



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Escuela de Pregrado

***“EFECTO INMUNOMODULADOR DE LAS CÉLULAS
MADRE MESENQUIMALES SOBRE LINFOCITOS TH17:
EVALUACIÓN EN UN MODELO MURINO DE
ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL”***

Memoria para Optar al Título de Bioquímico

JAVIERA BEATRIZ BRAVO ALEGRÍA

Lugar de realización

**Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular
Facultad de Medicina
Universidad de Los Andes**

Profesor Patrocinante:

Dr. Dante Miranda Wilson

Universidad De Chile

Director de Tesis:

Dr. Flavio Carrión Arriagada

Universidad De Los Andes

Santiago de Chile

Junio, 2012

“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en donde quiera que vayas”

Josué 1:9

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas estuvieron conmigo durante el desarrollo de este proyecto, que ha sido un largo y difícil camino. Primero, recordamos que sin Dios, las cosas no pasan, y de manera obvia, agradecer a Dios por darme la oportunidad de elegir donde hacer mi tesis, de trabajar con obstáculos, sin enfermedades graves, de iluminar mi cabeza de vez en cuando para sentenciar las más locas teorías... En fin, por estar aquí y estar escribiendo esto.

Quiero agradecer a mis padres, Cristina Alegría y Juan Bravo, quienes confiaron en mí y me apoyaron en esta locura de estudiar Bioquímica. Me aconsejaron en los momentos difíciles e hicieron esfuerzos enormes para llevarme a casa de vacaciones. Su trabajo de padres ha sido la razón por la cual he llegado a este punto de mi vida, en donde el futuro se mira desde abajo, pero se ve tan bonito desde aquí.

A mis hermanos, por estar siempre conectados, a pesar de los 3.700 Km de distancia, y darme sus consejos desde sus tan diferentes puntos de vista. Sin ustedes, la vida en Santiago se hizo compleja, y me di cuenta de que somos un quinteto fantástico y multidisciplinario, que tuvo que aprender a trabajar de forma independiente. Los amo mucho y los extrañé cada día que estuve estudiando.

A toda mi familia, mis tíos, mis primos, que me apoyaron incondicionalmente en este proceso, que me acompañaron en mis momentos de soledad, animaron mis fines de semana, pero por sobre todo, porque me acercaron más a Dios durante todo mi proceso de Universidad, que pasó por muchos altos y bajos. Agradecer sinceramente a la ayuda de mi abuela Ejidia Alzamora y de mi tata Sergio Alegría (Q.E.P.D), sin los cuales no hubiese podido estudiar en Santiago, ya que me alimentaron, me cuidaron, se preocuparon por mí en los momentos más críticos, me hicieron reír, y me acompañaron todos los días. Los quiero y querré siempre con todo el corazón. Recordar mi tía Gloria Alegría, quien me apoyo mucho, sobre todo finalizando el proceso, con sus regalones, su buena onda y su buena disposición, y a mi tía Bertita, mi parienta más cercana en estos años de universidad, mi madre postiza y mi amiga necesaria.

Agradecer también al Dr. Fernando Figueroa, por sus consejos y por notar mis fallas y hacérmelas saber, y así, ayudarme a mejorar y ajustar clavijas de mi profesionalidad.

Siempre estaré muy agradecida de Dios por tener gente a mi lado, aparte de la familia, que me ha apoyado como tal, bancándose mis malos ratos, animándome cuando estaba triste, haciendo

esfuerzos para subirme el ánimo, celebrando mis victorias cuando nadie más estaba cerca. Quiero agradecer, muy especialmente, a mi amiga Ximena Fernández, quien ha sido mi compañera desde que volví de congelar, con la cual hemos tenido de todo tipo de discusiones, batallas, y ocasos, pero siempre hemos estado juntas, en los laboratorios, en clases y trabajos, y ahora, juntas en la tesis. Sus sabios consejos fueron muy importantes para mí, sobre todo en el último tiempo. Muchas gracias por hacerme entrar en razón infinitas veces, por sacarme a comer hamburguesas en mis arrebatos, los relajos después de una terrible tarde de laboratorio, y por todas las conversaciones para arreglar al mundo. Te quiero mucho amiga.

A mis amigos más cercanos, estas personas sabias e inteligentes, complejas y simples, que me acompañaron en diferentes etapas del proyecto de ser Bioquímico: Feña Argaluz, Steffania Carozzi, Valentina Doberti, Laura Hurtado, José Jiménez, Francisca Noya, Naria Oyanedel y Carolina Vera (Por orden alfabético para que nadie se enoje). Han sido muy importantes en mi vida, y los quiero y adoro.

A mis amigos a distancia, sobre todo a mi queridísima Giannina Espina, quien a pesar de estar en Bath, y yo envidiarla hasta el infinito por pasear por los lugares que siempre desee recorrer, es capaz de animarme, darme consejos y papers, preocuparse por mi todo el tiempo, y hacer que la extrañe menos y más todos los días. Ojalá puedas leer alguna vez estas palabras desde el texto y no desde el mail que te enviaré.

A pesar de lo difícil que fue, la gente del laboratorio, hizo de esta una etapa entretenida y llena de discusiones y emociones, arregladas de mundo, salidas y conversaciones con un rico café en la mañana. A la gente que pasó por el laboratorio mientras estuve ahí, Dr. Rodrigo Fuentealba, por su apoyo y su buen humor, Carolina Leal, Alejandra Berrios, Feña Argaluz, Paty Luz; y a la gente de los laboratorios vecinos, que siempre tuvieron una buena sonrisa para empezar el día, sobre todo a Daniela Santapau y a la Dra. Lorena Salazar. Agradecer sinceramente a mi amiga Carito Maria Inostroza, quien me ayudó, me escuchó y me armó en cada detalle técnico de lo que fue mi tesis, y además, estuvo conmigo en momentos complicados sabiendo siempre apoyarme para salir adelante y darme ánimos para llegar a este punto.

Agradecer a mi patrocinador, Dr. Dante Miranda Wilson, por escuchar y preocuparse de mí durante el proceso de Tesis, por tener una forma sabia y entretenida de ver las cosas, por las pocas tardes conversando que siempre quise que se repitieran a menudo (pero los cortos plazos del laboratorio lo evitaron), y por cuidarme a mí y a otros alumnos que pasaron por procesos malos en diferentes experiencias de lo que es la vida universitaria. Ha sido un gran director de carrera, a pesar de que esté sobrepasado de trabajo, siempre tiene un espacio disponible en su correo o teléfono.

Tuve la suerte de encontrarme con personas de mucha paciencia a lo largo de este camino, con muchas opiniones, gente muy inteligente, que ayudo de diferentes formas en mi carrera. Tuve la bendición de no tener ningún contratiempo, ni de sufrir por asuntos sin solución. Tuve el agrado de nunca estar sola, a pesar de que mi familia se encontraba al otro lado del Pacífico. Por todas estas cosas y la finalización de mi tesis de pregrado, agradezco a Dios.

Por todo esto y más, Muchas Gracias

Financiamiento

Proyecto Fondo de Ayuda a la Investigación Código FAI-MED-02-2010

Facultad de Medicina

Universidad de Los Andes

ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERAL	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	viii
MARCADORES Y MOLÉCULAS DE SUPERFICIE	x
RESUMEN	xi
SUMMARY	xii
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Esclerosis múltiple y Encefalitis Autoinmune Experimental	1
1.2. Linfocitos Th1 y Th17	2
1.3. Linfocitos Th1 y Th17 en Encefalitis Autoinmune Experimental	2
1.4. Tratamientos actuales para la Esclerosis Múltiple	3
1.5. Células Madre Mesenquimales	4
1.6. Células Madre Mesenquimales e Inmunomodulación	4
1.7. Células Madre Mesenquimales como terapia celular en modelos de enfermedades autoinmunes	5
2. HIPOTESIS	7
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo general	7
3.2. Objetivos específicos	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
5. RESULTADOS	
5.1. Implementación del modelo EAE en ratones C57BL/6	14
5.2. Grupos experimentales	14
5.3. Progresión clínica del EAE en los diferentes grupos experimentales	18
5.4. Cambios de peso como indicadores de la enfermedad	22
5.5. Aumento en la presentación de signos clínicos atípicos	24
5.6. Estudio de linfocitos Th1 y Th17 en bazo y nódulos linfáticos <i>ex vivo</i>	26
5.6.1. Linfocitos en bazo	26
5.6.2. Linfocitos en nódulos linfáticos	27
5.7. Expresión de ROR γ T en médula espinal	31
6. DISCUSIÓN	41
7. CONCLUSIONES	45
8. REFERENCIAS	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Comparación de la progresión de EAE en Inducciones con dos concentraciones diferentes	16
Figura 2: Diseño experimental	17
Figura 3: Parámetros Clínicos Analizados para los Diferentes grupos Experimentales	19
Figura 4: Progresión del Puntaje clínico para los diferentes grupos experimentales	20
Figura 5: Área bajo la curva de G1 y G4, desde el día 30 post inducción	21
Figura 6: Cambios de peso en los grupos experimentales	23
Figura 7: Presentación de Signos de EAE atípico	25
Figura 8: Selección de linfocitos para análisis mediante Citometría de Flujo	28
Figura 9: Citometría de Flujo en Linfocitos extraídos de Bazo	29
Figura 10: Citometría de Flujo en Linfocitos extraídos de Nódulos Linfáticos	30
Figura 11: Curvas de Eficiencia para Real Time PCR de <i>roryt</i> y <i>I8s</i>	33
Figura 12: Curvas de Amplificación para gen <i>roryt</i> en muestras de médula espinal	34
Figura 13: Curvas de Amplificación para gen <i>I8s</i>	35
Figura 14: Curvas de Disociación para <i>I8s</i> y <i>roryt</i>	36
Figura 15: Curva de Denaturación para muestras 3, 8, 19, 20 y 21 del gen <i>roryt</i>	37
Figura 16: Electroforesis en gel de Agarosa 2% para productos de Real Time PCR del gen <i>roryt</i>	38
Figura 17: Electroforesis en gel de Agarosa 2% para productos de Real Time PCR del gen <i>I8s</i>	39
Figura 18: Expresión de <i>roryt</i> en médula espinal de ratones pertenecientes a diferentes grupos experimentales	40

ABREVIATURAS

CDs	Células Dendríticas
CFA	Adyuvante Completo de Freund
CIA	Colagen Induced Arthritis: Artritis Inducida por Colágeno
CPAs	Celulas Presentadoras de Antígeno
EAE	Encefalomiелitis Autoimmune Experimental
EM	Esclerosis Múltiple
ES	Error Estándar
DS	Desviación Estándar
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> : ácido desoxirribonucleico
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic acid</i> : ácido desoxirribonucleico complementario
FITC	Fluoresceina Isocianato
IACUC	<i>Institutional Animal Care and Use Committee</i> – Comité Institucional de Cuidado Animal y Uso
IDO	Indolamina 2,3-Dioxigenasa
IFNγ	Interferón gamma
IL-10	Interleuquina 10
IL-12	Interleuquina 12
IL-17A	Interleuquina 17A
IL-17F	Interleuquina 17F
IL-21	Interleuquina 21
IL-22	Interleuquina 22
IL-23	Interleuquina 23
MOG₃₅₋₅₅	<i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i> : Glicoproteína de Mielina de Oligodendrocitos
MSCs	Células Madre Mesenquimales
NINDS	<i>National Institute of Neurological Disorders and Stroke</i> : Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares
NO	Óxido Nítrico
NTC	<i>No Template Control</i> : Control sin templado
PBMC	<i>Periferic Blood Mononuclear Cells</i> – Células Mononucleares de Sangre Periférica
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> : Reacción en Cadena de la Polimerasa

PE	<i>Phycoerythrin</i> : Ficoeritrina
PGE2	Prostaglandina E2
PHA	<i>Phytohaemagglutinin</i> : Fitohemaglutinina
PMA	Forbol 12-miristato-13-acetato
RAR	<i>Retinoic Acid Receptor</i> : Receptor de Ácido Retinoico
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> : ácido ribonucleico
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> : ácido ribonucleico mensajero
RORγT	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i> : Receptor Huerfano relacionado con RAR tipo γ
RT PCR	<i>Reverse transcription Polimerase Chain Reaction</i> : Reaccion en cadena de la polimerasa con Transcriptasa reversa
SFB	Suero Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervioso Central
Th	Linfocito T <i>helper</i>
Th1	Linfocitos T <i>helper</i> tipo 1
Th17	Linfocitos T <i>helper</i> tipo 17
Th2	Linfocitos T <i>helper</i> tipo 2
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor α</i> – Factor de Necrosis Tumoral tipo alpha
TNFβ	<i>Tumnor Necrosis Factor β</i> – Factor de Necrosis Tumoral tipo beta
Treg	Linfocitos T reguladores

MARCADORES Y MOLÉCULAS DE SUPERFICIE

CD3	Proteína de la familia de inmunoglobulinas que forma parte de receptor de célula T. Participa en señalización.
CD4	Glicoproteína expresada principalmente en la superficie de células T.
CD11b	Integrina expresada principalmente en monocitos, granulocitos y macrófagos.
CD14	Co-receptor de TLR presente principalmente en macrófagos, neutrófilos y células dendríticas.
CD25	Receptor de IL-2.
CD28	Receptor co-estimulador presente en linfocitos T.
CD29	Integrina. Se expresa en superficie de MSCs y fibroblastos.
CD34	Glicoproteína involucrada en adhesión célula-célula. Se expresa tempranamente en células de origen hematopoyético.
CD44	Receptor de ácido Hialurónico. Participa en adhesión y contacto celular.
CD45	Glicoproteína transmembrana con actividad tirosina quinasa. Expresado en superficie de células hematopoyéticas.
CD73	Ecto-5'-Nucleotidasa. Cataliza la conversión de purina 5' mononucleotido a nucleosidos, específicamente AMP.
CD80	Gluproteína B7-1 presente en células presentadoras de antígeno que funcionan como moléculas co-estimuladoras.
CD86	Gluproteína B7-2 presente en células presentadoras de antígeno que funcionan como moléculas co-estimuladoras.
CD90	<i>Thymocyte differentiation antigen 1</i> (THY.1) Marcador de superficie de células madre y participa en contacto célula-célula y célula-matriz.
CD105	Glicoproteína de superficie característica de proliferación de células endoteliales.
CD106	Molécula de adhesión vascular -1 (VCAM-1).
HLA-DR	<i>Human Leucocyte Antigen</i> . MHC-II humano.
MHC I	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I
MHC II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II

RESUMEN

Efecto inmunomodulador de Células Madre Mesenquimales sobre linfocitos Th17: Evaluación en un modelo murino de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental.

Las Células Madre Mesenquimales (MSCs) se han propuesto como una nueva terapia para las enfermedades autoinmunes debido a la inmunosupresión que ejercen sobre linfocitos T. Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que bajo ciertas condiciones, las MSCs son capaces de favorecer la generación de linfocitos T CD4⁺ IL-17⁺ (Th17) proinflamatorios pero siempre suprimen a linfocitos T CD4⁺ IFN γ ⁺ (Th1). En el siguiente trabajo, decidimos evaluar el efecto *in vivo* de las MSCs en ratones con Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE), a diferentes tiempos de la enfermedad y estudiar las poblaciones linfocitarias Th1 y Th17 en Sistema Nervioso Central (SNC), bazo y nódulos linfáticos. Para ello, se indujo EAE en ratones hembras C57BL/6 (de 5 a 8 semanas) con 50 μ g MOG₃₅₋₅₅. 1^x10⁶ de MSCs fueron administradas intravenosamente a días 10 (n=6), 18 (n=7) y 30 (n=6) en diferentes grupos experimentales, manteniendo un control sin tratamiento (n=5). El puntaje clínico clásico y atípico fue asignado según se describió previamente por Domingues et al en el 2010. Al día 52 post inducción, se extrajeron nódulos linfáticos, bazo y SNC. Linfocitos Th1 y Th17 obtenidos de bazo y nódulos linfáticos fueron analizados a través de citometría de flujo y se observó la presencia de linfocitos Th17 en SNC mediante la detección de ROR γ T por PCR en tiempo real.

El tratamiento con MSCs a los días 10 y 18 tiende a disminuir la severidad de la enfermedad, y el tratamiento al día 30 tiende a aumentarla, comparando con un control sin tratamiento, aunque no se observan diferencias significativas. La razón de linfocitos Th17/Th1 tiende a aumentar en ratones tratados al día 30 en bazo y en nódulos linfáticos, sin embargo el porcentaje de Th17 es mayor en ratones tratados con MSCs al día 10, lo que se observa tanto en nódulos linfáticos como en médula espinal. Luego del tratamiento con MSCs se observó en todos los grupos experimentales la aparición de signos atípicos relacionados con la infiltración de Th17 en cerebro.

Aparentemente, la inyección de MSCs genera un aumento de Th17 en ratones con EAE, aunque de forma diferente, dependiendo del órgano observado y el tiempo de la inyección. A pesar de la disminución de severidad que se ha observado en este modelo en publicaciones anteriores, estos resultados nos indican que el tratamiento con MSCs genera la aparición de estirpes pro inflamatorias que pueden afectar la estabilidad de una enfermedad autoinmune.

SUMMARY

Immunomodulatory effect of Mesenchymal Stem Cells on Th17 lymphocytes: evaluation in a murine model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) have been proposed as a new therapy in autoimmune pathology, due to the immune suppression exerted on T lymphocytes. Nevertheless *in vitro* studies show that in certain conditions MSCs favor the generation of CD4⁺ IL-17⁺ T Lymphocytes (Th17) but always suppresses CD4⁺ IFN γ ⁺ T Cells (Th1). We decided to evaluate the *in vivo* effect of MSCs in Experimental Autoimmune Encephalitis (EAE) at different times of the disease and to study the Th1 and Th17 population in Central Nervous System (SNC), spleen and lymph nodes. With this aim, EAE disease in female C57BL/6 (5-8 weeks) mice was induced with 50 μ g MOG₃₅₋₅₅. 1^x10⁶ MSCs was administrated intravenously at days 10 (n=6), 18 (n=7) and 30 (n=6), considering a not treatment control (n=5). The classical and atypical EAE scores were given as was describe previously (Domingues et al, 2010). At day 52, lymph nodes, spleen and spinal cord and where extracted. Th1 and Th17 cells from spleen and lymph nodes were evaluated through flow cytometry and Th17 were check in spinal cord by the detection of ROR γ T by Real Time PCR.

Day 10 treatment with MSCs tends to ameliorate the disease as at 18, and day 30 treatment tends to increase the disease, compares with EAE control. No-significant changes were observed in cumulate score between groups. Th17/Th1 Ratio tends to increase in mice treated at day 30 in spleen and in lymph nodes, but Th17 percent is higher in day 10 MSCs treated mice lymph nodes similar what is shown in spinal cord. After MSCs Treatment, the appearance of atypical EAE signs, related to Th17 cells brain infiltration was observed.

Apparently, the MSCs injection causes an increase of Th17 cells in EAE mice, but in a differently, depending on the tissue and the time of injection. Despite the decrease in the severity that was observed in this model in previous publications, these results indicate that treatment with MSCs creates the appearance of pro-inflammatory strains that may affect the stability of an autoimmune disease.

INTRODUCCIÓN

Esclerosis Múltiple y Encefalomiелitis Autoinmune Experimental

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune, caracterizada principalmente por la infiltración de linfocitos T helper (Th) CD4⁺, macrófagos y neutrófilos en el Sistema Nervioso Central (SNC), inflamación de la materia blanca, y posterior demielinización y daño axonal, produciendo en el paciente una reducción o pérdida de las funciones motoras. Según el Instituto Nacional de Desórdenes e Infartos Neurológicos de Estados Unidos (*National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NINDS*) las mujeres son más propensas que los hombres en un 50%, y la enfermedad se manifiesta entre los 20 y los 40 años. En Europa, América del Norte, y Australasia (Australia, Nueva Zelanda y Melanesia) 1 de cada 1000 personas sufren de esta enfermedad, teniendo menor incidencia en América del Sur y África. En Chile, existen 12 a 13 enfermos por cada 100.000 habitantes, por lo que nuestro país se clasifica como una zona de riesgo medio en base a la prevalencia de la enfermedad (Kurtzke et al, 1980). La sintomatología varía dependiendo de los pacientes, pero los síntomas comunes son perturbaciones visuales, dificultad al caminar y desarrollar tareas que requieran coordinación, pérdida de sensación, fatiga y/o debilidad, y pérdida del control de esfínter.

Para posibilitar el estudio de esta enfermedad, existe el modelo animal denominado Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE). Los primeros estudios de este modelo fueron publicados en 1933, en donde una vacuna antirrábica experimental, generada con extractos de cerebro de conejo, produjo parálisis y muerte en monos, causados por la demielinización de su SNC (Rivers *et al*, 1933). El modelo EAE fue descrito y establecido como una enfermedad inflamatoria autoinmune del SNC en 1949 (Otlisky *et al*, 1949). Actualmente, se puede inducir EAE en diferentes animales, como ratas, ratones, conejos, monos y puercos de guinea. En el caso del modelo murino, se utilizan diferentes ratones para generar diferentes tipos de enfermedad en cuanto a tiempo y severidad, por ejemplo, ratones B10.PL (H-2^u) sólo presentan un episodio agudo y auto limitante, del cual se pueden recuperar total o parcialmente; ratones SJL (H-2^s) presentan una enfermedad de episodios reincidentes. En cambio, ratones C57BL/6 (H-2^b) presentan una enfermedad crónica, lo cual es muy útil para el estudio de las distintas etapas de la enfermedad (Tompkins *et al*, 2002). Con el tiempo, este modelo experimental se ha perfeccionado, transformándose en un modelo clásico de estudio de enfermedades autoinmunes, como

EM, mediadas por linfocitos T inflamatorios, dentro de los cuales se encuentran los linfocitos T helper 1 (Th1) y T helper 17 (Th17) (Miller *et al*, 2007).

Linfocitos Th1 y Th17

Los linfocitos Th1, secretores de IFN γ , TNF α y TNF β (Yisong, 2010), estimulan la respuesta citotóxica celular, tanto en el sistema inmune innato, como en el sistema inmune adaptativo. La generación de este linaje celular *in vivo* depende de la secreción de Interleuquina 12 (IL-12) por parte de las Células Presentadoras de Antígenos (CPAs). La IL-12 es una citoquina heterodimérica compuesta por 2 subunidades p40 y p35, necesaria para la expresión de *T-bet*, factor transcripcional maestro para la diferenciación a Th1, y de su expresión depende la secreción de altas cantidades de IFN γ . Un aumento descontrolado de linfocitos Th1 es capaz de producir daño tisular, inflamación, y auto reactividad, haciendo de los linfocitos Th1 mediadores importantes de enfermedades autoinmunes órgano-específicas, como por ejemplo la Artritis Reumatoide, Diabetes Mellitus tipo I y EM (Jäger *et al*, 2010).

Los linfocitos Th17 secretan principalmente IL-17F e IL-17A, además de IL-21 y 22. La secreción de estas citoquinas depende de la expresión de los factores de transcripción STAT 3 y ROR γ T, siendo este último marcador específico y factor transcripcional maestro de este linaje celular. Este eje se ha visto altamente asociado a infecciones parasitarias y su desregulación, a enfermedades autoinmunes. La mantención del perfil Th17, así como su diferenciación, dependen de la secreción de IL-23 por parte de las Células Dendríticas (CDs) activadas. La IL-23 es una citoquina heterodimérica, al igual que IL-12, e incluso, comparten una subunidad, p35. La proteína p19, la otra subunidad de IL-23, es muy parecida en estructura a IL-6 y p40, no tiene actividad biológica por sí sola, y esta sólo existe cuando las dos subunidades se sintetizan en la misma célula productora. Esto ocurre tanto en ratón como en humanos (Oppman *et al*, 2000).

Linfocitos Th1 y Th17 en Encefalomiелitis Autoinmune Experimental

Se han descrito diferentes roles para linfocitos Th1 y Th17 en EAE. Th1 específicas para el péptido MOG₃₅₋₅₅ (*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein; Glicoproteína de Mielina de Oligodendrocitos*) son altamente patogénicas, y además necesarias para que las células Th17 penetren a las lesiones en el SNC (O'Connor *et al*, 2008). T-bet, factor transcripcional esencial para la diferenciación a Th1, es necesario para la inducción de EAE por Th1 y Th17 mediante transferencia adoptiva de linfocitos T

antígeno específicos para MOG₃₅₋₅₅ (Yang *et al*, 2009). Se demostró que la proporción entre linfocitos Th1/Th17 determina el lugar de inflamación en el SNC (Stromnes *et al*, 2008) y que la generación de EAE espontánea en ratones transgénicos IgH^{MOG}, TCR^{MOG} (2D2) y MOG^(-/-), Th1 y Th17 son necesarias para la patogénesis de la enfermedad (Pöllinger *et al*, 2009; Krishnamoorthy *et al*, 2006). Domingues y colaboradores publicaron datos de los diferentes efectos de linfocitos Th1 y Th17 en esta patología. Ratones Rag-2^(-/-) (linfopénicos), fueron inyectados con series de linfocitos Th1, MOG₃₅₋₅₅ específicos y mezcla de Th1+Th17, los cuales generaron EAE clásico, es decir parálisis desde la cola a la cabeza progresivamente; mientras que Th17 presentaron EAE atípico, patología caracterizada por ataxia, rumbo desbalanceado, defectos rotatorios y axiales. Estos ratones podían generar EAE clásico luego de presentar los síntomas atáxicos. Además, demostraron que ratones inyectados sólo con linfocitos Th17 presentaban células doble positivas para IFN γ e IL-17 en las lesiones del SNC, y que esta plasticidad de las Th17 sólo era posible cuando las vías IL-12 e IL-23 estaban habilitadas (Domingues *et al*, 2010). En ratones IFN γ ^(-/-) se vio un aumento en la producción de IL-17 (Komiyama *et al*, 2006), lo que se condice con el hecho de que ratones IFN γ ^(-/-) tengan una progresión de la enfermedad mucho más severa (Ferber *et al*, 1996). En esta línea, se ha visto efectividad en el tratamiento del EAE con anticuerpos neutralizantes de IL-17 (Uyttenhove *et al*, 2007) y receptores solubles para IL-17 (Hoffstetter *et al*, 2005), sugiriendo que los linfocitos Th17 tienen un papel fundamental en el desarrollo del EAE.

Tratamientos actuales para Esclerosis Múltiple

Teniendo en consideración la enfermedad del punto de vista inmunológico, se pueden asociar varios tratamientos para disminuir la progresión de la enfermedad buscando, como blanco, la disminución de la inflamación y la proliferación de linfocitos autoreactivos. En tratamientos a largo plazo, se combinan fármacos específicos para el tratamiento de los síntomas, como benzodiacepina y antidepresivos, con inmunosupresores. Uno de los tratamientos más utilizados a largo plazo es la terapia con interferones. El IFN- β es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos T proinflamatorios, la expresión de proteínas de adhesión y metaloproteinasas, y la presentación antigénica, además de polarizar la respuesta inmune hacia Th2, favoreciendo la respuesta humoral, disminuyendo la actividad citotóxica sistémica (Markowitz *et al*, 2007). Estos tratamientos son útiles solo para disminuir la inflamación y así proteger a las neuronas que aún no sufren daño de episodios o crisis agudas. La terapia celular es otra herramienta en estudio para el tratamiento de esta y otras patologías autoinmunes órgano específicas. En el caso específico de EAE y EM, las células madre podrían ser de gran ayuda tanto a la inmunomodulación como a la neuroregeneración. En este contexto y debido a su potente capacidad

inmunomoduladora, las Células Madre Mesenquimales (MSCs) se han estudiado como posible estrategia terapéutica para EM (Martino et al, 2010).

Células Madre Mesenquimales

Las MSCs son células madre multipotenciales, y se encuentran principalmente en la médula ósea y tejido adiposo de organismos adultos, sin embargo, se han podido aislar a partir de tejidos de origen mesenquimal, como tejido conectivo, hueso y músculo (Sánchez-Ramos 2006). Estas células se caracterizan por ser células adherentes al plástico, presentar morfología fibroblastoide, potencial de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica, y proliferar en presencia de Suero Fetal Bovino (SFB). Recientemente la Sociedad Internacional de Terapia Celular ha propuesto que las MSCs expresan (Positividad $\geq 95\%$) los marcadores de superficie CD106, CD73, CD90 y ausencia (Negatividad $\leq 2\%$) de CD45, CD34 o CD14 (o CD11b), CD79 α (o CD19) y HLA-DR (Dominici *et al*, 2006). Las MSCs son capaces de sintetizar componentes de la matriz celular como fibronectina, versicán y colágeno tipo I, además de factores solubles como G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-7, IL-11, TGF- β 1, SDF-1, entre otros (Croitoru-Lamoury *et al*, 2007). Además, se ha descrito que estas células son capaces de evadir al sistema inmune (hipoinmunogénicas), ya que expresan bajos niveles del Complejo de Histocompatibilidad tipo I (MHC-I) y no expresan de forma constitutiva el Complejo de Histocompatibilidad tipo II (MHC-II) ni moléculas co-estimuladoras, como CD40, CD80 y CD86.

Células Madre Mesenquimales e Inmunomodulación

Las MSCs son capaces de ejercer efectos supresores sobre linfocitos T, generando una detención en los estados G₀/G₁ del ciclo celular. Además, generan una modulación específica en estirpes T CD4⁺, promoviendo linajes anti inflamatorios, como linfocitos T reguladores (Treg), y suprimiendo estirpes inflamatorias, como Th1. Los mecanismos por los cuales las MSCs ejercen su efecto sobre el sistema inmune son desconocidos, pero se ha sugerido que involucran contacto celular y factores solubles, tales como Prostaglandina E2 (PGE2), Óxido Nítrico (NO), Indolamina Dioxigenasa (IDO), Interleuquina 10 (IL-10), etc. (Meisel et al. 2004, Djouad et al. 2007, English et al. 2007, Ryan et al. 2007, Ren et al. 2008, Bian et al. 2009). A pesar del efecto supresor observado en Th1, se ha descrito una respuesta diferente por parte de los linfocitos Th17 cuando son co-cultivadas con MSCs. Guo y colaboradores demostraron que el co-cultivo de MSCs con T CD4⁺ aislados de PBMC, y activados con

PHA y IL-2, aumentan los transcritos de IL-17A e inhiben los de IFN γ , comparados con CD4⁺ sin MSCs (Guo *et al*, 2009). Además, nuestro laboratorio recientemente ha descrito que las MSCs inhiben la diferenciación a Th1 de linfocitos T CD4⁺ previamente activados con anti CD3/CD28, sin embargo, se observa un incremento del linaje Th17 a tiempos tardíos de co-cultivo, correlacionado con el aumento de IL-17A con respecto a un control de diferenciación (Carrión *et al*, 2010). Se postula que la secreción de IL-6 y TGF- β 1 por parte de las MSCs aumentaría la diferenciación a Th17, sin embargo, los mecanismos por los cuales las MSCs podrían originar la diferenciación a linfocitos Th17 son desconocidos.

Todos estos datos indican que las MSCs poseen un efecto diferencial sobre los linfocitos Th1 y Th17, lo que nos impulsa a estudiar el efecto inmunológico que ejercerían estas células como agentes inmunomoduladores en modelos de autoinmunidad.

Células Madre Mesenquimales como Terapia Celular en Modelos de Enfermedades Autoinmunes

Las MSCs se han utilizado como herramienta regenerativa en enfermedades caracterizadas por daño o destrucción de tejidos, como SNC, esquelético, cardiaco y hematopoyético. Además de sus propiedades regenerativas, las MSCs poseen efectos inmunomoduladores, siendo capaces de inhibir la proliferación y activación de los linfocitos B, T, NK y de CD4 (Le Blanc *et al*, 2003; Tang *et al*, 2006). Estas características hacen de las MSCs un ejemplar idóneo para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Como ejemplo, se han utilizado anteriormente y con éxito en el tratamiento experimental de este tipo de patologías, como en la Enfermedad de injerto contra huésped (Sudres *et al*, 2006), Artritis reumatoide (Boissier *et al*, 2008) y Lupus Eritematoso Sistémico (Sun *et al*, 2010).

Sin embargo, en algunos modelos experimentales de enfermedades autoinmunes se han observado efectos paradójicos. Por ejemplo, se ha demostrado un empeoramiento de la Artritis Inducida por Colágeno (*Collagen Induced Arthritis* – CIA) asociado a la inoculación de MSCs en tiempos tardíos (Djouad *et al*, 2005; Chen *et al*, 2009). Por otro lado, González y colaboradores demostraron que las MSCs perdían su efecto anti inflamatorio en este mismo modelo animal, a medida que aumenta la severidad de la enfermedad (González *et al*, 2009). Zappia y colaboradores publicaron que al inyectar MSCs a tiempos lejanos al *comienzo* de la patología EAE, la enfermedad no mejoraba (Zappia *et al*, 2005). Este empeoramiento o falta de efecto podría asociarse a un aumento de Th17 vinculado a la inyección de MSCs en un ambiente proinflamatorio, particularmente, un ambiente Th17.

Como se mencionó anteriormente, estados agudos de EAE presentan altos niveles de linfocitos Th1 y Th17 en bazo, ganglios linfáticos y SNC de ratón (Hoffstetter *et al*, 2010), existiendo este ambiente proinflamatorio sistémico, lo que nos lleva a pensar que la inyección MSCs en ratones con EAE aguda puede, más que ayudar a mejorar la patología, provocar un empeoramiento severo de los síntomas adjudicados a Th17, como son los trastornos atáxicos de la marcha, y defectos en la rotación (Domingues et al, 2010), o bien, generar un empeoramiento de la enfermedad clásica, caracterizado por la parálisis progresiva de las extremidades, debido a un posible aumento de infiltración al SNC de células Th1/Th17.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto clínico e inmunológico de la inyección de MSCs en ratones con EAE a diferentes tiempos de la progresión enfermedad, y así comparar el efecto diferencial de estas células sobre los linfocitos Th1, Th17 y su balance, dependiendo del ambiente proinflamatorio sistémico.

Por lo tanto, se propone la siguiente hipótesis:

Hipótesis

“La Infusión de Células Madre Mesenquimales en ratones con Encefalomiелitis Autoinmune Experimental avanzada inducen un aumento de Linfocitos Th17”

Objetivo General

Estudiar el efecto de Células Madre Mesenquimales, sobre linfocitos Th17 en ratones con Encefalomiелitis Autoinmune Experimental.

Objetivos Específicos

1. Establecer el modelo EAE en ratones C57BL/6 y evaluar la progresión clínica de la enfermedad mediante curvas de puntaje clínico, y tablas que incluyan otros parámetros como peso, mortalidad, incidencia, y puntaje máximo alcanzado.
2. Establecer los días tratamiento con MSCs en ratones con EAE a tres diferentes tiempos de la enfermedad (comienzo de la enfermedad, pico de severidad y Enfermedad Avanzada).
3. Evaluar perfil Th17 en Bazo, Nódulos Linfáticos y SNC de ratones EAE tratados o no con MSCs mediante citometría de flujo.
4. Evaluar la expresión de mRNA de ROR γ T en SNC de ratones EAE, tratados o no con MSCs a diferentes tiempos de la enfermedad, mediante PCR en tiempo real.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Ratones hembras C57BL/6 de 5-8 semanas, provenientes del Bioterio de Alta Seguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, fueron llevados a la Sala de Mantención de Animales de la Universidad de Los Andes, donde se realizaron los experimentos. Los ratones se mantuvieron en micro aisladores con comida y agua *ad libitum*, en una pieza termo regulada, y con sistema de iluminación 12 horas día/12 horas noche. Durante el transcurso de los experimentos, los ratones fueron mantenidos bajo condiciones no específicas libres de patógenos, alimentados con dieta regular de semillas y pellet hidratados con agua acidificada o leche. Los protocolos fueron realizados de acuerdo al criterio aceptado por el Comité de Cuidado y Uso Experimental de Animales de Laboratorio (IACUC-*Institutional Animal Care and Use Comitee*) y aprobado por el comité de Cuidado y Uso Animal de la Universidad de los Andes.

Inducción de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental

Se realizaron 2 inducciones diferentes para el proceso de estandarización. Ratones hembras fueron inyectados 2 veces, de forma subcutánea, en el lomo superior e inferior con un total de 100 μ L de emulsión de inducción, la cual contenía 30 μ g (n=8) o 60 μ g (n=6) de péptido MOG₃₅₋₅₅ (LifeTein) emulsionado con Adyuvante Completo de Freund (CFA) (Difco, Detroit, MI) y suplementado con 4 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Detroit, MI) inactivado por calor. 2 y 48 horas después de la inducción con MOG₃₅₋₅₅, los ratones fueron inyectados de forma intraperitoneal con 350 ng de *toxina pertúsica* (Calbiochem) disuelta en PBS 1X estéril. En una siguiente inducción, posterior a la estandarización y a experimentos previos del laboratorio, 29 hembras fueron inyectadas para inducir EAE, utilizando una concentración de 50 μ g de péptido MOG₃₅₋₅₅ emulsionado con Adyuvante Completo de Freund (CFA) y suplementado con 4 mg/mL de *Mycobacterium Tuberculosis* H37RA. Los ratones fueron pesados diariamente, y se les facilitó la comida cuando comenzaron los síntomas de la patología, como se mencionó anteriormente.

Evaluación de la Enfermedad

Diariamente se evaluó el peso y los signos clínicos de la enfermedad clásica, utilizando la siguiente tabla de puntajes clínicos: (0) no hay enfermedad, (0.5) tono muscular de la cola reducido, (1) cola flácida, (1,5) cola flácida y ataxia, (2) cola flácida, ataxia y debilidad en patas traseras, (2,5) al menos un miembro trasero paralizado, (3) completa parálisis de patas traseras, (3,5) parálisis total en patas traseras, (4) parálisis hasta las caderas, (5) moribundo o muerto. Los ratones moribundos fueron eutanasiados bajo la supervisión de un veterinario. Los signos atípicos de la enfermedad se evaluaron siguiendo los parámetros descritos a continuación: (0) no hay enfermedad, (1) cabeza ligeramente inclinada (ataxia y no parálisis en cola), (2) cabeza inclinada, (3) dificultad para caminar en línea recta, (4) inmóvil y de lado, (4,5) gira en su eje, (5) moribundo o muerto (Domingues et al, 2010). Junto con lo anterior, se evaluaron otros datos clínicos, como la mortalidad, morbilidad, puntaje máximo alcanzado, cambios de peso con respecto al peso inicial, el día de inicio de síntomas o comienzo de la enfermedad y de máximo puntaje alcanzado.

Células Madre Mesenquimales

MSCs provenientes de médula ósea de tibia y fémur de ratones C57BL/6, purificadas y ya caracterizadas mediante citometría de flujo (CD29+, CD44-, CD90+, CD45-, CD34-), tri-diferenciación (Adipogénesis, condrogénesis, osteogénesis), y adherencia al plástico, fueron incubadas en medio α -MEM, suplementado con 10% SFB, 100 U/mL Penicilina, 100 μ g/mL Estreptomycin (α -MEM completo), a 37°C y 5%CO₂.

Tratamiento con MSCs

Grupos de ratones inducidos con EAE fueron inoculados vía endovenosa con 1×10^6 MSCs en pasajes 10-15, contenidas en 100 μ L de PBS estéril, con una jeringa de tuberculina. Se trabajó con 4 grupos experimentales: (1) Ratones control con EAE (como control de vehículo 100 μ L PBS, n=5); (2) Ratones EAE tratados con MSCs inyectadas al día 10 post inducción (n=6); (3) Ratones EAE tratados con MSCs en el pico de la enfermedad, inyectadas al día 18 (n=7); y (4) ratones EAE tratados con MSCs en períodos tardíos de la enfermedad, inyectadas al día 30 (n=6). Los ratones fueron sacrificados al día 52 del experimento, para la extracción de muestras.

Obtención de Linfocitos T de Bazo y Ganglios Linfáticos

Bazo y nódulos linfáticos de ratones con EAE tratados o no con MSCs, fueron extraídos, y disgregados en filtros de 70 μm (Cell Strainer, Falcon). Se realizó la lisis de glóbulos rojos mediante la incubación del pellet en buffer NH_4Cl por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los linfocitos fueron sembrados en medio RPMI-1640 suplementado con 10% SFB, 100 U/mL penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomina (RPMI completo) a una densidad de 5×10^5 células/ cm^2 en placas de 96 pocillos, a 37°C y 5% CO_2 , para realizar citometría de flujo.

Citometría de Flujo de Linfocitos de ratones con Encefalitis Autoinmune Experimental *Ex vivo*

Para los análisis de las poblaciones linfocitarias Th17 y Th1, linfocitos de ganglio y bazo cultivados por toda la noche, fueron estimulados con PMA (50ng/mL)/ionomicina (500ng/mL) durante 4 horas, en presencia de brefeldina A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La producción de $\text{IFN}\gamma$ e IL-17, fue evaluada en linfocitos CD4^+ , permeabilizados con el kit *Fixation/Permeabilization* (BD, Pharmigen). Los anticuerpos utilizados fueron Rat-anti Mouse CD4-PeCy5 , IL-17-PE, $\text{IFN}\gamma$ -FITC.

Obtención de RNA total de Sistema Nervioso Central

Cerebros y médula espinal de ratones con EAE, tratados o no con MSCs, fueron extraídos en seco, y luego embebidos en Trizol (Invitrogen). Las muestras fueron disgregadas con un vástago en microtubos de 1,5 mL, para luego extraer RNA mediante separación de fases orgánica/acuosa con cloroformo. La precipitación, pureza e integridad de las muestras se realizó de la misma forma indicada en el punto anterior.

Obtención y Cultivo de Linfocitos CD4^+ en condiciones polarizantes a la estirpe Th17

Los linfocitos fueron obtenidos a partir de bazo de ratones C57BL/6 de 8 a 10 semanas de edad. Las células fueron centrifugadas por 6 min a 1680 rpm y resuspendidas en PBS. Para eliminar los glóbulos rojos presentes, las células fueron incubadas por 5 min, con agitación periódica, en tampón de

lisis (0.16 M NH₄Cl, 10nM KHCO₃, 0.13 mM EDTA), luego lavadas y resuspendidas en PBS-EDTA 2mM. Las células CD4⁺ fueron purificadas de los linfocitos de bazo utilizando un kit comercial (Miltenyi Biotec).

Las células T CD4⁺ fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen) suplementado con 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomicina, a 37°C con 5% de CO₂ atmosférico y a una densidad de 2 x10⁶ células por ml en placa de 24 pocillos (Corning). Las células fueron cultivadas en presencia de anticuerpos anti CD3 (3.5 µg/ml) y anti CD28 (1.5 µg/ml) (Beckton Dickinson), para inducir su activación y proliferación. Los linfocitos fueron diferenciados hacia Th17 mediante un cóctel de citoquinas que incluye 50 ng/ml de IL-6 (R&D Systems), 5 ng/ml de TGF-β1 (BioVision USA), 2.5 µg/ml de anticuerpos anti IFN-γ y de anti IL-4 (ambos BD Bioscience) por 6 días.

Obtención de RNA total de cultivo de linfocitos Th17

Los linfocitos fueron resuspendidos centrifugados a 2010 rpm durante 15 minutos a 4°C para recuperar el pellet de células. Este fue resuspendido en Trizol, en proporción 1 mL de Trizol por cada 2,5x10⁶ células (Invitrogen). Luego de agitar enérgicamente e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, el RNA se extrajo mediante separación de fases orgánica/acuosa, con cloroformo, y luego fue precipitado con isopropanol. El RNA se dejó precipitar en etanol 70% a -20°C durante 3 días, y luego se almacenó en agua DEPC a -80°C. La pureza del RNA extraído se diagnosticó mediante la absorbancia a 260/280 nm en Nanodrop 2000 (Thermo).

RT-PCR, PCR en Tiempo Real

Para determinar la infiltración de linfocitos Th17 en SNC se midió la expresión mRNA de factores de transcripción RORγT, respectivamente, por medio de PCR en tiempo real. 1µg de RNA se utilizó para obtener el cDNA con la enzima Improm II Reverse Transcriptase (Promega), posterior a su tratamiento con DNAsa I (Epicentre), siguiendo los protocolos estandarizados en el laboratorio. El cDNA obtenido se amplificó mediante PCR en tiempo real con la enzima Go Taq qPCR Master Mix (Promega), utilizando el equipo Stratagene, como intercalador SYBERgreen (Promega) y el software MxPro. Los partidores utilizados se describen en la tabla a continuación.

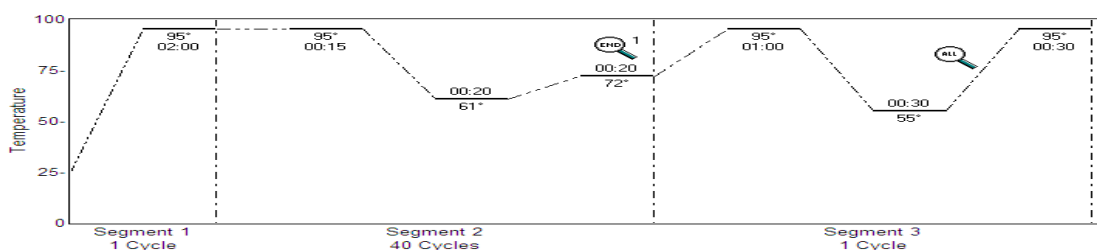
Nombre	Secuencia 5' – 3'	Función
18S S	CGGACAGGATTGACAGATTG	18S RNA ribosomal
18S AS	GTTTAGCGAGGTGGTTGATT	
ROR γ T S	GGAGCTCTGCCAGAATGACC	Factor de transcripción específico del linaje Th17
ROR γ T AS	CAAGGCTCGAAACAGCTCCACAC	

La expresión de ROR γ T se normalizará con 18S como gen constitutivo y todas las reacciones se realizarán por duplicado. Los productos de PCR se visualizarán en geles de agarosa al 2% para verificar el tamaño del fragmento y la especificidad. Para obtener la cantidad relativa de los mRNA en cada muestra se utilizará la ecuación $y=2^{-\Delta\Delta C(t)}$, donde “y” es la expresión relativa, y $\Delta\Delta C(t)$ corresponde a la ecuación,

$$(C(t)_{\text{gen de interés}} - C(t)_{\text{gen constitutivo}})_{\text{muestra}} - (C(t)_{\text{gen de interés}} - C(t)_{\text{gen constitutivo}})_{\text{control}}$$

En donde C (t) es el ciclo en la reacción de amplificación en el cual la fluorescencia aumenta exponencialmente con respecto a la fluorescencia basal.

El patrón de temperaturas utilizado se grafica en la siguiente figura, en donde se grafica la temperatura en grados Celsius. El primer segmento a 95°C es para activar la enzima, el segundo, es para realizar la reacción de PCR en tiempo real, y el tercero, es para realizar la curva de denaturación.



Curvas de Eficiencia

Para evaluar la eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real para los genes 18s y ROR γ T se utilizó cDNA proveniente de los cultivos de linfocitos de bazo en condiciones polarizantes a Th17. La muestra de cDNA fue diluida a diferentes concentraciones, tanto para ROR γ T (diluciones desde 1:5 a 1:1000) como para 18s (diluciones desde 1:50 hasta 1:10000). Los datos de Ct de cada dilución, como el

logaritmo de la dilución fueron graficados para obtener la pendiente de la recta, de donde se calcula la eficiencia mediante la siguiente fórmula

$$\text{Eficiencia} = [10^{-1/\text{pendiente}}] - 1$$

Análisis Estadístico

Se determinó la normalidad de cada resultado con la prueba estadística de Kolmogorov/Smirnow y la distribución de varianzas mediante el Test de Fisher. Posteriormente, se aplicaron los test estadísticos correspondientes a las muestras y análisis. Para comparar curvas de puntaje clínico y de pesos, además de datos no paramétricos, se utilizó el test Mann-Whitney U con el test comparación de Dunns cuando se trataba de varios grupos experimentales. Para la comparación de datos paramétricos se utilizaron el test t Student y ANOVA con post test de comparación de Bonferroni cuando se trataba de diferentes grupos experimentales.

RESULTADOS

Implementación del modelo EAE en ratones C57BL/6.

Con el fin de obtener un modelo de enfermedad EAE de severidad controlada y cronicidad, se realizó una inducción en la que se convinieron dos diferentes concentraciones del péptido MOG₃₅₋₅₅: 30 µg (n=8) y 60 µg (n=6). Aunque la progresión clínica de la enfermedad es significativamente diferente para los grupos experimentales (Figura 1A), los datos clínicos extraídos no lo son. El puntaje máximo alcanzado para los ratones inducidos con 60 µg de MOG₃₅₋₅₅ (4,3±0,3) y el puntaje máximo en el período de incremento exponencial de síntomas (3,9±0,2) es mayor que el observado en ratones inducidos con 30 µg de MOG₃₅₋₅₅ (3,3±0,4 y 3,2±0,3); respectivamente, aunque las diferencias no son significativas. Otros datos, como el día de aparición de síntomas o comienzo de la enfermedad, y el día pico de la enfermedad, no difieren entre los diferentes grupos experimentales (Tabla 1B), por lo que la diferencia en las dos inducciones radica sólo en la intensidad de la enfermedad, dependiente de la concentración de MOG₃₅₋₅₅.

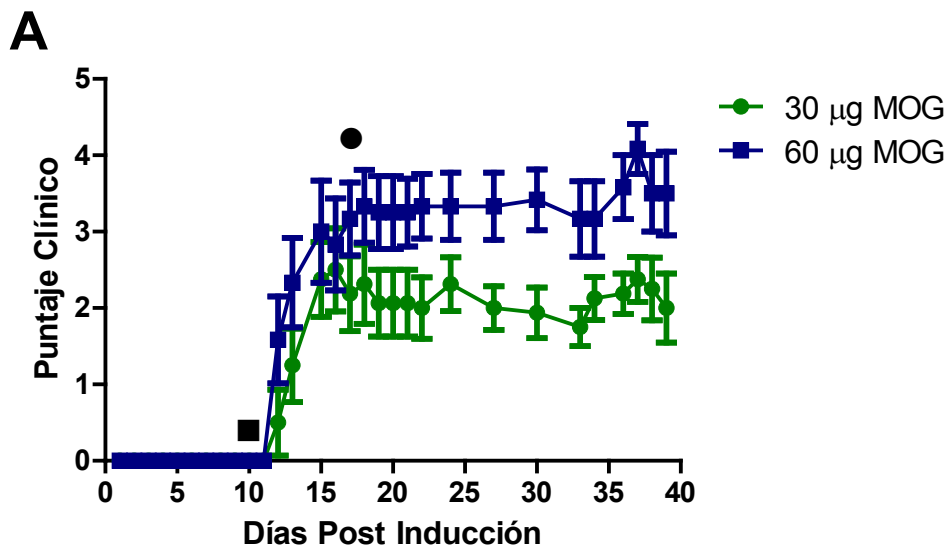
Con estos resultados, y experiencias anteriores en el laboratorio, se decidió inducir a los ratones con inyecciones de 50 µg de MOG₃₅₋₅₅, emulsionados en CFA y 4 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. Además, se establecieron los diferentes tiempos para tratamiento con MSCs, previo a la aparición de síntomas de la enfermedad, término del aumento exponencial de los síntomas o pico de la enfermedad, y en etapa crónica de la enfermedad, con el fin de determinar el efecto de MSCs a diferentes tiempos, en donde se infiere que existen diferentes estados inflamatorios.

Grupos Experimentales

Para observar el efecto clínico que tenía la inoculación de MSCs en diferentes etapas de EAE, con diferentes episodios inflamatorios, se seleccionaron 4 grupos experimentales G1 (EAE sin tratamiento), G2 (EAE tratados con MSCs al día 10 post inducción), G3 (EAE tratados con MSCs al día 18 post inducción) y G4 (EAE tratados con MSCs al día 30 post inducción) (Figura 2). Posterior a la inducción de EAE, de un grupo total de 24 ratones hembra, fueron seleccionados los individuos para los diferentes grupos experimentales G1 (n=5), G2 (n=6), G3 (n=7) y G4(n=6), de los cuales se excluyeron, en total, 2

ratones, pertenecientes a los grupos G3 y G4, debido a anomalías presentadas en el transcurso del experimento (Figura 3A).

**CURVAS DE PUNTAJE CLÍNICO PARA DOS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE
MOG₃₅₋₅₅**



B

	30 µg MOG ₃₅₋₅₅	60 µg MOG ₃₅₋₅₅
Ratones inducidos	8	6
Puntaje Máx. Alcanzado (X ± ES)	3,3±0,4	4,3 ±0,3
Día de aparición de síntomas (X±ES) ■	13,0±0,3	12,5±0,3
Último día de incremento exponencial de síntomas (X±ES) ●	17,4±1,2	17,0±1,3
Puntaje pico (X±ES)	3,2 ±0,3	3,9 ±0,2
Área bajo la curva (X±ES)	53,81 ± 7,69	85,88 ± 10,87
Incidencia	8/8	6/6
Mortalidad	0/8	1/6

Figura 1: Comparación de la progresión clínica del EAE comparando dos concentraciones de MOG₃₅₋₅₅. (A) Curvas de puntaje clínico para inducciones de EAE con 2 diferentes concentraciones de MOG₃₅₋₅₅, 30µg (n=8) y 60 µg (n=6). El aumento exponencial de los síntomas comienza con el inicio de estos (■), y la enfermedad comienza a ser crónica y estable desde el día 17, aproximadamente (●). Las curvas son significativamente diferentes ($p < 0,05$; *Test Mann-Whitney U*). (B) Tabla con diferentes parámetros clínicos observados en las dos inducciones. No hay diferencias significativas entre los datos clínicos de los dos grupos experimentales.

DISEÑO EXPERIMENTAL

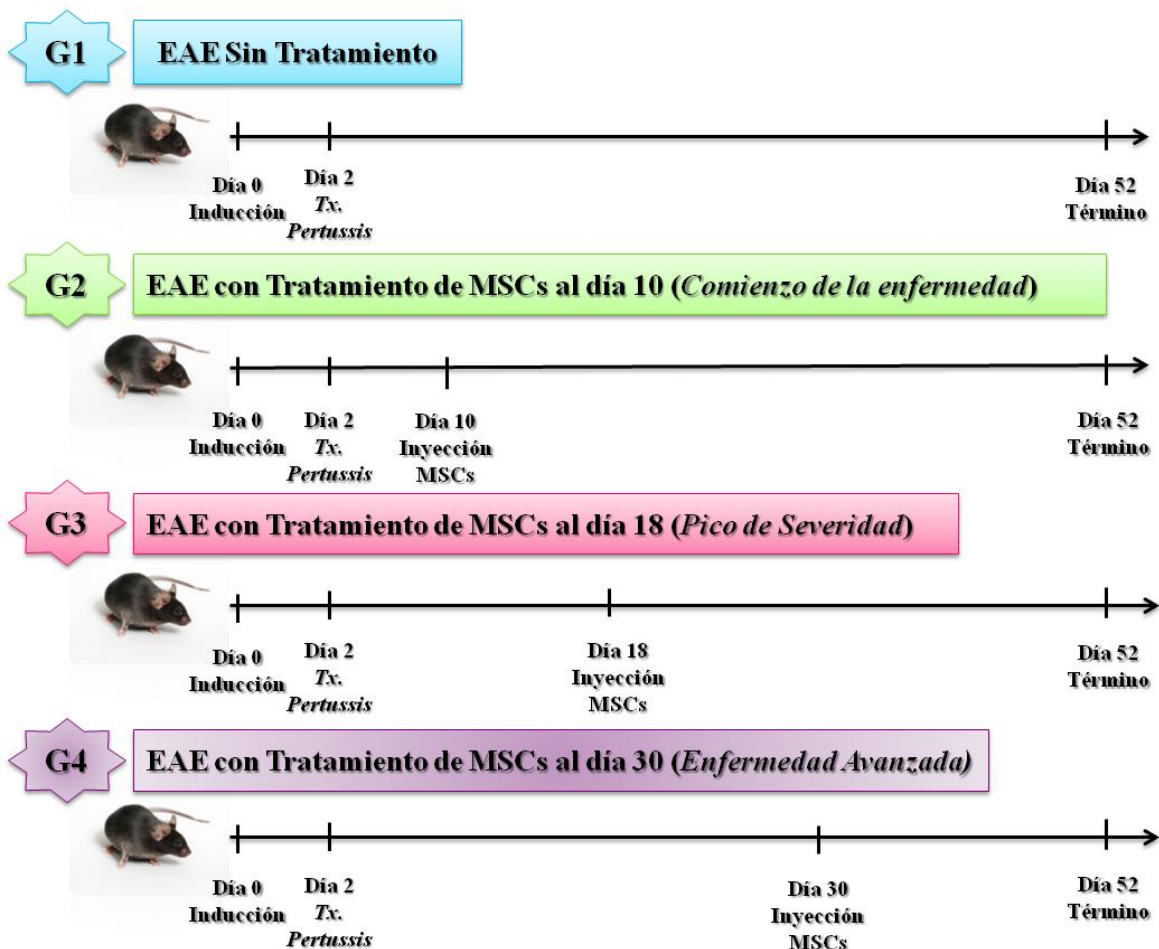


Figura 2: *Diseño experimental.* Ratones C57BL/6 fueron inducidos con 2 inyecciones subcutáneas de 50 μg de MOG₃₅₋₅₅ emulsionados con 4 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA en CFA, y posteriores inyecciones de 350 ng de toxina pertúsica, a las 2 y 48 horas después de las inyecciones de MOG₃₅₋₅₅. El tratamiento con MSCs se realizó mediante una inyección intravenosa de 100 μL de PBS 1x estéril que contenía 1 millón de MSCs. Los grupos experimentales se definieron según los días de inyección, G1) EAE sin tratamiento; G2) EAE con tratamiento de MSCs al día 10 o comienzo de la enfermedad; G3) EAE con tratamiento de MSCs al día 18 o pico de la enfermedad; y G4) EAE con tratamiento de MSCs al día 30 o enfermedad avanzada.

Progresión Clínica de EAE en los diferentes grupos experimentales.

Con el fin de evaluar el efecto de las MSCs sobre el estado clínico de los grupos experimentales, el puntaje clínico de cada ratón fue estimado diariamente. El puntaje clínico es una forma de evaluar y registrar la severidad y características de la enfermedad inducida, la cual luego se compara para notar diferencias entre distintos grupos experimentales. En la Figura 3A se indican los diferentes parámetros clínicos observados, siendo el puntaje máximo alcanzado un indicador del extremo de la severidad de la enfermedad en cada grupo experimental. Aunque el grupo G4 presenta mayor puntaje máximo alcanzado ($3,7 \pm 0,27$), este valor no es significativamente mayor al resto de los grupos experimentales G1, G2 y G3 ($3,3 \pm 0,82$; $3,0 \pm 1,05$; $2,9 \pm 0,80$; respectivamente). El área bajo la curva provee información referida a los niveles de severidad de la enfermedad alcanzados por los diferentes grupos experimentales. Los valores del área bajo la curva para los grupos G1, G2, G3 y G4 son $69,11 \pm 12,32$; $53,29 \pm 12,57$; $55,95 \pm 4,81$ y $83,51 \pm 13,01$ respectivamente, sin observarse diferencias significativas entre ellos. Con ambos datos podemos observar una tendencia de aumento de la severidad de la enfermedad relacionado con el día de tratamiento: ratones tratados al día 10 (G2) y al día 18 (G3) presentan menor severidad a que el control sin tratamiento, y el control sin tratamiento, presenta menor severidad que ratones tratados al día 30 (G4) (Figura 3B).

La curva de puntaje clínico del grupo G2 es diferente a la curva del control G1 ($p < 0,05$), y se observa menor severidad de la enfermedad en la curva del grupo G2 comparado con G1 (Figura 4A). No se observaron diferencias significativas entre G3 y G1 (Figura 4B), pero si con el grupo G4 ($p < 0,05$) (Figura 4C) (*Test Mann-Whitney U*). En este último grupo experimental se observa un puntaje pico más alto que el control en donde radica la diferencia significativa en las dos curvas, por lo tanto, se analizaron los datos desde el momento de la inyección de MSCs, en donde G1 y G4 eran dos grupos homogéneos. Se analizó el área bajo la curva de estos grupos desde el día 30 hasta el final del experimento, y aunque no hay una diferencia significativa, si se observa una tendencia de aumento del área bajo la curva del grupo G4 sobre el grupo G1 (*Test t student*) (Figura 5).

Estos resultados indican que, a pesar de que la inyección de MSCs antes del comienzo de la enfermedad (G1) puede ser efectiva en la disminución de signos clínicos, puede no tener efecto, como generar un empeoramiento clínico de la enfermedad, dependiendo del momento del tratamiento en la enfermedad.

TABLA DE PARAMETROS CLÍNICOS PARA CADA GRUPO EXPERIMENTAL

A

	EAE (G1)	EAE MSC d10 (G2)	EAE MSC d18 (G3)	EAE MSC d30 (G4)
Nº Ratones inducidos (n)	5	6	7	6
Puntaje máx. alcanzado (x ±DE)	3,3 ± 0,82	3,0 ± 1,05	2,9 ± 0,8	3,7 ± 0,27
Incidencia	5/5	6/6	7/7	6/6
Ratones excluidos	0	0	1	1
Mortalidad	0	0	0	0
Puntaje clínico acumulado (x ±ES)	61,40±10,14	48,50±11,08	49,42 ± 4,01	74,90±11,15
Área bajo la curva de puntaje clínico (x±ES)	69,11 ±12,32	53,29±12,57	55,92 ± 4,81	83,51±13,01

ÁREA BAJO LA CURVA DE PUNTAJE CLÍNICO DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL

B

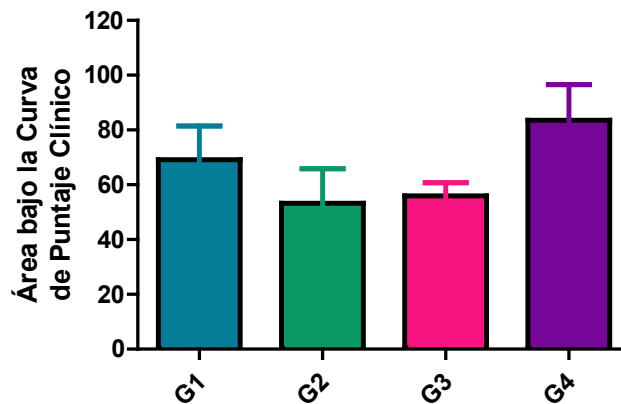


Figura 3: *Parámetros clínicos analizados para los diferentes grupos experimentales. (A) Tabla con diferentes parámetros clínicos observados en los diferentes grupos experimentales. No se observan diferencias significativas (ANOVA, Post Test de comparación Bonferroni). (B) Área bajo la curva de progresión de puntaje clínico de los diferentes grupos experimentales (Media ± ES).*

PROGRESIÓN DEL PUNTAJE CLÍNICO PARA LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES

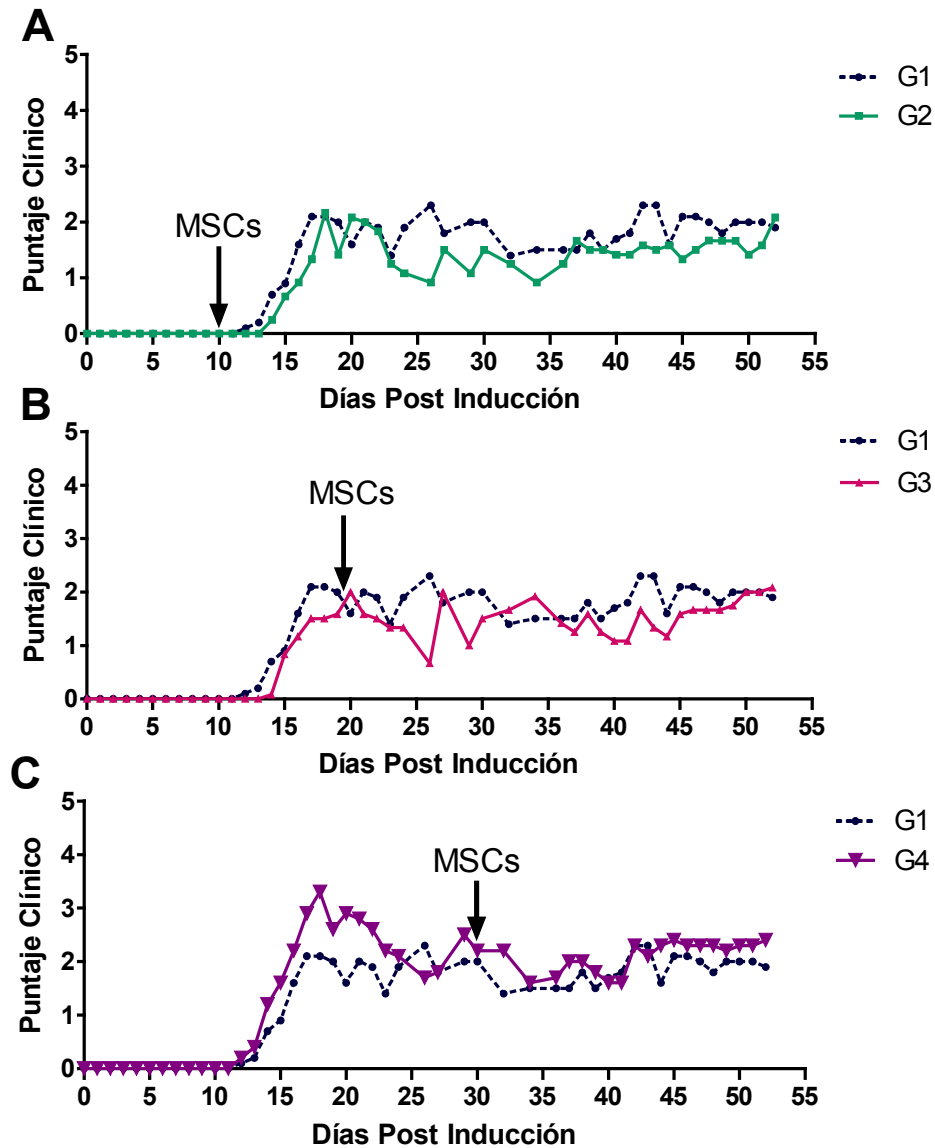


Figura 4: Progresión del puntaje clínico para los diferentes grupos experimentales. (A) Ratones tratados con MSCs al día 10 comparados con el control sin tratamiento ($p < 0,05$). (B) Tratamiento con MSCs al día 18 comparado con el control; (C) Tratamiento con MSCs al día 30, comparado con el control ($p < 0,05$) (Test Mann-Whitney U, Post test de comparación de Dunns).

ÁREA BAJO LA CURVA DE PUNTAJE CLÍNICO DESDE EL DÍA 30 POST INDUCCIÓN EN LOS GRUPOS G1 Y G4

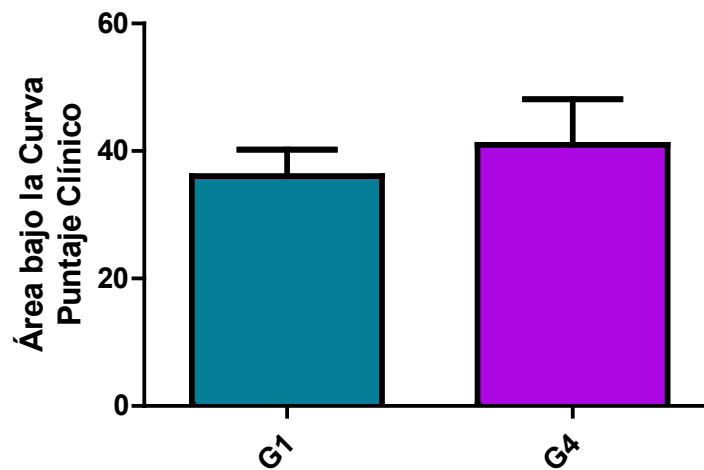


Figura 5: Área bajo la curva de G1 y G4, desde el día 30 post inducción. Área bajo la curva promedio de los grupos experimentales G1 y G4, para comparar la gravedad de la enfermedad en los dos grupos luego de la inyección de MSCs al día 30 en el grupo G4.(X±ES) (*Test t student*)

Cambios de peso como indicadores de Enfermedad.

El peso de cada ratón fue registrado diariamente, para luego realizar una razón entre el peso de cada día post inducción y el peso inicial. Este es un indicador de cuanto se ve afectado el grupo experimental tanto por la enfermedad inducida como por el tratamiento con MSCs a diferentes tiempos. Para poder comparar, un grupo de ratones sanos fue alimentado bajo el mismo protocolo de alimentación de ratones con EAE y evaluado en conjunto con los grupos experimentales. Todos los grupos de ratones inducidos presentan una disminución significativa de peso en comparación con los ratones sanos ($p < 0,001$; ANOVA) (Figura 6A). El grupo G2 presenta una disminución de peso significativa, constante ($p < 0,05$), y representada por una curva de diferente comportamiento a la del grupo control G1: aunque la disminución inicial tiene menor pendiente, la razón de pesos se mantiene menor que 1, y siempre mayor que el control EAE (Figura 6B). La curva de razón de pesos de G3 presenta un comportamiento similar a G1 (Figura 6C), sin embargo, luego de la recuperación de peso observada en ambas curvas entre los días 15 y 20 post inducción, el grupo con tratamiento de MSCs mantiene un peso significativamente mayor que el control ($p < 0,001$, ANOVA). El grupo G4 es, hasta el día 25, de igual comportamiento que G1, sin embargo existe un aumento significativo en la razón de pesos al día 30, día en que se inoculan las MSCs, que es mantenido en el tiempo hasta el final del experimento ($p < 0,05$, ANOVA) en donde se observa una disminución (Figura 6D).

La enfermedad genera bajas de peso significativas en los ratones, comparado con un grupo de ratones sanos alimentados con el mismo cuidado que los ratones EAE. En la curva razón de pesos de G1, se observa que entre los días 10 y 20 existe un pico de aumento de peso, que a los días siguientes comienza a disminuir nuevamente. Esto también se observa en los grupos G3 y G4.

Se puede observar en el grupo G2 que las MSCs generan una disminución de peso paulatina con respecto a un control sin tratamiento, en que la disminución de peso es mucho más repentina. En los grupos G3 se observa que la inyección de MSCs es capaz de mantener el aumento de peso ocurrido entre los días 10 y 20 con respecto al control G1, aunque permanezcan bajos con respecto a controles sanos. En G4, se observa que el aumento de pesos ocurrido entre los días 10 y 20 vuelve a bajar, al igual que en el control G1, sin embargo, vuelve a ocurrir un aumento al día 30, día en que se inyectan las MSCs. Estas MSCs no son responsables del aumento de peso, pero sí de la mantención de esta tendencia en los días siguientes.

CAMBIOS DE PESO EN LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES

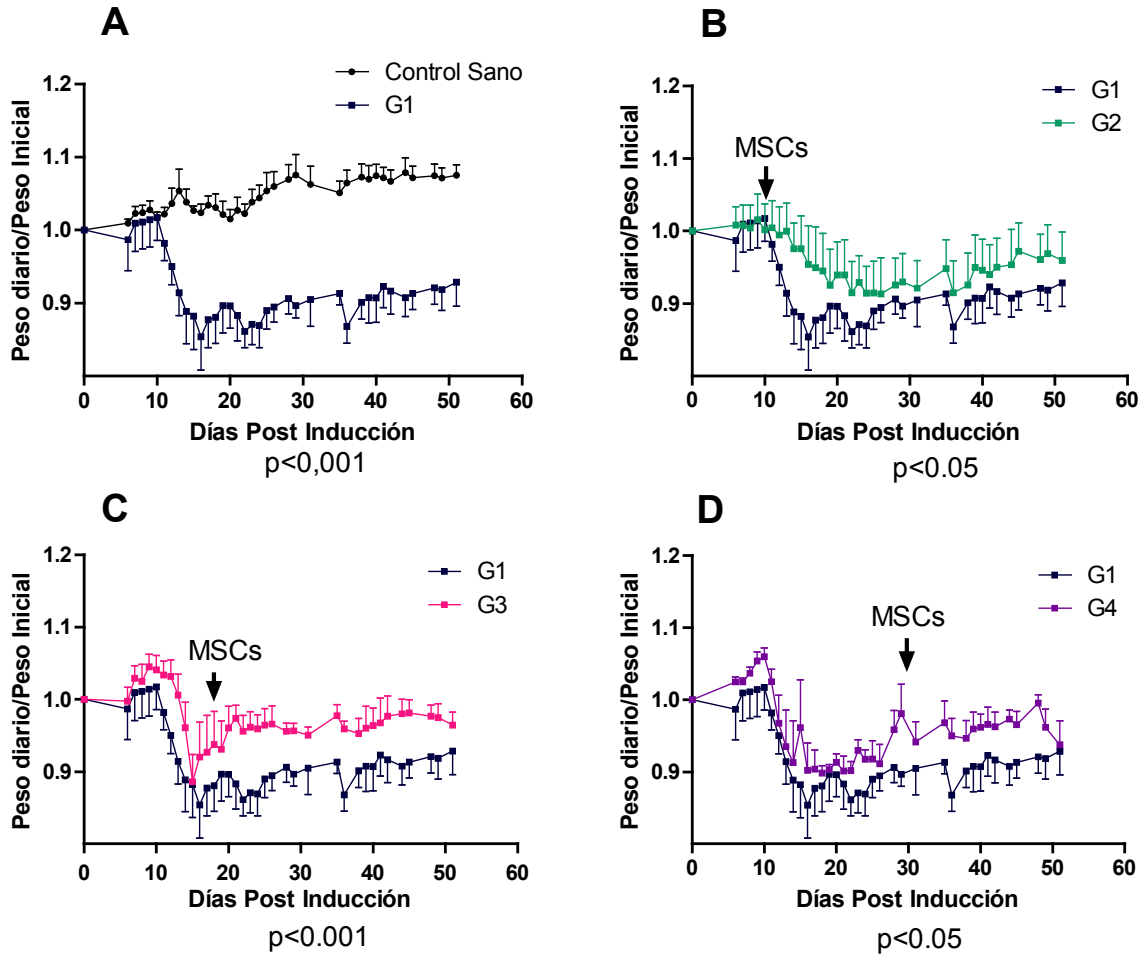


Figura 6: Cambios de peso en los grupos experimentales. (A) Razón peso diario registrado: peso inicial de ratones sin tratamiento comparado con ratones sanos bajo el mismo protocolo de alimentación ($p < 0,001$). (B) Ratones tratados con MSCs al día 10 comparados con control sin tratamiento ($p < 0,05$). (C) Ratones tratados con MSCs al día 18 comparados con control sin tratamiento ($p < 0,001$). (D) Ratones tratados con MSCs al día 30 comparados con control sin tratamiento ($p < 0,05$). ($X \pm ES$) (*Test Mann-Whitney U*, *Post test de comparación de Dunns*)

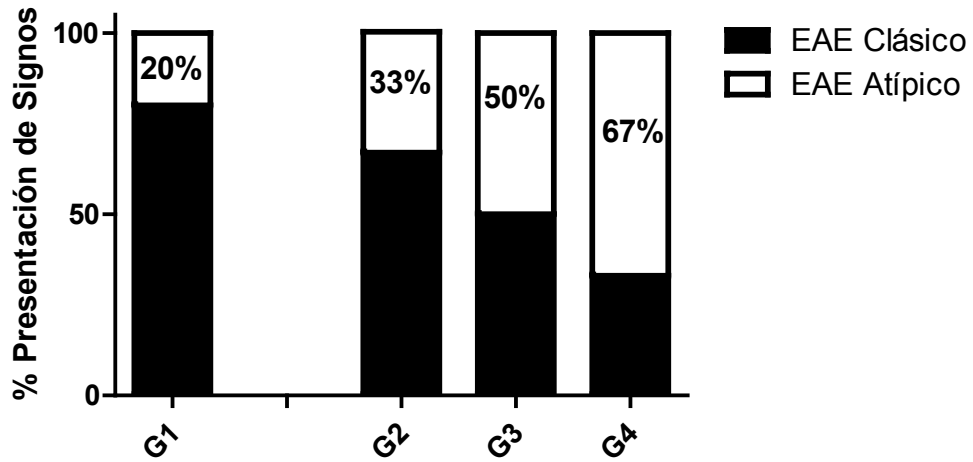
Aumento de presentación de Signos Atípicos en ratones inducidos.

Ratones inducidos con EAE, tanto tratados como no tratados con MSCs, presentaron de forma irregular signos clínicos atípicos de EAE, asociados a la infiltración de linfocitos Th17 al cerebro (Domingues et al, 2010; Stromnes et al, 2008). Este comportamiento fue registrado diariamente, en conjunto con el puntaje clásico, con el fin de evaluar si este comportamiento se veía aumentado en presencia de MSCs. En el grupo control G1, sin tratamiento de MSCs, sólo el 20% de los ratones presentó signos atípicos. Sin embargo, luego de la inyección de MSCs, un 33% del grupo G2, un 50% de G3 y un 67% en el grupo G4 presentó signos atípicos durante un tiempo prolongado (Figura 7).

Estos datos nos indican que la inyección de MSCs provoca signos clínicos atribuidos, por otros autores, a la infiltración de linfocitos Th17 en el cerebro de ratones con EAE. Además, podemos observar que mientras más tarde se inyectan las MSCs, el porcentaje de ratones con signos atípicos durante un tiempo prolongado aumenta.

PRESENTACIÓN DE SIGNOS ATÍPICOS EN DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES

A



B

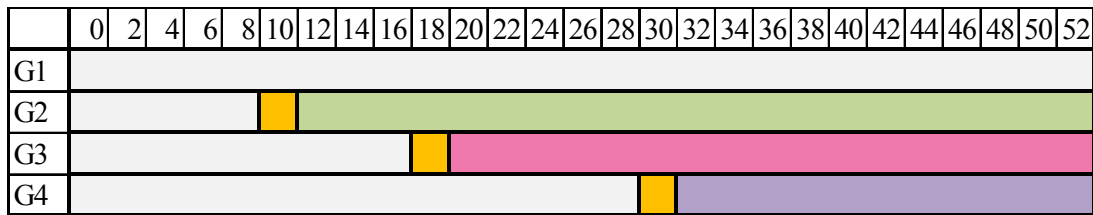


Figura 7: *Presentación de signos de EAE atípico.* Ratones inducidos con EAE en los diferentes grupos experimentales presentaron signos atípicos de forma progresiva después de la inyección de MSCs. A) Se observa que mientras más tardía es la inyección de MSCs en el transcurso de la enfermedad, aumenta la presentación de signos clínicos de la enfermedad atípica causada por la infiltración de Th17 al cerebro de los ratones de cada grupo experimental. B) En colores se observa el período post inyección donde se registraron los signos atípicos, siendo el cuadro amarillo el día de la inyección de MSCs.

Estudio de Linfocitos Th1 y Th17 en bazo y nódulos linfáticos *ex vivo*

Con el objetivo de estudiar el efecto de las MSCs sobre linfocitos Th1 y Th17, se realizó citometría de flujo de linfocitos provenientes de bazo y nódulos linfáticos de ratones de los diferentes grupos experimentales, los cuales fueron cultivados durante la noche sin estímulos externos. Al finalizar el cultivo, las células fueron estimuladas con PMA/Ionicina con el fin de aumentar la producción intracelular de citoquinas en las células del cultivo, y con Brefeldina A, para evitar la secreción de estas al medio. Las células fueron luego incubadas con anticuerpos conjugados con fluoróforo, CD4-PECy5, IFN γ -FITC e IL17-PE. Las células analizadas, tanto en bazo como en nódulos linfáticos, fueron seleccionadas desde las que marcaban CD4⁺. Luego se analizaron las diferentes subpoblaciones Th1 (CD4⁺ IFN γ ⁺ IL-17⁻), Th17 (CD4⁺ IFN γ ⁻ IL-17⁺) y células doble positivas (CD4⁺ IFN γ ⁺ IL-17⁺) (Figura 8). Los resultados obtenidos se describen a continuación.

1. Linfocitos en bazo

No se observan diferencias significativas en los porcentajes de linfocitos Th1, sin embargo, se observa que los valores promedio de ratones del grupo G1 y G2 son mayores que los grupos G3 y G4. Ratones sanos también tienen un alto porcentaje de linfocitos Th1 (Figura 9A). Con respecto a linfocitos Th17, no se observan diferencias significativas ni tendencias lógicas para ninguno de los grupos experimentales (Figura 9B).

Aunque no se observan diferencias significativas en linfocitos dobles positivos, si se observa que existen mayor dispersión en los grupos G3 y G4, mientras que los grupos G1 y G2, en conjunto con el control sano, son valores estables y bajos (Figura 9C).

Con el fin de evaluar el balance entre linfocitos Th1 y Th17, y observar el efecto de MSCs en este, se estudió la razón de linfocitos Th17 sobre linfocitos Th1. En bazo se observa una tendencia de aumento de Th17 sobre Th1, siendo solo significativa la diferencia entre el grupo G4 y los controles sanos ($p < 0,05$; *Test Mann-Whitney U, Post Test de comparación de Dunns*) (Figura 9D).

Las MSCs no generan un efecto significativo en linfocitos Th17 de bazo, sin embargo, la tendencia al aumento de la razón Th17/Th1 es dependiente del día de tratamiento. Además podemos observar que linfocitos de G1 tienen mayor porcentaje de Th1, tal vez indicando un cese del efecto de las MSCs sobre Th debido al tiempo transcurrido entre la inyección y la toma de muestras.

2. Linfocitos en nódulos linfáticos

Las células analizadas como Th1 ($CD4^+ IFN\gamma^+ IL-17^-$), se observan en bajo porcentaje en general y presentan porcentajes similares de linfocitos Th1 en los diferentes grupos experimentales, existiendo mayor dispersión de los datos en los grupos G1, G2 y G3 (Figura 10A). Los linfocitos Th17 ($CD4^+ IFN\gamma^- IL-17^+$) presentan un comportamiento diferente y mucho más variable. Nódulos linfáticos de ratones tratados al día 10 con MSCs (G2) presentan un porcentaje significativamente mayor que ratones sanos ($p < 0,05$; *Test Mann-Whitney U, Post test de comparación de Dunns*). No hay diferencias con respecto a los ratones inducidos con EAE pertenecientes a otros grupos experimentales (G1, G3 y G4) (Figura 10B), sin embargo, la tendencia indica que ratones del grupo G1 y G4 presentan mayor porcentaje de linfocitos Th17 que ratones sanos, y el porcentaje de linfocitos Th17 en G2 tiende a ser mayor que en los grupos G3 y G4. No se observan diferencias significativas cuando se analizan las células doble positivas ($CD4^+ IFN\gamma^+ IL-17^+$) de los diferentes grupos experimentales (Figura 10C).

Todas las razones Th17/Th1 son mayores a 1, expresando el alto porcentaje en nódulos linfáticos de linfocitos Th17. En ratones tratados en la etapa crónica de la enfermedad (G4) se observa un aumento significativo con respecto al grupo G3. Los valores de la razón Th17/Th1 son similares para los grupos control sano G1, G2 y G3, y no existen diferencias significativas entre estos (Figura 10D).

La inyección de MSCs a diferentes tiempos tiene distintos efectos sobre el sistema inmune. En nódulos linfáticos podemos observar que el porcentaje de linfocitos Th1 es bajo y que no se observan efectos de las MSCs en los diferentes grupos experimentales. Con respecto a los linfocitos Th17, podemos observar que ratones con EAE tienen mayor porcentaje que ratones sanos, y que el tratamiento con MSCs aumenta significativamente el porcentaje cuando son tratados al día 10. Además, se puede visualizar que las MSCs inyectadas a tiempos tardíos de la enfermedad generan un aumento del balance Th17/Th1, significativo cuando se compara con G3, grupo que presenta menor porcentaje de Th17. Los valores de la razón Th17/Th1 para el resto de los grupos experimentales son similares.

REGIÓN DE ANÁLISIS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO

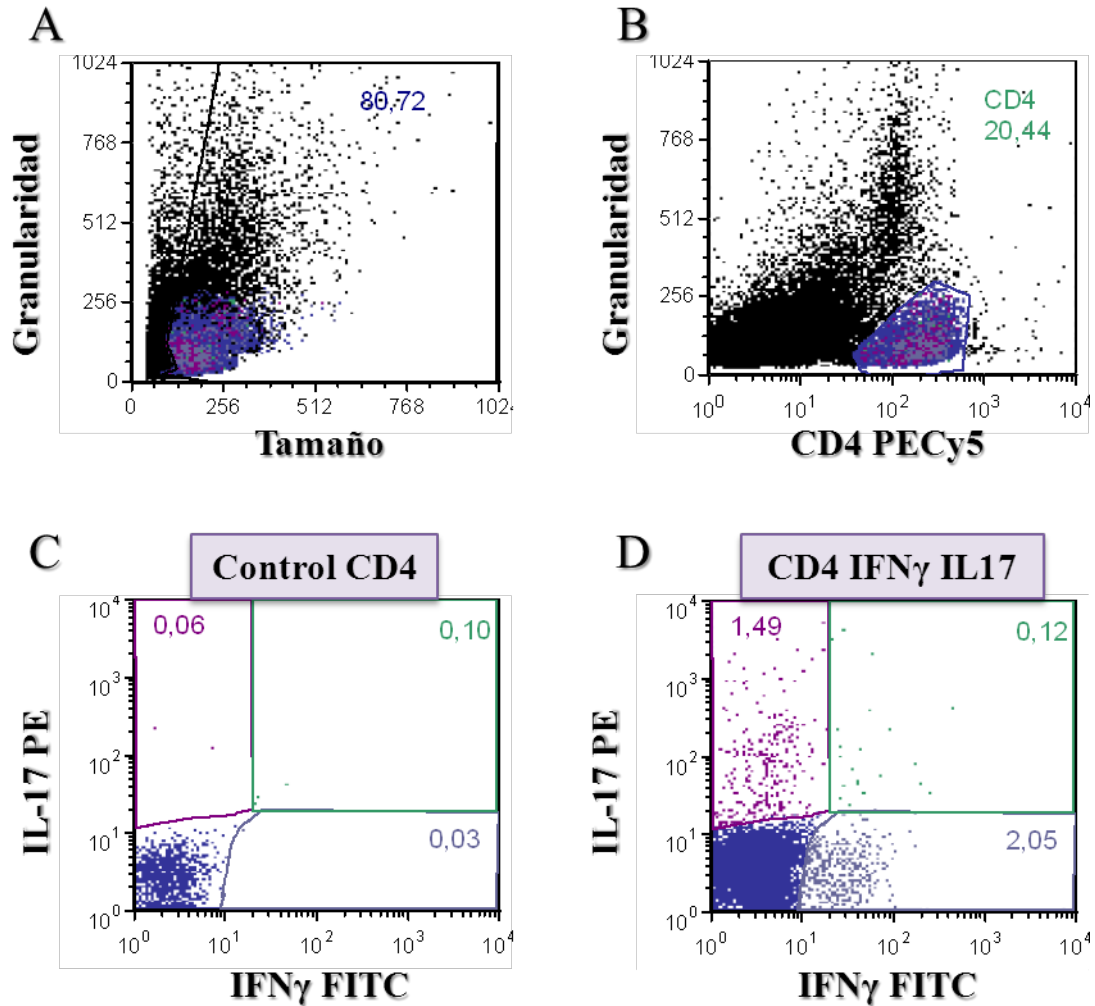


Figura 8: Selección de linfocitos para análisis mediante citometría de flujo. Citometría representativa de una muestra de bazo y la selección realizada para el estudio de linfocitos Th1 y Th17. (A) Selección de Células a analizar, según granularidad y tamaño. (B) Selección de las células CD4⁺. (C) Gráfico de células CD4⁺, para linfocitos marcados sólo con CD4 PE Cy5, como control de tinción. (D) Gráfico de células CD4⁺ para linfocitos marcados con CD4 PE-Cy5, IFN γ FITC y IL-17 PE.

PORCENTAJES DE LINFOCITOS Th1 Y Th17 EN BAZO

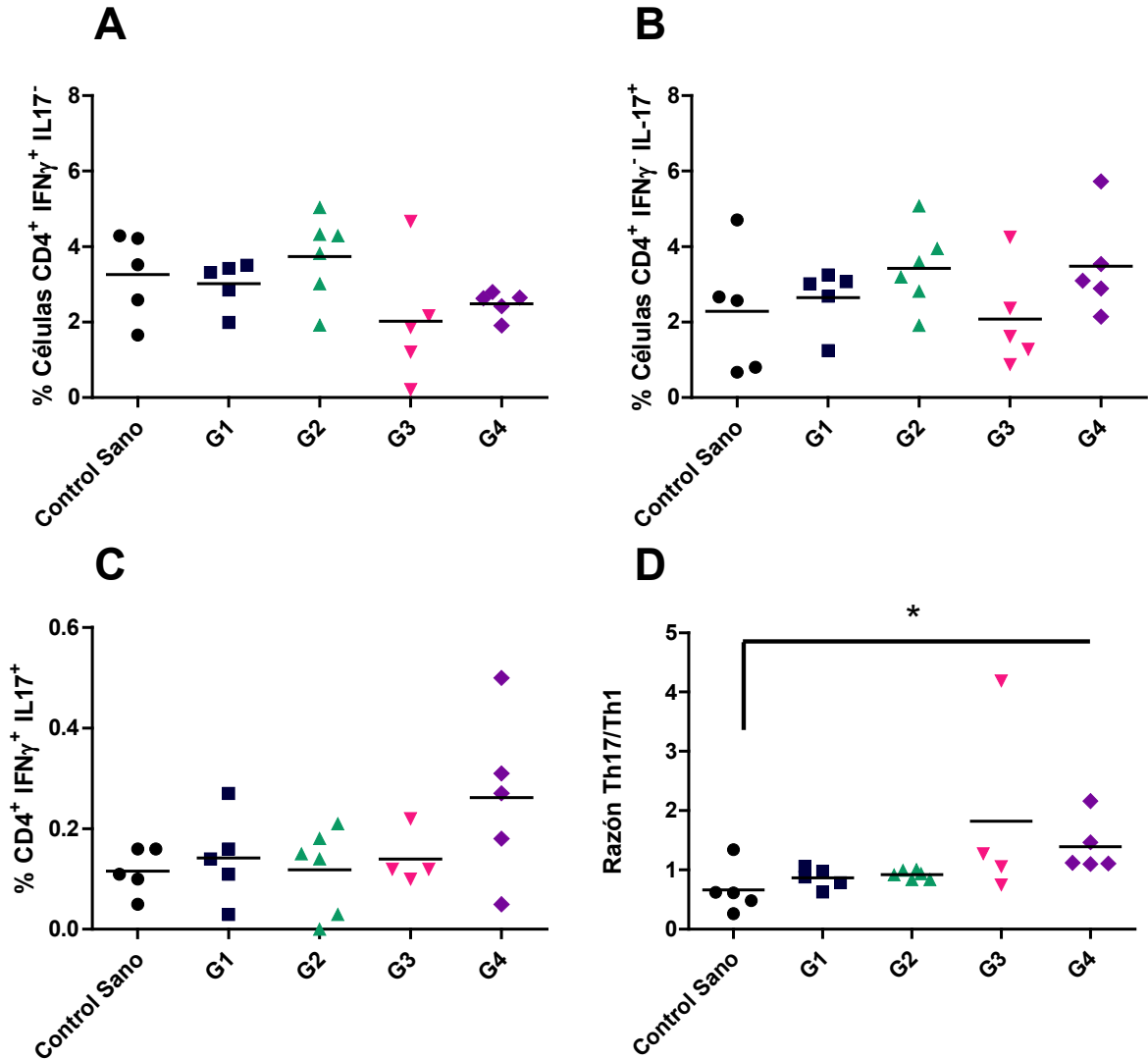


Figura 9: Citometría de flujo en linfocitos extraídos de bazo. (A) Porcentajes de células CD4⁺ IFN γ ⁺ (Th1) en los diferentes grupos experimentales. (B) Porcentajes de células CD4⁺ IL-17⁺ (Th17). (C) Presencia de linfocitos doble positivos (CD4⁺ IL-17⁺ IFN γ ⁺). (D) Razón Th17/Th1 para los diferentes grupos experimentales (*Test Mann-Whitney U, Post Test de comparación de Dunns*).

*p<0,05

PORCENTAJES DE LINFOCITOS Th1 Y Th17 EN NÓDULOS LINFÁTICOS

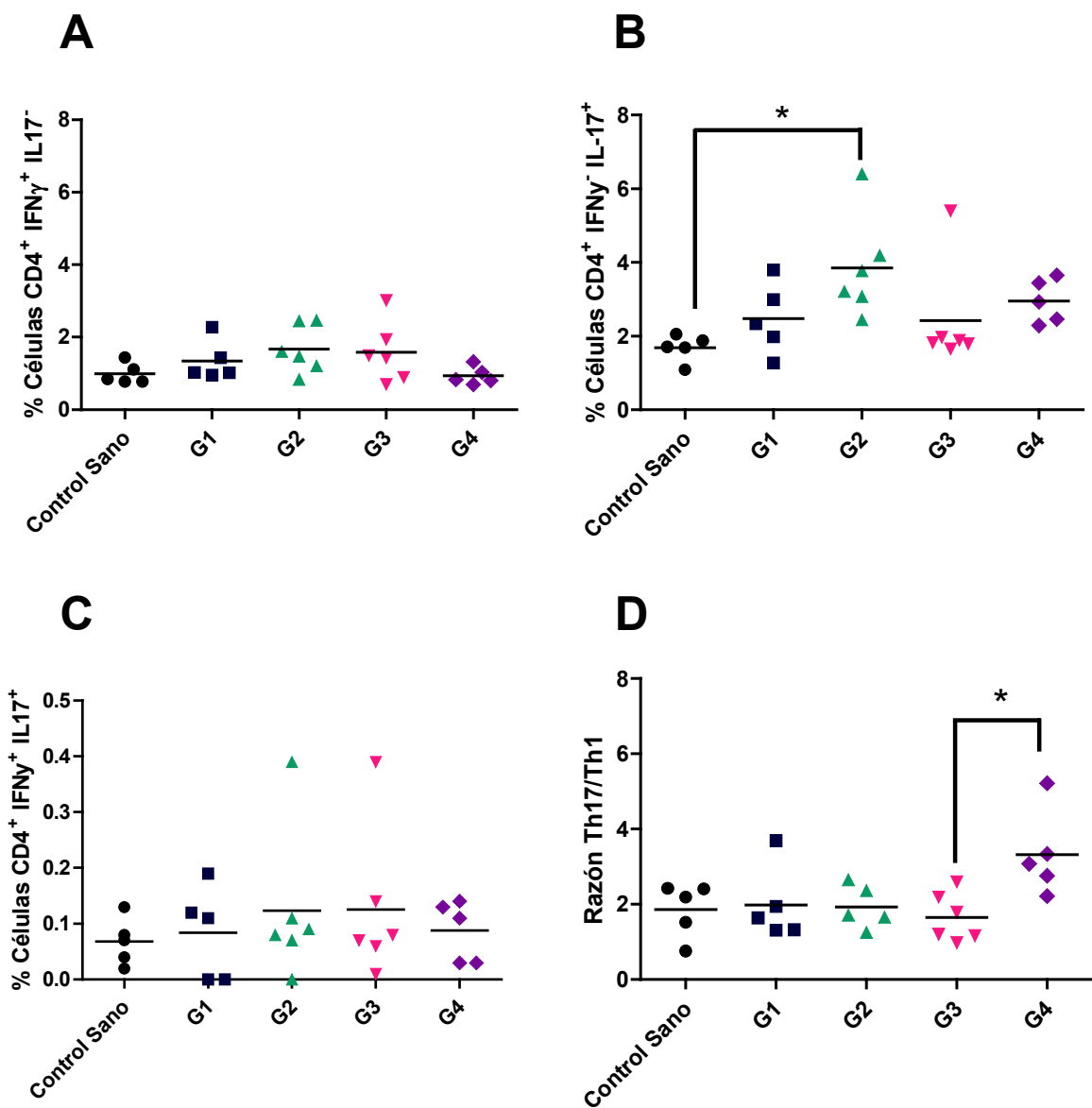


Figura 10: Citometría de flujo en linfocitos extraídos de nódulos linfáticos. (A) Porcentajes de células CD4⁺ IFN γ ⁺ IL-17⁻ (Th1) en los diferentes grupos experimentales (B) Porcentajes de células CD4⁺ IFN γ ⁻ IL-17⁺ (Th17) (*Test Mann-Whitney U, Post Test de comparación de Dunns*). (C) Presencia de linfocitos doble positivos (CD4⁺ IL-17⁺ IFN γ ⁺). (D) Razón Th17/Th1 para los diferentes grupos experimentales. (*ANOVA, Post Test de comparación Bonferroni*).

*p<0,05

Expresión de ROR γ T en Médula Espinal.

Con el fin de evaluar el efecto de MSCs en SNC, y su efecto en la infiltración de linfocitos Th17, se extrajo tanto médula espinal de los ratones de los diferentes grupos experimentales como cerebro, para luego extraer RNA de estas muestras y evaluar la presencia de Th17 mediante la presencia de un marcador específico, el factor de transcripción ROR γ T, mediante PCR en tiempo real.

Se extrajo RNA desde cultivos de linfocitos CD4⁺ en condiciones polarizantes a Th17, y el cDNA obtenido de la reacción de RT PCR de estas muestras fue diluido de manera seriada con el fin de realizar Curvas Estándar para calcular la eficiencia de la amplificación de ROR γ T y 18S, además de asegurar la amplificación del gen con este control positivo. Al ser la eficiencia de ambas reacciones mayores al 90%, se procedió a analizar la presencia de este gen en médulas espinales de ratones de los diferentes grupos experimentales (Figura 11).

Para realizar la reacción de PCR en tiempo real en muestras de médula espinal, se utilizaron diluciones de 1:3 para ROR γ T y 1:500 para 18S, de un total de 2 μ g cDNA, para disminuir la saturación del fluoróforo y mantener la amplificación dentro de los parámetros entregados por la curva de eficiencia. Un total de 23 muestras fue evaluado para este análisis, de las cuales, 4 correspondían a controles sanos, 3 al grupo G1, y 4 para cada grupo de ratones tratados con MSCs (G2, G3, y G4). Las reacciones de PCR en tiempo real fueron analizadas en 2 sets, uno de 15 y el siguiente con 8 muestras, con los mismos parámetros. La amplificación de los genes blanco fue evaluada mediante la incorporación del fluoróforo SYBERgreen (Promega).

La amplificación del gen ROR γ T comenzó en el ciclo 25 de temperaturas aproximadamente para los dos sets (Figura 12), sin embargo, algunas muestras presentaron amplificación inespecífica, por lo que fueron eliminadas del análisis final, punto que será discutido más adelante. La amplificación del gen 18S comenzó alrededor del ciclo 10 de temperaturas, sin observarse amplificaciones inespecíficas (Figura 13).

Las curvas de denaturación muestran la temperatura a la cual los productos de PCR formados durante la reacción se comienzan a denaturar. Este tipo de ensayo nos muestra si el producto amplificado es el correcto y si hay más de un producto en una muestra, demostrando amplificación inespecífica. La temperatura de denaturación alcanzada, para el gen 18S es de 82,7°C, y para ROR γ T es de 84,7°C (Figura 14), como era lo esperado según lo establecido en el diseño de partidores. Las curvas de denaturación para las muestras que presentaron amplificación inespecífica muestran que existe un producto que es capaz de denaturar a menores temperaturas que el templado que deseamos obtener. Esto

ocurre tanto en las muestras del set 1 como en el set 2 y puede deberse a dímeros de partidores (Figura 15).

Las muestras pasaron por un gel de agarosa 2% con el fin de chequear el tamaño del amplificado observado en el PCR en tiempo real. Se puede observar que para la amplificación por PCR en tiempo real del gen ROR γ T, mientras la mayoría de las muestras presentan el mismo tamaño de templado existen muestras (3, 8 19, 21 y 22) que presentan amplificación inespecífica de productos, que pueden ser dímeros de partidores, por lo que fueron excluidos del análisis final. Además, el control sin templado (NTC) también presenta amplificación, denotando la existencia de una contaminación (Figura 16). Se realizó igual evaluación para los productos de PCR obtenidos de la reacción para el gen 18S, en los cuales no se observa amplificación inespecífica, pero si amplificación en uno de los controles NTC (Figura 17)

La reacción de PCR, en el control NTC, generó amplificación a partir del ciclo 34 para ROR γ T y a partir del ciclo 30 para 18S, por lo que para evaluar la confiabilidad de los resultados obtenidos, se realizó un análisis estadístico, como recomienda el manual del equipo (Stratagene). Para que nuestros datos sean confiables, debe existir diferencias significativas entre el ciclo de amplificación de las muestras con el control NTC. La diferencia es significativa en los dos casos, tanto para la reacción de PCR para el gen ROR γ T ($p < 0,001$; test t student) como para 18S ($p < 0,001$; test t student), por lo que nuestros datos son confiables.

El resultado obtenido en un ratón sano fue utilizado como calibrador para los análisis de todas las muestras mediante el cálculo de expresión relativa con el Método de delta- delta Ct, que expresa la expresión de la muestra en proporción al control. Ratones sanos ($n=4$) y del grupo G1 ($n=2$) no presentan un incremento con respecto al control sano ya que ambas razones presentan valores cercanos a 1 ($1,17 \pm 0,16$ y $1,29 \pm 0,07$ respectivamente), sin embargo, se observa que en todos los ratones tratados con MSCs, aumenta la razón de la expresión relativa de ROR γ T, siendo el aumento más notorio en G2 ($3,67 \pm 1,06$ veces por sobre el control) ($n=4$), luego G3 ($2,86 \pm 1,18$ veces por sobre el control) ($n=4$) y finalmente G4 ($2,5 \pm 1,12$ veces por sobre el control) ($n=4$). Aunque las diferencias no son significativas, se observa que ratones tratados mucho antes con MSCs tienen mayor expresión de ROR γ T que ratones tratados a tiempos más tardíos. Una tendencia similar se observa también en los porcentajes de células secretoras de IL-17A en nódulos linfáticos pero no en bazo.

CURVAS DE EFICIENCIA PARA PCR EN TIEMPO REAL

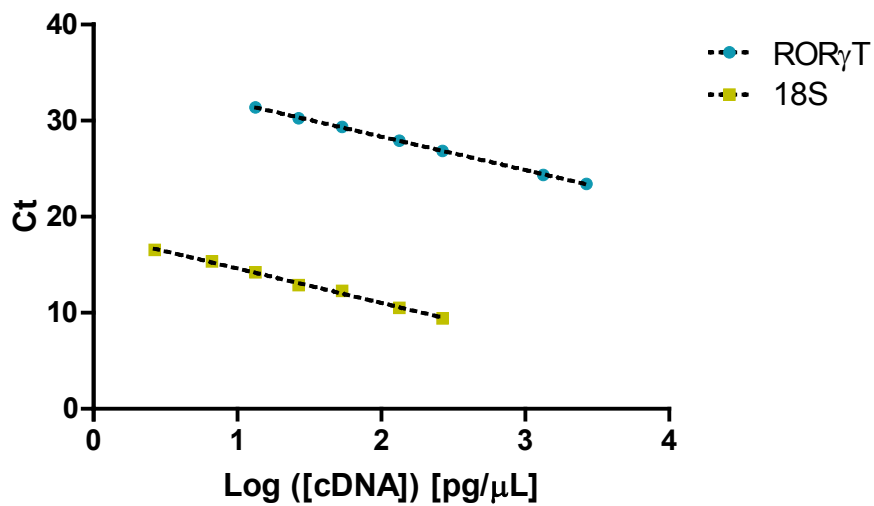


Figura 11: *Curvas de eficiencia para PCR en tiempo real para ROR γ T y 18S.* Curva realizada con diferentes diluciones seriadas de cDNA de concentración desconocida con partidores de segmentos pertenecientes a los genes 18S (1:50 hasta 1:10000) y ROR γ T (1:5 hasta 1:1000). La pendiente de la curva de eficiencia de 18S tiene como ecuación de la recta: $y=-3,59x+18,19$; por lo que la eficiencia de amplificación de este gen es de un 90,0455%. La ecuación de la recta perteneciente a la curva de eficiencia de ROR γ T es $y=-3,48x+35,29$, por lo que la eficiencia de amplificación de este gen es de un 93,9073%.

CURVAS DE AMPLIFICACION ROR γ T

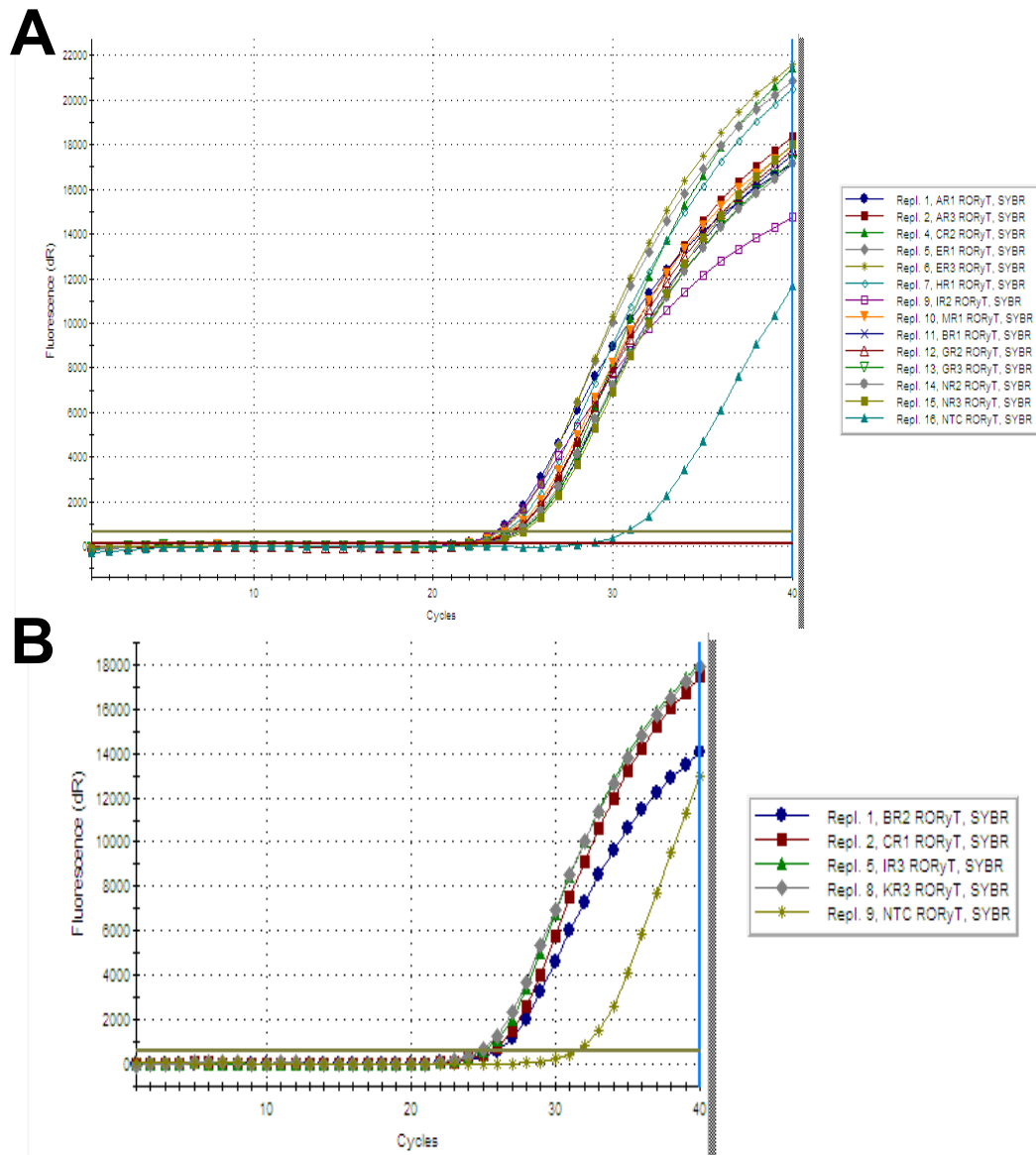


Figura 12: *Curvas de amplificación para gen ROR γ T en muestras de médula espinal.* El estudio de la presencia de linfocitos Th17 en médula espinal se realizó mediante el análisis de la expresión de ROR γ T mediante PCR en tiempo real. Esto se realizó en dos partes, de donde se extraen las curvas presentadas. En el primer set se analizaron 15 diferentes muestras de médula espinal, mientras que en la segunda se analizaron 8. El aumento de fluorescencia se observa alrededor del ciclo (Ct) 25 en adelante.

CURVAS DE AMPLIFICACIÓN 18S

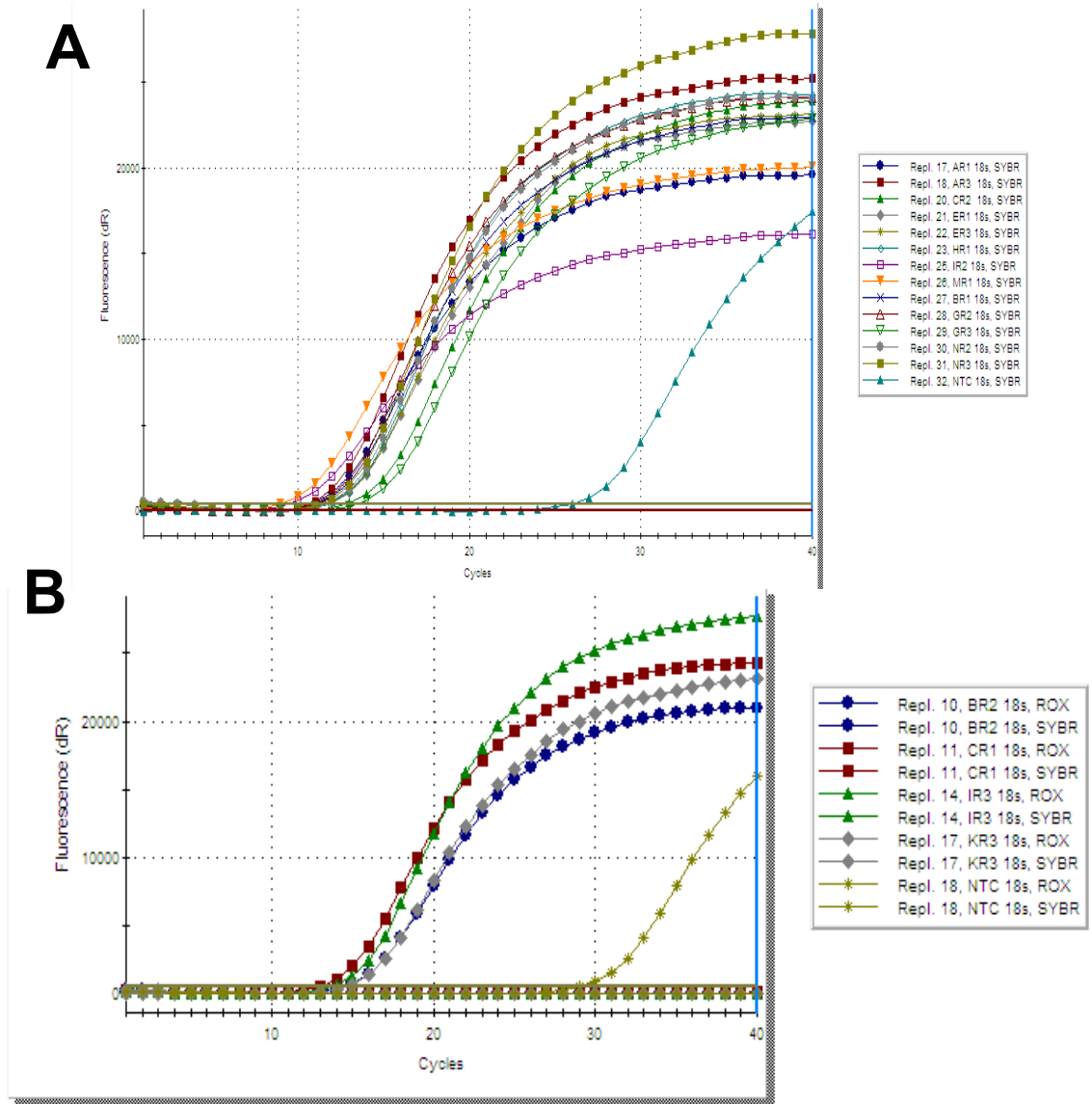


Figura 13: Curvas de amplificación para gen 18S. El análisis cuantitativo relativo de la expresión de ROR γ T se realizó utilizando como gen constitutivo 18S. Las reacciones de PCR en tiempo real para el gen 18S fueron realizadas al mismo tiempo que para el gen ROR γ T. El aumento de fluorescencia se observa alrededor del ciclo (Ct) 10 en adelante.

CURVAS DE DENATURACIÓN PARA 18S Y ROR γ T

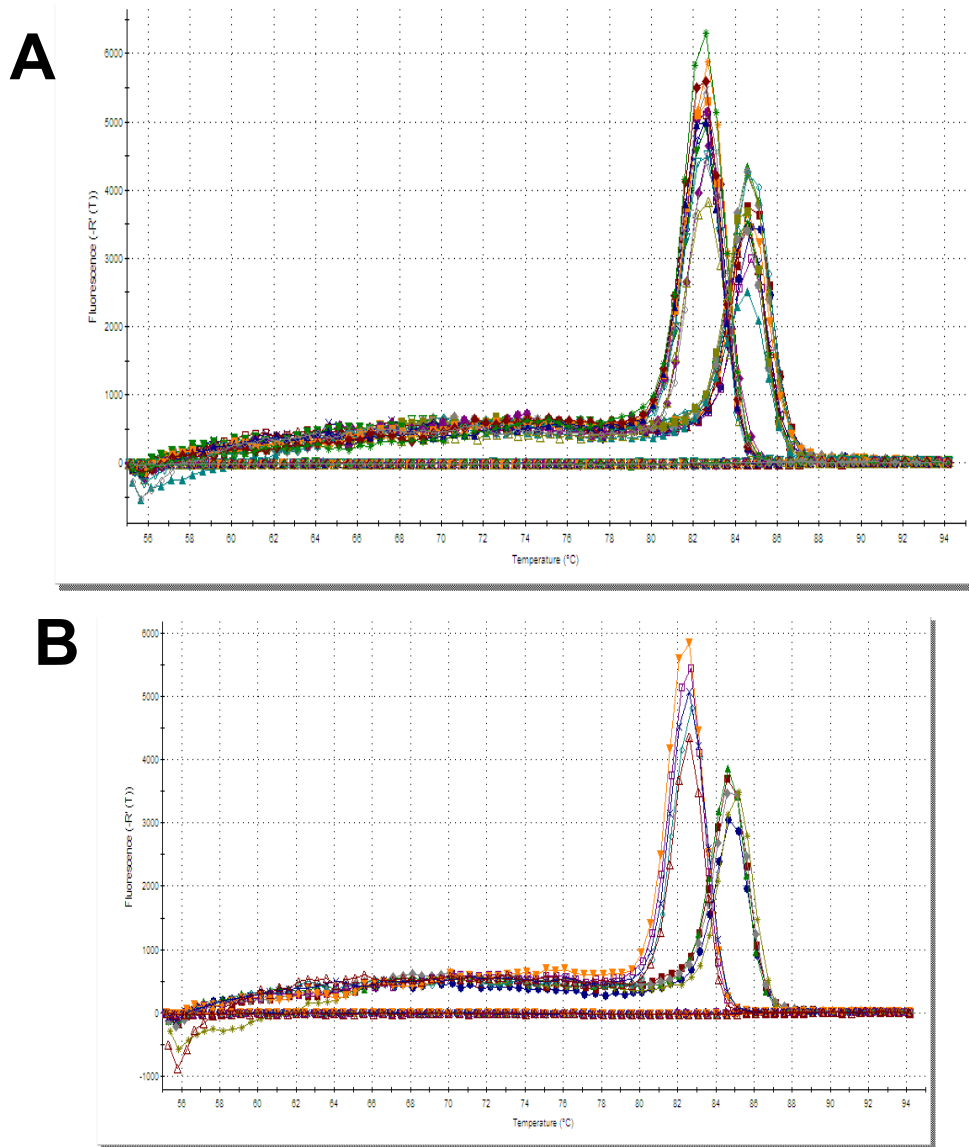


Figura 14: *Curvas de Disociación para 18S y ROR γ T.* Gráficos representativos de la curva de denaturación de ambas partes del experimento, tanto para 18S como para ROR γ T. La temperatura de denaturación alcanzada, para el gen 18S es de 82,7°C, y para ROR γ T es de 84,7°C.

CURVA DE DENATURACIÓN PARA MUESTRAS 3, 8 19, 21 y 22

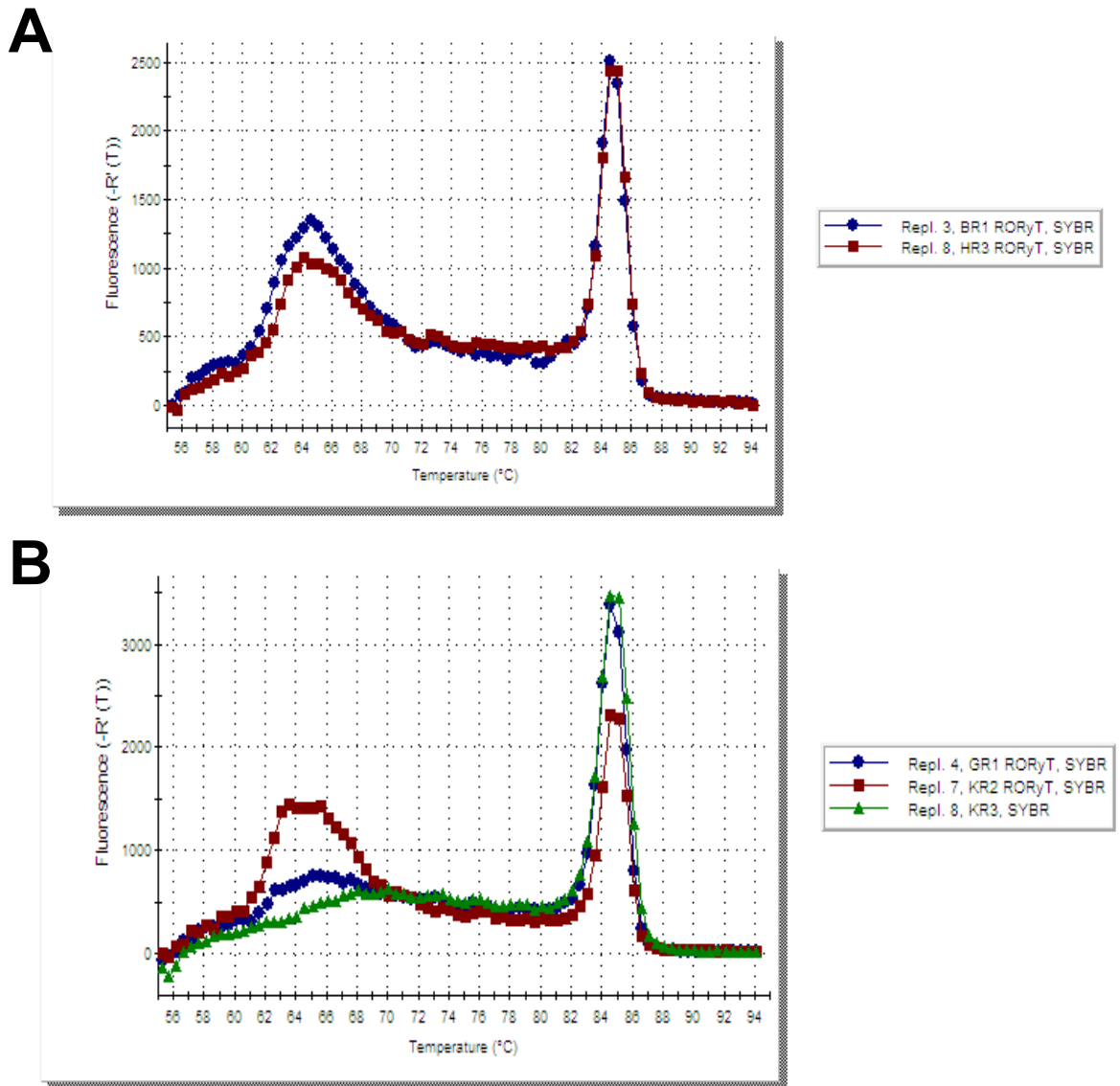


Figura 15: Curva de denaturación para muestras 3, 8, 19, 20 y 21 del gen RORyT. Se puede observar que las muestras 3, 8, 19, 21 y 22 denaturación a menores temperaturas además de la correspondiente para el gen RORyT a 84,7°C, demostrando la amplificación inespecífica en estas muestras.

GEL DE AGAROSA 2% PARA ROR γ T

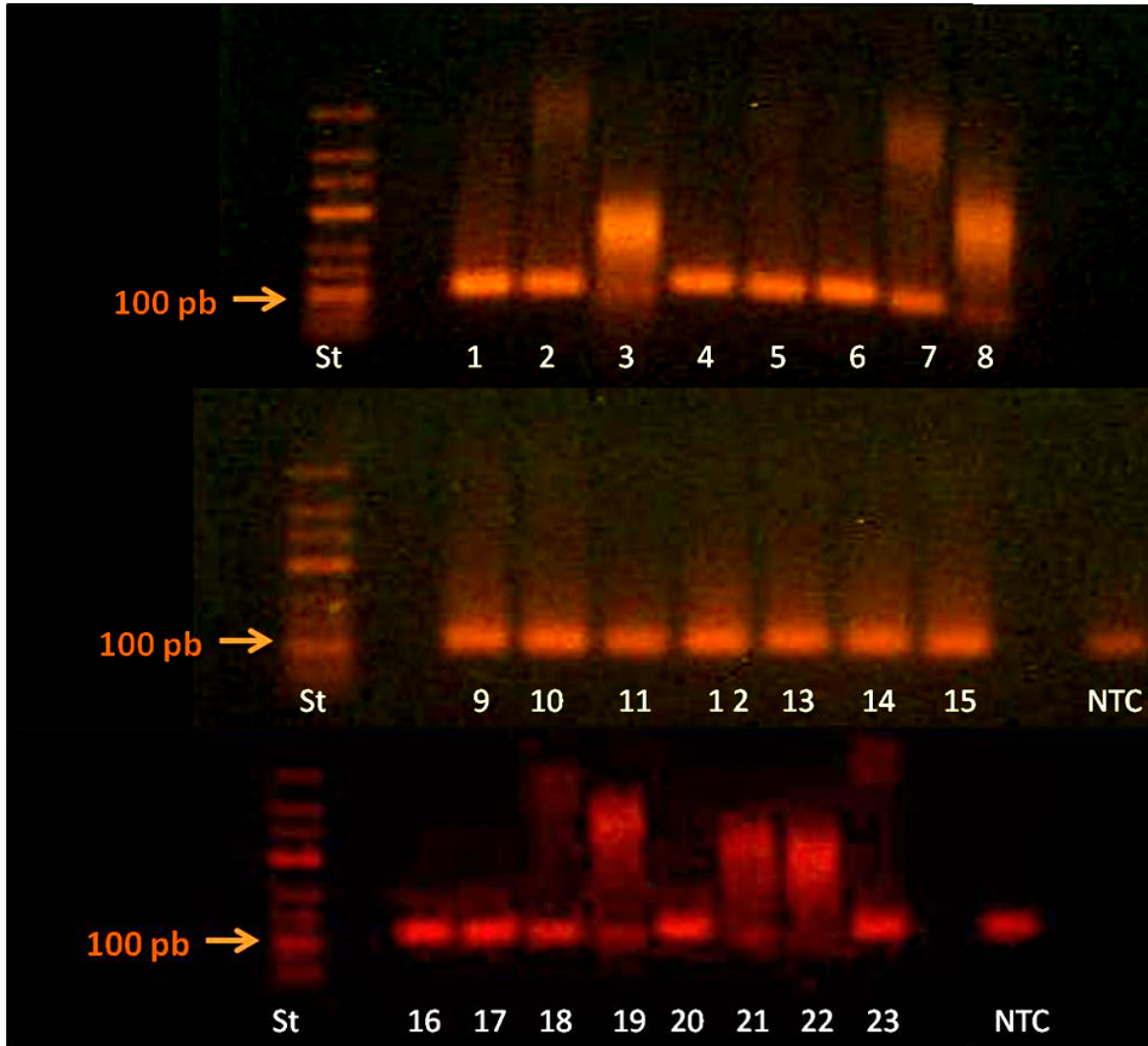


Figura 16: *Electroforesis en gel de agarosa 2% para productos de PCR en tiempo real del gen ROR γ T.* Se puede observar que las muestras 3, 8 19, 21 y 22 presentan amplificación inespecífica de productos, por lo que fueron excluidos del análisis final. El resto de las muestras presenta la amplificación esperada.

GEL DE AGAROSA 2% PARA 18S

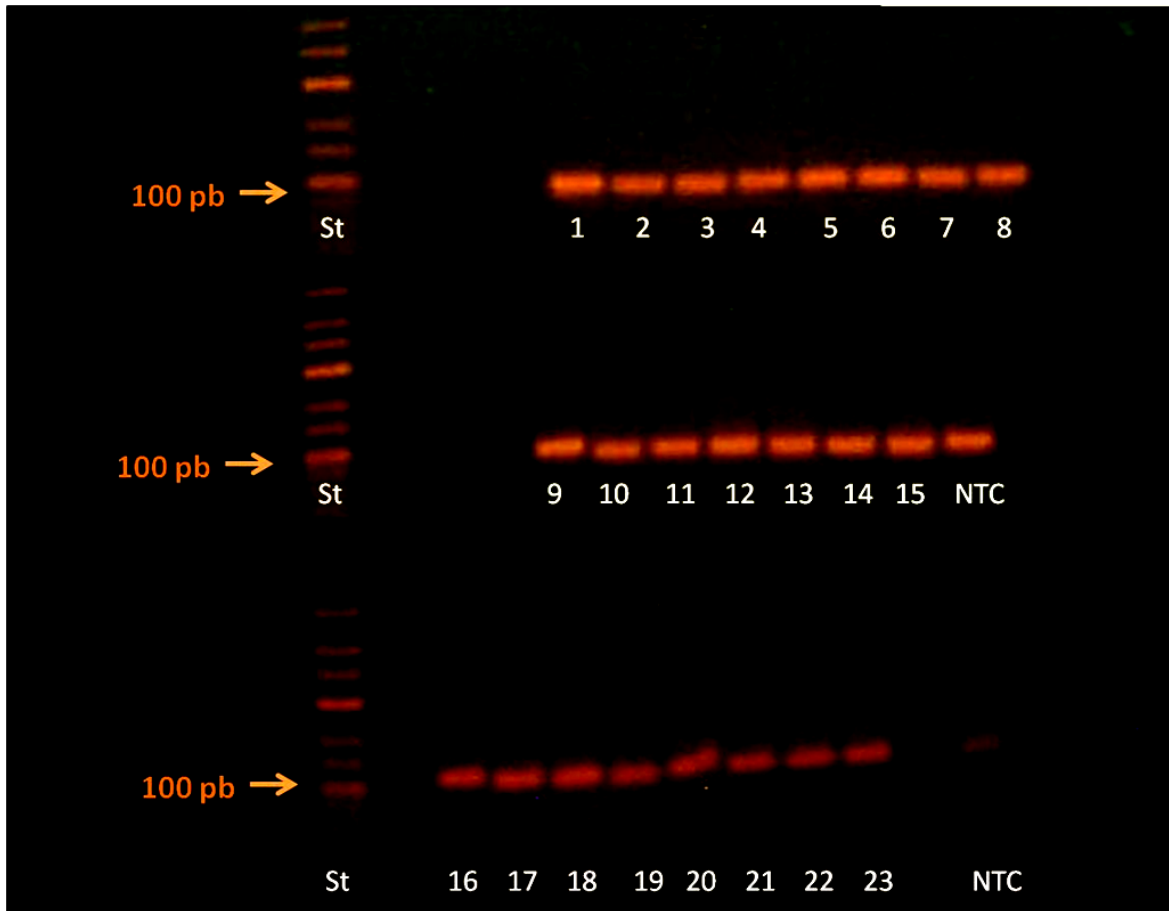


Figura 17: *Electroforesis en gel de agarosa 2% para productos de PCR en tiempo real del gen 18S.* Se puede observar que las muestras 3, 8, 19, 21 y 22 no presentan amplificación inespecífica de cómo se presenta en el producto de PCR de las mismas muestras para el gen ROR γ T.

EXPRESIÓN DE ROR γ T EN MÉDULA ESPINAL

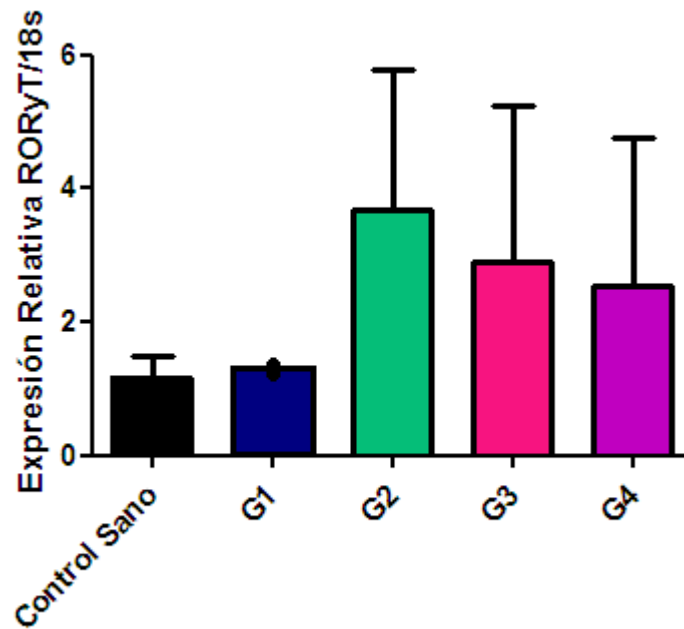


Figura 18: *Expresión de ROR γ T en médula espinal de ratones pertenecientes a diferentes grupos experimentales.* Ratones sanos (n=4) y del grupo G1 (n=2) no presentan un incremento con respecto al calibrador, sin embargo, se observa que en todos los ratones tratados con MSCs, aumenta la razón de la expresión relativa de *roryt* por sobre los controles sanos y G1. Aunque las diferencias no son significativas, se observa que ratones tratados en estadios tempranos con MSCs tienen mayor expresión de ROR γ T que ratones tratados a tiempos más tardíos. (G1: n=4; G2: n=4; G3: n=4) (Media \pm DS)

DISCUSIÓN

El fin de esta investigación fue observar el efecto que tenía la terapia con MSCs en ratones con EAE sobre el sistema inmunológico a nivel periférico y órgano específico, y como esto afecta realmente el fenotipo de la enfermedad. Las MSCs se han propuesto como terapia para el tratamiento de diversas enfermedades, tanto para la regeneración de tejidos como enfermedades autoinmunes, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, los resultados de esta tesis apuntan a demostrar que este tipo de terapia celular puede ejercer efectos diferenciales y paradójicos sobre las diferentes estirpes linfocitarias involucradas en enfermedades autoinmunes, como son los linfocitos Th1 y Th17.

El modelo utilizado para estudiar este efecto de las MSCs como tratamiento para enfermedades autoinmunes fue el de EAE, debido a que se ha descrito que los linfocitos Th17, estirpe que se ve afectada por las MSCs de manera diferente a las Th1, son importantes en el desarrollo de la enfermedad (Komiyama et al, 2006), y que la enfermedad cambia cuando la razón Th17/Th1 aumenta, presentando otro tipo de signos clínicos (Domingues et al, 2010; Stromnes et al, 2008). Además, los efectos publicados de MSCs en EAE demuestran que, a pesar de tener un efecto benéfico en el puntaje clínico cuando son inyectadas en los primeros días, tendencia que pudimos observar en nuestros experimentos a pesar de no obtener diferencias significativas, en etapas más avanzadas estas pueden no tener efecto (Zappia et al, 2005), por lo que es importante conocer el estado inmunológico en que se encuentran los individuos y evaluar la razón de la baja efectividad de MSCs en tiempos tardíos.

Para realizar estos experimentos, se decidió estandarizar la concentración de MOG₃₅₋₅₅ con la que se trabajaría, ya que se requería de un modelo animal de severidad media y no grave, de modo de poder observar un agravamiento notorio con la inyección de MSCs. Por esta razón se realizaron inducciones paralelas con dos diferentes concentraciones de MOG₃₅₋₅₅, donde se comprobó que la concentración de MOG₃₅₋₅₅ sólo afectó la severidad de la enfermedad inducida y no los días del comienzo de la enfermedad, ni el período del pico o aumento de severidad. No se utilizó ninguna de las concentraciones probadas de MOG₃₅₋₅₅, 30 y 60 µg, ya que en otras experiencias se demostró que la utilización de 50 µg era igualmente efectiva. Sin embargo, no se probaron las concentraciones publicadas en la literatura, por lo que el nivel de comparación puede estar afectado con la inmunización. Es necesario probar concentraciones de MOG₃₅₋₅₅ entre 50 y 100 µg para corroborar que la estabilidad de la enfermedad y que esta se comporta de la misma forma en altas concentraciones del antígeno. Además,

con esta modificación podemos comparar esta experiencia con otras publicaciones en donde se han probado inyecciones de MSCs.

La idea de hacer un seguimiento del EAE e inyectar MSCs a diferentes tiempos tuvo por objetivo analizar el efecto que estas pueden tener en diferentes grados de inflamación sistémico. Que las MSCs no tengan efecto a tiempos tardíos de la enfermedad puede deberse a que el nivel de inflamación afecte a las MSCs y evite que ejerza un efecto inmunomodulador. Nuestro laboratorio postula que las MSCs pueden influir en la diferenciación de las Th17 cuando existe un ambiente inflamatorio (Carrión et al, 2010). Hofstetter y colaboradores estudiaron la cinética de inflamación de los ejes Th1 y Th17, observando que existía un aumento en la secreción de IL-17 e IFN γ en linfocitos de bazo y nódulos linfáticos al iniciar la enfermedad, y en SNC en los días de mayor severidad (Hofstetter et al, 2010). El modelo utilizado en esta publicación no es el mismo, ya que estudian el EAE de tipo remitente, que no presenta una fase crónica, por lo que se decidió estudiar igualmente al día 30 después de la administración de MOG₃₅₋₅₅ en CFA.

El protocolo de trabajo incluyó 4 grupos experimentales, a los cuales se les administró MOG₃₅₋₅₅ en CFA y fueron tratados a diferentes tiempos con MSCs. De estos grupos, se excluyeron, en total 2 ratones: un individuo perteneciente al grupo de ratones tratados al día 18 post inducción (G3) fue excluido del análisis debido a que presentaba alteraciones diferentes a los de su grupo experimental, siendo el único en presentar un día diferente de inicio de síntomas y muy alta severidad; y un individuo perteneciente al grupo de ratones tratados al día 30 (G4), ya que presentaba una deformación hipertrófica de bazo, posiblemente generada por una infección parasitaria, y por esta razón, inmovilidad, por lo que el puntaje clínico evaluado pudo verse afectado.

En estos experimentos, no se observaron diferencias significativas con respecto al puntaje clínico. Se evaluaron diferentes parámetros. Por un lado, el puntaje acumulado es un indicador de los niveles de severidad alcanzados, y una forma más correcta de llevar este análisis es con el área bajo la curva de puntaje clínico. Se observó que no hay diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales, aunque los valores del área bajo la curva de los ratones que son tratados cuando existe cronicidad de la enfermedad son mayores. El aumento del número de individuos en un próximo estudio debiera hacer esta diferencia significativa e importante, ya que las tendencias son claras. Como parámetro de extremidad de la severidad de la enfermedad, se estudia el puntaje máximo alcanzado, en donde los resultados tampoco fueron significativos, aunque con la misma tendencia.

Ya se ha comentado que los linfocitos Th17, cuando se encuentran en mayor porcentaje o razón con respecto a Th1, generan un tipo de EAE llamado atípico, en el cual se observa que estas células

infiltran severamente el cerebro, particularmente el parénquima, generando defectos de propiocepción (conocimiento del lugar de ubicación de las partes del propio cuerpo), ataxia y espasticidad (Contracción constante de algunos músculos), entre otros (Stromnes et al, 2008). Además, se ha observado que los linfocitos Th17 no son capaces de mantener su fenotipo dentro del SNC, y que estos cambian plásticamente a la estirpe Th1 (Domingues et al, 2010). Lo que se observó en este experimento fue que en todos los grupos de ratones tratados con MSCs existió un aumento considerable de signos de la enfermedad atípica, y que este aumento se relacionaba con el día de la inyección de MSCs. Ratones tratados al comienzo de la enfermedad tienen menor porcentaje de sintomatología atípica y ratones tratados al día 30 tienen mayor porcentaje. Esto se correlaciona con la razón Th17:Th1 registrada en bazo. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos secretores de IL-17A se ve aumentado en nódulos linfáticos de ratones tratados al día 10 post inducción, e incluso se observa una tendencia contraria entre el porcentaje de signos atípicos en los 4 grupos experimentales y el porcentaje de Th17, lo que nos indica que el aumento de la razón Th17/Th1 no se debe al aumento del porcentaje de linfocitos Th17, si no que a una regulación diferente en Th1. Los porcentajes de Th1 son variables, y sin tendencia definida, por lo que es difícil asegurar esta aseveración si no aumentamos el número de individuos en los grupos experimentales.

Las MSCs pueden ser capaces de promover la diferenciación a Th17, o bien, de mantener su fenotipo *in vitro* (Carrión et al, 2010; Guo et al, 2009), fenotipo que se pierde al infiltrar la barrera hematoencefálica, como ya se ha comentado, aumentando la plasticidad de linfocitos Th17 hacia Th1 (Domingues et al, 2010). En esta tesis, pudimos observar que en presencia de MSCs, siempre hay un aumento de marcadores de Th17 en SNC, específicamente en médula espinal, por lo que podemos corroborar que las MSCs poseen mecanismos por los cuales aumentan la diferenciación a Th17 y/o mantener su fenotipo también *in vivo*. Queda ahora estudiar cuales son los mecanismos por los cuales las MSCs ejercen este efecto, como vimos, dependiente del tiempo de permanencia en el sistema. Se han propuesto diferentes mecanismos, siendo uno de los más influyentes, la secreción constitutiva de IL-6 por parte de las MSCs para la diferenciación, sin embargo, no se ha descrito que las MSCs sean capaces de secretar citoquinas del eje Th17, como IL-23, esencial para mantener el fenotipo. Existen dos evaluaciones necesarias para corroborar la hipótesis de que las MSCs son capaces de disminuir la plasticidad de linfocitos Th17 hacia la estirpe Th1 en SNC. Primero, es trascendental continuar la evaluación en muestras de SNC de este experimento y dilucidar que está ocurriendo con los linfocitos Th1 en cerebro y médula espinal de los ratones de los diferentes grupos experimentales, mediante de la expresión de T-bet por PCR en tiempo real. Además, es necesario realizar un estudio del estado de los linfocitos dentro del SNC, separando células mononucleares del tejido nervioso y observar por citometría de flujo el cambio que están generando las MSCs en el fenotipo de las Th17, y corroborar que la

aparición de signos atípicos corresponde al aumento de la razón Th17/Th1 generado por la inyección de MSCs.

Se ha descrito que la inyección de MSCs en tiempos tempranos es capaz de disminuir la severidad de la enfermedad (Zappia et al, 2005). Contrario a lo esperado, el mayor aumento de Th17 se registra cuando las MSCs son inyectadas a tiempos tempranos. Tal vez, la infiltración de linfocitos Th17, y la mantención de esta estirpe en médula espinal debido a la infiltración de MSCs y sus mecanismos pro Th17, es protectora y evita la aparición de la enfermedad clásica que es mucho más severa y limitante. Las MSCs pueden ejercer efectos, además, en otras estirpes linfocitarias, como Treg, que pueden estar generando una regulación de ambas estirpes proinflamatorias, Th1 y Th17, y disminuyendo los signos clínicos de esta patología.

Con respecto al eje Th17, mucho queda por estudiar. Mayoritariamente en modelos de colitis, se han descrito diferentes propiedades de esta estirpe linfocitaria, atribuyéndole diferentes roles dependiendo de las citoquinas que secreten. Los linfocitos Th17 que además, son secretores de $IFN\gamma$, son más patogénicos que linfocitos Th17 $IFN\gamma^-$, y en esta línea, existe evidencia que estos linfocitos doble positivos son reclutados al SNC en EAE y EM (Kebir et al, 2012). Además, al parecer, la secreción de IL-17F e IL-22 podría ser protectora en colitis inducida, sin embargo, la secreción de IL-17F e IL-21 se cataloga de patogénica (Morrison et al, 2011), evidenciando la dualidad de esta estirpe linfocitaria.

Es muy importante dilucidar qué mecanismos están implicados en el aumento de Th17, puesto que ya existen protocolos de tratamiento de MSCs para algunas enfermedades autoinmunes, incluyendo EM. Es posible mejorar a las MSCs para que mantengan sus propiedades, que las hacen una terapia celular idónea para diferentes tipos de enfermedades, y que contrarresten estos efectos paradójicos que hemos observado y que pueden ser nocivos. La evaluación de estos efectos *in vivo* nos puede dar una visión más amplia de lo que tenemos que optimizar para generar una mejor terapia para estas enfermedades.

CONCLUSIONES

Con lo anteriormente descrito y discutido, podemos concluir que

1. Las MSCs podrían generar una mejoría en ratones tratados a tiempos tempranos de la enfermedad, observándose diferencias significativas en el peso de los ratones, registrado diariamente, y tendencias en el puntaje clínico. Cuando son inyectadas de forma tardía, estas podrían no tener incidencia significativa en el comportamiento de la enfermedad, como también, generar un agravamiento con respecto a un control no tratado.
2. Las MSCs favorecen la aparición de la patología de tipo atípica, atribuida por otros autores a un aumento de linfocitos Th17 con respecto a Th1 y su infiltración en esta razón al parénquima cerebral.
3. Las MSCs mantienen, tanto en bazo como en nódulos linfáticos, una alta razón Th17/Th1 cuando son inyectadas a tiempos tardíos de la enfermedad. Cuando son inyectadas en tiempos tempranos, no se observan diferencias en la razón Th17/Th1, si no que más bien, en los porcentajes aislados de Th1 y Th17, en donde se observan mayores porcentajes de Th17 en nódulos linfáticos de ratones tratados al comienzo de la enfermedad, sin embargo, no se observan diferencias ni tendencias significativas en los porcentajes de Th1.
4. Las MSCs son capaces de mantener la estirpe Th17 en SNC, específicamente, en médula espinal, comparado con ratones sin tratamiento los cuales, al igual que controles sanos, no presentan expresión de ROR γ T, marcador específico de Th17. No se conoce su comportamiento con respecto a linfocitos Th1 en SNC.

REFERENCIAS

- Bian L., Guo Z., Wang H., Wang J., Wang H., Li Q., Yang Y., Xiao F., Wu C., Wang L. (2009) *In Vitro* and *In Vivo* Immunosuppressive characteristics of Hepatocyte Growth Factor-modified murine Mesenchymal Stem Cells. *In vivo* 23: 21-28.
- Boissier M., Assier E., Falgarone G., Bessis N. (2008) Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/Treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine: Revue du Rhumatisme*, 75(4):373-375.
- Carrión F., Nova E., Luz P., Apablaza F., Figueroa F. (2010) Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4⁺ T cell activation. *Letters in Immunology*, 135(1-2):10-16.
- Chen B., Hu J., Liao L., Sun Z., Han Q., Song Z. (2009) FLK-1 (+) Mesenchymal stem cells aggravate collagen-induced arthritis by up-regulating interleukin-6. *Clinical and Experimental Immunology* 159 (3): 292–302.
- Croitoru-Lamoury J., Lamoury F., Zaunders J., Veas L., Brew B. (2007) Human mesenchymal stem cells constitutively express chemokines and chemokine receptors that can be upregulated by cytokines, IFN-beta, and Copaxone. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 27(1): 53-64.
- Djouad F., Fritz V., Apparailly F., Louis-Pence P., Bony C., Sany J., Jorgensen C., Noel D. (2005) Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 52: 1595-1603.
- Djouad F., Charbonnier L., Bouffi C., Louis-Pence P., Bony C., Apparailly F., Cantos C., Jorgensen C., Noël D. (2007) Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. *Stem Cells* 25:2025–2032.
- Domingues H., Mues M., Lassmann H., Wekerle H., Krishnamoorthy G. (2010) Functional and Pathogenic Differences of Th1 and Th17 Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PlosOne*, 5 (11): e15531.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-317.
- English K., Barry F., Field-Corbett C., Mahon B. (2007) IFN- γ and TNF- α differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunology Letters* 110: 91–100.
- Ferber I., Brocke S., Taylor-Edwards C., Ridgway W., Dinisco C., Steinman L., Dalton D., Fathman C. (1996) Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *The Journal of Immunology*, 156 (1):5-7.

- Gonzalez M.; Gonzalez-Rey E., Rico L., Buscher D., Delgado M. (2009) Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis and Rheumatism* 60: 1006-1019.
- Guo Z., Zheng C., Chen Z., Gu D., Du W., Ge J., Han Z., Yang R. (2009) Fetal BM-derived mesenchymal stem cells promote the expansion of human Th17 cells, but inhibit the production of Th1 cells. *European Journal of Immunology*, 39(10):2840-2849.
- Hofstetter H., Forsthuber T. (2010) Kinetics of IL-17- and interferon-gamma-producing PLPp-specific CD4 T cells in EAE induced by coinjection of PLPp/IFA with pertussis toxin in SJL mice. *Neuroscience Letters*, 476(3):150-5.
- Hofstetter H., Ibrahim S., Koczan D., Kruse N., Weishaupt A., Toyka K. (2005) Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cellular Immunology*, 237: 123–130.
- Jäger A., Kuchroo V. (2010) Effector and Regulatory T-Cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 72(3): 173-184.
- Kebir H., Ifergan I., Alvarez J., Bernard M., Poirier J., Arbour N., Duquette P., Prat A. (2009) Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 66(3): 390-402.
- Komiyama Y., Nakae S., Matsuki T., Nambu A., Ishigame H., Kakuta S. (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 177: 566–573.
- Krishnamoorthy G., Lassmann H., Wekerle H., Holz A. (2006) Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *Journal of Clinical Investigation*, 116: 2385–2392.
- Kurtzke J. (1977) Geography in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*; 215:1-26.
- Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E., Ringdén O. (2003) HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, 31(10):890-896.
- Markowitz, C. (2007) Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues. *Neurology*; 68: s8-s11.
- Martino G., Franklin J., Van Evercooren A., Kerr D., Stem Cells in Multiple Sclerosis (STEMS) Consensus Group. (2010) Stem cell transplantation in multiple sclerosis: current status and future prospects. *Nature Reviews*; 6(5): 247-255.
- Meisel R., Zibert A., Laryea M., Göbel U., Däubener W., Dilloo D. (2004) Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103:4619-4621.
- Miller S., Karpus W., Davidson T. (2007). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mouse. *Current Protocols in Immunology*, 88(15.1):1-20.

Morrison P., Ballantyne S., Kullberg M (2011). Interleukin-23 and T helper 17-type responses in Intestinal inflammation: from cytokines to T-cell plasticity. *Immunology* 133, 397 – 408.

O'Connor R., Prendergast C., Sabatos C., Lau C., Leech M., Wraith D., Anderton S. (2008) Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 181(6):3750-3754.

Olitsky P., Yager R. (1949) Experimental Disseminated Encephalomyelitis in White Mice. *Journal of Experimental Medicine*, 90(3):213-224.

Oppmann B., Lesley R., Blom B., Timans J., Xu Y., Hunte B., Vega F., Yu N., Wang J., Singh K., Zonin F., Vaisberg E., Churakova T., Liu M., Gorman D., Wagner J., Zurawski S., Liu Y., Abrams J., Moore K., Rennick D., de Waal-Malefyt R., Hannum C., Bazan J., Kastelein R. (2000) Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity*; 13:715–725.

Pöllinger B., Krishnamoorthy G., Berer K., Lassmann H., Bösl M., Dunn R., Domingues H., Holz A., Kurschus F., Wekerle H. (2009) Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 206(6):1303-1316.

Ren G., Zhang L., Zhao X., Xu G., Zhang Y., Roberts A., Zhao R., Shi Y. (2008) Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell* 2:141–150.

Rivers T., Sprunt D., Berry P. (1933) Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *Journal of Experimental Medicine*, 58: 39-55.

Ryan J., Barry F., Murphy J., Mahon B. (2007) Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 149: 353–363.

Stromnes I., Cerretti L., Liggitt D., Harris R., Goverman J. (2008) Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nature Medicine*, 14(3): 337-342.

Sudres M., Norol F., Trenado A., Grégoire S., Charlotte F., Levacher B., Lataillade J., Bourin P., Holy X., Vernant J., Klatzmann D., Cohen J. (2006) Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *The Journal of Immunology*, 176(12):7761-7767.

Sun L., Wang D., Liang J., Zhang H., Feng X., Wang H., Hua B., Liu B., Ye S., Hu X., Xu W., Zeng X., Hou Y., Gilkeson G., Silver R., Lu L., Shi S. (2010) Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 62(8):2467-2475.

Tang Q., Bluestone J. (2006) Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunological Reviews*, 212: 217-237.

Tompkins S., Padilla J., Dal Canto M., Ting J., Van Kaer L., Miller S. (2002) De Novo Central Nervous System Processing of Myelin Antigen Is Required for the Initiation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 168 (8): 4173-4183.

Uyttenhove C., Sommereyns C., Théate I., Michiels T., Van Snick J. (2007) Anti-IL-17A Autovaccination Prevents Clinical and Histological Manifestations of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1110: 330-336.

Yang Y., Weiner J., Liu Y., Smith A., Huss D., Winger R., Peng H., Cravens P., Racke M., Lovett-Racke A. (2009) T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *Journal of Experimental Medicine*, 206 (7): 1549–1564.

Zappia E., Casazza S., Pedemonte E., Benvenuto F., Bonanni I., Gerdoni E., Giunti D., Ceravolo A., Cazzanti F., Frassoni F., Mancardi G., Uccelli A. (2005) Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 106(5): 1755-1761.