetabular de fémur. En la tabla 4 se presentan los datos obtenidos de las muestras de MO humana recolectadas.

**TABLA 4. Características de muestras recolectadas de MO para la obtención de CEM.**

MÉDULA	EDAD DE PACIENTE (AÑOS)	SEXO	VOLUMEN TOTAL DE MUESTRA (mL)	RECuento DE CÉLULAS MONONUCLEARES
MO63	53	M	54 mL	$179 \times 10^3/\text{mm}^3$
MO68	38	M	50 mL	$43.200 \times 10^3/\text{mm}^3$
MO70	36	F	25 mL	$45.875 \times 10^3/\text{mm}^3$

#### 6.1.1 Evaluación morfológica de CEM

Se establecieron cultivos primarios de CEM aisladas de MO humana, observando células con morfología fibroblastoide que se caracterizan por tener citoplasma de forma irregular con grandes prolongaciones citoplasmáticas observadas por microscopio invertido Olympus, no se observó la formación de UFC-F. También se encontró por la técnica citológica *Cytospin* que las CEM poseen un núcleo redondo excéntrico, con cromatina parcialmente condensada, el citoplasma es ligeramente basófilo y agranular (Figura 3: Morfología de CEM de MO).



**FIGURA 3. Morfología de CEM de MO.** Se realizó la caracterización de las CEM con morfología fibroblastoide. (A) CEM en cultivo con 30% de confluencia (Objetivo 10x, microscopio invertido Olympus). (B) CEM en cultivo con 80% de confluencia (Objetivo 5x, microscopio invertido Olympus). (C-D) CEM en cultivo (*Cytospin*, Tinción con Wright – Objetivo 100x).

### 6.1.2 Inmunofenotipo de CEM

Además de la caracterización morfológica de las CEM, se estableció el inmunofenotipo de los cultivos. Se observó la expresión positiva para los antígenos CD105 y CD73, en ausencia de los antígenos hematopoyéticos CD34 y CD45 acorde con lo sugerido por la SITC. (Figura 4: Inmunofenotipo de CEM de MO)



### **6.1.3 Diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica de CEM**

La caracterización biológica de las CEM en células de linaje adipogénico, condrogénico y osteogénico, se realizó en segundo pase para MO63 y MO68 y en tercer pase para MO70. La diferenciación adipogénica se evaluó transcurrido 14 días mediante la coloración de vacuolas lipídicas con Sudan Negro, las células presentan el núcleo central rodeado de vacuolas lipídicas teñidas de color azul lo que indica que la coloración Sudan Negro fue positiva. (Figura 5: Diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica)

La diferenciación condrogénica se evaluó luego de 14 días mediante el reconocimiento de proteoglicanos por medio de la tinción de Safranina "O", las células presentaron cambios morfológicos observando células completamente redondas y disminuidas de tamaño, estas se tiñeron de color rojo indicando la producción de matriz extracelular. (Figura 5: Diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica)

La diferenciación osteogénica se evaluó transcurrido 21 días mediante la determinación de depósitos de calcio por medio de la tinción de Von Kossa, donde se observó cambios morfológicos presentando una forma celular estrellada con prolongaciones y de menor tamaño. (Figura 5: Diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica)

El control negativo de las coloraciones se realizó con CEM no diferenciadas (Cultivadas en IMDM + SFB 10%), las coloraciones para las CEM no diferenciadas fueron negativas; ya que las células no presentaron vacuolas lipídicas intracelulares, matriz extracelular, ni depósitos de calcio.

## 6.2 Aislamiento y caracterización de exosomas de CEM

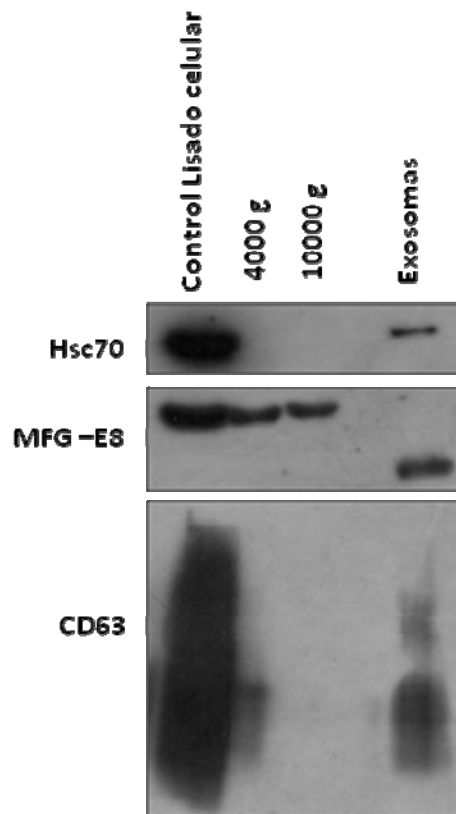
Los exosomas derivados de CEM de MO fueron aislados usando el método de centrifugación diferencial; luego del aislamiento se realizó cuantificación de proteínas, medición de actividad de AChE, y determinación de proteínas asociadas a exosomas.

La cuantificación de proteínas se realizó por método de Bradford obteniendo entre 18,46 y 90  $\mu\text{g}$  de proteína total en un promedio de  $46,7 \times 10^6$  CEM, también se estableció la actividad de AChE que tenían los exosomas aislados de las CEM de MO con un promedio de 14,82 mU de AChE. (Tabla 5: Cuantificación de proteína y niveles de acetilcolinesterasa en exosomas aislados de CEM de MO)

**TABLA 5. Cuantificación de proteína y niveles de acetilcolinesterasa en exosomas aislados de CEM de MO.**

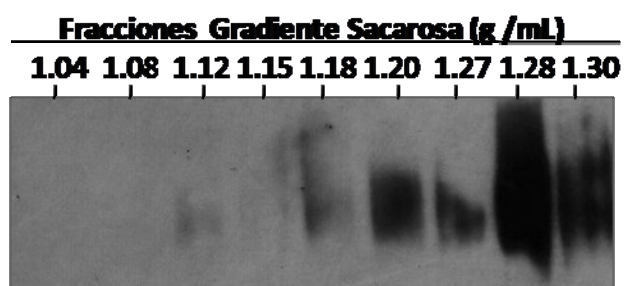
MÉDULA	CEM x $10^6$	PROTEÍNA TOTAL ( $\mu\text{g}$ )	AchE TOTAL (mU de AchE)	PROTEÍNA ( $\mu\text{g}$ )/ $10^6$ CEM	mUAChE/ $10^6$ CEM	mUAChE/PROTEÍNA ( $\mu\text{g}$ )
MO63	47	18,46	21,9	0,392	0,465	1,18
MO68	46.5	90	21,15	1,935	0,454	0,235
MO70	14.4	28	1,41	1,944	0,097	0,050

En el análisis de Western Blot se detecto en los precipitados de 4.000 y 10.000 gravedades la expresión de MFG-E8 y ausencia en las proteínas Hsc70 y CD63. En los exosomas de CEM de MO se detectaron proteínas asociadas a exosomas como Hsc70, MFG-E8 y CD63; expresando altos niveles de CD63 y MFG-E8, aunque en esta se expresa una banda proteica de menor peso molecular. (Figura 6: Análisis por Western Blot de proteínas asociadas a exosomas)



**FIGURA 6. Análisis por Western Blot de proteínas asociadas a exosomas.** Se colectaron los sobrenadantes de CEM 48 horas después de adicionar el medio depletado, para realizar el aislamiento de exosomas por ultracentrifugación diferencial. Las CEM fueron lisadas con buffer de lisis (Triton X-100, 1%) (Control Lisado). Durante las centrifugaciones del aislamiento de exosomas, se colectaron los pellet de 4000 g, 10.000 g y 100.000 g (Exosomas). En las diferentes fracciones se analizó la presencia de Hsc70, MFG-E8 (Lactaderina, mostrando una banda proteica de menor peso molecular en los exosomas), y CD63. Imagen representativa de tres muestras independientes.

Para cumplir con otro de los criterios para caracterizar los exosomas se analizó la flotación de estos sobre un gradiente de sacarosa, donde se encontró que el marcador de exosomas (CD63), se expresó en las fracciones entre 1.12 – 1.30 g/mL. (Figura 7: Flotación en gradiente de sacarosa de exosomas de CEM)



**FIGURA 7: Flotación en gradiente de sacarosa de exosomas de CEM.** Los exosomas de CEM fueron ultracentrifugados sobre un gradiente de sacarosa (2.0 – 0.5 M) a 100.000 g durante 15 horas. Se recuperaron fracciones de 1 mL y se precipitaron por ultracentrifugación. Los precipitados fueron evaluados para CD63 por Western Blot. La densidad de flotación sobre el gradiente de sacarosa de exosomas de CEM se encontró en fracciones de alta densidad (1.12 – 1.30 g/mL). El CD63 es más abundante en la fracción de 1.28 g/mL.

## 7 DISCUSIÓN

Desde la década de los 70 las CEM han sido ampliamente estudiadas, por sus propiedades regenerativas y capacidad de modular la respuesta inmune. Para esto ha sido indispensable su aislamiento y caracterización *in vitro*. Con el fin de facilitar un enfoque más unificado para el estudio de la biología de CEM, la SITC estableció tres criterios para identificar CEM, primero, la adhesión de las células aisladas en cultivo al plástico, segundo, la expresión de marcadores de diferenciación tales como CD105, CD73, y CD90, mayor a 95% en las células del cultivo, con ausencia en la expresión de marcadores como CD34, CD45 CD14 o CD11b, CD19 y CD79A o antígeno leucocitario humano- DR (HLA-DR), mayor a 95% en las células del cultivo, y tercero, la capacidad para diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteocitos [7]. Trabajos de *Harichandan et al* y *Akiyama et al* han demostrado que las CEM de MO son células multipotentes, que son capaces de formar UFC-F; y cumplir con los criterios de identificación de CEM después de la expansión en cultivo [82, 83].

En nuestro estudio, hemos logrado aislar CEM de MO caracterizadas según los criterios de la SITC. Observamos que las células aisladas eran células adherentes con morfología fibroblastoide y su inmunofenotipo correspondía a la expresión de antígenos CD105 y CD73 positivos, en ausencia de antígenos CD34 y CD45, en más del 95% de las células en cultivo. Las CEM se han caracterizado por su capacidad de diferenciación en adipocitos, condrocitos y osteoblastos. Hasta el momento no es claro cuál es la jerarquía de las CEM, sin embargo *Minguell et al* propone que la jerarquía puede estar basada en su potencial de diferenciación multi-potente, tri-potente, bi-potente o uni-potente; indicando que el progenitor multi-potente tiene la capacidad de diferenciación hacia los tres linajes principales (Adipocitos, Condrocitos y Osteoblastos), el estroma de soporte hematopoyético y tenocitos. El progenitor tri-potente con capacidad de diferenciación hacia condrocitos, osteoblastos y tenocitos; el progenitor bi-potente con capacidad de diferenciación en condrocitos y osteoblastos, y el progenitor uni-potente con capacidad de diferenciación hacia un solo linaje [84]. En comparación a nuestros resultados, donde vimos que todas las CEM de las médulas óseas aunque hacen diferenciación a los tres linajes, unas poseen más capacidad de diferenciación adipogénica que otras (MO68). Otros autores describen que la población de CEM no es homogénea, encontrando diferentes subpoblaciones que tienen la capacidad de coexpresar marcadores neuronales, como tubulina  $\beta$ III y el marcador progenitor neuronal nestin, lo que sugiere la existencia de subpoblaciones maduras e inmaduras de CEM [85].

Posterior a la caracterización de las CEM, se realizó un escalonamiento celular para lograr una producción óptima de exosomas, que fueron aislados por ultracentrifugación diferencial. Aunque *Yang et al* menciona que las CEM embrionarias en su morfología redonda tienen un diámetro de 10  $\mu\text{m}$  y en su forma adherente un diámetro de 20  $\mu\text{m}$  [86]. En nuestros resultados de CEM de MO humana evaluadas por la técnica *Cytospin* se observó que las CEM tienen un diámetro superior a tres veces el de un linfocito, que tienen un diámetro aproximado de 12  $\mu\text{m}$ . Debido al diámetro de las CEM fue indispensable realizar el escalonamiento celular, encontrando que la proliferación celular en cajas de T175  $\text{cm}^2$  es máximo de aproximadamente  $4,5 \times 10^6$  células/Caja T175  $\text{cm}^2$ .

Aunque actualmente no se ha logrado definir un sistema para cuantificar exosomas, se han usado otros criterios para identificar y caracterizar los exosomas aislados, estos incluyen microscopía electrónica, expresión de proteínas asociadas a exosomas y flotación en gradiente de sacarosa. En nuestro estudio caracterizamos exosomas por medición de la cantidad de proteína aislada, actividad de acetilcolinesterasa, expresión de proteínas por Western Blot y flotación en gradiente de sacarosa.

La medición de la cantidad total de proteína presente en las preparaciones de exosomas da una idea de la cantidad de exosomas secretados por las células. *Thery et al* indica que usualmente se obtiene 0,5  $\mu\text{g}$  exosomas por cada  $10^6$  CDs inmaduras en 24 horas, cantidad que puede ser variable con algunas líneas celulares [1]. Nuestros resultados indican que en promedio de un cultivo primario de CEM de MO humana se obtienen 1,42  $\mu\text{g}$  exosomas/ $10^6$  CEM. También se identificó que la actividad de AChE en exosomas aislados de CEM no depende de la cantidad de proteínas aislada, por lo tanto es probable que la AChE sea un factor que varíe entre los distintos donantes de MO. En resultados no publicados del grupo de inmunología y biología celular de la Universidad Javeriana con exosomas de células Caco-2 se encontró un promedio de 2,65 mUChE/ $\mu\text{g}$  con un rango de (1,91 – 3,8mUChE/ $\mu\text{g}$ ) (*Barreto et al*, 2012) y en exosomas de CEM un promedio de 1,46 mUChE/ $\mu\text{g}$  con un rango de (0,5 – 1,18 mUChE/ $\mu\text{g}$ ), sugiriendo que los exosomas de células Caco-2 tienen una mayor cantidad de mUChE, respecto a los exosomas de CEM.

Los exosomas se han caracterizado por contener un conjunto de proteínas citosólicas, involucradas en la función y biogénesis de exosomas; proteínas de membrana involucradas en su asociación con otras células; proteínas de exosomas como MFG-E8 que se une a integrinas expresadas en CDs y macrófagos, y otras proteínas como miembros de la familia de las Hsp70 [75]. Además de incluir en sus superficie abundantes moléculas de tetraspaninas como CD9, CD63, CD81 y CD82[16]. En nuestro estudio realizamos un análisis del perfil de proteínas de exosomas de CEM, con la identificación de proteínas como Hsc70, MFG-E8, CD63 y CMH-I.

*Bobrie et al* encontró que en el pellet de 10.000 g usualmente llamado microvesículas, se expresan marcadores usados para caracterizar exosomas como CD9 y MFG-E8. El CD63 estaba presente algunas veces en bajos niveles, mientras que Hsc70, Tsg101 y Alix no fue detectable [87]. En nuestro análisis proteico por Western Blot identificamos la expresión de MFG-E8 en la fracción de microvesículas y exosomas, encontrando en esta última fracción la expresión de una banda de menor peso molecular. También encontramos la expresión de Hsc70 y CD63 en la fracción de exosomas y ausente en microvesículas, lo que nos puede indicar que el CD63 es posiblemente es el mejor marcador para la identificación de exosomas en CEM.

CMH-I es una proteína identificada en muchos exosomas de diferentes tipos celulares, sin embargo en las CEM de nuestro estudio no se observó la expresión del antígeno CMH-I, por lo que se propone que esta disminución podría estar asociada con su papel inmunoregulador [88], aunque es necesario más investigación debido al tamaño de muestra de nuestro estudio.

*Thery et al* define el gradiente de sacarosa como el método para medir la densidad de exosomas, encontrando que estos flotan a un rango de densidad entre 1,15 a 1,19 g/mL [1]; en otro estudio logró identificar que la flotación sobre el gradiente de sacarosa muestra diferentes proporciones de CD63, CD9 y MFG-E8 no solo en la fracción de densidad clásica descrito para exosomas (alrededor de 1,15 g/mL), sino también en fracciones de alta densidad mayores a 1,20 g/mL, indicando la presencia de población de vesículas heterogéneas [87]. Nosotros hemos observado la expresión de CD63 en las fracciones de alta densidad en sacarosa (1,12 – 1,30 g/mL), indicando que los exosomas de CEM pueden tener una mayor densidad que los reportados para otro tipo de células [55].

En resumen, los resultados de nuestro estudio demuestran que las CEM aisladas de MO humana cumplen con los criterios de identificación establecidos por el SITC. Para lograr un aislamiento de exosomas del cultivo primario de CEM, es necesario realizar un escalonamiento celular. Los exosomas de CEM se aíslan por ultracentrifugación diferencial, y de los criterios establecidos por la literatura para caracterizar exosomas, nosotros logramos identificar parámetros como actividad de AChE, expresión de proteínas asociadas a exosomas, como por ejemplo expresión de Hsc70, MFG-E8 con una banda de menor peso molecular y CD63, además de flotación en gradiente de sacarosa lo que nos confirma que el aislamiento de exosomas de CEM fue exitoso.

## 8 CONCLUSIONES

- Las CEM aisladas de MO humana cumplen los tres criterios establecidos por las ISCT.
- El inmunofenotipo de CEM aisladas de MO fue CD105 y CD73 positivas, y CD45 y CD34 negativas.
- Las CEM pueden diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteoblastos en medios de inducción de diferenciación específicos.
- El aislamiento de exosomas de CEM por ultracentrifugación diferencial dependen de la cantidad de células aisladas.
- Los exosomas de CEM de MO expresan proteínas específicas de exosomas como Hsc70, MFG-E8 y CD63.
- Los exosomas de CEM de MO no presentan expresión de la proteína CMH-I.
- Los exosomas de CEM de MO flotan sobre gradiente de sacarosa en fracciones de alta densidad (1,12 – 1,30 g/mL).



## 9 BIBLIOGRAFÍA

1. They, C., et al., *Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids*. Curr Protoc Cell Biol, 2006. **Chapter 3**: p. Unit 3 22.
2. Lai, R.C., T.S. Chen, and S.K. Lim, *Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease*. Regen Med, 2011. **6**(4): p. 481-92.
3. Schneider, A. and M. Simons, *Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders*. Cell Tissue Res, 2012.
4. Parolini, I., et al., *Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(49): p. 34211-22.
5. Segura, E., et al., *CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo*. J Immunol, 2007. **179**(3): p. 1489-96.
6. Bang, C. and T. Thum, *Exosomes: new players in cell-cell communication*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(11): p. 2060-4.
7. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
8. Camassola, M., et al., *Methodology, biology and clinical applications of human mesenchymal stem cells*. Methods Mol Biol, 2012. **879**: p. 491-504.
9. Lai, R.C., et al., *Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury*. Stem Cell Res, 2010. **4**(3): p. 214-22.
10. Zhu, W., et al., *Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo*. Cancer Lett, 2012. **315**(1): p. 28-37.
11. Coelho, M.B., J.M. Cabral, and J.M. Karp, *Intraoperative stem cell therapy*. Annu Rev Biomed Eng, 2012. **14**: p. 325-49.
12. Kuo, T.K., et al., *Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells*. Gastroenterology, 2008. **134**(7): p. 2111-21, 2121 e1-3.
13. Denzer, K., et al., *Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device*. J Cell Sci, 2000. **113** p. 3365-3374.
14. Barreto, A., et al., *Membrane vesicles released by intestinal epithelial cells infected with rotavirus inhibit T-cell function*. Viral Immunol, 2010. **23**(6): p. 595-608.
15. They, C., *Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications*. F1000 Biol Rep, 2011. **3**: p. 15.
16. Chaput, N. and C. They, *Exosomes: immune properties and potential clinical implementations*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(5): p. 419-40.
17. Chen, X., M.A. Armstrong, and G. Li, *Mesenchymal stem cells in immunoregulation*. Immunol Cell Biol, 2006. **84**(5): p. 413-21.
18. Hass, R., et al., *Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC*. Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 12.
19. Wagner, W., et al., *Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood*. Exp Hematol, 2005. **33**(11): p. 1402-16.
20. Sabatini, F., et al., *Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities*. Lab Invest, 2005. **85**(8): p. 962-71.
21. Shi, S., et al., *The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures*. Orthod Craniofac Res, 2005. **8**(3): p. 191-9.

22. Krebsbach, P.H., et al., *Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts*. Transplantation, 1997. **63**(8): p. 1059-69.
23. Wakitani, S., et al., *Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am, 1994. **76**(4): p. 579-92.
24. Awad, H.A., et al., *Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon*. Tissue Eng, 1999. **5**(3): p. 267-77.
25. Krampera, M., et al., *Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair*. Bone, 2006. **39**(4): p. 678-83.
26. Nauta, A.J. and W.E. Fibbe, *Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells*. Blood, 2007. **110**(10): p. 3499-506.
27. Rastegar, F., et al., *Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications*. World J Stem Cells, 2010. **2**(4): p. 67-80.
28. Chan, J.L., et al., *Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4817-24.
29. Uccelli, A., V. Pistoia, and L. Moretta, *Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression?* Trends Immunol, 2007. **28**(5): p. 219-26.
30. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells*. Eur J Immunol, 2006. **36**(10): p. 2566-73.
31. Yi, T. and S.U. Song, *Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications*. Arch Pharm Res, 2012. **35**(2): p. 213-21.
32. Sato, K., et al., *Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells*. Blood, 2007. **109**(1): p. 228-34.
33. Soleymaninejadian, E., K. Pramanik, and E. Samadian, *Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors*. Am J Reprod Immunol, 2012. **67**(1): p. 1-8.
34. Fonsatti, E., et al., *Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels*. Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6557-63.
35. Airas, L., et al., *Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells*. J Cell Biol, 1997. **136**(2): p. 421-31.
36. Vlassov, A.V., et al., *Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(7): p. 940-8.
37. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *Molecular regulation of adipogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 145-71.
38. Farmer, S.R., *Transcriptional control of adipocyte formation*. Cell Metab, 2006. **4**(4): p. 263-73.
39. Rosen, E.D., *The transcriptional basis of adipocyte development*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. **73**(1): p. 31-4.
40. Barry, F.P. and J.M. Murphy, *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p. 568-84.
41. Akiyama, H., *Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9*. Mod Rheumatol, 2008. **18**(3): p. 213-9.
42. Enomoto, H., et al., *Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro*. J Cell Sci, 2004. **117**(3): p. 417-25.
43. Hamade, E., et al., *Chick embryo anchored alkaline phosphatase and mineralization process in vitro*. Eur J Biochem, 2003. **270**(9): p. 2082-90.
44. Xiao, G., et al., *Ascorbic acid-dependent activation of the osteocalcin promoter in MC3T3-E1 preosteoblasts: requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(8): p. 1103-13.

45. Tominaga, H., et al., *Expression of osterix inhibits bone morphogenetic protein-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells*. J Bone Miner Metab, 2009. **27**(1): p. 36-45.
46. Thery, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(8): p. 581-93.
47. Johnstone, R.M., *Revisiting the road to the discovery of exosomes*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **34**(3): p. 214-9.
48. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1161-72.
49. Zitvogel, L., et al., *Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes*. Nat Med, 1998. **4**(5): p. 594-600.
50. Peters, P.J., et al., *Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes*. Eur J Immunol, 1989. **19**(8): p. 1469-75.
51. Wolfers, J., et al., *Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming*. Nat Med, 2001. **7**(3): p. 297-303.
52. Faure, J., et al., *Exosomes are released by cultured cortical neurones*. Mol Cell Neurosci, 2006. **31**(4): p. 642-8.
53. van Niel, G., et al., *Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles*. Gastroenterology, 2001. **121**(2): p. 337-49.
54. Hoorn, E.J., et al., *Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers*. Nephrology (Carlton), 2005. **10**(3): p. 283-90.
55. Caby, M.P., et al., *Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma*. Int Immunol, 2005. **17**(7): p. 879-87.
56. Bard, M.P., et al., *Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(1): p. 114-21.
57. Skriner, K., et al., *Association of citrullinated proteins with synovial exosomes*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(12): p. 3809-14.
58. Fecchi, K., et al., *Human melanoma cells express FGFR/Src/Rho signaling that entails an adhesion-independent caveolin-1 membrane association*. Int J Cancer, 2012. **130**(6): p. 1273-83.
59. Thery, C., et al., *Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1156-62.
60. Clayton, A., et al., *Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2*. Cancer Res, 2007. **67**(15): p. 7458-66.
61. Stoorvogel, W., et al., *The biogenesis and functions of exosomes*. Traffic, 2002. **3**(5): p. 321-30.
62. Bobrie, A., et al., *Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses*. Traffic, 2011. **12**(12): p. 1659-68.
63. Simpson, R.J., S.S. Jensen, and J.W. Lim, *Proteomic profiling of exosomes: current perspectives*. Proteomics, 2008. **8**(19): p. 4083-99.
64. Savina, A., et al., *Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner*. Traffic, 2005. **6**(2): p. 131-43.
65. Hsu, C., et al., *Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C*. J Cell Biol, 2010. **189**(2): p. 223-32.
66. Ostrowski, M., et al., *Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(1): p. 19-30; sup pp 1-13.

67. Andre, F., et al., *Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells.* J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2126-36.
68. Wubbolts, R., et al., *Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation.* J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 10963-72.
69. Liu, T., C.K. Daniels, and S. Cao, *Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential.* Pharmacol Ther, 2012. **136**(3): p. 354-74.
70. Geminard, C., et al., *Characteristics of the interaction between Hsc70 and the transferrin receptor in exosomes released during reticulocyte maturation.* J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 9910-6.
71. Veron, P., et al., *Accumulation of MFG-E8/lactadherin on exosomes from immature dendritic cells.* Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(2): p. 81-8.
72. Bocca, S.M., et al., *Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8): a novel protein in the mammalian endometrium with putative roles in implantation and placentation.* Placenta, 2012. **33**(10): p. 795-802.
73. Pols, M.S. and J. Klumperman, *Trafficking and function of the tetraspanin CD63.* Exp Cell Res, 2009. **315**(9): p. 1584-92.
74. Escola, J.M., et al., *Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes.* J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20121-7.
75. They, C., et al., *Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73.* J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 599-610.
76. Heijnen, H.F., et al., *Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules.* Blood, 1999. **94**(11): p. 3791-9.
77. Rezin, G.T., et al., *Inhibition of acetylcholinesterase activity in brain and behavioral analysis in adult rats after chronic administration of fenproporex.* Metab Brain Dis, 2012. **27**(4): p. 453-8.
78. Cantin, R., et al., *Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants.* J Immunol Methods, 2008. **338**(1-2): p. 21-30.
79. Fleissner, F., et al., *Microvesicles as novel biomarkers and therapeutic targets in transplantation medicine.* Am J Transplant, 2012. **12**(2): p. 289-97.
80. Biancone, L., et al., *Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles.* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(8): p. 3037-42.
81. Lai, R.C., et al., *Exosomes for drug delivery - a novel application for the mesenchymal stem cell.* Biotechnol Adv, 2012.
82. Harichandan, A. and H.J. Buhring, *Prospective isolation of human MSC.* Best Pract Res Clin Haematol, 2011. **24**(1): p. 25-36.
83. Akiyama, K., et al., *Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension.* Stem Cell Res Ther, 2012. **3**(5): p. 40.
84. Minguell, J.J., A. Erices, and P. Conget, *Mesenchymal stem cells.* Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(6): p. 507-20.
85. Foudah, D., et al., *Expression of neural markers by undifferentiated rat mesenchymal stem cells.* J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 820821.

86. Yang, Y., et al., *Embryonic mesenchymal cells share the potential for smooth muscle differentiation: myogenesis is controlled by the cell's shape*. *Development*, 1999. **126**(13): p. 3027-33.
87. Bobrie, A., et al., *Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2012. **1**.
88. Abdi, R., et al., *Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2008. **57**(7): p. 1759-67.

## 10 ANEXOS

### ANEXO 1. Consentimiento informado para la donación voluntaria de médula ósea.



## PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA FACULTAD DE CIENCIAS- LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA GRUPO DE INMUNOBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MEDULA ÓSEA

Hoja 1 de 3

#### INFORMACIÓN GENERAL

En la actualidad usted puede encontrar información sobre células madre en diversos medios de comunicación, sin embargo, es muy importante que este tema sea investigado en detalle. En la médula ósea se pueden encontrar diversos tipos de células madre, entre ellas las denominadas células madre mesenquimales. Las células madre mesenquimales han sido estudiadas especialmente por su propiedad de mejorar los trasplantes de las células madre que forman las células sanguíneas, sin embargo, aún es necesario seguir explorando las funciones de éstas células.

Por este motivo le solicitamos su colaboración para recolectar una muestra de su médula ósea durante el procedimiento quirúrgico que le será practicado por el médico ortopedista. Este procedimiento no comporta ningún riesgo para su salud y la muestra será recolectada por personal especializado.

**CONFIDENCIALIDAD:** Los registros médicos permanecerán archivados, en el Laboratorio de Hematología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de atención clínica tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento.

**Cualquier información adicional usted puede obtenerla de los encuestadores, o directamente con Viviana Rodríguez en el Laboratorio de Hematología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Javeriana al Teléfono 3208320 extensión 4025.**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS- LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA**  
**GRUPO DE INMUNOBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR**

Hoja 2 de 3

**PROCEDIMIENTO:**

Se realizará una entrevista previa (Consentimiento informado) y se procederá a tomar una muestra de médula ósea de aproximadamente 10 mL durante el procedimiento quirúrgico. Estas muestras serán manejadas únicamente por personal involucrado en el equipo de atención clínica y de investigación.

**APROBACIÓN ESCRITA DONACIÓN VOLUNTARIA**

Yo \_\_\_\_\_ identificado(a) con número de cédulas de ciudadanía \_\_\_\_\_ declaro que:

1. Entiendo que la muestra de médula ósea será utilizada con fines de investigación y será manejada bajo las normas éticas pertinentes.
2. Entiendo que la información referente a mi será manejada de forma confidencial para proteger mi identidad.
3. Entiendo que no recibiré ninguna compensación económica ni de ningún otro tipo por la donación.
4. Entiendo que la donación de médula ósea **NO representa ningún peligro** para mí.
5. He leído y comprendido toda la información entregada, estoy satisfecho(a) con la información recibida, he podido formular todas las preguntas que he creído convenientes y me han aclarado todas las dudas planteadas.

En consecuencia, doy mi consentimiento para la donación voluntaria de médula ósea durante el procedimiento quirúrgico que me será practicado por el médico ortopedista:

**Nombre:** \_\_\_\_\_

**c.c. :** \_\_\_\_\_

**Teléfono:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_\_



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS- LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA**  
**GRUPO DE INMUNOBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR**

Hoja 3 de 3

**BENEFICIOS ADICIONALES:**

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudio, pero otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

**Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio.**

**Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla junto con el resultado del estudio, en las situaciones señaladas a continuación:**

- |  | SI                       | NO                       |
|--|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> En estudios complementarios de diagnóstico para mí o algún miembro de mi familia.   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación.         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) Entidad (es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación. | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> En estudios de investigación colaborativos con otras Instituciones Nacionales y/o internacionales, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación.       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |



## ANEXO 2. STEMPro® Adipogenesis Differentiation Kit Ref. A1007001



### STEMPro® Adipogenesis Differentiation Kit

#### Introduction

STEMPro® Adipogenesis Differentiation Kit has been developed for the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) in tissue culture vessels. The kit contains all reagents required for inducing MSCs to be committed to the adipogenesis pathway and generate adipocytes. Using STEMPro® Adipogenesis Differentiation Kit in combination with STEMPro® MSC SFM or MesenPRO RS™ Medium provides a standardized culture workflow solution for MSC isolation, expansion and differentiation into lipid vesicle-forming adipocytes.

Description	Cat. no.	Size	Storage	Shelf Life
STEMPro® Adipogenesis Differentiation Kit	A10070-01	1 kit		—
Contains:				
STEMPro® Adipocyte Differentiation Basal Medium	A10410-01	100 mL	2 to 8°C (protect from light)	12 months
STEMPro® Adipogenesis Supplement	A10065-01	10 mL	-5 to -20°C (in the dark)	12 months

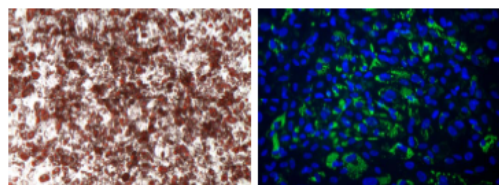
#### Intended Use

For research use only (RUO). **Caution:** Not intended for human or animal diagnostic or therapeutic uses.

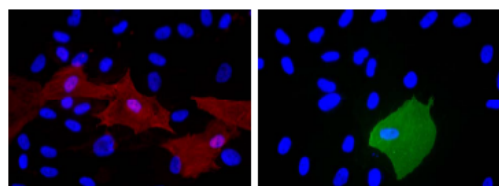
#### Characteristics

The STEMPro® Adipogenesis Differentiation Kit has been extensively tested and proven to have the following characteristics:

- Contains all components required to reliably and reproducibly induce MSCs into the adipogenic lineage.
- Demonstrated to robustly induce adipogenesis in adipose tissue-derived stem cells (STEMPro® Human Adipose-Derived Stem Cell Kit, Cat. nos. R7788-110 and R7788-115).
- Lipid vesicle staining methods demonstrates differentiation of MSCs into adipocytes (Figure 1).
- Immunocytochemistry methods demonstrate expression of relevant adipocyte biomarkers (Figure 2).



**Figure 1:** Analysis of MSCs cultured in STEMPro® Adipogenesis Differentiation Medium demonstrated differentiation into adipogenic lineage by Oil Red O and HCS LipidTOX™ Green neutral lipid staining.



**Figure 2:** Analysis of MSCs cultured in STEMPro® Adipogenesis Differentiation Medium demonstrated differentiation into adipogenic lineages by FABP4 and CD36 immunostaining.

#### Storage and Handling

- STEMPro® Adipogenesis Supplement is supplied frozen. Thaw supplement in a 37±2°C water bath prior to use.
- **It is normal to see a precipitate formed in the supplement after thawing.** The precipitate does not impact performance of the product. See **Media Preparation**, next page, for guidelines for dissolving the precipitate.
- **Do not refreeze the supplement after thawing.** Thawed STEMPro® Adipogenesis Supplement is stable up to at least one month at 2 to 8°C.
- Complete STEMPro® Adipogenesis Differentiation Media is stable up to at least one month at 2 to 8°C.

#### Important Guidelines for Adipogenesis Differentiation

To obtain optimal adipogenic differentiation with STEMPro® Adipogenesis Differentiation Medium, follow these guidelines:

- **Expansion culture:** Primary MSC isolates should be expanded with STEMPro® MSC SFM or MesenPRO RS™ Medium in T-75 or T-150 flasks. Standard growth media of DMEM+10% MSC Qualified FBS has been successfully tested. It is recommended that the cultures are refed every 2 to 3 days and passaged every 5 to 7 days.
- **Passaging:** We strongly recommend using low-passage MSCs (<8 to 10 passages). Continuously passaged MSCs will gradually lose their multipotency with increased passage number (>10 passages).
- **Harvesting:** We recommend using TrypLE™ Express for enzymatically treating and harvesting MSCs. TrypLE™ Express is a recombinant protease that has been demonstrated to be gentle on MSCs. Overexposure to trypsin will lead to reduced MSC viability and expansion.
- **Timing of passaging:** It is critical to not let passaged MSCs become completely confluent as it can reduce multipotency of MSCs. Passaging should take place when cultures reach 60 to 80% confluency, cell viability be at least 90% and growth rate be in mid-logarithmic phase.
- **Seeding density:** For expansion, we recommend a seeding density of  $3 \times 10^3$  to  $5 \times 10^3$  viable cells/cm<sup>2</sup> with MesenPRO RS™ Medium or  $1 \times 10^4$  viable cells/cm<sup>2</sup> with STEMPro® MSC SFM.
- **Confluency:** Expanding MSCs in growth medium for 2 to 4 days (to near or complete confluency) before refeeding with Adipogenesis Differentiation Medium can enhance adipogenesis.

#### Certificate of Analysis

The Certificate of Analysis (CofA) provides quality control information for this product. The CofA is available on our website at [www.invitrogen.com/cofa](http://www.invitrogen.com/cofa), and is searchable by product lot number, which is printed on the box.

### Physical Conditions for Adipogenesis Culture

**Media:** STEMPro<sup>®</sup> Adipogenesis Differentiation Medium

**Cell Line:** Human mesenchymal stem cells

**Incubator:** 36 to 38°C, humidified atmosphere of 4 to 6% CO<sub>2</sub> in air

**Culture Conditions:** Adherent; ensure proper gas exchange and minimize exposure to light

**Recommended Culture Vessels:** 12-well tissue-culture plates, 16-well CultureWell slides, 96-well tissue-culture plates, 75 cm<sup>2</sup> tissue-culture flasks

### Media Preparation

**Complete Adipogenesis Differentiation Medium:** Prepare according to the table below. Thaw supplement in 37±2°C water bath. Store complete medium at 2 to 8°C in the dark.

**It is normal to see a precipitate formed in the supplement after thawing.** To promote dissolution of the precipitate, warm the supplement with swirling for no more than 30 minutes prior to preparing complete media. Any remaining precipitate should be suspended in solution before it is added to STEMPro<sup>®</sup> Adipocyte Differentiation Basal Medium, and will dissolve completely when mixed with the Basal Medium and warmed.

Adipogenesis Differentiation Medium	Conc.	100 mL
STEMPro <sup>®</sup> Adipocyte Differentiation Basal Medium	1X	90 mL
STEMPro <sup>®</sup> Adipogenesis Supplement	1X	10 mL
Gentamicin reagent (10 mg/mL)	5 µg/ml	50 µl

**MSC Growth Medium:** Prepare as below.

MSC Growth Medium	Final Conc.	For 500 mL
DMEM low glucose		445 mL
MSC-qualified FBS	10%	50 mL
GLUTAMAX <sup>™</sup> -I (200 mM)	2 mM	5 mL
Gentamicin (10 mg/mL)	5 µg/mL	250 µl

### Adipogenesis Differentiation

1. Observe cell monolayer from basal cultures expanded in STEMPro<sup>®</sup> MSC SFM, MesenPRO RS<sup>™</sup> medium or standard growth medium (DMEM+10% FBS) to ensure mid-log growth phase confluence (60 to 80%). Aspirate medium and floating cells from culture flask and discard.
2. Add 5 to 10 mL DPBS. Gently rinse cell monolayer.
3. Remove DPBS, add 5 to 7 mL of pre-warmed TrypLE<sup>™</sup> Express to flask and completely coat culture surface. Incubate for 5 to 8 minutes at 36 to 38°C or until cells have fully detached.
4. Gently pipet detached cells into a single cell solution and verify on inverted microscope.
5. Remove cell suspension from flask, transfer into a centrifuge tube, and pellet cells at 100 × g for 5 to 10 minutes.
6. Determine cell viability and total cell density using Trypan Blue Stain and electronic (*i.e.*, Coulter Counter) or manual (*i.e.*, hemocytometer) cell counting method.
7. Resuspend pellet in appropriate volume of pre-warmed MSC Growth Medium (see **Media Preparation**).
8. Seed MSCs into culture vessels at 1 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>. For classical stain differentiation assay, seed into a 12-well plate. For gene expression profile studies, seed into a T-75 flask. For immunocytochemistry studies, seed into a 16-well CultureWell<sup>™</sup> chambered coverglass or 96-well plate.
9. Incubate in MSC Growth Medium at 36 to 38°C in a humidified atmosphere of 4 to 6 % CO<sub>2</sub> for a minimum of 2 hours up to 4 days.
10. Replace media with pre-warmed Adipogenesis Differentiation Medium and continue incubation. MSCs will continue to undergo limited expansion as they differentiate

under adipogenic conditions. Refeed cultures every 3 to 4 days.

11. After specific periods of cultivation, adipogenic cultures can be processed for Oil Red O or LipidTOX<sup>™</sup> staining (beginning at 7 to 14 days; see below for method), gene expression analysis or protein detection.

### HCS LipidTOX<sup>™</sup> Green Neutral Lipid Stain Analysis

1. After 7 days or longer under differentiating condition, remove media from 16-well CultureWell or 96-well tissue culture plate and rinse once with DPBS. Fix cells with 4% formaldehyde solution for 30 minutes.
2. After fixation, rinse wells twice with DPBS, apply 1:100 dilution LipidTOX<sup>™</sup> Green and incubate for 15 to 30 minutes. 1:4000 Hoechst 33342 can be added as a nuclear counterstain.
3. Rinse twice with DPBS, apply SlowFade<sup>®</sup> Gold to the wells, visualize under fluorescent microscope and capture images for qualitative or quantitative analysis.

### Additional Products

Some products are recommended but not supplied in the kit. See below for ordering information.

Product	Size	Cat. no.
STEMPro <sup>®</sup> MSC SFM	500 mL	A10332-01
STEMPro <sup>®</sup> Human Adipose-Derived Stem Cell Kit	1 kit	R7788
STEMPro <sup>®</sup> Osteogenesis Differentiation Kit	1 kit	A10072-01
MesenPRO RS <sup>™</sup> Medium	500 mL	12746
FBS, MSC-Qualified (non-US)	100 mL	12662
GLUTAMAX <sup>™</sup> -I	100 mL	35050
Gentamicin reagent (10 mg/mL)	10 mL	15710
TrypLE <sup>™</sup> Express	100 mL	12604
DPBS without Ca <sup>++</sup> and Mg <sup>++</sup>	500 mL	14190
HCS LipidTOX <sup>™</sup> Green neutral lipid	1 kit	H34475
SlowFade <sup>®</sup> Gold antifade reagent	1 kit	S-2828
CultureWell <sup>™</sup> chambered coverglass	1 pack	C-37005
Trypan Blue Stain	100 mL	15250

### Explanation of Symbols and Warnings

The symbols present on the product label are explained below:



### Purchaser Notification

This product is covered by Limited Use Label Licenses (see our web-site [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com), or the Invitrogen catalog). By the use of this product you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

**Limited Use Label License No. 5: Invitrogen Technology:** The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) not to transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. For products that are subject to multiple limited use label licenses, the most restrictive terms apply. Invitrogen Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of patents owned or controlled by Invitrogen Corporation which cover this product based upon the manufacture, use or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Invitrogen is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact Licensing Department, Invitrogen Corporation, 1500 Faraday Avenue, Carlsbad, California 92008. Phone (760) 603-7200. Fax (760) 602-6500. Email: [outlicensing@invitrogen.com](mailto:outlicensing@invitrogen.com).

GIBCO<sup>®</sup>, STEMPro<sup>®</sup>, and SlowFade<sup>®</sup> are registered trademarks and MesenPRO RS<sup>™</sup>, TrypLE<sup>™</sup>, LipidTOX<sup>™</sup>, and GLUTAMAX<sup>™</sup> are trademarks of Invitrogen Corporation. CultureWell<sup>™</sup> is a trademark of Grace Bio-Labs, Inc.

### Technical Support

Worldwide email: [techsupport@invitrogen.com](mailto:techsupport@invitrogen.com). Toll-free U.S. phone support: 1 800 955 6288. For additional country-specific support, visit our website at [www.invitrogen.com/contacts](http://www.invitrogen.com/contacts).



### ANEXO 3. STEMPro® Chondrogenesis Differentiation Kit Ref. A1007101



### STEMPro® Chondrogenesis Differentiation Kit

#### Introduction

The STEMPro® Chondrogenesis Differentiation Kit has been developed for the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) in tissue-culture vessels. The kit contains all reagents required for inducing MSCs to be committed to the chondrogenesis pathway and generate chondrocytes. Using STEMPro® Chondrogenesis Differentiation Kit in combination with STEMPro® MSC SFM or MesenPRO RS™ Medium provides a standardized culture workflow solution for MSC isolation, expansion, and differentiation into collagen matrix-producing chondrocytes.

Description	Cat. no.	Size	Storage	Shelf Life
STEMPro® Chondrogenesis Differentiation Kit	A10071-01	1 kit		—
Contains: STEMPro® Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium	A10069-01	100 mL	2 to 8°C (protect from light)	12 months
STEMPro® Chondrogenesis Supplement	A10064-01	10 mL	-5 to -20°C (in the dark)	12 months

#### Caution

Human origin materials are non-reactive (donor level) for anti-HIV 1 & 2, anti-HCV, and HBsAG. Handle in accordance with established bio-safety practices.

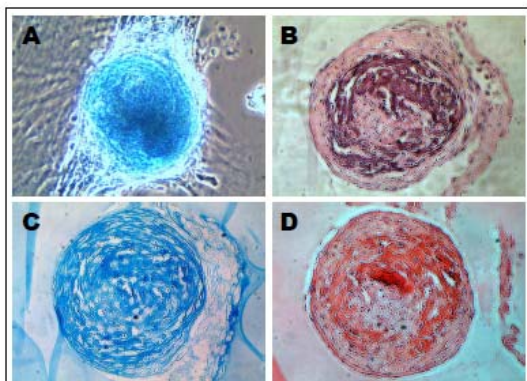
#### Intended Use

For research use only (RUO). **Caution:** Not intended for human or animal diagnostic or therapeutic uses.

#### Characteristics

The STEMPro® Chondrogenesis Differentiation Kit has been extensively tested and proven to have the following characteristics:

- Contains all components required to reliably and reproducibly induce MSCs into the chondrogenic lineage.
- Demonstrated to robustly induce chondrogenesis in adipose tissue-derived stem cells (STEMPro® Human Adipose-Derived Stem Cell Kit, Cat. no. R7788-110 and R7788-115).
- Classical staining methods demonstrate differentiation of MSCs into chondrocytes (Figure 1).



**Figure 1:** Analysis of MSCs cultured in STEMPro® Chondrogenesis Differentiation Medium demonstrated differentiation into chondrogenic lineage by A) Alcian Blue staining of developing chondrogenic pellet, B) hematoxylin staining of cross-section of day 20 chondrogenic pellet, C) Alcian Blue staining of cross-section of same day 20 chondrogenic pellet, and D) Safranin O staining of cross-section of same day 20 chondrogenic pellet.

#### Storage and Handling

- STEMPro® Chondrogenesis Supplement is supplied frozen. Thaw prior to use, as described in **Media Preparation**, next page.
- Thawed STEMPro® Chondrogenesis Supplement is stable up to at least one month at 2 to 8°C. Supplement can be refrozen in desired volumes and stored at -5°C to -20°C. **Avoid multiple freeze thaw cycles** of supplement.
- Store prepared Complete STEMPro® Chondrogenesis Differentiation Medium at 2 to 8°C in the dark. Complete medium is stable up to at least one month at 2 to 8°C.

**Important Guidelines for Chondrogenesis Differentiation**  
To obtain optimal chondrogenic differentiation with STEMPro® Chondrogenesis Differentiation Medium, follow these guidelines:

- **Expansion culture:** Primary MSC isolates should be expanded with STEMPro® MSC SFM or MesenPRO RS™ Medium in T-75 or T-225 flasks. Standard growth media of DMEM+10% MSC Qualified FBS has been successfully tested. We recommend refeeding the cultures every 2 to 3 days and passaging every 5 to 7 days.
- **Passaging:** We strongly recommend using low-passage MSCs (<8 to 10 passages). Continuously passaged MSCs will gradually lose their multipotency with increased passage number (>10 passages).
- **Harvesting:** We recommend using TrypLE™ Express for enzymatically treating and harvesting MSCs. TrypLE™ Express is a recombinant protease that has been demonstrated to be gentle on MSCs. Overexposure to trypsin will lead to reduced MSC viability and expansion.
- **Timing of passaging:** It is critical to not let passaged MSCs become completely confluent, as it can reduce multipotency of MSCs. Passage cultures when they reach 60 to 80% confluency, cell viability is at least 90%, and the growth rate is in mid-logarithmic phase.
- **Seeding density:** For expansion, we recommend a seeding density of  $3 \times 10^3$  to  $5 \times 10^3$  viable cells/cm<sup>2</sup> with MesenPRO RS™ Medium or  $1 \times 10^4$  viable cells/cm<sup>2</sup> with STEMPro® MSC SFM.
- **Micromass culture:** We recommend preparing a cell solution of  $1.6 \times 10^7$  viable cells/ml and letting cells attach to culture surface under humidified conditions for 2 hours before adding Chondrogenesis Differentiation Media.

#### Certificate of Analysis

The Certificate of Analysis (CofA) provides quality control information for this product. The CofA is available on our website at [www.invitrogen.com/support](http://www.invitrogen.com/support), and is searchable by product lot number, which is printed on the box label.

### Physical Conditions for Chondrogenesis Culture

**Media:** STEMPro® Chondrogenesis Differentiation Medium

**Cell Line:** Human mesenchymal stem cells

**Incubator:** 36 to 38°C, humidified atmosphere of 4 to 6 % CO<sub>2</sub> in air

**Culture Conditions:** Adherent; ensure proper gas exchange and minimize exposure to light

**Recommended Culture Vessels:** 12-well tissue-culture plates, 24-well tissue-culture plates, or 100-cm<sup>2</sup> tissue-culture plates

### Media Preparation

**Complete Chondrogenesis Differentiation Medium:** Thaw supplement at 4°C, room temperature, or in a 37°C water bath, and prepare as below. Store complete medium at 2 to 8°C in the dark.

Chondrogenesis Differentiation Medium	Final Conc.	For 100 mL
STEMPro® Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium	1X	90 mL
STEMPro® Chondrogenesis Supplement	1X	10 mL
Gentamicin (10 mg/mL)	5 µg/mL	50 µl

**MSC Attachment Medium:** Prepare as below.

MSC Attachment Medium	Final Conc.	For 100 mL
DMEM low glucose		89 mL
MSC-qualified FBS	10%	10 mL
GLUTAMAX™-I (200 mM)	2 mM	1 mL
Gentamicin (10 mg/mL)	5 µg/mL	50 µl

### Chondrogenesis Differentiation

1. Observe cell monolayer from basal cultures expanded in STEMPro® MSC SFM, MesenPRO™ RS medium, or standard growth medium (DMEM+10% FBS) to ensure mid-log growth-phase confluence (60 to 80%). Aspirate medium and floating cells from culture flask and discard.
2. Add 5 to 10 mL DPBS. Gently rinse cell monolayer.
3. Remove DPBS, add 5 to 7 mL of pre-warmed TrypLE™ Express to flask, and completely coat the culture surface. Incubate for 5 to 8 minutes at 36 to 38°C or until cells have fully detached.
4. Gently pipet detached cells into a single cell solution and verify on inverted microscope.
5. Remove cell suspension from flask, transfer into a centrifuge tube, and pellet cells at 100 × g for 5 to 10 minutes.
6. Determine cell viability and total cell density using Trypan Blue Stain and electronic (*i.e.*, Coulter Counter) or manual (*i.e.*, hemocytometer) cell counting method.
7. For MesenPRO™ RS expansion cultures, resuspend pellet in an appropriate volume of pre-warmed MesenPRO™ RS media to generate a cell solution of 1.6 × 10<sup>7</sup> viable cells/ml. For STEMPro® MSC SFM or standard growth medium, use MSC Attachment Medium (see **Media Preparation**) to generate a cell solution of 1.6 × 10<sup>7</sup> viable cells/ml.
8. Generate micromass cultures by seeding 5-µl droplets of cell solution in the center of multi-well plate wells for classical stain or 100-mm Petri dish for gene expression analysis, protein detection, or immunohistochemistry.
9. After cultivating micromass cultures for 2 hours under high humidity conditions, add warmed chondrogenesis media to culture vessels and incubate in 37°C incubator with 5% CO<sub>2</sub>.
10. Refeed cultures every 2 to 3 days.
11. After specific periods of cultivation, chondrogenic pellets can be processed for Alcian Blue or Safranin O staining (>14 days), gene expression analysis, protein detection, or immunohistochemistry.

### Alcian Blue Stain Analysis

1. After 14 days or longer under differentiating conditions, remove media from culture vessel, rinse once with DPBS, and fix cells with 4% formaldehyde solution for 30 minutes.
2. After fixation, rinse wells with DPBS and stain cells with 1% Alcian Blue solution prepared in 0.1 N HCL for 30 minutes.
3. Rinse wells three times with 0.1 N HCL, add distilled water to neutralize the acidity, visualize under light microscope, and capture images for analysis. Blue staining indicates synthesis of proteoglycans by chondrocytes.

### Additional Products

Some products are recommended but not supplied in the kit. See below for ordering information.

Product	Size	Cat. no.
STEMPro® MSC SFM	1 kit	A10332-01
STEMPro® Human Adipose-Derived Stem Cell Kit	1 kit	R7788
MesenPRO RS™ Kit	1 kit	12746-012
DMEM low glucose	500 mL	11054
FBS, MSC-Qualified (non-US)	100 mL	12662
GLUTAMAX™-I	100 mL	35050
CELLstart™	2 ml	A10142-01
Gentamicin (10 mg/mL)	10 mL	15710
TrypLE™ Express	100 mL	12604
DPBS without Ca <sup>++</sup> and Mg <sup>++</sup>	500 mL	14190
Collagenase Type II	1 g	17101
Trypan Blue Stain	100 mL	15250
Mouse anti-Aggregan	0.5 mg	AHP0012
Mouse anti-Aggregan	0.5 mL	AHP0022
Mouse anti-CD29	100 µg	AHS2902
Mouse anti-Osteonectin/SPARC	100 µg	33-5500
STEMPro® Adipogenesis Differentiation Kit	1 kit	A10070-01
STEMPro® Osteogenesis Differentiation Kit	1 kit	A10072-01

### Explanation of Symbols and Warnings

The symbols present on the product label are explained below:



### Purchaser Notification

This product is covered by the following Limited Use Label Licenses. By the use of this product you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

**Limited Use Label License No. 5: Invitrogen Technology:** The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product, (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) not to transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. For products that are subject to multiple limited use label licenses, the most restrictive terms apply. Invitrogen Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of patents owned or controlled by Invitrogen Corporation which cover this product based upon the manufacture, use or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Invitrogen is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact Licensing Department, Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California 92008. Phone (760) 603-7200. Fax (760) 602-6500. Email: [outlicensing@invitrogen.com](mailto:outlicensing@invitrogen.com). GIBCO® and STEMPro® are registered trademarks and MesenPRO RS™, TrypLE™, GLUTAMAX™, and CELLstart™ are trademarks of Invitrogen Corporation.

### Technical Support

Worldwide email: [techsupport@invitrogen.com](mailto:techsupport@invitrogen.com). Toll-free U.S. phone support: 1 800 955 6288. For additional country-specific support, visit our website at [www.invitrogen.com/contacts](http://www.invitrogen.com/contacts).



## ANEXO 4. STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit Ref. A1007201



### STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit

#### Introduction

The STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit has been developed for the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) in tissue-culture vessels. The kit contains all reagents required for inducing MSCs to be committed to the osteogenesis pathway and generate osteocytes. Using STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit in combination with STEMPRO® MSC SFM or MesenPRO RS™ Medium provides a standardized culture workflow solution for MSC isolation, expansion, and differentiation into matrix-forming osteocytes.

Description	Cat. no.	Size	Storage	Shelf Life
STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit	A10072-01	1 kit		—
Contains:				
STEMPRO® Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium	A10069-01	100 mL	2 to 8°C (protect from light)	12 months
STEMPRO® Osteogenesis Supplement	A10066-01	10 mL	-5 to -20°C (in the dark)	12 months

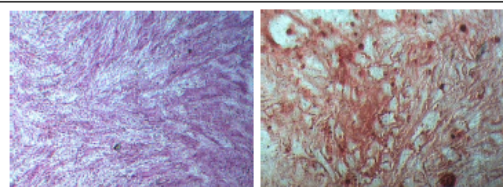
#### Intended Use

For research use only (RUO). **Caution:** Not intended for human or animal diagnostic or therapeutic uses.

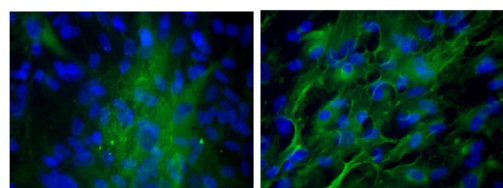
#### Characteristics

The STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit has been extensively tested and proven to have the following characteristics:

- Contains all components required to reliably and reproducibly induce MSCs into the osteogenic lineage.
- Demonstrated to robustly induce osteogenesis in adipose tissue-derived stem cells (STEMPRO® Human Adipose-Derived Stem Cell Kit, Cat. nos. R7788-110 and R7788-115).
- Classical staining methods demonstrate differentiation of MSCs into osteoblasts and osteocytes (Figure 1).
- Immunocytochemistry methods demonstrate expression of relevant osteocyte biomarkers (Figure 2).



**Figure 1:** Analysis of MSCs cultured in STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Medium demonstrated differentiation into osteogenic lineages by alkaline phosphatase staining and Alizarin Red S staining.



**Figure 2:** Analysis of MSCs cultured in STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Medium demonstrated differentiation into osteogenic lineages by bone sialoprotein and osteopontin immunostaining.

#### Storage and Handling

- STEMPRO® Osteogenesis Supplement is supplied frozen. Thaw prior to use, as described in **Media Preparation**, next page.
- Thawed STEMPRO® Osteogenesis Supplement is stable up to at least one month at 2 to 8°C. Supplement can be refrozen in desired volumes and stored at -5°C to -20°C. **Avoid multiple freeze thaw cycles** of supplement.
- Store prepared Complete STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Medium at 2 to 8°C in the dark. Complete medium is stable up to at least one month at 2 to 8°C.

#### Important Guidelines for Osteogenesis Differentiation

To obtain optimal osteogenic differentiation with STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Medium, follow these guidelines:

- **Expansion culture:** Primary MSC isolates should be expanded with STEMPRO® MSC SFM or MesenPRO RS™ Medium in T-75 or T-225 flasks. Standard growth media of DMEM+10% MSC Qualified FBS has been successfully tested. We recommend refeeding the cultures every 2 to 3 days and passaging every 5 to 7 days.
- **Passaging:** We strongly recommend using low-passage MSCs (<8 to 10 passages). Continuously passaged MSCs will gradually lose their multipotency with increased passage number (>10 passages).
- **Harvesting:** We recommend using TrypLE™ Express for enzymatically treating and harvesting MSCs. TrypLE™ Express is a recombinant protease that has been demonstrated to be gentle on MSCs. Overexposure to trypsin will lead to reduced MSC viability and expansion.
- **Timing of passaging:** It is critical to not let passaged MSCs become completely confluent, as it can reduce multipotency of MSCs. Passage cultures when they reach 60 to 80% confluency, cell viability is at least 90%, and the growth rate is in mid-logarithmic phase.
- **Seeding density:** For expansion, we recommend a seeding density of  $3 \times 10^3$  to  $5 \times 10^3$  viable cells/cm<sup>2</sup> with MesenPRO RS™ Medium or  $1 \times 10^4$  viable cells/cm<sup>2</sup> with STEMPRO® MSC SFM.
- **Confluency:** Expanding MSCs in growth medium for 2 to 4 days before refeeding with Complete Osteogenesis Differentiation Medium can enhance osteogenesis.

#### Certificate of Analysis

The Certificate of Analysis (CofA) provides quality control information for this product. The CofA is available on our website at [www.invitrogen.com/cofa](http://www.invitrogen.com/cofa), and is searchable by product lot number, which is printed on the box.

### Physical Conditions for Osteogenesis Culture

**Media:** STEMPro<sup>®</sup> Osteogenesis Differentiation Medium

**Cell Line:** Human mesenchymal stem cells

**Incubator:** 36 to 38°C, humidified atmosphere of 4 to 6 % CO<sub>2</sub> in air

**Culture Conditions:** Adherent; ensure proper gas exchange and minimize exposure to light

**Recommended Culture Vessels:** 12-well tissue-culture plates, 16-well CultureWell<sup>™</sup> slides, 96-well tissue-culture plates, or 75-cm<sup>2</sup> tissue-culture flasks

### Media Preparation

**Complete Osteogenesis Differentiation Medium:** Thaw supplement at 4°C, room temperature, or in a 37°C water bath, and prepare as below. Store complete medium at 2 to 8°C in the dark.

Osteogenesis Differentiation Medium	Final Conc.	For 100 mL
STEMPro <sup>®</sup> Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium	1X	90 mL
STEMPro <sup>®</sup> Osteogenesis Supplement	1X	10 mL
Gentamicin (10 mg/mL)	5 µg/mL	50 µl

**MSC Growth Medium:** Prepare as below.

MSC Growth Medium	Final Conc.	For 500 mL
DMEM low glucose		445 mL
MSC-qualified FBS	10%	50 mL
GLUTAMAX <sup>™</sup> -I (200 mM)	2 mM	5 mL
Gentamicin (10 mg/mL)	5 µg/mL	250 µl

### Osteogenesis Differentiation

1. Observe cell monolayer from basal cultures expanded in STEMPro<sup>®</sup> MSC SFM, MesenPRO<sup>™</sup> RS medium, or standard growth medium (DMEM+10% FBS) to ensure mid-log growth phase confluence (60 to 80%). Aspirate medium and floating cells from culture flask and discard.
2. Add 5 to 10 mL DPBS. Gently rinse cell monolayer.
3. Remove DPBS, add 5 to 7 mL of pre-warmed TrypLE<sup>™</sup> Express to flask and completely coat culture surface. Incubate for 5 to 8 minutes at 36 to 38°C or until cells have fully detached.
4. Gently pipet detached cells into a single cell solution and verify on inverted microscope.
5. Remove cell suspension from flask, transfer into a centrifuge tube, and pellet cells at 100 × g for 5 to 10 minutes.
6. Determine cell viability and total cell density using Trypan Blue Stain and electronic (*i.e.*, Coulter Counter) or manual (*i.e.*, hemocytometer) cell counting method.
7. Resuspend pellet in an appropriate volume of pre-warmed MSC Growth Medium (see **Media Preparation**).
8. Seed MSCs into culture vessels at 5 × 10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>. For classical stain differentiation assays, seed into a 12-well plate. For gene expression profile studies, seed into a T-75 flask. For immunocytochemistry studies, seed into a 16-well CultureWell<sup>™</sup> chambered coverglass or 96-well plate.
9. Incubate in MSC Growth Medium at 36 to 38°C in a humidified atmosphere of 4 to 6% CO<sub>2</sub> for a minimum of 2 hours up to 4 days.
10. Replace media with pre-warmed Complete Osteogenesis Differentiation Medium and continue incubation. MSCs will continue to expand as they differentiate under osteogenic conditions. Refeed cultures every 3 to 4 days.
11. After specific periods of cultivation, osteogenic cultures can be processed for alkaline phosphatase staining (7 to

14 days) or Alizarin Red S staining (>21 days; see below for method), gene expression analysis, or protein detection.

### Alizarin Red S Stain Analysis

1. After 21 days or longer under differentiating condition, remove media from 12-well plate and rinse once with DPBS. Fix cells with 4% formaldehyde solution for 30 minutes.
2. After fixation, rinse wells twice with distilled water and stain cells with 2% Alizarin Red S solution (pH 4.2) for 2 to 3 minutes.
3. Rinse wells three times with distilled water, visualize under light microscope and capture images for qualitative or quantitative analysis.

### Additional Products

Some products are recommended but not supplied in the kit. See below for ordering information.

Product	Size	Cat. no.
STEMPro <sup>®</sup> MSC SFM	500 mL	A10332-01
STEMPro <sup>®</sup> Human Adipose-Derived Stem Cell Kit	1 kit	R7788
STEMPro <sup>®</sup> Adipogenesis Differentiation Kit	1 kit	A10070-01
MesenPRO RS <sup>™</sup> Medium	500 mL	12746
FBS, MSC-Qualified (non-US)	100 mL	12662
GLUTAMAX <sup>™</sup> -I	100 mL	35050
Gentamicin (10 mg/mL)	10 mL	15710
TrypLE <sup>™</sup> Express	100 mL	12604
DPBS without Ca <sup>++</sup> and Mg <sup>++</sup>	500 mL	14190
Mouse anti-Osteocalcin	100 µg	33-5700
Rabbit anti-Osteopontin	100 µg	42-7701
CultureWell <sup>™</sup> chambered coverglass	1 pack	C-37005
Trypan Blue Stain	100 mL	15250

### Explanation of Symbols and Warnings

The symbols present on the product label are explained below:



### Purchaser Notification

This product is covered by Limited Use Label Licenses (see our web-site [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com), or the Invitrogen catalog). By the use of this product you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

**Limited Use Label License No. 5: Invitrogen Technology:** The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product, (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) not to transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. For products that are subject to multiple limited use label licenses, the most restrictive terms apply. Invitrogen Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of patents owned or controlled by Invitrogen Corporation which cover this product based upon the manufacture, use or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Invitrogen is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact Licensing Department, Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California 92008. Phone (760) 603-7200. Fax (760) 602-6500. Email: [quiltensing@invitrogen.com](mailto:quiltensing@invitrogen.com).

GIBCO<sup>®</sup> and StemPro<sup>®</sup> are registered trademarks and MesenPRO<sup>™</sup>, TrypLE<sup>™</sup>, and GLUTAMAX<sup>™</sup> are trademarks of Invitrogen Corporation. CultureWell<sup>™</sup> is a trademark of Grace Bio-Labs, Inc.

### Technical Support

Worldwide email: [techsupport@invitrogen.com](mailto:techsupport@invitrogen.com). Toll-free U.S. phone support: 1 800 955 6288. For additional country-specific support, visit our website at [www.invitrogen.com/contacts](http://www.invitrogen.com/contacts).

## ANEXO 5. Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit (A12217)



Product Information

Revised: 01–October–2004

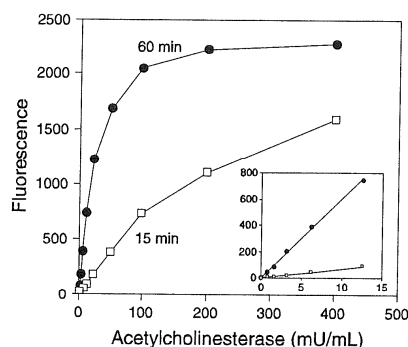
# Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit (A12217)

### Quick Facts

#### Storage upon receipt:

- -20°C
- Desiccate
- Protect from light

**Abs/Em of reaction product:** 571/585 nm



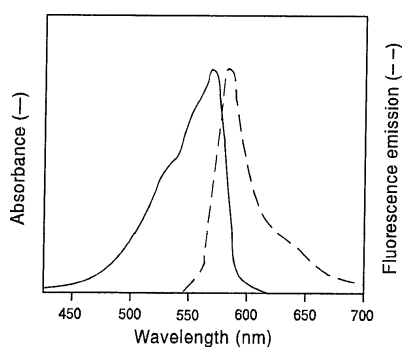
### Introduction

The Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit provides an ultrasensitive method for continuously monitoring acetylcholinesterase (AChE) activity or for detecting acetylcholine (ACh) in a fluorescence microplate reader or fluorometer. Potential uses for this kit include screening for AChE inhibitors and measuring the release of ACh from synaptosomes. In the assay, AChE activity is monitored indirectly using 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red reagent), a sensitive fluorogenic probe for  $H_2O_2$ .<sup>1</sup> First, AChE converts the acetylcholine substrate to choline. Choline is in turn oxidized by choline oxidase to betaine and  $H_2O_2$ , the latter of which, in the presence of horseradish peroxidase, reacts with Amplex Red reagent in a 1:1 stoichiometry to generate the highly fluorescent product resorufin.<sup>1,2</sup> Because resorufin has absorption and fluorescence emission maxima of approximately 571 nm and 585 nm, respectively (Figure 1), there is little interference from autofluorescence in most biological samples.

Experiments with purified AChE from electric eel indicate that the Amplex Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay

**Figure 2.** Detection of electric eel acetylcholinesterase activity using the Amplex Red reagent-based assay. Each reaction contained 50  $\mu$ M acetylcholine, 200  $\mu$ M Amplex Red reagent, 1 U/mL HRP, 0.1 U/mL choline oxidase and the indicated amount of acetylcholinesterase in 1X Reaction Buffer. Reactions were incubated at room temperature. After 15 and 60 minutes, fluorescence was measured in a fluorescence microplate reader using excitation at  $560 \pm 10$  nm and fluorescence detection at  $590 \pm 10$  nm.

Kit can detect AChE levels as low as 0.002 U/mL using a reaction time of one hour (Figure 2). By providing an excess of AChE in the assay, the kit can also be used to detect acetylcholine levels as low as 0.3  $\mu$ M, with a range of detection from 0.3  $\mu$ M to 100  $\mu$ M acetylcholine (Figure 3).



**Figure 1.** Normalized absorption and fluorescence emission spectra of resorufin, the product of the Amplex Red reagent.

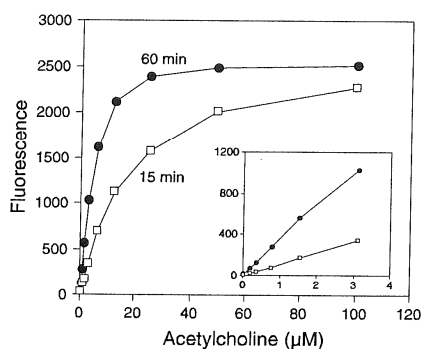
### Materials

#### Kit Contents

- **Amplex Red reagent** (MW = 257, Component A), five vials, each containing 1 mg
- **Dimethylsulfoxide (DMSO)**, anhydrous (Component B), 1.3 mL
- **Horseradish peroxidase** (Component C), 200 U, where 1 unit is defined as the amount of enzyme that will form 1.0 mg purpurogallin from pyrogallol in 20 seconds at pH 6.0 at 20°C
- **Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )** (Component D), 500  $\mu$ L of a stabilized ~3% solution; the actual concentration is indicated on the component label
- **5X Reaction Buffer** (Component E), 28 mL of 250 mM Tris-HCl, pH 8.0
- **Choline oxidase from *Alcaligenes* sp.** (Component F), 12 U, where 1 unit is defined as the amount of choline oxidase that will form 1.0  $\mu$ mole of  $H_2O_2$  due to oxidation of 1  $\mu$ mole of choline to betaine aldehyde per minute at pH 8.0 at 37°C

MP 12217

Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit



**Figure 3.** Detection of acetylcholine using the Amplex Red reagent-based assay. Each reaction contained 200 μM Amplex Red reagent, 1 U/mL HRP, 0.1 U/mL choline oxidase, 0.5 U/mL acetylcholinesterase and the indicated amount of acetylcholine in 1X Reaction Buffer. Reactions were incubated at room temperature. After 15 and 60 minutes, fluorescence was measured with a fluorescence microplate reader using excitation at 560 ± 10 nm and fluorescence detection at 590 ± 10 nm.

- **Acetylcholine chloride** (MW = 181.7, Component G), ~100 mg
- **Acetylcholinesterase from electric eel** (Component H), 60 U, where one unit is defined as the amount of enzyme that will hydrolyze 1.0 μmole of acetylcholine to choline and acetate per minute at pH 8.0 at 37°C

Each kit provides sufficient reagents for approximately 500 assays using a fluorescence microplate reader and reaction volumes of 200 μL per assay.

#### Storage and Handling

Upon receipt, the kit should be stored frozen at -20°C, protected from light. Stored properly, the kit components should remain stable for at least six months. Allow reagents to warm to room temperature before opening vials. The Amplex Red reagent is somewhat air sensitive. Once a vial of Amplex Red reagent is opened, the reagent should be used promptly. PROTECT THE AMPLEX RED REAGENT FROM LIGHT.

#### Experimental Protocol

The following procedure is designed for use with a fluorescence multiwell plate scanner. For use with a standard fluorometer, volumes must be increased accordingly. Please note that the product of the Amplex Red reaction is unstable in the presence of thiols such as dithiothreitol (DTT) or 2-mercaptoethanol. For this reason, the final DTT or 2-mercaptoethanol concentration in the reaction should be less than 10 μM.

The absorption and fluorescence of resorufin are pH-dependent. Below the pK<sub>a</sub> (~6.0), the absorption maximum shifts to ~480 nm and the fluorescence quantum yield is markedly lower. In addition, the Amplex Red reagent is unstable at high pH (>8.5). For these reasons, the reaction should be performed at pH 7–8, for example by using the provided reaction buffer (pH 8).

#### Stock Solution Preparation

**1.1** Prepare an ~20 mM stock solution of the Amplex Red reagent: Allow one vial of the Amplex Red reagent (Component A) and DMSO (Component B) to warm to room temperature. Just prior to use, dissolve the contents of the vial of Amplex Red reagent (1 mg) in 200 μL DMSO. Each vial of Amplex Red reagent is sufficient for approximately 100 assays of 200 μL each. This stock solution should be stored frozen at -20°C, protected from light.

**1.2** Prepare a 1X working solution of Reaction Buffer by adding 5 mL of 5X Reaction Buffer stock solution (Component E) to 20 mL of deionized water (dH<sub>2</sub>O). This 25 mL volume of 1X Reaction Buffer is sufficient for approximately 100 assays of 200 μL each, with a 5 mL excess for making stock solutions and dilutions.

**1.3** Prepare a 200 U/mL stock solution of horseradish peroxidase (HRP) by dissolving the contents of the vial of HRP (Component C) in 1.0 mL of 1X Reaction Buffer. After use, the remaining solution should be divided into small aliquots and stored frozen at -20°C.

**1.4** Prepare a 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> working solution by diluting the ~3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stock solution (Component D) into the appropriate volume of dH<sub>2</sub>O. The actual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration is indicated on the component label. For instance, a 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> working solution can be prepared from a 3.0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stock solution by diluting 23 μL of 3.0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into 977 μL of dH<sub>2</sub>O. Please note that although the ~3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stock solution has been stabilized to slow degradation, the 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> working solution will be less stable and should be used promptly.

**1.5** Prepare a 20 U/mL stock solution of choline oxidase by dissolving the contents of the vial of choline oxidase (Component F) in 600 μL of 1X Reaction Buffer. After use, the remaining solution should be divided into small aliquots and stored frozen at -20°C.

**1.6** Prepare a 100 mM solution of acetylcholine in dH<sub>2</sub>O. For example, dissolve 5 mg of acetylcholine chloride (Component G) in 275 μL of dH<sub>2</sub>O. This solution should be made fresh before each set of experiments. Because acetylcholine hydrochloride is hygroscopic, the remaining solid should be stored desiccated at -20°C. Please note that the concentration of acetylcholine in the stock solution should be considered approximate, since the acetylcholine hydrochloride may have varying amounts of water in the solid.

**1.7** Prepare a 100 U/mL stock solution of acetylcholinesterase by dissolving the contents of the vial of acetylcholinesterase (Component H) in 600 μL of 1X Reaction Buffer. After use, the remaining solution should be divided into small aliquots and stored frozen at -20°C.

#### Acetylcholine Assay

The following protocol describes the assay of acetylcholine in a total volume of 200 μL per microplate well. The volumes recommended here are sufficient for ~100 assays.



**2.1** Prepare an acetylcholine standard curve: Dilute the appropriate amount of 100 mM acetylcholine stock solution (prepared in step 1.6) into 1X Reaction Buffer to produce acetylcholine concentrations of 0 to 100  $\mu$ M. Use 1X Reaction Buffer without acetylcholine as a negative control. A volume of 100  $\mu$ L will be used for each reaction. Please note that the acetylcholine concentrations will be twofold lower in the final reaction volume.

**2.2** Dilute the acetylcholine-containing samples in 1X Reaction Buffer. A volume of 100  $\mu$ L will be used for each reaction.

**2.3** Prepare a positive control by diluting the 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> working solution to 10  $\mu$ M in 1X Reaction Buffer.

**2.4** Pipet 100  $\mu$ L of the diluted samples and controls into separate wells of a microplate.

**2.5** Prepare a working solution of 400  $\mu$ M Amplex Red reagent containing 2 U/mL HRP, 0.2 U/mL choline oxidase and 1 U/mL acetylcholinesterase by adding 200  $\mu$ L of Amplex Red reagent stock solution (prepared in step 1.1), 100  $\mu$ L of the HRP stock solution (prepared in step 1.3), 100  $\mu$ L of the choline oxidase stock solution (prepared in step 1.5) and 100  $\mu$ L of the acetylcholinesterase stock solution (prepared in step 1.7) to 9.5 mL of 1X Reaction Buffer. This 10 mL volume is sufficient for ~100 assays. Note that final concentrations of each component will be twofold lower in the final reaction volume.

**2.6** Begin the reactions by adding 100  $\mu$ L of the Amplex Red reagent/HRP/choline oxidase/acetylcholinesterase working solution to each microplate well containing the samples and controls.

**2.7** Incubate the reactions for 30 minutes or longer at room temperature, protected from light. Because the assay is continuous (not terminated), fluorescence may be measured at multiple time points to follow the kinetics of the reactions.

**2.8** Measure the fluorescence in a fluorescence microplate reader using excitation in the range of 530–560 nm and emission detection at ~590 nm (see Figure 1).

**2.9** For each point, correct for background fluorescence by subtracting the values derived from the no-acetylcholine control.

### **Acetylcholinesterase Assay**

The following protocol provides a guideline for using the Amplex Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit to

measure acetylcholinesterase activity. The volumes recommended here are sufficient for ~100 assays, each containing a volume of 200  $\mu$ L.

**3.1** Dilute the acetylcholinesterase-containing samples in 1X Reaction Buffer. A volume of 100  $\mu$ L will be used for each reaction.

**3.2** Prepare a positive control by diluting the 100 U/mL acetylcholinesterase stock solution (prepared in step 1.7) into 1X Reaction Buffer to produce a 0.2 U/mL acetylcholinesterase solution. Use 1X Reaction Buffer without acetylcholinesterase as a negative control. A volume of 100  $\mu$ L will be used for each reaction.

**3.3** Prepare a second positive control by diluting the 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> working solution to 10  $\mu$ M in 1X Reaction Buffer.

**3.4** Pipet 100  $\mu$ L of the diluted samples and controls into separate wells of a microplate.

**3.5** Prepare a working solution of 400  $\mu$ M Amplex Red reagent containing 2 U/mL HRP, 0.2 U/mL choline oxidase and 100  $\mu$ M acetylcholine by adding 200  $\mu$ L of Amplex Red reagent stock solution (prepared in step 1.1), 100  $\mu$ L of the HRP stock solution (prepared in step 1.3), 100  $\mu$ L of choline oxidase stock solution (prepared in step 1.5) and 10  $\mu$ L of acetylcholine stock solution (prepared in step 1.6) to 9.59 mL of 1X Reaction Buffer. This 10 mL volume is sufficient for ~100 assays. Note that final concentrations of each component will be twofold lower in the final reaction volume.

**3.6** Begin the reactions by adding 100  $\mu$ L of the Amplex Red reagent/HRP/choline oxidase/acetylcholine working solution to each microplate well containing the samples and controls.

**3.7** Incubate the reactions for 30 minutes or longer at room temperature, protected from light. Because the assay is continuous (not terminated), fluorescence may be measured at multiple time points to follow the kinetics of the reactions.

**3.8** Measure the fluorescence in a fluorescence microplate reader using excitation in the range of 530–560 nm and emission detection at ~590 nm (see Figure 1).

**3.9** For each point, correct for background fluorescence by subtracting the values derived from the no-acetylcholinesterase control.

---

## **References**

1. Anal Biochem 253, 162 (1997); 2. J Immunol Methods 202, 133 (1997).

---

## **Product List** *Current prices may be obtained from our Web site or from our Customer Service Department.*

<b>Cat #</b>	<b>Product Name</b>	<b>Unit Size</b>
A12217	Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit *500 assays*	1 kit
A12222	Amplex® Red reagent (10-acetyl-3, 7-dihydroxyphenoxazine)	5 mg
A22177	Amplex® Red reagent *packaged for high-throughput screening*	10 x 10 mg
A36006	Amplex® UltraRed reagent	5 x 1 mg

---

## Contact Information

Further information on Molecular Probes products, including product bibliographies, is available from your local distributor or directly from Molecular Probes. Customers in Europe, Africa and the Middle East should contact our office in Paisley, United Kingdom. All others should contact our Technical Assistance Department in Eugene, Oregon.

Please visit our Web site — [www.probes.com](http://www.probes.com) — for the most up-to-date information

### Molecular Probes, Inc.

29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402  
Phone: (541) 465-8300 • Fax: (541) 335-0504

**Customer Service:** 6:00 am to 4:30 pm (Pacific Time)

Phone: (541) 335-0338 • Fax: (541) 335-0305 • [order@probes.com](mailto:order@probes.com)

**Toll-Free Ordering for USA and Canada:**

Order Phone: (800) 438-2209 • Order Fax: (800) 438-0228

**Technical Assistance:** 8:00 am to 4:00 pm (Pacific Time)

Phone: (541) 335-0353 • Toll-Free: (800) 438-2209

Fax: (541) 335-0238 • [tech@probes.com](mailto:tech@probes.com)

### Invitrogen European Headquarters

Invitrogen, Ltd.  
3 Fountain Drive

Inchinnan Business Park

Paisley PA4 9RF, UK

Phone: +44(0) 141 814 6100 • Fax: +44(0) 141 814 6260

Email: [euinfo@invitrogen.com](mailto:euinfo@invitrogen.com)

Technical Services: [eurotech@invitrogen.com](mailto:eurotech@invitrogen.com)

*Molecular Probes products are high-quality reagents and materials intended for research purposes only. These products must be used by, or directly under the supervision of, a technically qualified individual experienced in handling potentially hazardous chemicals. Please read the Material Safety Data Sheet provided for each product; other regulatory considerations may apply.*

Several Molecular Probes products and product applications are covered by U.S. and foreign patents and patents pending. Our products are not available for resale or other commercial uses without a specific agreement from Molecular Probes, Inc. We welcome inquiries about licensing the use of our dyes, trademarks or technologies. Please submit inquiries by e-mail to [busdev@probes.com](mailto:busdev@probes.com). All names containing the designation ® are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

Copyright 2004, Molecular Probes, Inc. All rights reserved. This information is subject to change without notice.