



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

*“EFECTO INMUNOMODULADOR DE LAS CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES SOBRE LINFOCITOS T HELPER 1 Y T HELPER 17”*

Memoria para Optar a Título de Bioquímico

XIMENA BEATRIZ FERNÁNDEZ BARRIGA

Lugar de realización

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

Profesor Patrocinante:
Dr. Javier Puente Piccardo

Director de Tesis:
Dr. Flavio Carrión Arriagada

Santiago de Chile
Abril, 2012

Todos mis agradecimientos a:

Mi familia, en especial a mis padres que siempre estuvieron ahí para darme apoyo y ánimo en los momentos difíciles, que en todo momento velaron por mi educación y permitieron que llegara a la universidad y pasara por ella en las mejores condiciones.

A mis amigos, que siempre estuvieron presente dándome su apoyo y confianza, y que a lo largo de los años fueron motivándome a seguir adelante y cumplir mis metas.

A mis profesores y compañeros, quienes estuvieron presentes cada día y que me entregaron un sinfín de conocimientos que hoy me permiten sentirme una profesional con exitoso futuro.

Al Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular de la Universidad de los Andes, en especial al Dr. Flavio Carrión por darme la oportunidad, y depositar su confianza en mí, para llevar a cabo esta investigación y desarrollar esta tesis.

Finalmente, agradecer a todas las personas que en esta etapa han estado ahí y ayudado de manera silenciosa, con una sonrisa o buena voluntad, a que cada día llegara a su fin con alegría y satisfacción

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ABREVIATURAS	iv
MARCADORES Y MOLÉCULAS DE SUPERFICIE	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1. Células Madre	1
1. 2. Células Madre Mesenquimales	1
1. 3. Efecto de MSCs sobre células del sistema inmune	3
1. 3.1. Linfocitos T	3
1. 3. 2. Efecto inmunomodulador de MSCs sobre linfocitos TH	5
1. 4. Mecanismo Inmunosupresor de MSCs	7
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	11
3. OBJETIVOS	11
3. 1. Objetivo General	11
3. 2. Objetivos Específicos	11
4. MÉTODOS	12
4. 1 Animales	12
4. 2. Obtención y expansión de MSCs <i>in vitro</i>	12
4. 3. Caracterización de MSCs	12
4. 4. Obtención de Células T CD4 ⁺	13
4. 5. Obtención de linfocitos TH1 y TH17	13
4. 6. Cocultivos de MSCs con linfocitos T CD4 ⁺	14
4. 7. Tinción intracelular para citometría de flujo	14
4. 8. Análisis Estadístico	14
5. RESULTADOS	15
5. 1. Caracterización funcional y fenotípica de MSCs derivadas de médula ósea	15
5. 2. Diferenciación de linfocitos TH1 y TH17 a partir de linfocitos CD4 ⁺ purificados de bazo de ratón C57BL/6	18

5. 3. Efecto de MSCs <i>Wild Type</i> sobre la activación de linfocitos TH1 y TH17	20
5. 4. Efecto de MSCs <i>Wild Type</i> sobre la diferenciación de linfocitos TH1 y TH17 en presencia del contacto celular	24
5. 5 Efecto de MSCs <i>Wild Type</i> sobre la diferenciación de linfocitos TH1 y TH17 en ausencia del contacto celular	28
5. 6. Efecto de MSCs IL6 ^{-/-} sobre diferenciación de linfocitos TH1 y TH17.	34
6. DISCUSIÓN	39
7. CONCLUSIONES	43
8. REFERENCIAS	44
	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Caracterización de MSCs	16
Figura 2	Diferenciación de Linfocitos	19
Figura 3	Activación de linfocitos TH1 y TH17	21
Figura 4	Efecto de MSCs sobre activación de linfocitos TH1 determinado por la presencia de CD25	22
Figura 5	Efecto de MSCs sobre activación de linfocitos TH17 determinado por la presencia de CD25	23
Figura 6	Efecto de MSCs sobre secreción de IFN- γ por linfocitos TH1	26
Figura 7	Efecto de MSCs sobre secreción de IL-17 por linfocitos TH17	27
Figura 8	Disposición de células en sistema de transwell	31
Figura 9	Efecto de MSCs sobre linfocitos TH1 en ausencia del contacto celular	32
Figura 10	Efecto de MSCs sobre linfocitos TH17 en ausencia del contacto celular	33
Figura 11	Efecto de MSCs IL-6 ^{-/-} sobre linfocitos TH1	37
Figura 12	Efecto de MSCs IL-6 ^{-/-} sobre linfocitos TH17	38

ABREVIATURAS

APC	Célula Presentadora de Antígenos
ASCs	Células Madre Adulta
CD	Grupo de Diferenciación
CFU-F	Células Formadoras de Colonias de Fibroblastos
CIA	Artritis Inducida por Colágeno
DMSO	Dimetilsulfoxido
EAE	Encefalitis Autoinmune Experimental
ESCs	Células Madre embrionarias
FITC	Flourocianina Isocianato
Foxp3	<i>Forkhead box P 3</i>
GATA-3	<i>GATA-binding protein 3</i>
G-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos-Monocitos
GVHD	Enfermedad de Injerto Contra el Huesped
HGF	Factor de Crecimiento de Hepatocitos
HLA-G	antígeno humano leucocitario tipo G
HSCs	Células Madre Hematopoyéticas
IDO	Indolamina 2,3 oxigenasa
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
ION	Ionicina
KO	<i>Knock Out</i>
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MLR	Reacción Mixta Linfocitaria
MSCs	Células Madre Mesenquimales
MSCs IL-6^{-/-}	Células Madre Mesenquimales provenientes de ratón <i>knock out</i> de IL-6

NK	Células <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico
PBS	Buffer Salino de Fosfato
PD	Proteína De Muerte Programada
PDL	Ligando de Proteína de Muerte Programada
PE	Ficoeritrina
PECy5	Ficoritrina Tamdem Cyan 5
PGE2	Prostaglandina E2
PMA	Forbol-12-Meristato-13-Acetato
RORγT	<i>Retinoid-related Orphan Receptor gamma</i>
RPMI	Medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDF	Factor derivado de Célula de Estroma
T-bet	<i>T-box-expressed-in-Tcells</i>
TCR	Receptor de Célula T
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TH1	Linfocitos T <i>helper</i> 1
TH17	Linfocitos T <i>helper</i> 17
TH2	Linfocitos T <i>helper</i> 2
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral
Treg	Linfocitos T reguladores
WT	<i>Wild Type</i>
α-MEM	Medio Mínimo Escencial

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.
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).
CD166	Glicoproteína transmembrana expresada en fibroblastos.
MHC I	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I
MHC II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II
SCA-1	Stem Cell Antigen -1. Participa en migración.

RESUMEN

Las Células Madre Mesenquimales (MSCs) se han convertido en un interesante campo de estudio. Inicialmente fueron estudiadas por su capacidad de diferenciarse a células de diversos tejidos mesodermales, sin embargo, con el paso de los años se determinó que las MSCs tenían una amplia capacidad de escapar del reconocimiento de células del sistema inmune. Más tarde se descubrió que las MSCs no solo tienen la capacidad de escapar del reconocimiento, sino que también son capaces de inhibir la activación y proliferación de células del sistema inmune. Diversas enfermedades autoinmunes y proinflamatorias están mediadas por linfocitos T, principales células efectoras del sistema inmune adaptativo, por tanto, dadas las características inmunosupresoras de las MSCs, han sido propuestas como nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de estas enfermedades. Con este objetivo, varios autores han enfocado sus estudios para determinar el mecanismo por el cual las MSCs ejercen este efecto inhibitorio. Algunos autores postulan que el contacto celular, entre MSCs y linfocitos, es indispensable para producir este efecto, sin embargo otros postulan que las MSCs secretan una amplia variedad de factores solubles inmunosupresores que son suficientes para producir el efecto inmunosupresor.

Dentro de las estirpes linfocitarias sobre las cuales las MSCs podrían ejercer su efecto inmunosupresor encontramos a los linfocitos T *helper* (TH), las cuales son células efectoras que se clasifican principalmente en: linfocitos TH1 que participan en la respuesta contra bacterias intracelulares, linfocitos TH2 que participan en la respuesta contra parásitos, linfocitos TH17 que participan en la respuesta contra bacterias extracelulares y hongos y, finalmente, los linfocitos T reguladores (Treg) cuya función es mantener la homeostasis del sistema inmune y promover la tolerancia inmunológica frente a antígenos propios.

Durante más de una década fue ampliamente descrita la capacidad inmunosupresora de las MSCs sobre linfocitos T, sin embargo en los últimos años se ha descrito que bajo ciertas condiciones las MSCs producen un efecto estimulador sobre algunas de estas estirpes linfocitarias.

El objetivo de este estudio fue determinar si las MSCs suprimen la proliferación y diferenciación de linfocitos TH1 y TH17. Estos linfocitos fueron estudiados ya que se ha descrito que diversas enfermedades autoinmunes se caracterizan por un aumento o desbalance de estas estirpes. Para esto, investigamos si es que el efecto inmunomodulador de las MSCs era dependiente del estado de activación y diferenciación de linfocitos, del ratio MSCs:CD4⁺, del contacto celular o de factores solubles.

Dado que ha sido ampliamente descrito que las MSCs son capaces de secretar basalmente IL-6, la cual corresponde a una citoquina que cumple diversas funciones sobre el sistema inmune, entre ellas promover la secreción de citoquinas y factores de crecimiento necesarias para la respuestas de linfocitos T y que

además son capaces de promover la estirpe, altamente proinflamatoria, TH17, y que esta secreción aumenta cuando las MSCs se encuentran frente a estímulos proinflamatorios como IFN- γ o TNF- α , postulamos que la IL-6 secretada por las MSCs es el principal factor soluble involucrado en la inmunomodulación ejercida por las MSCs.

Las MSCs fueron obtenidas a partir de médula ósea de ratones C57BL/6 y caracterizadas por el patrón de expresión de antígenos de superficie y por su capacidad de multidiferenciación. Los linfocitos T CD4⁺ fueron obtenidos a partir de bazo de ratones C57BL/6, purificados mediante kit comercial y cultivados en presencia de citoquinas que favorecen la diferenciación hacia la estirpe TH1 o TH17. Las MSCs fueron agregadas a los cultivos de linfocitos TH1 o TH17 a distintos tiempos de cultivo celular en presencia o ausencia de contacto celular, contacto MSCs-linfocito. La diferenciación de los linfocitos fue medida por medio de la detección de citoquinas intracelulares características de ambas estirpes, IFN- γ e IL-17 para linfocitos TH1 y TH17 respectivamente, por medio de citometría de flujo.

Demostramos que las MSCs son capaces de inhibir a linfocitos TH1 independiente del estado de activación y del ratio MSCs:CD4⁺. Determinamos que el efecto inmunosupresor está presente incluso en condiciones donde no existe contacto celular y que este efecto es independiente de la IL-6 secretadas por las MSCs.

A diferencia de lo que ocurre con linfocitos TH1, las MSCs sólo son capaces de inhibir a linfocitos TH17 cuando estas son agregadas a tiempo temprano al cultivo celular y este efecto es dependiente del contacto celular, mientras que cuando las MSCs son agregadas al cultivo a tiempos tardíos, al día 4 de cultivo celular, promueven la diferenciación de linfocitos TH17.

Concluimos que el efecto inmunomodulador que ejercen las MSCs sobre linfocitos TH1 y TH17 es por medio de mecanismos diferenciales. El efecto inmunosupresor sobre linfocitos TH1 es independiente de IL-6, sin embargo, no ha sido posible determinar el efecto real que ejerce la IL-6 secretada por las MSCs sobre linfocitos TH17 ya que la diferenciación de linfocitos TH17 requiere de IL-6 en el medio de cultivo. Sin embargo, determinamos que las MSCs en baja concentración no solo pierden su capacidad inhibitoria cuando se encuentran con linfocitos TH17 diferenciados sino que son capaces de promover su diferenciación. Observamos también que la IL-6 proveniente de MSCs podría, bajo ciertas, de revertir este efecto.

ABSTRACT

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) have become an interesting field of study. Initially MSCs were studied for their capacity to differentiate into various cell types from different tissues from the mesoderm, however, over the years it was determined that MSCs have a large capacity to escape from the recognition by cells from the immune system. Later it was discovered that MSCs not only have the capacity to escape recognition, but are also able to inhibit the activation and proliferation of immune cells. Several autoimmune and proinflammatory diseases are mediated by T cells, major effector cells of the adaptive immune system, therefore, given the immunosuppressive properties of MSCs they have been proposed as a new therapeutic strategy for treating these diseases. To this end, several authors have focused their studies to determine the mechanisms by which MSCs exert this inhibitory effect. Some authors postulate that cell contact between MSCs and lymphocytes is essential to produce this effect, while others postulate that MSCs secrete a wide variety of immunosuppressive soluble factors that are sufficient to produce the immunosuppressive effect on T lymphocytes.

MSCs can exert their immunosuppressive effect on lymphocytes called T helper (TH), which are an effector cell line mainly classified into: TH1 cells that participate in the response against intracellular bacteria, TH2 cells that participate in the response against parasites, TH17 cells that participate in the response against extracellular bacteria and fungi. Finally there are T regulatory (Treg) cells whose main function is to maintain immune system homeostasis and to promote immunologic tolerance against self antigens.

For over a decade, it was widely described the immunosuppressive capacity of MSCs on T lymphocytes, however in recent years it has been described that under certain conditions MSCs may produce a stimulatory effect on some of these lymphocyte strains.

The aim of this study was to determine whether MSCs are able to suppress TH1 and TH17 proliferation and differentiation. These cells were studied because it has been previously described that many autoimmune diseases are characterized by an increase or imbalance of these two strains. For this purpose, we investigated whether the immunomodulatory effect of MSCs was dependent on lymphocyte activation and differentiation state, MSCs: CD4⁺ ratio, cell contact or soluble factors.

It has also been highly described that MSCs are able to secrete basal amounts of IL-6, a cytokine which has a variety of functions on the immune system, among them, to promote cytokine and growth factor secretion necessary for T cell response, and to promote differentiation of the highly proinflammatory TH17 cells. This IL-6 basal secretion is augmented when MSCs are in the presence of proinflammatory

stimulus like IFN- γ or TNF- α , thus we postulate that MSCs secreted IL-6 main soluble factor involved in MSCs immunomodulation.

MSCs were obtained from mice bone marrow and characterized by their surface antigen expression pattern and their capability of multilineage differentiation. CD4⁺ T cells were obtained from mice splenocytes, purified by a commercial Kit and cultivated with cytokines that promote the differentiation to TH1 or TH17 cells. MSCs were added to TH1 or TH17 cultures at early or late time points and in the presence or absence of cell to cell contact, MSCs-T cell contact, mediated by a transwell system. The differentiation of TH1 or TH17 cell was measured by the detection of intracellular cytokines characteristics for each population, IFN- γ and IL-17 for TH1 and TH17 cells respectively, by flow cytometry.

We demonstrated that MSCs are capable to suppress TH1 cells differentiation despite on their state of activation or MSCs:CD4⁺ ratio. We determined that the immune suppressor effect of MSCs is present even in the absence of cell to cell contact and that this effect is independent of MSCs secreted IL-6.

In contrast with TH1 cells, MSCs are only capable to suppress TH17 cells when added at early time points of cell culture and that this effect requires cell to cell contact, while promoting TH17 differentiation when added at later time points, at day 4 of cell culture.

We concluded that the immune modulator effect of MSCs on TH1 and TH17 cells is mediated by differential mechanism. The immune suppressor effect on TH1 cells is independent from IL-6, though it was not possible to determined de real effect of MSCs secreted IL-6 over TH17 cells, since the TH17 differentiation media requires IL-6. However, we determined that low concentration of MSCs in the coculture, fail to inhibit TH17 differentiation more over they promote an augmentation of TH17 cells. We also observed that under certain culture conditions MSCs secreted IL-6 may revert this effect.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Células Madre

Las células madre se caracterizan por ser células indiferenciadas que tienen la capacidad de autorenovarse y diferenciarse a distintos linajes celulares. Estas células pueden ser totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes dependiendo de la variedad de tipos celulares que se pueden generar a partir de ellas (Minguell et al. 2001).

De acuerdo a su origen, en mamíferos encontramos dos tipos de células madre principalmente, 1) las Células Madre Embrionarias (ESCs, del inglés *Embryonic Stem Cells*) y 2) las Células Madre Adultas (ASCs, del inglés *Adult Stem Cells*). Las primeras forman parte de la masa celular interna del embrión en estadio de blastocisto y tienen la capacidad pluripotente de diferenciarse a todas las células que conforman un organismo adulto (Thomson et al. 1998). Las segundas se encuentran en organismos adultos, localizadas principalmente en “nichos” como el tejido nervioso, adiposo, médula ósea, músculo, piel y mucosa intestinal. Se caracterizan por poseer una menor capacidad de diferenciación que las ESCs y por cumplir un papel importante en la homeostasis y regeneración celular (Basak and Taylor 2009, Pekovic and Hutchison 2008).

Dentro de las ASCs, encontramos a las células madre hematopoyéticas (HSCs, del inglés *Hematopoietic Stem Cells*), las cuales se encuentran en la médula ósea y son capaces de generar todas las células de la sangre y del sistema inmune. Otro tipo de célula Madre Adulta, son las células Madre Mesenquimales (MSCs, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*) presentes en numerosos tejidos del cuerpo.

1. 2. Células Madre Mesenquimales

En la década de los 60' Friedenstein aisló, mediante cultivo celular, células de médula ósea de ratones y de un modelo porcino. Estas células resultaron ser adherentes, con forma de fibroblasto y capaces de proliferar y diferenciarse a células que parecían de cartílago y hueso, además parecían formar colonias, por lo que inicialmente fueron llamadas “Células formadoras de Colonias de fibroblastos (CFU-F)” cuya principal función era mantener el microambiente hematopoyético (Friedenstein et al. 1966, Friedenstein et al. 1968, Friedenstein 1970). Como resultado de su supuesta capacidad de diferenciación y auto-renovación Caplan y colaboradores las denominaron, por primera vez, Células Madre Mesenquimales (Bruder et al. 1994).

Las MSCs, al igual que las HSCs, se encuentran principalmente en la médula ósea, sin embargo, a diferencia de las anteriores, las MSCs pueden diferenciarse a células que conforman tejido de origen mesodermal como condrocitos, adipocitos y osteoblastos. Fenotípicamente las MSCs se caracterizan por tener una forma alargada similar a fibroblastos, por carecer de marcadores hematopoyéticos, como CD11b, CD34, CD14 y CD45 y por presentar positividad para los marcadores CD29, CD44, CD73, CD105, CD106 y CD166 (Ryan et al. 2005). Estas células además son capaces de sintetizar componentes de la matriz extracelular como fibronectina, versicán y colágeno-1, también producen factores solubles como G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-7, IL-11, TGF- β 1, SDF-1,IDO, PGE2, entre otros (Croitoru-Lamoury, Lamoury et al. 2007).

Dados estos antecedentes, y considerando su potencial de diferenciación a otros linajes celulares así como su fácil obtención, cultivo, manejo y alta tasa de proliferación *in vitro* las MSCs son consideradas como una poderosa herramienta terapéutica para la aplicación clínica en el tratamiento de patologías caracterizadas por el daño o destrucción de tejidos, como por ejemplo enfermedades del sistema nervioso, esquelético, cardíaco y hematopoyético, entre otros, lo que ha impulsado el inicio de una serie de estudios preclínicos en modelos animales y también estudios clínicos en humanos (Bruder et al. 1994, Uccelli et al. 2008).

De manera interesante, se ha descrito que las MSCs son importantes moduladores del sistema inmune ya que son capaces de responder a la inflamación alojándose en los tejidos dañados y controlando localmente la inflamación gracias a la expresión de una amplia variedad de quimioquinas y receptores de citoquinas que les permiten migrar a los sitios dañados (Newman et al. 2009). Liechty y colaboradores observaron por primera vez que las MSCs eran capaces de evadir la inmuno-vigilancia luego de un trasplante celular (Liechty et al. 2000, Bartholomew et al 2002). Diversos estudios posteriores atribuyeron esta característica al inmunofenotipo de MSCs en cultivo ya que estas presentan baja cantidad de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC, del inglés *Major Histocompatibility complex*, tipo I) pero carecen de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 lo que les permite escapar del reconocimiento por parte de células *Natural Killer* (NK) e impedir la activación de linfocitos T. Además, estas células no expresan constitutivamente MHC tipo II, principal característica que les permite evadir el reconocimiento por parte de linfocitos T. Estos hallazgos hicieron que las MSCs comenzaran a ser estudiadas con fines terapéuticos para el tratamiento de enfermedad de injerto contra el huésped (GVHD) dado que estas características hipoinmunogénicas representan una enorme ventaja y abre las puertas para el uso clínico de MSCs en trasplantes alogénicos como agentes inmunosupresores (Le Blanc et al. 2003, Chan et al. 2006, Krampera et al. 2003, Le Blanc et al. 2004).

1. 3. Efecto de MSCs sobre células del sistema inmune.

Con el paso de los años, diversos grupos observaron que la capacidad de modular el sistema inmune que tenían las MSCs era vía la supresión de células T, principalmente, aunque son capaces de inhibir tanto al sistema inmune innato como al adquirido. Aún cuando el mecanismo por el cual las MSCs regulan la actividad de linfocitos T no está del todo claro, varios autores postulan mecanismos que involucran tanto contacto célula-célula como secreción de diversos factores solubles que promueven la inhibición de estos linfocitos (Di Nicola et al. 2002, Krampera et al. 2003, Tse et al. 2003, Meisel et al. 2004, Aggarwal y Pittenger 2005). Estos últimos antecedentes han hecho que actualmente se desarrolle una amplia investigación de MSCs como nueva estrategia terapéutica para enfermedades autoinmunes y proinflamatorias mediadas por linfocitos T como GVHD, enfermedad de Crohn, Lupus, Esclerosis Múltiple y Artritis Reumatoide entre otras.

1. 3.1. Linfocitos T

Los linfocitos T se desarrollan en la médula ósea para posteriormente madurar en el timo desde donde salen al sistema inmune periférico. Participan en la inmunidad adquirida y corresponden a un subgrupo de la población linfocitaria total. Su principal función es coordinar la respuesta inmune celular y se caracterizan por expresar el Receptor de Célula T o TCR (del inglés *T-Cell Receptor*). Por medio de este receptor los linfocitos T son capaces de reconocer péptidos presentados por las células presentadoras de antígenos (APC, del inglés *Antigen Presenting Cells*). Así comienza la expansión clonal que finalmente genera una respuesta celular específica. Subsecuentemente, los linfocitos T se diferencian para expresar nuevos patrones de genes que les permitirán ejercer distintas funciones efectoras. Dependiendo de la función que finalmente cumplan los linfocitos T, estos se clasifican en subpoblaciones entre las cuales encontramos a linfocitos T *naïve*, T de memoria, T *helper* (TH), T citotóxicos (LTC) y T citotóxicos naturales o *Natural Killer* (NK) (O'Garra y Nakai 2000).

Los linfocitos TH son células que expresan la molécula de superficie CD4⁺ que junto al TCR reconocen los péptidos antigénicos presentados por el MHC clase II de las APC (células dendríticas, linfocitos B, entre otros). Así, los linfocitos TH se activan, proliferan y se diferencian a otros linajes "*helper*" que se definen principalmente por sus patrones de expresión de citoquinas y factores de transcripción con lo cual son capaces de coordinar la respuesta de otros componentes del sistema inmune tanto innato como adaptativo (Steward et al. 2010, Wing et al. 2010). Hoy en día, existe consenso en que los principales linfocitos TH son los TH1, TH2, TH17 y T reguladores (Tregs). Aun cuando se han propuesto otros linajes TH, su determinación requiere mayor estudio ya que los patrones de secreción de citoquinas son

compartidos con los de TH ya conocidos por lo que no se puede asegurar que formen parte de linajes distintos.

Los linfocitos TH1 se caracterizan por producir IFN- γ capaces de activar células fagocíticas. Esta respuesta confiere protección contra patógenos intracelulares como virus, micobacterias y protozoos. La diferenciación hacia TH1 es promovida por la IL-12, producida principalmente por APCs, la cual activa una cascada de señalización que finaliza en la expresión del factor de transcripción *T-box-expressed-in-Tcells* (T-bet) (Murphy et al. 2002, Almeida et al. 2005, Singh et al. 2007)

Los linfocitos TH2, que participan en la defensa contra parásitos, producen IL-4, IL-5 e IL-13 que promueven la producción de anticuerpos por parte de linfocitos B y reclutamiento de eosinófilos, además son capaces de inhibir la diferenciación a TH1. Su diferenciación es promovida por IL-4, secretada principalmente por células NK, mastocitos y basófilos, la que desencadena la regulación positiva del factor de transcripción *GATA-binding protein 3* (GATA-3) (Mosmann et al. 1989, Zhou et al. 2009)

Los linfocitos TH17 producen una amplia variedad de citoquinas entre las que se encuentran la IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-21. Estos linfocitos juegan un papel importante en la respuesta contra bacterias extracelulares y hongos. Se diferencian en presencia de TGF- β , IL-6, IL-21, IL-23 e IL-1 β y el factor de transcripción *Retinoid-related Orphan Recetor gamma* (ROR γ T) es específico para su desarrollo (Mai et al. 2011). La IL-17 ejerce su efecto en diversos lugares, induce la expresión de citoquinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- α , quimioquinas y metaloproteasas que finalmente producen destrucción tisular por lo que linfocitos TH17 tienen un comportamiento altamente proinflamatorio en varios modelos animales, en donde al reconocer auto antígenos, gatillan una severa respuesta de autoinmunidad (Betelli, Korn et al. 2007, Betelli, Ouka et al. 2007).

Finalmente los linfocitos Treg, que corresponden al 5-10% de células CD4⁺ presentes en sangre periférica tanto en ratón como humanos, producen citoquinas antiinflamatorias, IL-10 y TGF- β . Se diferencian en presencia de TGF- β el cual desencadena la expresión del factor de transcripción *Forkhead box P 3* (Foxp3), además la IL-2 es necesaria para la expansión y supervivencia de los Treg. Su función principal es mantener la homeostasis del sistema inmune promoviendo la tolerancia inmunológica frente a antígenos propios y la autorregulación de las propias respuestas proinflamatorias (Baecher-Allan et al. 2001, Bacchetta et al. 2005)

1. 3.2. Efecto inmunomodulador de MSCs sobre linfocitos TH

Los primeros estudios con respecto al efecto que producen las MSCs sobre linfocitos T demostraron que estas células son capaces de suprimir la respuesta proliferativa de linfocitos tanto autólogos como alogénicos. Así, MSCs agregadas a una reacción mixta linfocitaria (MLR, del inglés *Mixed Lymphocyte Reaction*) o agregadas a un cultivo de linfocitos activados por mitógenos, reducen la tasa de proliferación de los linfocitos en más de un 50% cuando son agregadas al día 0, sin embargo, este efecto disminuye cuando las MSCs son agregadas a tiempos tardío como día 3 o 5 (Bartholomew et al. 2002, Di Nicola et al. 2002, Krampera et al. 2003). Los autores han descrito que este efecto inhibitorio no es apoptótico ya que al retirar las MSCs y reestimar los linfocitos estos recuperan su capacidad de proliferar (Di Nicola et al. 2002), lo cual se corrobora con el hecho que las MSCs son capaces de regular negativamente proteínas necesarias para el ciclo celular, induciendo un arresto de la división celular en etapas G0/G1 sin suprimir la activación inicial de linfocitos T (Glennie et al. 2005). Se ha descrito también que no requieren la presencia de APCs ni células reguladoras CD4⁺CD25⁺ (Krampera et al. 2003) y que este efecto supresor es MHC independiente (Le Blanc et al. 2003).

Más tarde, Aggarwal y Pittenger realizaron co-cultivos de MSCs con células T en presencia de citoquinas que promueven la diferenciación hacia las estirpes TH1 y TH2 por 48 horas. Observaron que al reestimar los linfocitos y cultivar por otras 16 horas, los linfocitos TH1 disminuyen hasta en un 60% la secreción de IFN- γ ; mientras linfocitos TH2 aumenta hasta en un 500% la secreción de IL-4. En este estudio, se determinó también que los cocultivos de MSCs con linfocitos T en presencia de IL-2, por 6 días, aumentan significativamente los linfocitos Treg. Así, se determinó por primera vez que las MSCs tienen la capacidad de interactuar con distintas células del sistema inmune y de esta forma alterar la respuesta inmune celular inhibiendo la secreción de citoquinas proinflamatorias como INF- γ y a su vez promover la secreción de citoquinas supresoras como IL-4 e IL-10 (Aggarwal y Pittenger 2005).

Por otro lado, Ghanam realizó cocultivos con linfocitos TH17. Observó que las MSCs son capaces de inhibir la diferenciación de TH17 lo que se determinó por la inhibición en la secreción de todas las citoquinas proinflamatorias secretadas los linfocitos TH17 y, sorprendentemente, observó además un leve aumento en la secreción de citoquinas antiinflamatorias como IL-4 e IL10, entre otras. Más aun, realizó estos mismos cultivos con células TH17 totalmente diferenciadas y observó que además de disminuir la presencia de IL-17 e IL-23 comenzaba a aparecer una población secretora de IL-10, por lo tanto éstas células comenzaban a presentar un fenotipo Treg (Ghanam et al. 2010).

Además de estos y otros estudios que corroboran el efecto supresor de las MSCs sobre linfocitos T *in vitro*, existen estudios *in vivo* que confirman lo descrito. Bartholomew y colaboradores realizaron injertos

allogénicos de piel en un modelo primate (*papio anubis*) los que fueron tratados con MSCs a partir del día 0 en distintas dosis. Los animales no tratados, presentaron escaras y por medio de biopsia se determino que existía rechazo al tejido, estos animales tuvieron una sobrevida de 7 días. Los animales tratados, con una simple inyección de MSCs por vía subcutánea, aumentaron la sobrevida hasta en 11 días y aquellos que recibieron mayores dosis, o una segunda dosis, no mostraron mayor mejoría, lo cual, según discuten los autores, indicaría que la dosis fue suficiente para inhibir a los linfocitos pero insuficiente para producir el reclutamiento de otras células del sistema inmune (Bartholomew et al. 2002).

Djouad y colaboradores corroboraron la capacidad de diferenciación y de escapar del reconocimiento del sistema inmune al inyectar MSCs en el espacio intra-articular de la rodilla de ratones Balb-c. Observaron que a los 11 días después de la infiltración había formación de hueso y que a los 60 días existían una matriz hipercartilagenosa rodeada de hueso, adicionalmente determinaron que las MSCs no generan respuesta inmunitaria con lo que concluyen que las MSCs no solo son capaces de inhibir una respuesta inmune sino que también son capaces de mantener su capacidad de diferenciación (Djouad et. Al 2003). Más tarde, Le Blanc y colaboradores dieron a conocer en 2004 un caso clínico en que un paciente que presentaba GVHD severo luego de un trasplante allogénico de células madre. Como tratamiento, le administraron MSCs de la madre por vía intravenosa con lo que el paciente mejoró considerablemente luego de 4 días. Aun cuando esta mejoría fue en aumento con el paso de los días, el paciente sufrió de una recaída de menor intensidad que la enfermedad original. Nuevamente fue tratado con las MSCs de la madre y presentó una mejoría considerable pero esta vez su evolución se mantuvo en el tiempo. Así, se confirma en humanos, lo descrito previamente por Bartholomew en primates y este caso abrió las puertas para avanzar en estudios controlados de MSCs para la prevención y tratamiento de GVHD (Le Blanc et al. 2004).

En cuanto al tratamiento de enfermedades autoinmunes con MSCs, Zappia y colaboradores trabajaron con un modelo murino de Esclerosis Múltiple, llamado encefalitis autoinmune experimental (EAE) la cual corresponde a una enfermedad autoinmune caracterizada por una inflamación del sistema nervioso central mediada por linfocitos T y macrófagos. Observaron que al inyectar por vía intravenosa MSCs antes del *onset*, momento en que aparecen los primeros síntomas, disminuye satisfactoriamente la severidad de la enfermedad. Así mismo, cuando son inyectadas al *onset* y al *peak* de la enfermedad, ambos tratamientos son capaces de detener su progreso comparados con ratones sin tratamiento (Zappia et al. 2005). Por otro lado, Auguello y colaboradores demostraron que una simple inyección de MSCs a ratones que padecen de Artritis Inducida por Colágeno tipo II (CIA, del inglés *Collagen Induced Arthritis*), modelo murino de Artritis Reumatoide, enfermedad autoinmune crónica de etiología desconocida causada principalmente por la generación de auto-anticuerpos y caracterizada por provocar

inflamación crónica, principalmente de las articulaciones, con la consecuente destrucción del cartílago (González et al. 2009), previene la ocurrencia de daño severo e irreversible en hueso y cartílago además de modular la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Augello et al. 2007), evidenciando, una vez más, su rol inmunosupresor *in vivo*. Todos estos hallazgos indican que las MSCs tienen un marcado efecto inmunosupresor con lo que se potencian una vez más como alternativa terapéutica frente a enfermedades autoinmunes y proinflamatorias.

1. 4. Mecanismo inmunosupresor de MSCs

Diversos autores postulan que el efecto inmunosupresor de las MSCs depende tanto del contacto celular, es decir, de interacciones célula-célula entre MSCs y células blanco, como de los factores solubles secretados por las MSCs, que en conjunto son capaces de producir una respuesta aún más potente, sin embargo tanto los mecanismo celulares como moleculares involucrados en la actividad inmunorreguladora de las MSCs son desconocidos.

Krampera y colaboradores determinaron que la relación en número que existe entre MSCs y linfocitos activados es importante para cumplir su función inmunosupresora, así una relación mayor (como 1:10) produce un efecto más pronunciado que relaciones menores (como 1:100), es decir que el efecto ejercido es dosis dependiente. Postulan, además, que la presencia de MSCs es necesaria en el cultivo, ya que al retirarlas, el efecto inmunosupresor es revertido, con estos antecedentes, realizaron MLR en presencia de una membrana semipermeable en la que posicionaron a las MSCs en el compartimiento inferior y observaron que estas disminuían significativamente su efecto con lo que concluyen que el contacto celular es un componente indispensable en los mecanismos de supresión de estas células (Krampera et al. 2003). Más tarde, Auguello y colaboradores corroboran que es necesario el contacto celular para inhibir a linfocitos T. Así, ellos observaron que una vía involucrada en la inmunosupresión de las MSCs sobre linfocitos T es la vía de señalización de la proteína inhibitoria PD-1 (del inglés *Programmed Death 1*) que al unirse con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 modulan la secreción de citoquinas y factores de transcripción por parte de los linfocitos. Este mecanismo fue corroborado por medio de anticuerpos anti PD-1, PD-L1 y PD-L2 con lo cual observaron que las MSCs pierden su capacidad inmunosupresora (Augello et. Al 2005).

González y colaboradores observaron en ratones con CIA que las MSCs inhiben la proliferación de linfocitos T, extraídos de nódulos linfáticos, durante el *peak* de la enfermedad. Además determinaron que este efecto es parcialmente dependiente del contacto celular ya que al co-cultivar las MSCs con linfocitos en presencia de una membrana semipermeable el efecto es menor pero siguen siendo capaces de inhibir la proliferación. Así también, al bloquear ciertos factores solubles secretados por las MSCs como PGE-2 e

IL-10, en condiciones de contacto celular, nuevamente su efecto disminuye de manera significativa (González et al. 2009).

Con estos antecedentes surge la idea de que los factores solubles secretados por las MSCs juegan un papel preponderante en su efecto inmunomodulador, ya que muchos de los factores secretados por las MSCs son capaces de inhibir tanto a linfocitos TH1 como TH17 y promover la expansión de Treg y TH2. Algunos autores postulan que el efecto supresor de las MSCs se debe particularmente a factores como TGF- β 1, IL-10, IL-6, indolamina 2,3 oxigenasa (IDO), prostaglandina E2 (PGE2), óxido nítrico (NO), antígeno humano leucocitario tipo G (HLA-G, involucrada en tolerancia), factor de crecimiento hepático (HGF), entre otros (Meisel et al. 2004, Djouad et al. 2007, English et al. 2007, Ryan et al. 2007, Nasef et al. 2008, Ren et al. 2008, Bian et al. 2009).

Meisel y colaboradores describen, en estudios *in vitro*, que las MSCs son capaces de secretar IDO, a consecuencia de la activación de las MSCs con IFN- γ y otras citoquinas proinflamatorias. Esta enzima cataliza el metabolismo de triptófano a quineurina, en consecuencia, depletando el medio de triptófano lo cual se ha descrito previamente, inhibe la respuesta proliferativa de linfocitos (Taylor et al. 1991). Así, en MLR en presencia de IDO se observa un marcado efecto inmunosupresor el cual puede ser revertido al agregar triptófano al medio (Meisel et al. 2004).

Otro factor soluble relacionado con la actividad inmunosupresora de las MSCs es la IL-6, sobre la cual se ha descrito que las MSCs secretan una concentración basal la que se ve aumentada en presencia de ciertos estímulos como IFN- γ y TNF- α (Wang et al. 2002, English et al. 2007, Nasef et al. 2008, Ren et al. 2008, Rizzo et al. 2008, Lepelletier et al. 2009). La IL-6 es una citoquina con múltiples células blanco, como linfocitos T y B entre otras, que tiene acciones tanto pro como antiinflamatorias. Su efecto final depende tanto de su concentración local como de la presencia o ausencia de otras proteínas reguladoras (Giovanni et al. 2011). Bouffi y colaboradores investigaron el efecto de la IL-6 proveniente de MSCs tanto *in vitro* como *in vivo*. Tal como se había descrito anteriormente, confirmaron *in vitro*, que las MSCs provenientes de ratones *wild type* son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos alogénicos. De la misma manera, determinaron que MSCs provenientes de ratones *knock out* para IL-6, aun cuando conservan su capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos, esta inhibición no es significativa. *In vivo*, observaron en un modelo CIA que las MSCs *knock out* para IL-6 no son capaces de inhibir el desarrollo de la enfermedad con la magnitud en que las MSCs *wild type* son capaces de hacerlo cuando estas son aplicadas en los inicios de la enfermedad. Además comprobaron que la ausencia de IL-6 provoca una desregulación en la secreción de otros factores solubles secretados por las mismas MSCs como PGE2, NO entre otros, los que contribuyen a disminuir su capacidad inmunosupresora (Bouffi et al. 2010). También con respecto a

la IL-6, Xu y colaboradores investigaron, *in vitro*, sobre este efecto, ellos observaron que esta citoquina inhibe la apoptosis espontánea de esplenocitos cuando son co-cultivados con MSCs tanto en presencia como ausencia de una membrana semipermeable, y que este efecto disminuye significativamente en presencia de bloqueadores de la citoquina, además corroboraron que en presencia de linfocitos las MSCs aumentan la secreción de IL-6 que es la responsable de este efecto (Xu et al. 2007). Así los autores determinan que la IL-6 juega un papel fundamental en el mecanismo inmunosupresor de las MSCs, ya sea por su efecto directo sobre las células blanco como por un *feedback* hacia las mismas MSCs.

A pesar que se ha descrito ampliamente el efecto inmunosupresor de las MSCs tanto *in vitro* como *in vivo*, diversos investigadores han reportado en el último tiempo que las MSCs presentan un efecto estimulador sobre el sistema inmune y principalmente linfocitos T.

Guo y colaboradores observaron, *in vitro*, que en cocultivos de MSCs con células CD4⁺ purificadas las MSCs son capaces de inhibir la proliferación de los linfocitos, sin embargo, en ambos casos observaron un aumento de la IL-17. Determinan además que el aumento de IL-17 está ampliamente relacionado con el aumento de IL-6 en el medio, la cual estaría siendo secretada por las MSCs. Para confirmar este hallazgo, agregaron IL-6 exógena y observaron un aumento significativo de IL-17 mientras que al agregar bloqueadores de IL-6 la generación de esta citoquina disminuye. Con estas observaciones concluyen que el aumento de TH17 es mediado por una regulación positiva de la IL-6. También observan el efecto de las MSCs sobre la generación de poblaciones TH1 y Treg; en este caso determinan que las MSCs son capaces de suprimir la expansión de TH1 mientras que no ejercen un efecto significativo sobre linfocitos Treg (Guo et al. 2009).

Al igual que Guo y colaboradores, resultados obtenidos recientemente en nuestro laboratorio indican que en cocultivos de MSCs con linfocitos CD4⁺ en presencia de citoquinas que promueve la diferenciación hacia linfocitos TH1 o TH17, cuando las MSCs son agregadas al día 0 de activación mantienen su efecto característico inmunosupresor. Sin embargo, cuando ya ha comenzado la polarización de las células esta capacidad inmunosupresora disminuye; más aun, si éstas son agregadas a tiempos tardíos (día 3 de cultivo) llevan a un aumento de los linfocitos proinflamatorios TH17 (Carrión et al. 2010).

Chen y colaboradores investigaron este efecto *in vivo*. Inyectaron MSCs a ratones CIA al día 0 o al día 21 y monitorearon el progreso de la enfermedad. Observaron que las MSCs agregadas al día 0 no presentan un efecto antiinflamatorio significativo y que la inyección al día 21 agrava los síntomas de la enfermedad con respecto al control y al grupo inyectado al día 0. Por medio de análisis del perfil de citoquinas en sueros, determinaron además que en el grupo inyectado al día 21 hay un aumento significativo de IL-6 e IL-17. Estos resultados fueron corroborados *in vitro* realizando cocultivos de MSCs con esplenocitos

provenientes de ratones CIA. Los autores concluyen que el aumento de IL-6 en el suero promueve la expansión de linfocitos TH17 (Chen et al. 2009).

Tomando en cuenta la naturaleza altamente pro-inflamatoria e inductora de autoinmunidad de linfocitos TH17, es muy importante determinar los mecanismos por los cuales las MSCs ejercen su efecto inmunosupresor.

Diversos autores postulan que el efecto pro-inflamatorio estaría mediado por el microambiente generado por la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de linfocitos TH17. Hoy en día, está ampliamente caracterizado que IL-6 y TGF- β , son necesarios y suficientes para la expansión de linfocitos TH17 (Kato and Fox 2010), mientras que se ha reportado que las MSCs secretan altas cantidades de estos factores (Djouad et al. 2007, Guo et al. 2009). Así el *feedback* entre TH17 y MSCs promovería un cambio en el fenotipo inmunosupresor, observado por las MSCs frente a linfocitos TH1, por uno proinflamatorio que promueve la expansión de células TH17 (Fossiez, et al. 1996, Mahanonda et al. 2008, Goldberg et al. 2009)

En resumen, con los antecedentes analizados anteriormente, podemos concluir que las MSCs promueven la expansión del fenotipo proinflamatorio TH17 cuando actúan sobre linfocitos T CD4⁺ activados y en vías de diferenciación, lo que puede asimilarse como un estado de actividad de una enfermedad en humanos. Esto último, está en discordancia con los efectos inmunosupresores usualmente reportados de las MSCs, que se ven reflejados en los efectos que producen sobre linfocitos TH1. Esto nos indica que *in vivo* pueden producir efectos perjudiciales en el tratamiento de enfermedades dependiendo del tiempo en que sean aplicadas. Es por esto que se genera la necesidad de dilucidar el mecanismo por el cual las MSCs ejercen su efecto, ya sea inmunosupresor o inmunoestimulador sobre linfocitos activados, diferenciados a TH1 y TH17.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Tomado en consideración los antecedentes que indican que las MSCs son productoras y secretoras de altos niveles de IL-6 y que, a su vez esta citoquina intracelular es necesaria para la diferenciación de linfocitos CD4⁺ a linfocitos TH17, y el alto potencial que tienen las MSCs para el tratamiento de enfermedades autoinmunes por sus características inmunosupresoras sobre linfocitos TH1 planteamos la siguiente hipótesis:

“El efecto inmunomodulador de las MSCs sobre linfocitos TH1 y TH17 es dependiente de IL-6”

3. OBJETIVOS

3. 1. Objetivo General

Determinar el efecto de la secreción de IL-6 por parte de MSCs sobre la diferenciación de linfocitos TH1 y TH17 en un modelo *in vitro*.

3. 2. Objetivos Específicos:

- 1) Aislar, cultivar y caracterizar la morfología, inmunofenotipo y potencial de diferenciación de MSCs provenientes de medula ósea de ratones C57BL/6.
- 2) Diferenciar a partir de linfocitos T CD4⁺ a linfocitos TH1 y TH17.
- 3) Establecer cocultivos de MSCs provenientes de ratones *Wild Type* con TH1 y TH17 en presencia y ausencia de contacto celular
- 4) Establecer cocultivos de MSCs provenientes de ratones *Knock Out* de IL-6^{-/-} con linfocitos TH1 y TH17 en presencia y ausencia de contacto celular.

4. MÉTODOS

4. 1. Animales

Las células madre Mesenquimales fueron obtenidas a partir de médula ósea de ratones C57BL/6. Los animales fueron mantenidos en las Facilidades de Mantenimiento de Animales de la Universidad de Los Andes y provistos de agua y alimento *ad libitum*. Los protocolos fueron realizados de acuerdo al criterio aceptado para el cuidado y uso experimental de animales de laboratorio y aprobado por el comité de Cuidado y Uso Animal de la Universidad de los Andes.

4. 2. Obtención y expansión de MSCs *in vitro*.

Ratones C57BL/6 de 8 a 10 semanas de edad fueron sacrificados por dislocación cervical, de acuerdo a las normas de eutanasia de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria. Células de la médula ósea fueron obtenidas por medio de perfusión de fémur y tibias con Buffer salino de fosfato (PBS) estéril y centrifugadas por 6 minutos a 1680 rpm. Luego de la centrifugación las células fueron resuspendidas en medio α -MEM suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado por calor y calificado para cultivo de MSCs, 100 U/ml de penicilina, y 100 μ g/ml de estreptomina y luego cultivadas a una densidad de 1×10^6 células por cm^2 , a 37°C con 5% de CO_2 atmosférico. Las células no adherentes fueron retiradas a las 72 horas y el medio de cultivo fue cambiado cada 3 días. Las células obtenidas fueron monitoreadas por medio de microscopía de luz invertida, así al alcanzar el 80% de confluencia las células fueron subcultivadas por medio del tratamiento con tripsina (enzima que rompe las proteínas de adhesión), lavadas y cultivadas a una densidad de 1×10^4 células por cm^2 . Luego de 2 pasajes las células adherentes fueron purificadas mediante depleción negativa, usando el marcador CD45, por esferas magnéticas (Midi Macs, Miltenyi). Las células CD45⁻ fueron caracterizadas por diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica e inmunotipificadas por antígenos hematopoyéticos y mesenquimales.

4. 3. Caracterización de MSCs

Para inducir la diferenciación adipogénica, las células fueron cultivadas en medio de cultivo suplementado con 1×10^{-6} M de dexametasona, 0.02 mg/ml de indometacina y 10 μ g/ml de insulina (todos marca Sigma-Aldrich). Luego de 12 días de cultivo la diferenciación a adipocitos fue confirmada por medio de la técnica de tinción Oil-Red O (Sigma-Aldrich). Para la diferenciación condrogénica, las células fueron cultivadas a 5×10^3 células por μ l en 10 μ l de medio de cultivo por 1 h para lograr la formación de una micromasa. Luego las células son cultivadas en medio de cultivo suplementado con 10^{-7}

10^{-7} M de dexametasona, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y 10 ng/ml de TGF- β 3 (todos marca Sigma-Aldrich). A los 7 días se confirma la diferenciación condrogénica por medio de la tinción con Safranina O (Sigma-Aldrich). Finalmente para inducir la diferenciación osteogénica, las células adherentes fueron cultivadas hasta una densidad de 3×10^4 células por cm^2 en medio de cultivo suplementado con 10^{-7} M de dexametasona, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y 10 mM b-glicerofosfato (Sigma-Aldrich). Luego de 21 días de cultivo los depósitos de calcio fueron detectados por medio de la tinción con Alizarin Red (Sigma-Aldrich). El inmunofenotipo fue confirmado por citometría de flujo, con un citómetro marca Coulter modelo Epics-XL, utilizando anticuerpos monoclonales para detectar positividad en moléculas de superficie CD29, CD44, CD90 y SCA-1 y la negatividad de CD34 y CD45 (todos los anticuerpos marca BD Bioscience).

4. 4. Obtención de Células T CD4[±]

Los linfocitos T CD4⁺ 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) y luego lavadas y resuspendidas en PBS-EDTA 2mM. Las células CD4⁺ fueron purificadas de los esplenocitos utilizando un kit comercial (Miltenyi Biotec) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

4. 5. Obtención de linfocitos TH1 y TH17

Las células T CD4⁺ purificadas fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen) suplementado con 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina, y 100 μ g/ml de estreptomina, a 37°C con 5% de CO₂ atmosférico y a una densidad de 2×10^6 células por ml en placa de 24 pocillos (Corning). Las células fueron cultivadas en presencia de anticuerpos anti CD3 (3.5 μ g/ml) y anti CD28 (1.5 μ g/ml) (Beckton Dickinson), para inducir su activación y proliferación. Las células TH1 fueron diferenciadas mediante un cóctel de citoquinas que incluye 10 ng/ml de IL-12 (R&D Systems), 2,5 μ g/ml de anticuerpo anti-IL-4 y 10 U/ml de IL-2 (R&D Systems) por 6 días. Las células TH17 fueron diferenciadas mediante un cóctel de citoquinas que incluye 50 ng/ml de IL-6 (R&D Systems), 5ng/ml de TGF- β 1 (BioVision USA), 2.5 μ g/ml de anticuerpos anti IFN- γ y de anti IL-4 (ambos BD Bioscience) por 6 días.

4. 6. Co-cultivos de MSCs con linfocitos T CD4[±]

Para observar el efecto de la presencia de MSCs sobre linfocitos TH1 y TH17, se utilizaron MSCs provenientes de ratones *Wild Type* obtenidas en nuestro laboratorio y MSCs provenientes de ratones *Knock Out* de IL-6 (MSCs IL6^{-/-}), amablemente donadas por el doctor Christian Jorgensen de la universidad de Montpellier, Francia. Las MSCs que se encontraban previamente en cultivo fueron removidas de su recipiente por medio de la utilización de una solución 2x de la enzima Tripsina (Sigma Aldrich), contadas y posteriormente agregadas a los cultivos en una proporción MSCs: CD4⁺ de 1:10 y 1:100 a los días 0, 2 ó 4 de cultivo celular. De la misma manera los cultivos fueron realizados en presencia de una membrana semipermeable (Corning), para evitar el contacto celular, donde los linfocitos se encontraban en el compartimento inferior y las MSCs en el superior.

4. 7. Tinción intracelular para citometría de flujo

El análisis del perfil de secreción de citoquinas intracelulares se realizó en todos los casos al final del experimento, al día 6 de cultivo celular. Las células TH1 y TH17 fueron reestimuladas con 50 ng/mL de Phorbol-12- Myristate-13-Acetate (PMA) y 1 ug/mL de Ionomicina (ION), por 1 h, luego se agregó brefeldina al 1%, para reclutar las proteínas en el golgi, y se cultivó por 3 h adicionales. Luego las células fueron teñidas extracelularmente con anticuerpos monoclonales conjugados con fluoróforos CD4-PECy5 y CD25-Texas Red (BD Bioscience) por 20 min a 4°C. A continuación las células fueron permeabilizadas mediante kit comercial (BD Bioscience) por 20 min según las recomendaciones del fabricante para luego realizar la tinción intracelular con anticuerpos monoclonales conjugados con fluoróforos, IFN- γ -FITC y IL-17-PE (para determinar la presencia de TH1 y TH17) por 30 min a 4°C. La adquisición y análisis fue realizada mediante un citómetro de flujo marca Coulter modelo Epics-XL utilizando el programa System II.

4. 8. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para las comparaciones de medias múltiples y la prueba de Mann-Whitney para las comparaciones de sólo dos medias, utilizando para ello el programa estadístico Prism5. Se considerará estadísticamente significativo un valor $p < 0.05$.

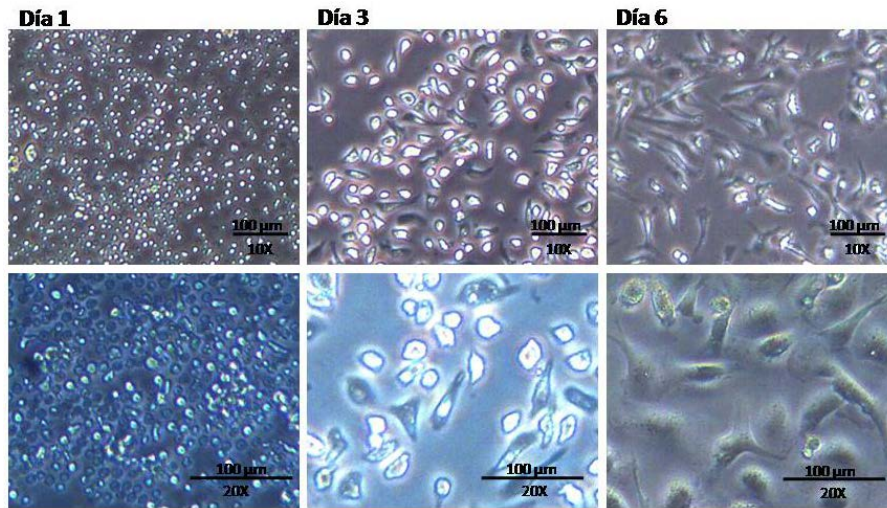
5. RESULTADOS

5. 1. *Caracterización funcional y fenotípica de MSCs derivadas de médula ósea.*

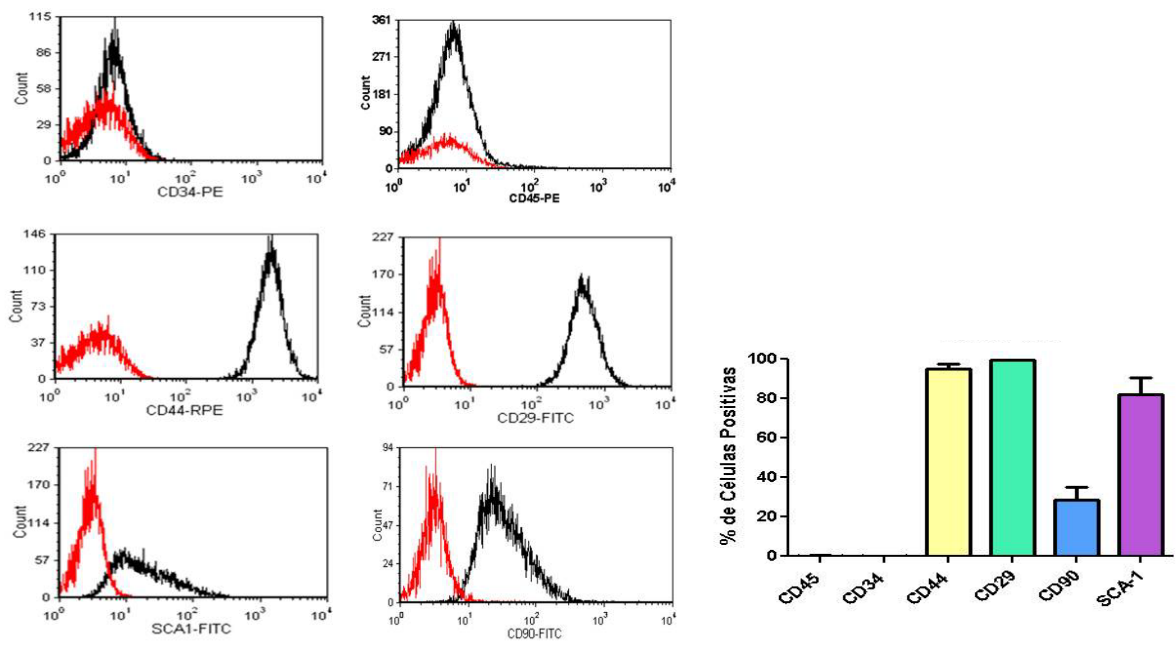
Las MSCs fueron obtenidas a partir de la extracción de médula ósea de fémur y tibia de ratones C57BL/6, como se detalla en materiales y métodos. Las células fueron cultivadas a una densidad de 1×10^6 células por cm^2 por 3 días, momento en el cual ya se observan las primeras CFU-F (Figura 1.A). Las células no adherentes fueron removidas por medio de lavados exhaustivos con PBS y se agregó medio fresco el cual fue cambiado cada 3 días hasta alcanzar un 80% de confluencia. Las células fueron tratadas con tripsina, por 5 min, periodo en el cual la enzima, que corresponde a una serina proteasa, es capaz de destruir las moléculas que permiten la adhesión de las MSCs al plástico pero que no alcanza a afectar las uniones de precursores hematopoyéticos, los que también pueden adherirse a la superficie. Una vez lavadas y resuspendidas en medio de cultivo las células obtenidas son cultivadas nuevamente a una densidad de 1×10^4 células por cm^2 , con lo cual las células alcanzan el pasaje 1. Luego del segundo pasaje se procedió a purificar y fenotipificar las células obtenidas. Las células presentaron forma de fibroblasto y por medio de citometría de flujo se determinó que éstas células poseen en su superficie CD29, CD44, CD90 y SCA-1 (99.7 ± 0.2 , 98.2 ± 1.3 y 43.4 ± 8.5 % respectivamente) y carecen de CD34 y CD45 (0.5 ± 0.4 y 2.1 ± 0.8 % respectivamente). Las MSCs IL-6^{-/-} también fueron fenotipificadas y se observó que también poseen en su superficie CD29, CD44, CD90 y SCA-1 (99.7 ± 6.5 , 95.2 ± 2.1 , 28.8 ± 6.5 y 81.0 ± 8.7 % respectivamente) y que carecen de CD34 y CD45 (0.1 ± 0.1 y 0.3 ± 0.1 % respectivamente) (Figura 1.B). Adicionalmente estas células fueron capaces de diferenciarse a adipocitos, condrocitos y osteoblasto bajo las condiciones adecuadas de cultivo (Figura 1.C). Las MSCs obtenidas son resuspendidas en medio de congelación que contiene 90% de SFB y 10% de dimetilsulfoxido (DMSO), el cual corresponde a un anticongelante que permite mantener estable a las células que fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su utilización.

Figura 1.

A.



B.



C.

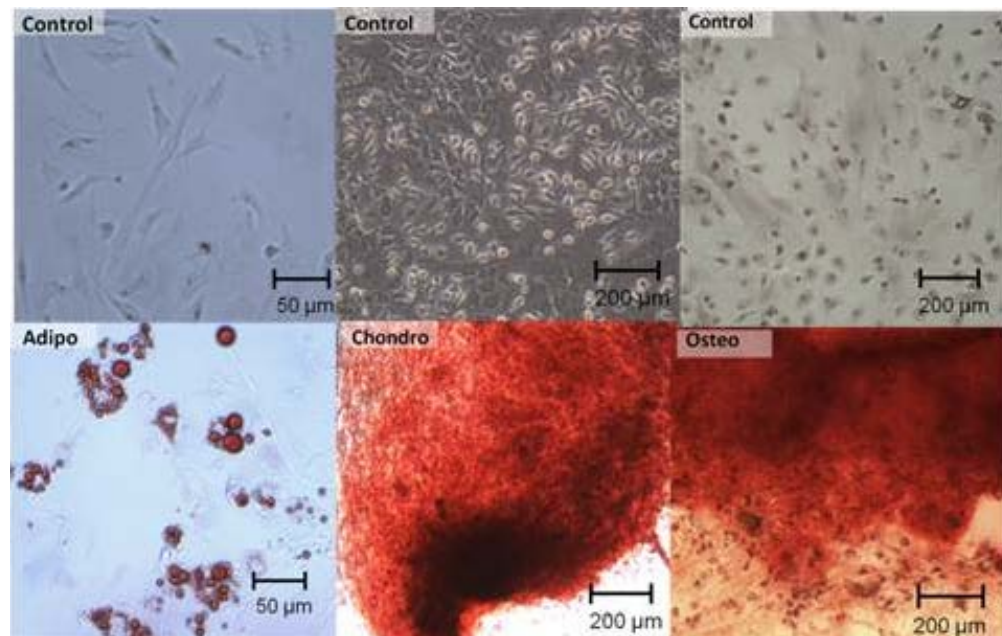


Figura 1: Caracterización de MSCs

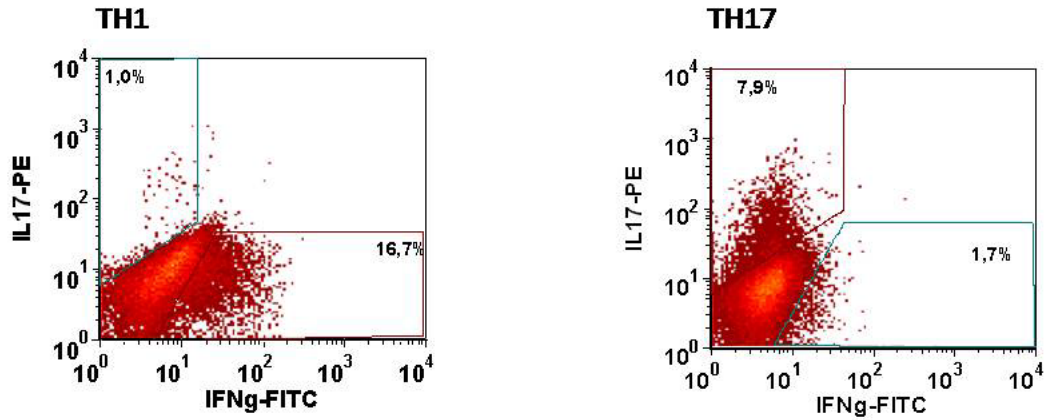
A) Fotos representativas de células aisladas de médula ósea de ratón a los días 1, 3 y 6 de cultivo, arriba con zoom 10x y abajo con zoom 20x. MSCs obtenidas de médula ósea de ratón C57BL/6 fueron caracterizadas fenotípicamente y por su capacidad de multidiferenciación cuando se encontraban en pasaje 2. B) A la izquierda, histograma representativo de 4 experimentos independientes para los distintos marcadores de superficie. En rojo se muestra el control sin marca. A la derecha, grafico que demuestra la presencia o ausencia de los distintos marcadores de superficie con su error estándar. C) Tri-diferenciación de MSCs a adipocitos (tinción con Oil Red O), condrocitos (tinción con safranina) y osteoblastos (tinción con Alizarin Red) respectivamente. Arriba, control que corresponde a líneas celulares sin medio de diferenciación, abajo MSCs diferenciadas.

5. 2. Diferenciación de linfocitos TH1 y TH17 a partir de linfocitos CD4⁺ purificados de bazo de ratón C57BL/6.

Linfocitos de bazo de ratones C57BL/6 fueron incubados con anticuerpos unidos a esferas magnéticas, como se detalla en materiales y métodos, para obtener linfocitos CD4⁺ purificados. Estos linfocitos fueron cultivados en placa de 24 pocillos a una concentración de 1 millón de células por ml. Para obtener linfocitos TH1 y TH17, al día 0, fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. El estímulo anti-CD3/CD28 es un estímulo policlonal de linfocitos T CD4⁺ que simula la presentación antigénica. El anti-CD3 activa el CD3, correceptor asociado al TCR, activando la cascada de señalización intracelular. Adicionalmente el CD28, molécula coestimuladora, amplifica la señal de activación. Una vez estimuladas, se les suministró un cóctel de citoquinas que favorece la diferenciación, anti-IL-4, IL-2 e IL-12 para obtener la estirpe TH1 y anti-IL-4, anti-IFN- γ , TGF- β e IL-6 para obtener la estirpe TH17. Luego de 6 días de cultivo las células obtenidas fueron sometidas a citometría de flujo, como se detalla en materiales y métodos, para determinar la expresión de IFN- γ , citoquina característica de células TH1 y la expresión de IL-17 que corresponde a la citoquina característica de TH17. Se observó que en el cultivo existía un 10.1% (\pm 0.5) de IFN- γ , mientras que se observó un 8.2% (\pm 0.4) de IL-17 (Figura 2).

Figura 2.

A.



B.

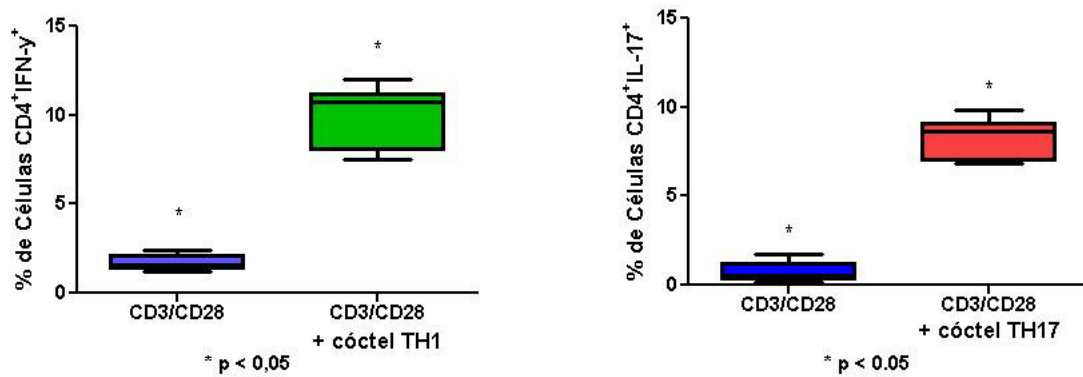


Figura 2. Diferenciación de Linfocitos.

A) Citometrías representativas de linfocitos CD4⁺ estimulados en presencia de cóctel de citoquinas, a la izquierda para TH1 y a la derecha para TH17, analizadas al día 6 de cultivo por citometría de flujo. B) Expresión de IFN- γ e IL-17 (N = 10 para TH1 y N = 7 para TH17) donde CD3/CD28 corresponde a linfocitos activados en ausencia de cóctel de citoquinas y CD3/CD28 + cóctel, corresponde a linfocitos activados en presencia de cóctel de citoquinas específico para cada estirpe.

5. 3. Efecto de MSCs Wild Type sobre la activación de linfocitos TH1 y TH17.

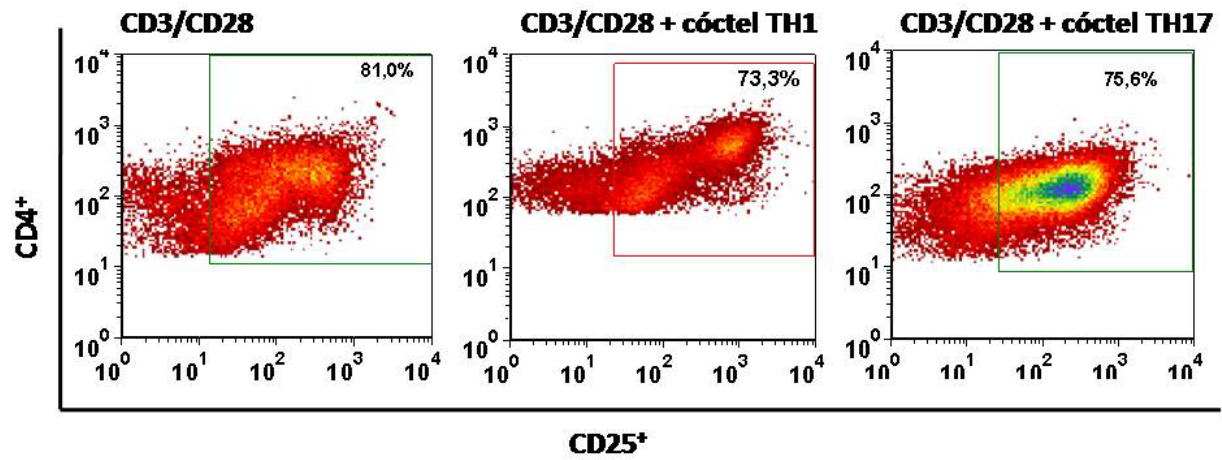
Ya que previamente se ha descrito que las MSCs son capaces de inhibir a linfocitos T, y que para que ocurra la proliferación los linfocitos necesitan, por medio de un estímulo, activarse para poder diferenciarse, estudiamos si es que las MSCs tienen la capacidad de inhibir la activación de los linfocitos TH1 y TH17.

Para ello, determinamos la presencia de CD25, molécula de superficie que corresponde a la cadena α del receptor de IL-2 (factor de crecimiento de linfocitos) y que a su vez es un marcador de activación de linfocitos, así, luego de su aparición en la superficie los linfocitos aumentan de tamaño y comienzan su proceso de diferenciación. En primer lugar, determinamos que tanto linfocitos en condiciones polarizantes para TH1 y TH17 se activan de igual manera que linfocitos activados con anti CD3/CD28 (Figura 3A y B).

Como era de esperarse, ya que las MSCs inhiben la proliferación de linfocitos T, cuando las MSC son agregadas al día 0 del cultivo celular tanto en proporción 1:10 como 1:100, los linfocitos, en su mayoría, no son capaces de activarse, este fenómeno ocurre casi con la misma intensidad tanto en cultivos de linfocitos TH1 (Figura 4) como TH17 (Figura 5). Las MSCs agregadas a los día 2 y 4 de cultivo, pierden gradualmente su capacidad de inhibir la activación tanto de linfocitos TH1 como TH17. Es probable que las MSCs no tengan la capacidad de regular negativamente la expresión de CD25 en la membrana celular y que la inhibición que se observa esté ocurriendo sobre linfocitos que aún no han comenzado su proceso de activación y consecuente diferenciación. Los resultados indican que cuando las MSCs son agregadas a tiempo temprano el efecto que producen es bloquear la activación de linfocitos independiente de su estirpe, ya que debemos considerar que en nuestro cultivos sólo un 10 a 15% corresponden efectivamente a linfocitos TH1 o TH17 y el efecto supresor de la activación se observa sobre más de un 50% de la población.

Figura 3.

A.



B.

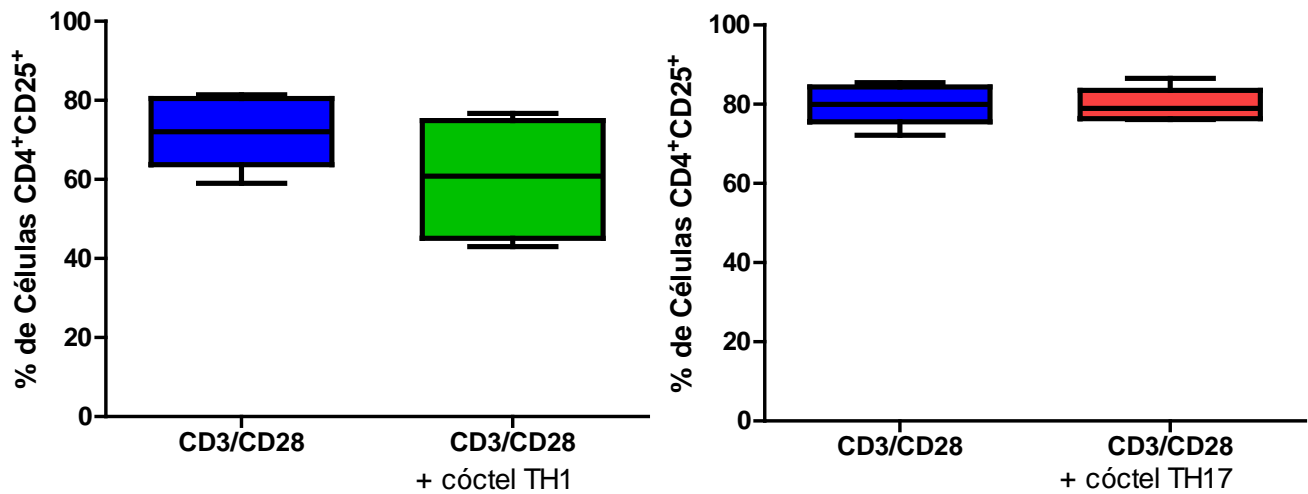
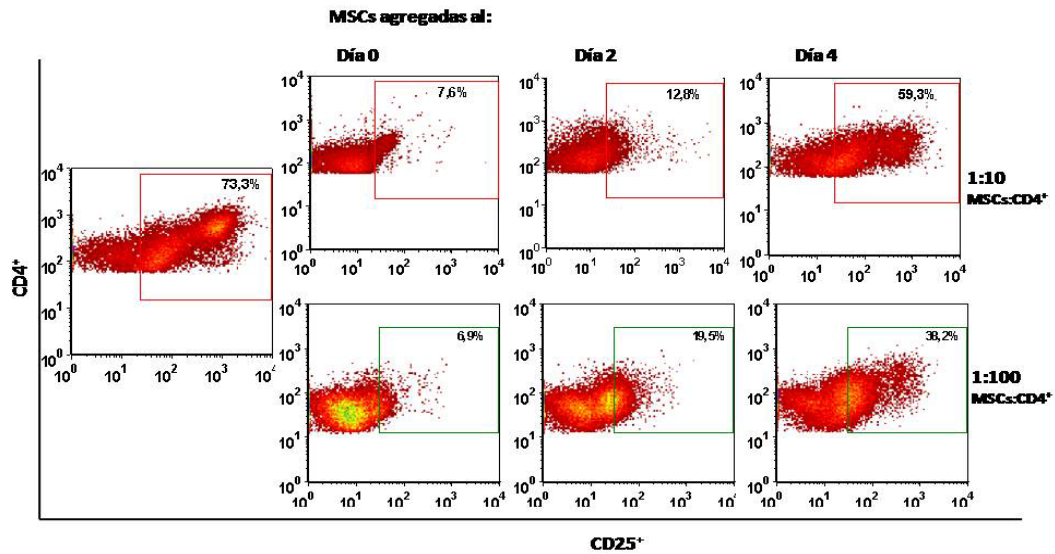


Figura 3. Activación de linfocitos TH1 y TH17.

A) Citometrías representativas y B) Gráficos que muestran la expresión de CD25 en la superficie celular de cultivos de linfocitos activados donde CD3/CD28 corresponde linfocitos activados en ausencia de cóctel de citoquinas (N = 8), CD3/CD28 cóctel TH1 (N = 7) y CD3/CD28 cóctel TH17 (N = 5) corresponden a linfocitos activados en presencia de cóctel de citoquinas para la diferenciación hacia las estirpes TH1 y TH17, respectivamente. Las mediciones fueron realizadas al final del experimento, al día 6 de cultivo celular.

Figura 4.

A.



B.

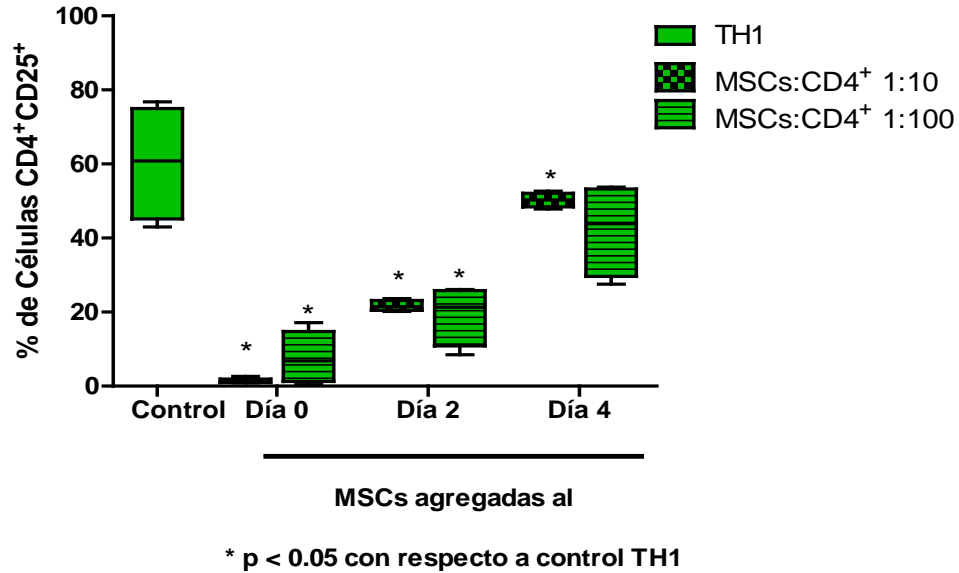
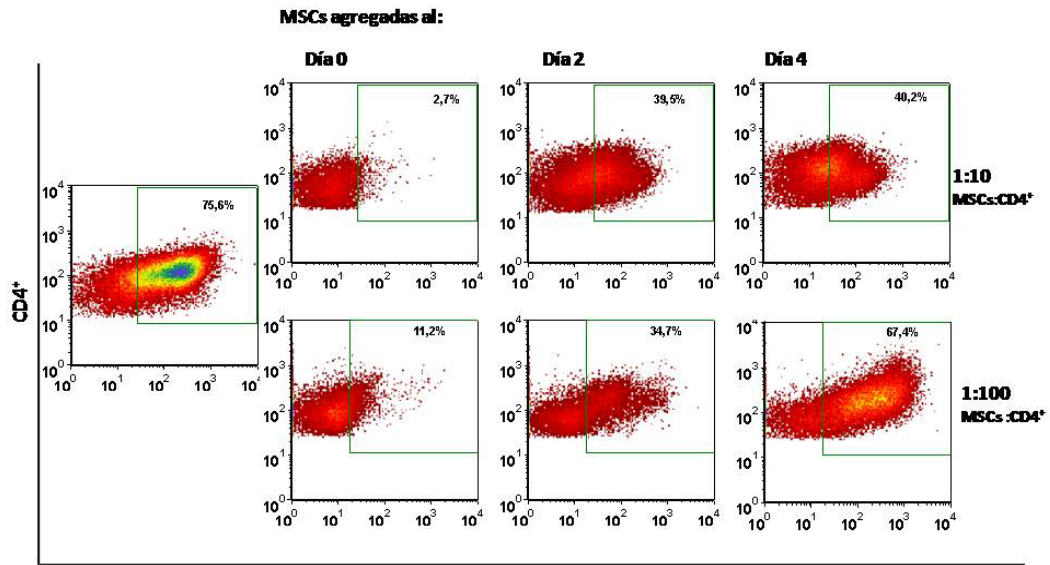


Figura 4. Efecto de MSCs sobre activación de linfocitos TH1 determinado por la presencia de CD25.

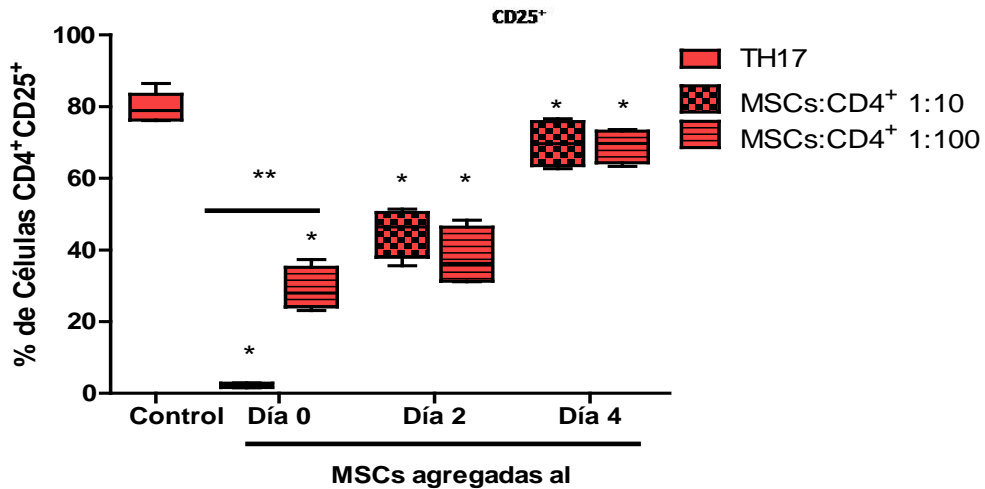
A. Citometrías representativas de linfocitos TH1 y su expresión de CD25 cuando las MSCs son agregadas en proporción MSCs:CD4⁺ = 1:10 (arriba) y 1:100 (abajo) al cultivo celular. B. Gráfico que muestra la expresión de CD25, donde TH1 corresponde a linfocitos activados en presencia de cóctel de citoquinas y en ausencia de MSCs (N = 7), Día 0 (N = 5), Día 2 (N = 4) y Día 4 (N = 4) corresponde a linfocitos activados en presencia de cóctel de citoquinas con MSCs agregadas al día 0, 2 y 4 de cultivo celular respectivamente. Las mediciones fueron realizadas al final del experimento, al día 6 de cultivo celular.

Figura 5.

A.



B.



* $p < 0.05$ con respecto a control TH17

** $p < 0.05$ con respecto a la misma condición en distinta proporción

Figura 5. Efecto de MSCs sobre activación de linfocitos TH17 determinado por la presencia de CD25.

A. Citometrías representativas de linfocitos TH17 y su expresión de CD25 cuando las MSCs son agregadas MSCs:CD4⁺ = 1:10 (arriba) y 1:100 (abajo) de cultivo celular. B. Gráfico que muestra la expresión de CD25 en proporción 1:10 y proporción 1:100, donde TH17 corresponde a linfocitos activados en presencia de cóctel de citoquinas y en ausencia de MSCs (N = 5), Día 0 (N = 4), Día 2 (N = 4) y Día 4 (N = 4) corresponde a linfocitos activados en presencia de cóctel de citoquinas con MSCs agregadas al día 0, 2 y 4 de cultivo celular respectivamente. Las mediciones fueron realizadas al final del experimento, al día 6 de cultivo celular.

5. 4. Efecto de MSCs Wild Type sobre la diferenciación de linfocitos TH1 y TH17 en presencia de contacto celular.

Para estudiar el efecto de MSCs en la diferenciación de linfocitos TH, células T CD4⁺ purificadas fueron activadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y luego cultivados por 6 días en condiciones polarizantes hacia la estirpe TH1 o TH17. Los linfocitos activados y cultivados en condiciones polarizantes fueron cocultivados con MSCs las cuales fueron agregadas a los cultivos a tiempo temprano (día 0), después de 2 días de cultivo celular, o después de 4 días de cultivo celular, en proporción 1:10 ó 1:100 (MSCs: CD4⁺). La diferenciación de linfocitos TH1 y TH17 fue medida por la expresión de citoquinas intracelulares características de ambas estirpes, IFN- γ e IL-17, para TH1 y TH17 respectivamente, y comparadas respecto a los respectivos controles sin tratamiento, TH1 ó TH17 en ausencia de MSCs. Las mediciones fueron realizadas por citometría de flujo al día 6 de cultivo celular.

Al utilizar una proporción 1:10, las MSCs agregadas a al día 0 de cultivo celular son capaces de inhibir la diferenciación de linfocitos TH1 en un 77.5%. Esta inhibición sigue siendo visible aun cuando las MSCs son agregadas a tiempos tardíos, así al día 2 la inhibición alcanza un 78.5% mientras que al día 4 de un 30.8%. Concluimos entonces que las MSCs agregadas en proporción 1:10 son capaces de inhibir la diferenciación de linfocitos TH1 a todos los tiempos estudiados ya que son inhibidas significativamente ($p < 0.5$) tanto a tiempo temprano como a tiempos tardíos, sin embargo, la capacidad de inhibición de las MSCs disminuye levemente mientras más tarde son agregadas al cultivo.

Frente a estos resultados, nos preguntamos si es que el número de MSCs presentes en el cultivo sería un factor determinante en este efecto, es por esto que decidimos observar si es que este efecto se mantiene cuando las MSCs están presentes en una proporción 1:100 en el cultivo.

Observamos que aun cuando la cantidad de MSCs en cultivo con respecto a linfocitos TH1 es 100 veces menor, éstas conservan su capacidad de inhibir tanto a tiempo temprano (75.7%) como a tiempos tardíos (45.8.3% y 38.3% a los días 2 y 4 respectivamente). Sin embargo, observando el grafico podemos ver que la mayor diferencia se encuentra cuando las MSCs son agregadas al día 2 ($p < 0.05$), donde en proporción 1:100 se observa una tendencia a disminuir su capacidad inhibitoria con respecto a proporción 1:10. Este efecto, que no se observa cuando las MSCs son agregadas al día 0 y 4, puede deberse a un factor dependiente del contacto celular, ya que al haber menor cantidad de células se generan menor cantidad de interacciones entre MSCs y linfocitos, o bien de una menor concentración de factores solubles secretados por esta menor concentración de MSCs en el cultivo que, como consecuencia, produzcan un efecto distinto sobre linfocitos TH1. Cuando las MSCs son agregadas al día 4 de cultivo celular, no se observan diferencias significativas entre ambas proporciones aun cuando ambas son capaces de inhibir a linfocitos

TH1. Esta menor inhibición puede deberse a que los linfocitos han tenido 4 días para activarse con lo que las MSCs tendrían menos blancos de acción y por tanto ejercen una menor inhibición (Figura 6A y B).

Los mismos experimentos fueron realizados con linfocitos TH17 y observamos que las MSCs en proporción 1:10 son capaces de inhibir la diferenciación de TH17 en un 94.2% cuando son agregadas al día 0 de cultivo. De la misma manera, a tiempos tardíos se observa una inhibición de 84.9% y 70.9% cuando las MSCs son agregadas a los días 2 y 4 respectivamente. En porcentaje, esta inhibición es considerablemente mayor que la observada sobre linfocitos TH1.

Sorprendentemente, a diferencia de lo que ocurre con linfocitos TH1 y a pesar de que inhiben con mayor intensidad a linfocitos TH17, las MSCs agregadas en proporción 1:100 al día 0 si bien son capaces de inhibir la diferenciación de linfocitos TH17 en un 89.5%, y al ser agregadas al día 2 en un 83.7%, es decir con la misma intensidad con que inhiben en proporción 1:10, al ser agregadas al día 4 pierden totalmente su capacidad de inhibir a linfocitos TH17, y desprendido de la observación del gráfico, aún cuando no existe un aumento significativo con respecto al control TH17, se observa una tendencia al aumento de linfocitos TH17 (Figura 7A y B).

Con estos resultados, queda de manifiesto que si bien las MSCs tienen una amplia capacidad inmunosupresora sobre las estirpes TH1 y TH17, existe un efecto paradójico cuando son agregadas al día 4, ya que inhiben a linfocitos TH1 mientras que parecen estimular la diferenciación de linfocitos TH17 en la proporción 1:100. Con este efecto paradójico que presentan las MSCs frente a las dos estirpes surge la idea que el mecanismo por el cual las MSCs ejercen su efecto sobre las distintas subpoblaciones de linfocitos difiere una de la otra, y dado que este efecto diferencial se produce principalmente cuando las MSCs son agregadas a tiempos tardíos a los cultivos y por un menor número de MSCs presentes en el cultivo, cabe preguntarse si es que el efecto observado es dependiente o no del contacto celular, ya que suponemos que al haber menor cantidad de MSCs en el medio habría un menor número de interacciones entre MSCs y linfocitos y como consecuencia, una menor intensidad en la inhibición de linfocitos TH1 y un posible aumento de linfocitos TH17.

Figura 6.

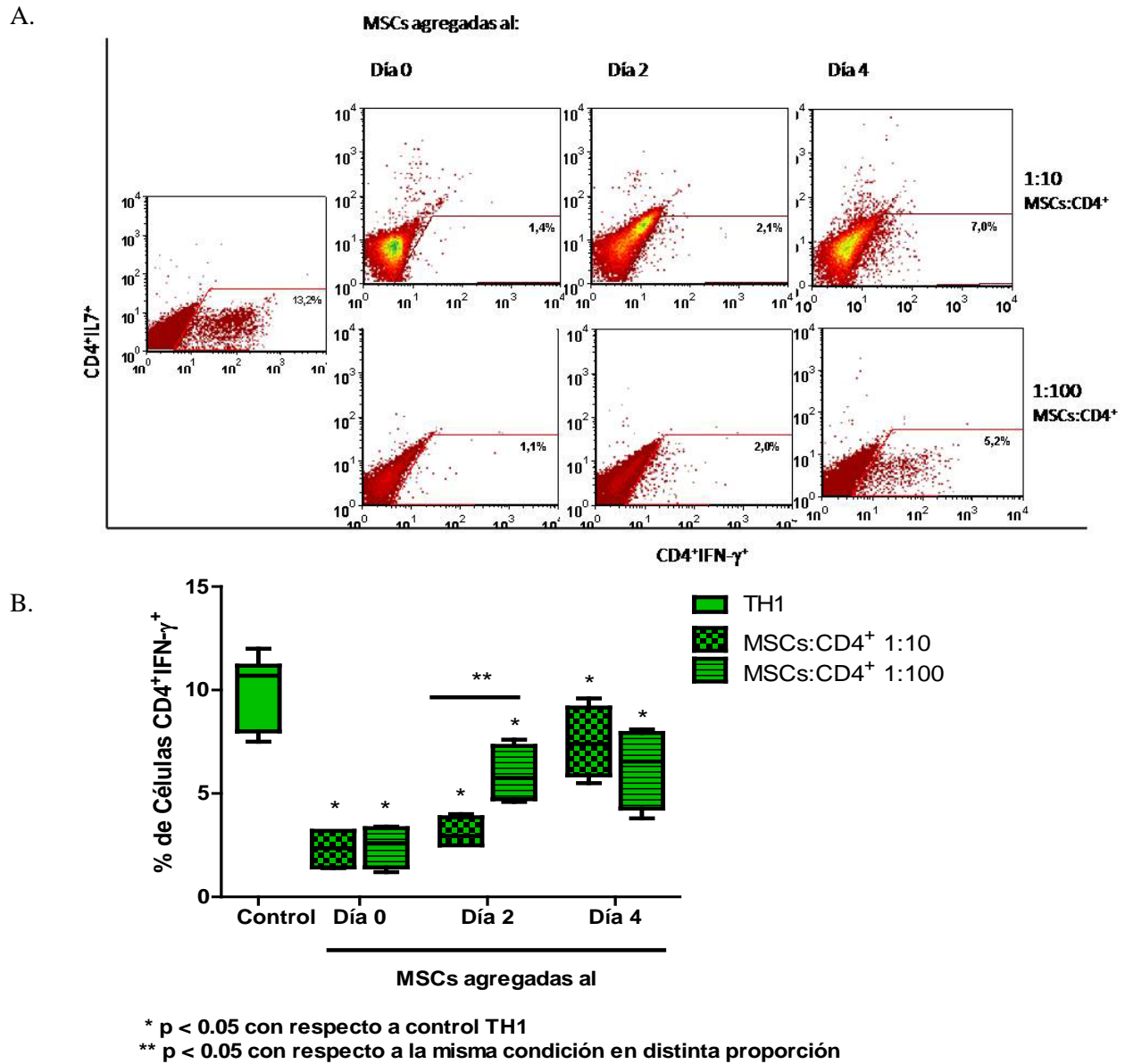
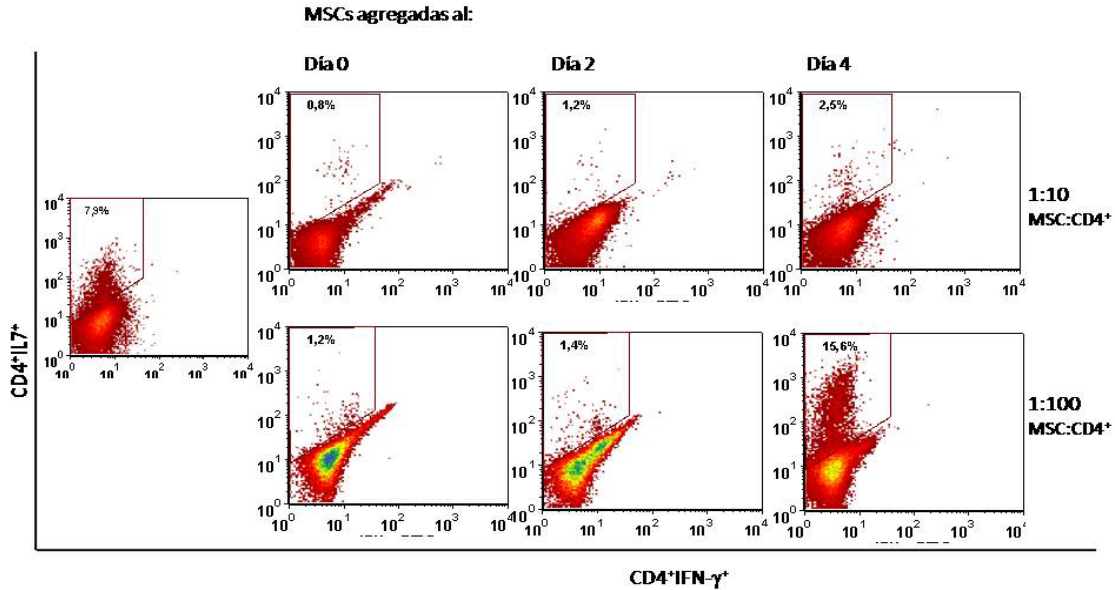


Figura 6. Efecto de MSCs sobre expresión de IFN-γ por linfocitos TH1.

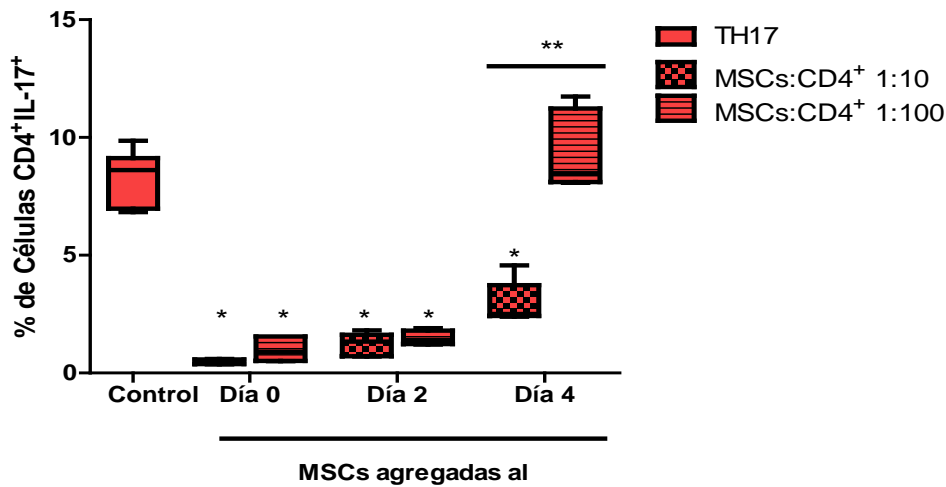
Expresión de IFN-γ medida por citometría de flujo. A) Citometrías representativas de cultivos de linfocitos con MSCs agregadas en proporción 1:10 (arriba) y proporción 1:100 (abajo) al cultivo. B) Gráfico que muestra secreción de INF-γ con MSCs agregadas en proporción 1:10 y en proporción 1:100, donde TH1 corresponde a linfocitos activados en presencia de cóctel de citoquinas y en ausencia de MSCs (N=10), Día 0, 2 y 4 corresponden a linfocitos activados en presencia de cóctel de citoquinas a los cuales se les agregó MSCs a los días 0, 2 y 4 de cultivo respectivamente (N = 4). Las mediciones fueron realizadas al final del experimento, al día 6 de cultivo celular.

Figura 7.

A.



B.



* $p < 0.05$ con respecto a control TH17

** $p < 0.05$ con respecto a la misma condición en distinta proporción

Figura 7. Efecto de MSCs sobre secreción de IL-17 por linfocitos TH17.

Expresión de IL-17 medida por citometría de flujo. A) Citometrías representativas de cultivos de linfocitos con MSCs agregadas en proporción 1:10 (arriba) y proporción 1:100 (abajo) de cultivo. B) Gráfico que muestra secreción de IL-17 con MSCs agregadas a distintos tiempos en proporción 1:10 y en proporción 1:100, donde TH17 corresponde a linfocitos activados en presencia de cóctel de citoquinas y en ausencia de MSCs (N=7), Día 0, 2 y 4 corresponden a linfocitos activados en presencia de cóctel de citoquinas a los cuales se les agregó MSCs a los días 0 (N = 6 y N = 5 para 1:10 y 1:100 respectivamente), día 2 (N = 5 y N = 4 para 1:10 y 1:100 respectivamente) y día 4 (N = 5) de cultivo respectivamente. Las mediciones fueron realizadas al final del experimento, al día 6 de cultivo celular.

5. 5. Efecto de MSCs Wild Type sobre la diferenciación de linfocitos TH1 y TH17 en ausencia de contacto celular.

Dado los resultados anteriores, en que observamos que existe una clara diferencia en el mecanismo por el cual las MSCs ejercen su efecto sobre linfocitos TH1 y TH17, ya que estas son capaces de inhibir la diferenciación de linfocitos TH1 en todos los tiempos agregadas y que los linfocitos TH17 no son inhibidos cuando las MSCs son agregadas al día 4 de cultivo celular, y dado que las mayores diferencias se presentan cuando la proporción es menor, decidimos estudiar si es que este efecto diferencial depende en alguna medida del contacto celular entre MSCs y linfocitos. Para ello, utilizamos membranas semipermeables que tiene un espesor de poro de 0.4 μm , el cual impide el paso de células, bloqueando el contacto celular entre MSCs y linfocitos, y permite el paso de factores solubles. Las MSCs fueron puestas en el compartimiento superior en proporciones 1:10 ó 1:100 mientras que los linfocitos fueron puestos en el compartimiento inferior, como se muestra en la figura 8, en concentración de 1 millón de células por ml, como se realizó en todos los experimentos anteriores.

En cultivos de linfocitos TH1, observamos que las MSCs en presencia o ausencia de la membrana semipermeable agregadas en proporción 1:10 al cultivo, son igualmente capaces de inhibir la diferenciación de linfocitos TH1 cuando son agregadas al día 0 de cultivo. Al igual como ocurre cuando existe contacto celular, esta inhibición es menor a medida que las MSCs son agregadas más tarde al cultivo (día 2 ó 4), aún cuando la inhibición no se pierde completamente. Así, cuando son agregadas al día 0 de cultivo celular, en proporción 1:10, los factores solubles secretados por las MSCs serían suficientes para ejercer el efecto inhibitorio sobre los linfocitos TH1. Cuando las MSCs son agregadas al cultivo al día 2 y 4, al igual que ocurre con el contacto celular, la capacidad inhibitoria de los factores solubles secretados por las MSCs sobre los linfocitos TH1 disminuye. Si bien existe una amplia dispersión en los datos de MSCs en ausencia del contacto celular agregadas al día 4 de cultivo, el efecto inhibitorio desaparece, por tanto en esta condición los factores solubles no son suficientes para inhibir a linfocitos TH1, ya sea porque existe una menor cantidad de células blancas, ya que la mayor parte de los linfocitos han de estar totalmente diferenciados, o bien porque el contacto celular es necesario para ejercer el efecto inhibitorio en ese estado de activación (Figura 9A).

Cuando las MSCs son agregadas en proporción 1:100 al cultivo, el efecto se reproduce y, como era de esperarse, con menor intensidad que en la proporción 1:10. Así, cuando las MSCs son agregadas al día 0 de cultivo, la diferencia en la capacidad inhibitoria de las MSCs sobre linfocitos TH1 en ausencia del contacto celular se acentúa aun cuando se mantiene un alto potencial inhibitorio. Esto puede deberse, sin duda, a que una menor cantidad de MSCs secretan una menor cantidad de factores solubles, por lo tanto existe una menor concentración de ellos en el medio, lo que impide producir un efecto tan pronunciado

como ocurre en la proporción 1:10. Nuevamente esta tendencia inhibitoria disminuye cuando las MSCs son agregadas más tarde a los cultivos (día 2 o 4). Cuando las MSCs son agregadas al día 4 de cultivo celular en ausencia de contacto celular y en proporción 1:100, a diferencia de lo que ocurre con la proporción 1:10, se observa una leve, pero significativa, inhibición de linfocitos TH1. Esto concuerda con la importancia que juegan los factores solubles en la modulación de los distintos tipos celulares ya que su efecto dependerá de su concentración en el medio, entre otros factores reguladores (Figura 9B).

En cultivos de linfocitos TH17, se observa un fenómeno distinto. En presencia de la membrana semipermeable, cuando las MSCs son agregadas en proporción 1:10 al cultivo, el efecto inhibitorio es ampliamente disminuido dejando en clara evidencia que el contacto celular juega un papel fundamental en la inhibición de linfocitos TH17 (Figura 10A). Cuando las MSCs son agregadas en proporción 1:100 al cultivo (Figura 10B), este fenómeno se repite aun con mayor intensidad, tanto así que cuando las MSCs son agregadas al día 2 en ausencia del contacto celular el efecto inhibitorio es totalmente abolido. En este punto, se observa una gran dispersión de datos, donde la mediana indica que no existe ni aumento ni disminución de la inhibición, sin embargo un 50% de los datos muestra que existe un aumento de la diferenciación a TH17, mientras que el otro 50% muestra una inhibición. Esto puede deberse a que, al día 2 deben existir células que estén comenzando a activarse y, por lo tanto, están recién entrando en el proceso de diferenciación, mientras que otras células ya han de haber comenzado el proceso de diferenciación y comprometido con la estirpe TH17, entonces los factores solubles, ayudados por la ausencia del contacto celular, estarían jugando un papel contrario sobre estas células, inhibiendo a las primeras y estimulando a las segundas. Este último resultado concuerda plenamente con el observado anteriormente donde vimos que las MSCs agregadas en proporción 1:100 inhiben a linfocitos TH17 cuando son agregadas al día 2 de cultivo celular pero que pierden su capacidad inhibitoria cuando son agregadas al día 4. El efecto estimulador de los factores solubles secretados por las MSCs, en ausencia del contacto celular, se observa claramente cuando las MSCs son agregadas al día 4 de cultivo, en esta condición es probable que las células, en su mayoría, estén diferenciadas y que la ausencia del contacto celular y la concentración de los factores solubles estarían comprometiendo a un mayor número de células activadas a diferenciarse hacia la estirpe TH17.

De acuerdo a todo lo anterior, podemos concluir que el efecto inmunosupresor de las MSCs sobre linfocitos TH1 y TH17 difiere en mecanismo, ya que sólo la presencia de factores solubles es capaz de inhibir a linfocitos TH1 mientras que para inhibir a linfocitos TH17 es necesario que exista el contacto celular. Además de las diferencias mediadas por el contacto celular, los factores solubles que secretan las MSCs, por sí solos, estarían actuando de manera distinta sobre ambas estirpes inhibiendo a una y estimulando a la otra, el efecto diferencial que producen estos factores solubles puede deberse a algún

factor en particular o bien, por las diferencias observadas entre ambas proporciones, a la concentración de estos factores en el medio.

Figura 8.

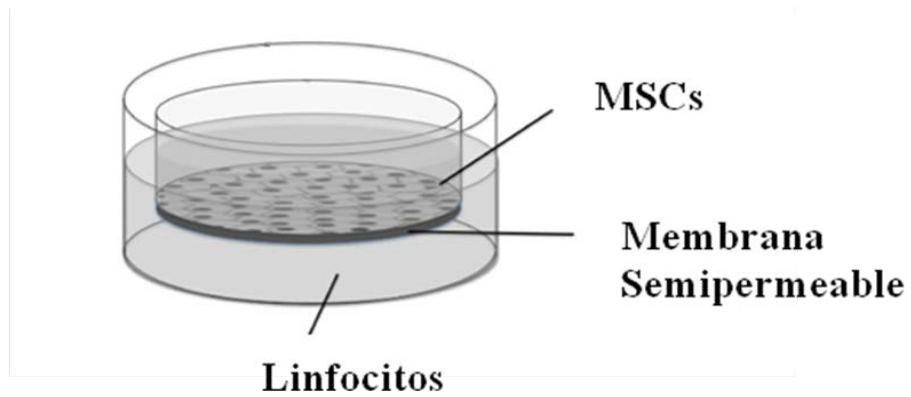
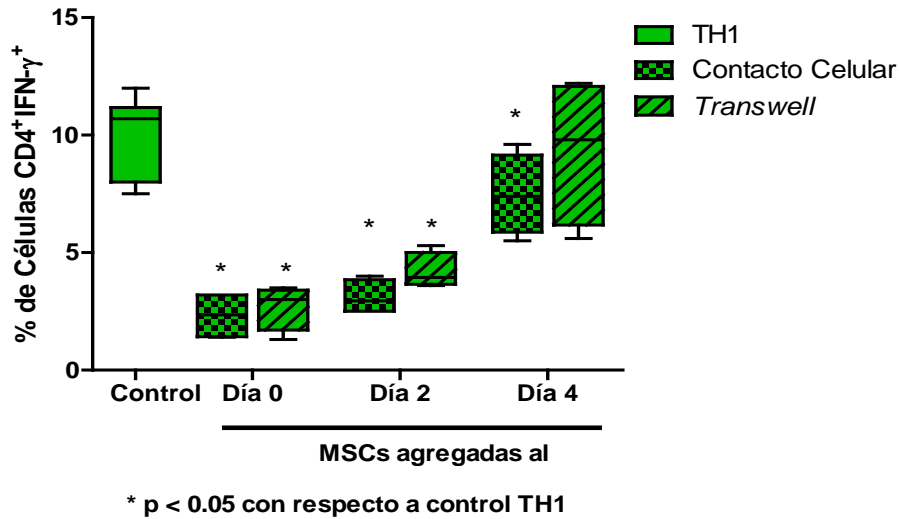


Figura 8. Disposición de células en sistema de *transwell*.

Esquema representativo de la disposición de células en el sistema de *transwell*. En la cavidad inferior se ubican los linfocitos a una concentración de 1 millón de células por ml y en la cavidad superior se ubican las MSCs en proporción 1:10 o 1:100. Ambas cavidades son separadas por una membrana semipermeable de 0.4 μm de diámetro que impide el contacto celular, contacto célula-célula entre MSCs y linfocitos, y permite el paso de factores solubles.

Figura 9.

A. MSCs agregadas en proporción 1:10 al cultivo



B. MSCs agregadas en proporción 1:100 al cultivo

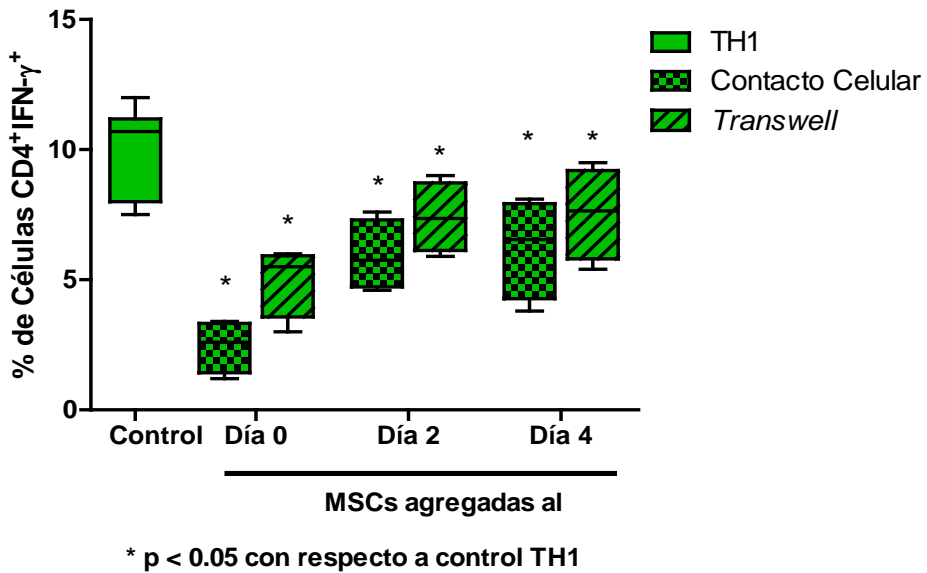
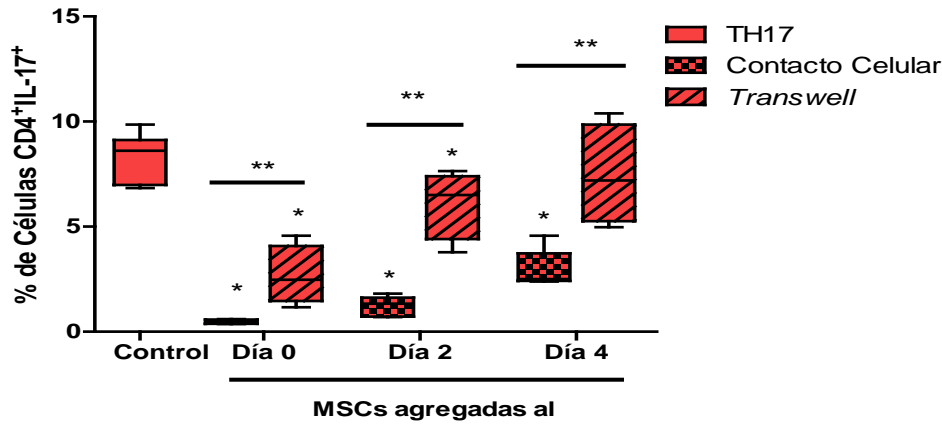


Figura 9. Efecto de MSCs sobre linfocitos TH1 en ausencia del contacto celular.

Cultivos de linfocitos con MSCs en presencia o ausencia (*Transwell*) del contacto celular. A) Corresponde a MSCs agregadas en proporción 1:10 y B) en proporción 1:100. Control corresponde a linfocitos TH1 en ausencia de MSCs (N = 10). Día 0, 2 y 4 corresponden a linfocitos TH1 con MSCs agregadas a los días 0, 2 y 4 respectivamente (N = 4). Las mediciones fueron realizadas al final del experimento, al día 6 de cultivo celular.

Figura 10.

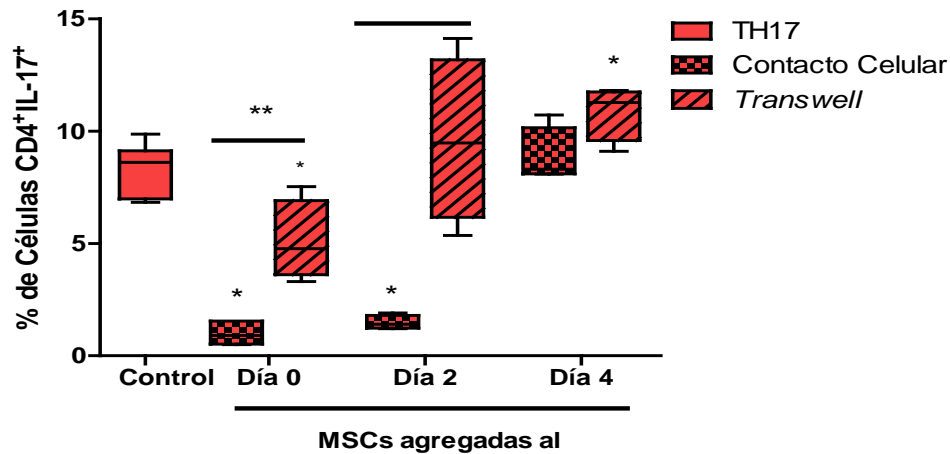
A. MSCs agregadas en proporción 1:10 al cultivo



* $p < 0.05$ con respecto a control TH17

** $p < 0.05$ con respecto a la presencia o ausencia del contacto celular

B. MSCs agregadas en proporción 1:100 al cultivo



* $p < 0.05$ con respecto a control TH17

** $p < 0.05$ con respecto a la presencia o ausencia del contacto celular

Figura 10. Efecto de MSCs sobre linfocitos TH17 en ausencia del contacto celular.

Cultivos de linfocitos con MSCs en proporción 1:10 en presencia o ausencia (*Transwell*) de contacto celular. A) Corresponde a MSCs agregadas al cultivo en proporción 1:10 y B) en proporción 1:100. Control corresponde a linfocitos TH17 en ausencia de MSCs ($N = 7$), día 0, 2 y 4 corresponden a linfocitos TH17 con MSCs agregadas a los días 0, 2 y 4 respectivamente ($N = 5$ para contacto celular y $N = 4$ para *transwell*). Las mediciones fueron realizadas al final del experimento, al día 6 de cultivo celular.

5. 6. Efecto de MSCs IL6^{-/-} sobre diferenciación de linfocitos TH1 y TH17.

La IL-6 es capaz de actuar sobre distintos tipos celulares y ejercer efectos tanto pro como antiinflamatorios (Giovanni et al. 2011), se ha descrito que esta citoquina es capaz de favorecer la diferenciación de linfocitos Treg, estirpe inmunosupresora, pero que en presencia de TGF- β promueve la estirpe proinflamatoria TH17. Por otra parte, la IL-6 promueve la secreción de IL-2, citoquina que corresponde a un factor de crecimiento de linfocitos, la cual es producida por los linfocitos TH1 y que produce un *feedback* positivo favoreciendo aún más la diferenciación de linfocitos TH1. Adicionalmente, se ha descrito previamente que las MSCs secretan de manera basal IL-6 y que esta secreción puede aumentar frente a estímulos como IFN- γ y TNF- α (Wang et al. 2002, English et al. 2007, Nasef et al. 2008, Ren et al. 2008, Rizzo et al. 2008, Lepelletier et al. 2009). Con estos antecedentes decidimos estudiar si es que esta citoquina es la responsable del efecto diferencial que ejercen las MSCs sobre linfocitos TH1 y TH17.

Para este estudio, utilizamos MSCs provenientes de ratones *Knock Out* de IL-6, las que se denominarán MSCs IL-6^{-/-}. Linfocitos activados y en presencia de cóctel de citoquinas para la diferenciación hacia TH1 y TH17 fueron cultivados en presencia y ausencia de MSCs IL-6^{-/-}, las cuales fueron adicionadas a los cultivos desde el día 0, al día 2 o al día 4 de cultivo celular de la misma manera que en los experimentos anteriores.

Cuando las MSCs IL-6^{-/-} son agregadas a los cultivos de linfocitos TH1, al estar en contacto celular, el efecto global observado es similar a lo que ocurre con MSCs *WT*, por tanto en esta condición como era de esperarse el contacto celular sumado a factores solubles independientes de IL-6 serían los responsables de ejercer el efecto inmunosupresor sobre los linfocitos TH1. Sin embargo, cuando las MSCs IL-6^{-/-} son agregadas al día 2 de cultivo celular tiene menor efecto inhibitorio con respecto a las MSCs *WT*, por tanto, en esta proporción la ausencia de IL-6 estaría generando un desbalance en la secreción de factores solubles al medio los cuales estarían promoviendo una menor inhibición sobre los linfocitos TH1. Esta diferencia no se observa cuando las MSCs IL-6^{-/-} son agregadas al día 4, el efecto en este punto se explicaría, al igual como hemos mencionado anteriormente, porque la mayoría de las células ya se han comprometido a la diferenciación y los factores solubles no son suficientes, por sí solos, para inhibir a linfocitos TH1 diferenciados (Figura 11A). Ya que observamos que la ausencia de IL-6 proveniente de las MSCs no es determinante en la inhibición de linfocitos TH1 y que esta inhibición es probablemente debido a otros factores solubles secretados al medio, además de la contribución que ejerce el contacto celular en la inhibición de los linfocitos, realizamos los mismos experimento en ausencia de contacto celular con MSCs IL-6^{-/-}.

Observamos nuevamente, que cuando las MSCs IL-6^{-/-} son agregadas al día 0 de cultivo, hay una fuerte inhibición por factores solubles, al igual que lo observado con las MSCs WT, por tanto en este punto corroboramos que la IL-6 no es el factor soluble directamente ligado a la supresión de linfocitos TH1 al día 0 de cultivo celular. Si bien no existen diferencias significativas en el efecto inhibitorio de las MSCs WT y las MSCs IL-6^{-/-}, cuando son agregadas al día 2 en ausencia del contacto celular, la tendencia hacia una leve disminución de la inhibición de linfocitos TH1, es la misma. Esto comprueba, que aun cuando la IL-6 no es la citoquina que esta modulando la actividad inmunosupresora sobre los linfocitos TH1, es posible que su ausencia bloquee o promueva la vía de secreción de otros factores solubles, los cuales posiblemente debido a su concentración en el medio estén causando este efecto. Ahora bien, cuando las MSCs IL-6^{-/-} son agregadas al cultivo al día 4, el efecto parece invertirse y por tanto parecen ser mejores inhibidores que las MSCs WT (Figura 11B). Este efecto puede deberse a que linfocitos TH1 diferenciados secretan IL-2, la cual actúa de manera autocrina favoreciendo la diferenciación de linfocitos TH1, y cuya secreción es promovida por la presencia de IL-6. Dado que al día 4 estaríamos frente a linfocitos ya activados, esta carencia de IL-6 podría estar inhibiendo la secreción de IL-2 y por tanto inhibiendo a linfocitos TH1, lo cual es concordante con que las MSCs WT no sean capaces de inhibir linfocitos TH1 en este punto.

Dado que en cultivos de linfocitos TH17 con MSCs agregadas en proporción 1:100 observamos que al agregar las MSCs al día 2 de cultivo celular en ausencia de contacto celular estas pierden completamente su capacidad inmunosupresora sobre linfocitos TH17, y que cuando son agregadas al día 4 de cultivo producen un aumento de linfocitos TH17, estudiaremos cual es el rol que juega la IL-6 proveniente de las MSCs en esta proporción.

Cuando existe contacto celular, las MSCs agregadas al día 0 y día 2 de cultivo celular, inhiben significativamente la diferenciación de linfocitos TH17, esto concuerda con los resultados anteriores en que determinamos que en estos dos puntos el contacto celular juega un papel preponderante en la inmunosupresión de linfocitos TH17. Existe una pequeña diferencia cuando las MSCs son agregadas al día 2 de cultivo celular, si bien ambas MSCs son capaces de inhibir a linfocitos TH17, las MSCs IL-6^{-/-} lo hacen con menor intensidad. Esto concuerda con lo que ocurre con linfocitos TH1, por lo tanto, es posible que la ausencia de IL-6 promueva, nuevamente, un desbalance en la secreción de factores solubles por parte de las MSCs y por lo tanto generan un menor efecto inhibitorio. Sin embargo, cuando las MSCs IL-6^{-/-} son agregadas al día 4 de cultivo celular observamos que existe un aumento significativo de linfocitos TH17 con respecto al control no tratado con MSCs.

Nuevamente, para determinar si es que el efecto estimulador de las MSCs en proporción 1:100 es realmente dependiente de la IL-6 o de algún factor asociado al contacto celular estudiamos el efecto de las MSCs IL-6^{-/-} en ausencia de contacto celular.

Observamos que cuando las MSCs IL-6^{-/-} son agregadas al día 0 de cultivo, al igual que ocurre con las MSCs *WT* existe un grado de inhibición, sin embargo al no haber contacto celular esta inhibición es menor. Al día 2 observamos que las MSCs IL-6^{-/-} ejercen un efecto estimulador de linfocitos TH17. Habíamos observado previamente que al día 2 las MSCs *WT* en presencia de la membrana semipermeable no son capaces de inhibir a linfocitos TH17, y que algunos de ellos estaban siendo promovidos hacia la estirpe TH17 y otros inhibidos por la presencia de los factores solubles. Con las MSCs IL-6^{-/-} el efecto es totalmente desplazado hacia la estimulación de linfocitos TH17, es decir, que existe un factor soluble independiente de la IL-6, e independiente del contacto celular, que estaría produciendo este efecto estimulador. Este resultado concuerda con la capacidad de las MSCs IL-6^{-/-} de estimular a linfocitos TH17 cuando son agregadas al día 4 de cultivo en presencia del contacto celular. Sin embargo, cuando las MSCs IL-6^{-/-} son agregadas al día 4 de cultivo en ausencia de contacto celular este efecto se invierte y las MSCs IL-6^{-/-} no son capaces de estimular ni inhibir a linfocitos TH17. Este resultado es algo contradictorio, pues habríamos esperado que las MSCs IL-6^{-/-} promovieran a los linfocitos TH17 (Figura 12B).

Figura 11.

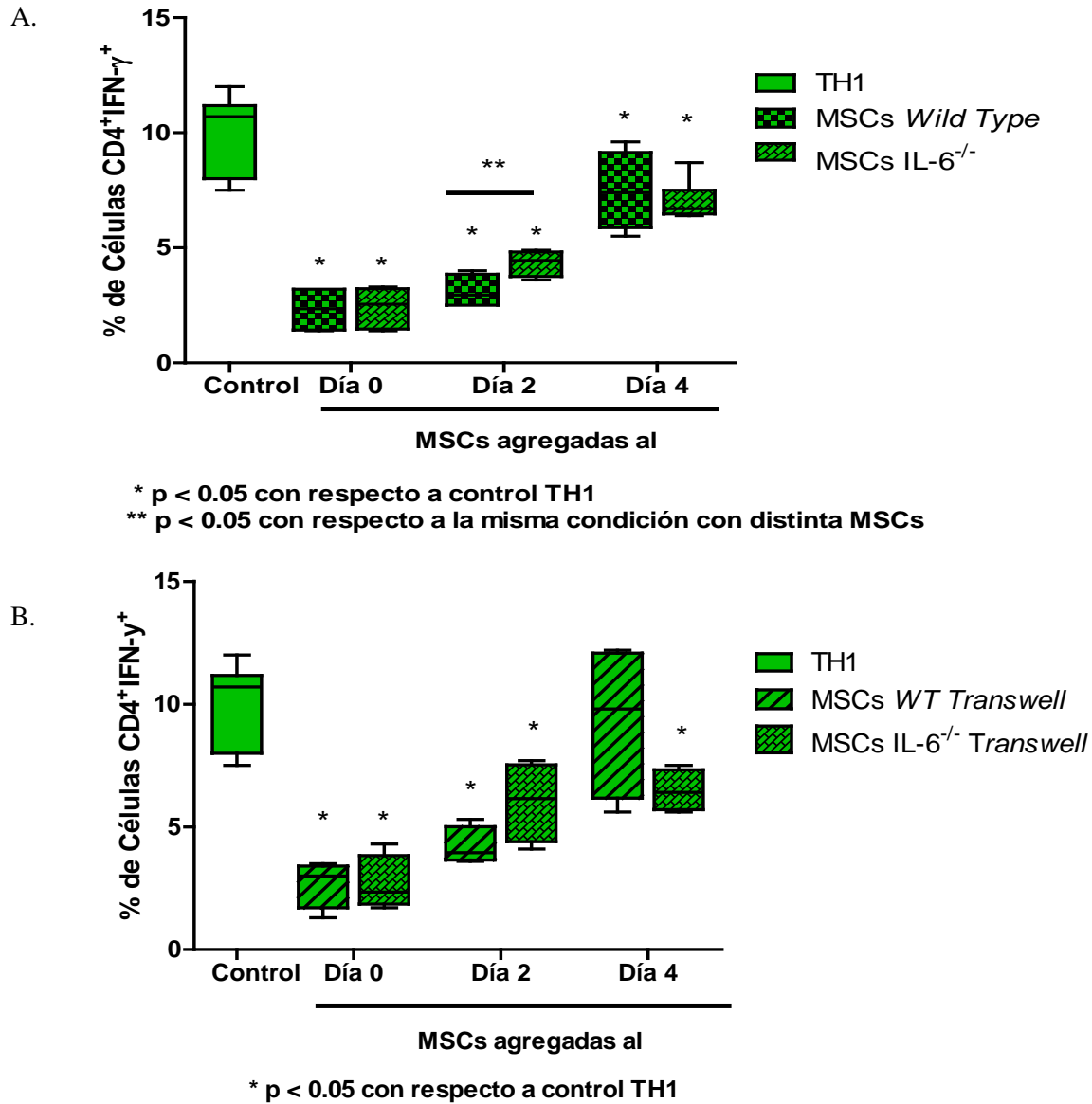


Figura 11. Efecto de MSCs IL-6^{-/-} sobre linfocitos TH1.

Gráficos que muestran el efecto de MSCs IL-6^{-/-} sobre linfocitos TH1 cuando son agregadas en proporción 1:10 al cultivo. A) En condiciones de contacto celular (N = 4 para MSCs *WT* y N = 6 para MSCs IL-6^{-/-}) y B) en ausencia de contacto (N = 4 para MSC *WT* y N = 4 para MSCs IL-6^{-/-}). Control corresponde a linfocitos TH1 en ausencia de MSCs, Día 0, 2 y 4 corresponde a linfocitos TH1 con MSCs agregadas al día 0, 2 y 4 de cultivo celular, respectivamente. Las mediciones fueron realizadas al final del experimento, al día 6 de cultivo celular.

Figura 12.

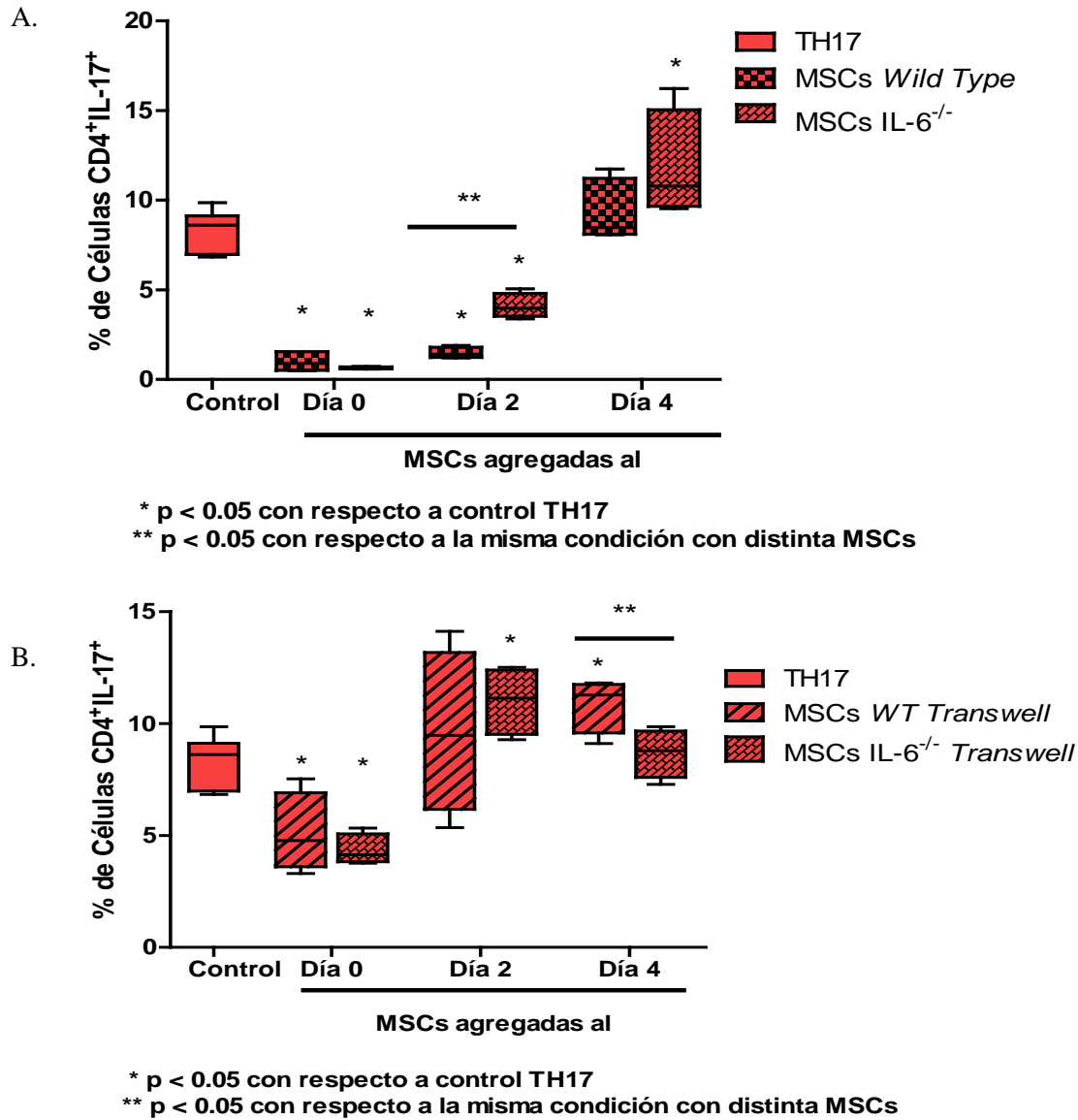


Figura 12. Efecto de MSCs IL-6^{-/-} sobre linfocitos TH17.

Gráficos que muestran el efecto de MSCs IL-6^{-/-} sobre linfocitos TH17 cuando son agregadas en proporción 1:100 al cultivo. A) En condiciones de contacto celular (N = 5 para Día 0 y 4, y N = 4 para día 2 para MSCs WT y N= 4 para MSCs IL-6^{-/-}) y B) en ausencia de contacto celular (N = 4 para MSC WT y N = 4 para MSCs IL-6^{-/-}). Control corresponde a linfocitos TH17 en ausencia de MSCs. Día 0, 2 y 4 corresponde a linfocitos TH17 con MSCs agregadas al día 0, 2 y 4 de cultivo celular, respectivamente. Las mediciones fueron realizadas al final del experimento, al día 6 de cultivo celular. Las mediciones fueron realizadas al final del experimento, al día 6 de cultivo celular.

6. DISCUSIÓN

En los últimos años, se han descrito diversas características inmunosupresoras de las MSCs las que han abierto un amplio e interesante campo de investigación. Estas células han sido propuestas como herramientas terapéuticas de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como GVHD, enfermedad de Chron, artritis reumatoide, entre muchas otras, gracias a su capacidad de albergarse en los sitios de inflamación y ahí generar su efecto inmunosupresor. Sin embargo, aun existe amplia controversia respecto a su mecanismo de acción y recientemente se ha descrito que estas células podrían generar efectos contradictorios estimulando a linfocitos TH17, los que se caracterizan por ser una estirpe altamente proinflamatoria (Guo et al. 2009, Carrión et. Al 2010). El efecto proinflamatorio observado podría estar mediado por el microambiente proinflamatorio que rodea a las MSCs, el cual puede producirse en cualquier momento cuando existe una enfermedad crónica. Es por este motivo, que decidimos estudiar el efecto de las MSCs a distintos tiempos de cultivo celular, ya que al agregar las MSCs a tiempos tardíos estamos, de cierta manera, simulando una enfermedad mediada por inflamación. Observamos, en primer lugar, que las MSCs son capaces de inhibir la activación de linfocito T, cuando son agregadas al día 0 de cultivo celular. Esto concuerda con lo descrito previamente por Glennie y cols., quienes determinan que el efecto inhibitorio de las MSCs es por medio del arresto en la etapa G0/G1 del ciclo celular. Así, los linfocitos *naïve* son retenidos en G0/G1 por la presencia de las MSCs en el cultivo lo que no les permite expresar el marcador de activación temprana CD25 (Abbas et al. 2011). Este efecto, no tiene la misma magnitud cuando las MSCs son agregadas a los cultivos a los días 2 ó 4, lo cual nos indica que el arresto del ciclo celular, ocurre sólo frente a linfocitos *naïve* ya que cuando los linfocitos han tenido 2 o 4 días de tiempo para activarse, las MSCs no son capaces de regular negativamente a los linfocitos T.

Al estudiar el efecto de MSCs sobre linfocitos TH1, observamos que cuando son agregadas al día 0 existe casi una inhibición total, esto concuerda con los resultados obtenidos por muchos otros autores que describen que las MSCs inhiben la proliferación de linfocitos activados (Newman et al. 2009, revisión). Más allá de estos resultados, nosotros estudiamos que es lo que pasa cuando las MSCs son agregadas a tiempo tardío, es decir, cuando los linfocitos ya han tenido tiempo de echar a andar la maquinaria de activación y proliferación. Observamos que las MSCs son capaces de inhibir a linfocitos TH1 a los distintos tiempos, sin embargo esta inhibición pierde intensidad mientras más tarde son agregadas las MSCs al cultivo (Figura 3). Cuando las MSCs son agregadas en proporción 1:100 al cultivo, al día 0, la inhibición se mantiene igual, al contrario de lo observado por Krampera y colaboradores quienes incubaron por 7 día a MSCs y linfocitos y observaron que el efecto era dosis dependiente. Sin embargo, estas diferencias pueden deberse a que, a diferencia de Krampera y cols., nosotros estamos trabajando con

linfocitos CD4⁺ purificados por tanto en sus cultivos existe una mayor cantidad de tipos celulares que pueden actuar de manera distinta frente a las MSCs. Sin embargo, cuando agregamos las MSCs al día 2 observamos que existe una disminución del efecto inhibitorio cuando las MSCs son agregadas en proporción 1:100 al cultivo. Ya que diversos autores han postulado que el efecto ejercido por las MSCs es dependiente del contacto celular (Krampera et. Al 2003, Auguello et. Al 2005, González et al. 2010) postulamos que la menor cantidad de células en cultivo generan menor cantidad de interacciones lo que contribuye a disminuir el efecto inhibitorio de las MSCs. Dado que las citoquinas, principales involucrados en la modulación del sistema inmune, ejercen su efecto principalmente mediados por su concentración en el medio y por la presencia de otras moléculas reguladoras secretadas, en este caso, tanto por las MSCs como linfocitos, la menor concentración de MSCs en el medio secreta una menor concentración de factores solubles contribuyendo a aminorar este efecto. Que las MSCs sean capaces de inhibir a linfocitos TH1 a tiempos tardíos, aunque sea con menor magnitud, puede deberse a que las MSCs en presencia de IFN- γ aumentan la secreción de factores solubles involucrados en los mecanismos inmunosupresores de las MSCs, como NO e IDO, los cuales ejercen un efecto inhibitorio sobre la transducción de señales en linfocitos TH1 e intervienen en la producción de proteínas necesarias para la proliferación de linfocitos, respectivamente (Meisel et. Al 2004, Djuad et al. 2007, Tatara et al. 2010).

Cuando estos mismos experimentos son realizados con linfocitos TH17, observamos nuevamente que las MSCs son capaces de inhibir a linfocitos TH17 cuando son agregadas al día 0 y al día 2 de cultivo celular y, diferencia de lo que observamos con linfocitos TH1, cuando las MSCs son agregadas en proporción 1:100 al cultivo, su capacidad inhibitoria se mantiene intacta. Esto nos indica, a diferencia de lo postulado por Tatara y cols., quien postula que el efecto inmunosupresor sobre linfocitos TH17 está mediado por factores solubles, que el contacto celular en estos puntos juega un papel fundamental y que es capaz de inhibir a linfocitos TH17 independientemente de la concentración de MSCs en el medio. A diferencia de lo que habíamos observado previamente en nuestro laboratorio, donde las MSCs promueven la diferenciación de linfocitos TH17 en proporción 1:10 cuando son agregadas al cultivo a tiempos tardíos (Carrión et. Al 2010), esta vez observamos que el aumento de linfocitos TH17 se produce cuando las MSCs son agregadas al día 4 de cultivo en la proporción 1:100. Estos resultados, pueden explicarse porque en los experimentos anteriormente publicados, las MSCs obtenidas no fueron purificadas por depleción de las células CD45⁺, por lo tanto, la proporción de MSCs, que se caracterizan por ser CD45⁻, en la población total de MSCs era menor, con lo cual se explicaría que en estos experimento al agregar las MSCs en proporción 1:100, y no 1:10, observáramos resultados similares a los anteriormente descritos para la proporción 1:10. Esto nuevamente nos indica que el momento de aplicación juega un papel fundamental en el efecto inmunosupresor de las MSCs sobre linfocitos tanto TH1 como TH17, ya que las diferencias en el estado de activación de los linfocitos y por tanto, el microambiente generado por ellos,

puede producir cambios en los efectos producidos por las MSCs. Estos resultados dejan de manifiesto además, que una baja concentración de MSCs en el microambiente proinflamatorio estaría promoviendo esta característica inmunoestimuladora. Esta situación, sin duda, es comparable a lo que podría ocurrir *in vivo* ya que sería difícil alcanzar una proporción 1:10 que permita ejercer un efecto exclusivamente inmunosupresor.

Al utilizar una membrana semipermeable para determinar si es que el efecto inhibitorio sobre linfocitos TH1 y TH17 es mediado principalmente por factores solubles, determinamos que la ausencia del contacto celular no impide la inhibición de linfocitos TH1, por lo tanto el mayor efecto inhibitorio sobre linfocitos TH1 sería producido por factores solubles. Estos resultados concuerdan con publicaciones previas que postulan a que existe un aumento de factores inmunosupresores por parte de las MSCs bajo condiciones polarizantes hacia la estirpe TH1 (Meisel et. Al 2004, Djuad et al. 2007, Tatara et al. 2010). En cultivos de linfocitos TH17, el efecto observado en presencia de la membrana semipermeable es significativamente disminuido dejando en clara evidencia que el contacto celular juega un papel fundamental en la inhibición de linfocitos TH17. Además, cuando las MSCs son agregadas a tiempo tardío en ausencia del contacto celular en proporción 1:100, los linfocitos TH17 son estimulados a diferenciarse. En este punto, parece ser que el efecto inmunosupresor mediado por el contacto celular es alterado por los factores solubles secretados al medio. Con estos resultados, se comprueba que existen mecanismos diferenciales por los cuales las MSCs inhiben a linfocitos TH1 y TH17, lo que concuerda con lo descrito previamente por Aggarwal y Pittenger quienes observaron que existe un mecanismo diferencial por el cual las MSCs actúan sobre linfocitos TH1 y TH2.

Ya que existe evidencia, y que nosotros mismos hemos comprobado, que el efecto inmunosupresor, usualmente descrito de las MSCs, puede ser alterado y llevado a un efecto inmunoestimulador sobre linfocitos TH17 es importante determinar el mecanismo de acción de las MSCs sobre las distintas estirpes linfocitarias, dado que estas células están siendo estudiadas para el tratamiento de diversas enfermedades proinflamatorias.

Como habíamos observado que las MSCs inhiben a linfocitos TH1 y promueven la diferenciación de linfocitos TH17 en determinadas condiciones, propusimos a la IL-6 como principal mediador de este efecto. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en la inhibición de linfocitos TH1 en presencia de MSCs IL-6^{-/-} en relación a MSCs WT.

En cultivos de linfocitos TH17 el efecto producido por las MSCs IL-6^{-/-} es contradictorio ya que, cuando las MSCs IL-6^{-/-} son agregadas al día 4 de cultivo, observamos que en presencia del contacto celular promueven a linfocitos TH17 mientras que en ausencia del contacto celular no son capaces de promover, ni de inhibir, a linfocitos TH17. El efecto observado cuando las MSCs IL-6^{-/-} son agregadas al día 2 de cultivo en ausencia del contacto celular puede deberse a que, ya que en el medio de diferenciación de

linfocitos TH17 existe IL-6, es posible que las células *knock out* comiencen a llevar a cabo mecanismos que le permiten recuperar la actividad perdida por la ausencia de IL-6, o bien que el ambiente proinflamatorio generado por los linfocitos TH17 genere un desbalance en el patrón de secreción de citoquinas que lleven a un aumento de los linfocitos TH17. Por el hecho de que en el medio ya existe IL-6 y que observamos algunas diferencias en la capacidad inmunoestimuladora de las MSCs sobre linfocitos TH17, no podemos concluir que la IL-6 es la citoquina determinante en la inmunomodulación, positiva o negativamente, de linfocitos TH17. Por lo tanto, es importante que en estudios venideros se considere depletar la IL-6 del medio, removiendo el medio de cultivo a tiempo tardío, y agregar las MSCs al cultivo con medio fresco libre de IL-6 con lo cual se podrá determinar el real efecto que produce la IL-6 secretada por las MSCs sobre linfocitos TH17. Sin embargo, existen otros factores solubles involucrados en la regulación de TH17, entre ellos se encuentra PGE2 el cual regula positivamente a la IL-6, necesaria para la diferenciación de linfocitos TH17, y negativamente al TNF- α .

La importancia del efecto que ejercen las MSCs, no sólo radica en el efecto inmunoestimulador sobre linfocitos TH17, también es importante considerar, para su uso como herramienta terapéutica en enfermedades inflamatorias principalmente en enfermedades autoinmunes, el efecto supresor que ejercen en las distintas condiciones sobre linfocitos TH1. Esto porque se ha descrito que algunos modelos de enfermedades autoinmunes, EAE o CIA, la enfermedad y sintomatología depende en gran medida de la razón TH1:TH17, por tanto el tratamiento adecuado podría estar basado en esta relación (Strommes et al. 2008, Domingues et al. 2010), así promoviendo la estirpe TH1 es posible que se alcance un mayor efecto inmunosupresor de las MSCs en enfermedades autoinmunes.

Nuestra investigación nos indica que el mecanismo por el cual las MSCs actúan sobre el sistema inmune tiene diversas aristas, que el contacto celular es importante, sin embargo, la presencia de citoquinas y factores solubles en el medio puede cambiar el fenotipo inmunosupresor de las MSCs y que las interacciones entre todos estos factores favorecerán, de una u otra manera, la acción de estas Células Madre

7. CONCLUSIONES

Tomando en cuenta los siguientes hallazgos:

- 1) Los linfocitos TH1 y TH17 son inhibidos por las MSCs, sin embargo, los mecanismos por los cuales las MSCs ejercen este efecto difieren entre las distintas especies de linfocitos. Para inhibir a linfocitos TH1 basta la presencia de factores solubles mientras que la inhibición de linfocitos TH17 requiere del contacto MSCs-linfocito para producir un efecto pronunciado.
- 2) Los estímulos que reciben las MSCs en ambos medio de cultivo son distinto. Estas diferencias pueden estar promoviendo un cambio en el fenotipo inmunosupresor, observado en cocultivos con linfocitos TH1, de las MSCs que las llevan a ejercer un efecto proinflamatorio en cocultivos con linfocitos TH17.
- 3) MSCs afecta la activación de linfocitos TH1 y TH17, sin embargo cuando las MSCs agregadas a los cultivos a tiempo tardío, día 4 de cultivo celular, inhibe a los linfocitos independientemente de su estado de activación.

Concluimos que el efecto inmunosupresor de las MSCs sobre linfocitos TH1 es independiente del la IL-6 secretada por las MSCs. No obstante, no nos es posible afirmar que la IL-6 es la responsable del efecto inmunoestimulador sobre linfocitos TH17, sin embargo, determinamos que las MSCs en baja concentración no solo pierden su capacidad inhibitoria cuando se encuentran con linfocitos TH17 diferenciados sino que son capaces de promover su diferenciación. Observamos también que la IL-6 proveniente de MSCs podría, bajo ciertas condiciones, revertir este efecto.

8. REFERENCIAS

Abbas A, Lichtman A, Pillai S. (2011). Cellular and Molecular Immunology 7th edition. 15-35.

Aggarwal S and Pittenger M. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105: 1815-22.

Allan S, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M, Orban P, Ziegler S, Roncarolo M, Levings M. (2005). The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *Journal of Clinical Investigation*. 115:3276–84.

Almeida A, Rocha B, Freitas A, Tanchot C. (2005). Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Seminars in Immunology*. 17: 239-49.

Augello A, Tasso R, Negrini S, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European Journal of Immunology* 35: 1482–90.

Augello A, Tasso R, Negrini S, Cancedda R, Pennesi G. (2007). Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 56: 1175-86.

Baecher-Allan C, Brown J, Freeman G, Hafler D. (2001). CD4⁺CD25^{high} Regulatory Cells in human peripheral blood. *The Journal of Immunology* 167: 1245-53.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology* 30: 42–8.

Basak O and Taylor V. (2009). Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. *Cellular and Molecular Life Science* 66: 1057-72.

Bettelli E, Oukka M, Kuchroo V. (2007). Th17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature Immunology* 8: 345-50.

Bettelli E, Korn T, Kuchroo V. (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Current Opinion of Immunology* 19: 652-7.

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: 21-7.

Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noel D. (2010). IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS ONE* 5: e14247.

Bruder S, Fink D, Caplan A. (1994). Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *Journal of Cell Biochemistry* 56: 283-94.

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. *Immunology Letters* 135:10-6.

Chan J, Tang K, Patel A, Bonilla L, Pierobon N, Ponzio N, Rameshwar P. (2006). Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood* 107: 4817-24.

Chen B, Hu J, Liao L, Sun, Z, Han Q, Song Z, Zhao R. (2009). Flk-1+ by up-regulating interleukin-6. *Clinical and experimental immunology* 159:292-302.

Croituru-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 and Cytokine Research* 27: 53-64.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni P, Matteucci P, Grisanti S, Gianni A. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T- lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838-43.

Djouad F, Ponce P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102: 3837-44.

Djouad , Charbonnier L, Bouffi C, Louis-Ponce P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noel D. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 25: 2025-32.

Domingues H, Mues M, Lassmann H, Wekerle H, Krishnamoorthy G. (2010). Functional and Pathogenic Differences of Th1 and Th17 Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS ONE* 5:e15531

English K, Barry F, Field-Corbett C, Mahon B. (2007). IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunology Letters* 110: 91-100.

Fossiez F, Djossou O, Chornarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin J, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Mahapatra B, Rouvierfl E, Golsteinfl P, Banchereau J, Lebecque S.

(1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *Journal of Experimental Medicine* 183: 2593-603.

Friedenstein A, Chailakhjan R, Lalykina K. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3: 393-403.

Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova K. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and experimental Morphology* 16: 581-390

Friedenstein A, Petrakova K, Kurolesova A, Frolova G. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6: 230-47

Ghannam S, Pène J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H. (2010). Mesenchymal Stem Cells inhibit human TH17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *The Journal of Immunology* 185: 302-12.

Glennie S, Soeiro I, Dyson P, Lam E, Dazzi F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105: 2821-7.

Goldberg M, Nadiv O, Luknar-Gabor N, Agar G, Beer Y, Katz Y. (2009). Synergism between tumor necrosis factor alpha and interleukin-17 to induce IL-23 p19 expression in fibroblast-like synoviocytes. *Molecular Immunology* 46: 1854-9.

González 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, Gu1 D, Du W, Ge1 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: 2840–2849.

Hoi Wan Tso G, Ka Wai Law H, Tu W, Chi Fung Chan G, Lung Lau Y. (2010). Phagocytosis of Apoptotic Cells Modulates Mesenchymal Stem Cells Osteogenic Differentiation to Enhance IL-17 and RANKL Expression on CD41 T Cells. *Stem Cells* 28:939–54.

Kato H and Fox D. (2010). Are Th17 Cells an Appropriate New Target in the Treatment of Rheumatoid Arthritis?. *Clinical and Tralational Science* 3: 319-26.

Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101: 3722-9.

Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth B, Ringdén O. (2003). Mesenchymal Stem Cells inhibit and stimulates mixed lymphocytes cultures and mitogen responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian Journal of Immunology* 57: 11-20.

- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström, C, Hassan M, Uzunel, M. and Ringdén, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363: 1439–41
- Lepelletier Y, Lecourt S, Renand A, Arnulf B, Vanneaux V, Fermand JP, Menasché P, Domet T, Marolleau JP, Hermine O, Larghero J. (2009). Galectin-1 and Semaphorin-3A are two soluble factors conferring T cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells and Development* 19: 1075-79.
- Liechty K, Mackenzie T, Shaaban A, Radu A, Moseley A, Deans R, Marshak D, Flake A. (2000). Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site specific differentiation after *in utero* transplantation in sheep. *Nature Medicine* 6: 1282-86.
- Mahanonda R, Jitprasertwong P, Sa-Ard-Iam N, Rerkyen P, Charatkulangkun O, Jansisyanont P, Nisapakultorn K, Yongvanichit K and Pichyangkul S. (2008). Effects of IL-17 on human gingival fibroblasts. *Journal of Dental Research* 87: 267-72.
- Mai J, Wang H, Yang X. (2011). T Helper 17 Cells Interplay with CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs in Regulation of Inflammations and Autoimmune Diseases. *Frontiers in Bioscience* 15: 986–1006.
- 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: 4619-21.
- Minguell J, Erices A, Conget P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine* 226: 507-20.
- Mosmann T and Coffman R. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* 7: 145-73.
- Murphy K and Stockinger B. (2002). Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nature Immunology* 11: 674-80.
- Murphy K and Reiner S. (2002). The lineage decisions of helper t cells. *Nature Reviews* 2: 933-44.
- Nasef A, Mazurier C, Bouchet S, François S, Chapel A, Thierry D, Gorin N, Fouillard L. (2008). Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cellular Immunology* 253: 16-22.
- Newman R, Yoo D, LeRoux M, Danilkovitch-Miagkova A. (2009). Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflammation and Allergy - Drug Targets* 8: 110-123
- Notley C and Ehrenstein M. (2010). The yin and yang of regulatory T cells and inflammation in RA. *Nature Reviews* 6: 572-7.

O'Garra A and Arai N. (2000). The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in Cell Biology* 10:542-50.

Pekovic V and Hutchison C. (2008). Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: the role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches. *Journal of Anatomy* 213: 5-25.

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: 141-50.

Rizzo R, Campioni D, Stignani M, Melchiorri L, Bagnara G, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Moretti S, Cuneo A, Lanza F, Baricordi O. (2008). A functional role for soluble HLA-G antigens in immune modulation mediated by mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 10: 364-75.

Ryan J, Barry F, Murphy M, Mahon B. (2005). Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation* 2:8

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: 353-63.

Saavedra P, Vásquez G, González L. (2011). Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia* 24: 157-66.

Singh H. (2007). Shaping a helper T cell identity. *Nature Immunology* 8: 119-20.

Steward-Tharpa S, Song Y, Siegel R, O'Shea J. (2010). New insights into T cell biology and T cell-directed therapy for autoimmunity, inflammation, and immunosuppression. *Annals of the New York Academy of Science* 1183: 123-48

Stromnes I, Cerretti L, Liggitt D, Harris R, Goverman J. (2008). Differential regulation of central nervous system autoimmunity by TH1 and TH17 cells. *Nature Medicine* 14:337-42.

Tatara R , Ozaki K, Kikuchi Y , Hatanaka K, Oh I, Meguro A , Matsu H , Sato K, Ozawa K. (2010). Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell Differentiation. *Cytotherapy* 13: 686-94.

Taylor MW and Feng G. (1991). Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB Journal* 2516-22.

Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, Waknitz M, Swiergiel J, Marshall V, Jones J. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-7.

Tse W, Pendleton J, Beyer W, Egalka M, Guinan E. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75: 389-397.

Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. (2007). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression?. *Trends in Immunology* 28: 219-26

Wang J, Luo C, Guo C, Zhang Y. (2002). Mesenchymal stem cells and related factors. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 10(5): 468-71.

Wing K and Sakaguchi S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature Immunology* 11: 7-13.

Wong W, Kohu K, Chiba T, Sato T, Satake M. (2010). Interplay of transcription factors in T-cell differentiation and function: the role of Runx. *Immunology* 132: 157-64.

Xu G, Zhang Y, Zhang L, Ren W, Shi Y. (2007). The Role of IL-6 in Inhibition of Lymphocyte Apoptosis by Mesenchymal Stem Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 36: 745-50.

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: 1755-61.

Zhou X, Bailey-Bucktrout S, Jeker LT, Bluestone JA. (2009). Plasticity of CD4⁺ FoxP3⁺ T cells. *Current Opinion in Immunology* 21:281-85.