

UNIVERSIDAD DE CHILE



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADO y POSTÍTULO**

**Evaluación del potencial de proliferación,
inmunomodulación e inmunogenicidad *in vitro* de células
madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea y
tejido adiposo fetal bovino**

OLGER HUAMAN CASAZOLA

Proyecto de tesis para optar al Título de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias.
Departamento de Fomento de la Producción Animal.

PROFESOR GUÍA: Oscar Peralta Troncoso MV, MSc. PhD

FINANCIAMIENTO: FONDEF Idea ID15I10129 y PRONABEC – Beca Presidente de la
República del Perú.

SANTIAGO, CHILE

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADO y POSTÍTULO

Evaluación del potencial de proliferación, inmunomodulación e inmunogenicidad *in vitro* de células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea y tejido adiposo fetal bovino

OLGER HUAMAN CASAZOLA

Proyecto de tesis para optar al Título de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias.
Departamento de Fomento de la Producción Animal.

Nota Final:

	Calificación	Firma
Dr. Oscar Peralta T.
Dr. Ulises Vergara C.
Dr. José Ignacio Arias F.

SANTIAGO, CHILE

BIOGRAFÍA

OLGER HUAMAN CASAZOLA

Nací el 30 de enero de 1984 en el distrito de Nuñoa, Melgar, Puno – Perú, mis estudios de educación primaria los cursé en la institución N° 70528 - Sincata, del distrito de Nuñoa. Posteriormente, mis estudios secundarios los realicé en el Colegio Nacional Agropecuario INA-91, en la ciudad de Juliaca. En el año 2003 inicié el grado superior en la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Luego en el año 2008 me gradué como Médico Veterinario y Zootecnista, a partir de ese año trabajé en gobiernos locales y regionales en el área de desarrollo económico. En 2014 realicé un diplomado en gerencia de desarrollo económico local, en el Colegio Médico Veterinario del Perú - Consejo Departamental Puno. A mediados de ese año también postulé a Programa de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias de la Escuela de Postgrado y Postítulo de la Facultad de Ciencia Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y a PRONABEC – Beca Presidente de la República del Perú. En el año 2015 inicié el Programa de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico con eterna gratitud e inmenso apego a mis padres, hermanos (as) y en especial a Beatriz; los cuales siempre y en todo momento me dieron las fuerzas y el aliento para continuar adelante.

Olger, HUAMAN CASAZOLA

AGRADECIMIENTOS

A dios por culminar con éxito este trabajo.

A mi director de tesis: Dr. Oscar Peralta Troncoso, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, a ello se suma su buena predisposición, sus enseñanzas, sus consejos, su paciencia y comprensión.

A la Dra. Javiera Bahamonde Azcuy, por sus enseñanzas, por sus sugerencias, buenos consejos y por esa capacidad de solucionar inconvenientes cuando los tiempos apremian.

Al Dr. Cristian Torres, Dr. Jaime Palomino y al Dr. Alejandro Escobar Álvarez, por sus colaboraciones y sus apoyos.

Al Dr. Ulises Vergara y al Dr. José I. Arias, por sus consejos, críticas y comprensión que me brindaron.

A mis compañeros tesisistas, Miguel Jervis, Berly Cahuascanco, Moisés Segunda, Jahaira Cortez, por sus colaboraciones y las experiencias plasmadas junto a ellos durante la investigación.

A PRONABEC - Beca Presidente de la República del Perú y a FONDEF Idea ID15I10129 por el financiamiento del estudio y la investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Biografía	3
Dedicatoria.....	4
Agradecimientos	5
Indice de contenidos	6
Indice de ayudas ilustrativas	8
Resumen	9
Abstract.....	11
i. Introducción	13
ii. Revisión bibliográfica.....	15
2.1. Células madre mesenquimáticas (msc).....	15
2.2. Diferencias entre msc derivadas de medula ósea y tejido adiposo.....	16
2.3. Capacidad proliferativa de las msc.....	17
2.4. Factores inmunomoduladores y antiinflamatorios producidos por las msc	18
2.5. Potencial de inmunogenicidad de msc sobre células del sistema inmune.....	21
2.6. Inmunomodulación de msc sobre las células del sistema inmune.....	22
iii. Hipótesis.....	25
iv. Objetivos	25
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos específicos	25
v. Materiales y métodos.....	26
5.1. Aislamiento y cultivo de msc derivadas de medula ósea fetal bovino	26
5.2. Aislamiento y cultivo de msc derivadas de tejido adiposo fetal bovino	27
5.3. Determinación del potencial de proliferación de msc-mo y msc-ta fetal bovino.....	27
5.4. Determinación del potencial inmunomodulador de msc-mo y ta.....	28
5.4.1. Determinar la actividad enzimática de ido en medio condicionado de msc preactivadas con ifny	28

5.4.2.	Niveles de mrna de factores paracrinis inmunomoduladores en msc-mo y msc-ta preactivadas con ifny.....	29
5.5.	Cuantificación de la expresión de genes de inmunogenicidad en msc-mo y msc-ta fetal bovino	32
5.6.	Determinación del efecto de medio condicionado de msc-mo y msc-ta preactivadas con ifny sobre la proliferación de linfocitos t bovinos.....	33
5.7.	Análisis de datos	35
vi.	Resultados.....	36
6.1.	Aislamiento de msc derivadas de mo y ta fetal bovino.	36
6.2.	Determinación de la curva de crecimiento de msc-mo y msc-ta fetal bovino.....	38
6.3.	Determinación de tiempo de doblaje poblacional de msc-mo y msc-ta. ..	40
6.4.	Determinación del potencial de inmunomodulación de msc-mo y msc-ta fetal bovina	40
6.4.1.	Expresión génica y actividad enzimática de ido en msc preactivadas con ifny 40	
6.4.2.	Niveles de mrna de factores inmunomoduladores en msc-mo y msc-ta fetal bovino preactivadas con ifny	42
6.5.	Cuantificación de los niveles de mrna de genes de inmunogenicidad de msc-mo y msc-ta fetal bovino	43
6.6.	Determinación del efecto de medio condicionado de msc preactivadas con ifny sobre la proliferación de pbl bovino	46
vii.	Discusión	49
viii.	Bibliografía.....	54

INDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

Tabla 1. Secuencia de los partidores utilizados en el análisis de expresión génica.....	31
Figura 1. Microfotografías de contraste de fase de cultivos en monocapa de MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas.	36
Figura 2. Niveles de mRNA de marcadores mesenquimales CD73, CD90 y CD105 y hematopoyéticos CD34 y CD45 en MSC-MO y MSC-TA.....	37
Figura 3. Curva de crecimiento de MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas con concentraciones de siembra de 5000 y 8500 células/cm ²	39
Figura 4. Microfotografías de contraste de fase de cultivos en monocapa de MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas en concentración de 5000 células/cm ²	39
Tabla 2. Tiempo de doblaje poblacional (PDT) en MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas.....	40
Figura 5. Niveles de mRNA deIDO y producción de quinurenina en medio condicionado de MSC-MO y MSC-TA preactivadas con IFN γ	41
Figura 6. Expresión relativa de mRNA de genes inmunomoduladores IL-6, TGF β 1, PGE2 e IL-10 en MSC-MO y MSC-TA tratadas con IFN γ	43
Figura 7. Niveles de mRNA de los genes de inmunogenicidad MHC-I y II, moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas.....	44
Figura 8. Análisis de expresión de MHC-II en MSC-MO, MSC-TA, FB y PBMC bovinas mediante citometría de flujo.	45
Figura 9. Efecto de medio condicionado de MSC-MO y MSC-TA preactivadas con IFN γ sobre la proliferación de PBL bovinas activadas con aloantígenos. ...	47
Figura 10. Efecto de medio condicionado de MSC-MO y MSC-TA preactivadas con IFN γ sobre la proliferación de PBL marcados con CFSE y activadas con aloantígenos.	48

RESUMEN

Las células madre mesenquimáticas (del inglés *Mesenchymal Stem Cells*, MSC), son células adultas indiferenciadas, que poseen propiedades de autorenovación, inmunomodulación y cuentan con una baja inmunogenicidad. Debido a ello son actualmente consideradas como potenciales agentes terapéuticos celulares para el tratamiento de variadas patologías. En el presente estudio se comparó el potencial de proliferación, inmunomodulación e inmunogenicidad *in vitro* de MSC derivadas de médula ósea (MO) y tejido adiposo (TA) fetal bovino. Las MSC fueron aisladas en base a su capacidad de adherencia al plástico y a su morfología fibroblastoide. El potencial de proliferación se determinó en dos concentraciones celulares (5000 y 8500 células/cm²) durante 10 y 15 días de cultivo, respectivamente. La expresión de genes de inmunomodulación indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO), interleuquina 6 (IL-6), factor de crecimiento de transformante β 1 (TGF β 1), prostaglandina E₂ (PGE₂) e interleuquina 10 (IL-10) fue cuantificada mediante PCR cuantitativo (Q-PCR) en MSC-MO y MSC-TA estimuladas con interferón γ (IFN γ). Adicionalmente, se cuantificaron los niveles de expresión de genes de inmunogenicidad complejo principal de histocompatibilidad I y II (MHC-I y II) y moléculas coestimuladoras de linfocitos T (CD80 y CD86). Además, se evaluó el efecto de medio condicionado de ambas líneas celulares estimuladas con IFN γ sobre la proliferación de linfocitos de sangre periférica (PBL) bovina activadas con aloantígenos. La población de MSC provenientes de MO y TA adherentes al plástico expresaron mayores (P<0,05) niveles de mRNA de marcadores mesenquimales (CD105, CD90 y CD73) en comparación a marcadores hematopoyéticos (CD45 y CD34). Las MSC-MO doblaron su población en menor (P<0,01) tiempo en comparación a MSC-TA (2,9 vs 4,4 días, respectivamente). La exposición de MSC-MO y MSC-TA a IFN γ activó la expresión de mRNA de IDO y aumentó (P<0,05) la concentración del metabolito de IDO, quinurenina en el medio condicionado de MSC. Además, ambas líneas celulares expresaron niveles de mRNA de IL-6, PGE₂, TGF β 1 e IL-10 con o sin tratamiento de IFN γ . Las MSC-MO expresan mayores (P<0,05) niveles de mRNA de MHC-II en comparación con MSC-TA. El medio condicionado de ambas líneas

celulares suprime la proliferación de PBL bovino. En conclusión, los potenciales de proliferación e inmunogenicidad de MSC son dependientes de la fuente de origen tisular, debido a que las MSC-MO poseen alto potencial de proliferación e inmunogenicidad en comparación a MSC-TA. Sin embargo, ambas líneas de MSC poseen similares potenciales de inmunomodulación.

Palabras clave: Células madre mesenquimales, médula ósea, tejido adiposo, proliferación, inmunomodulación, inmunogenicidad.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) are undifferentiated adult cells that possess self-renewal, immunomodulating and low immunogenicity properties. Hence, they are currently considered as potential therapeutic agents for the treatment of various pathologies. In the present study, proliferation, immunomodulation and immunogenicity in vitro potentials were compared between MSCs derived from bone marrow (BM) and adipose fetal bovine tissue (AT). MSC were isolated based on their ability to adhere to plastic and fibroblastoid morphology. The proliferation potential was determined at two cell concentrations (5000 and 8500 cells / cm²) during 10- and 15-days culture periods, respectively. Relative expression of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO), interleukin-6 (IL-6), transforming growth factor β 1 (TGF β 1), prostaglandin E2 (PGE2) and interleukin-10 (IL-10) were quantified using quantitative PCR (Q PCR) in MSC-BM and MSC-AT stimulated with IFN γ . Additionally, the mRNA levels of immunogenicity genes, major histocompatibility complex I and II (MHC-I and II) and T-cell costimulatory molecules (CD80 and CD86) were determined. In addition, the effect of conditioned medium from IFN γ -stimulated MSC was estimated on the proliferation of alloantigen-activated bovine peripheral blood lymphocytes (PBL). The plastic-adherent population of MSC derived from BM and AT expressed higher (P <0.05) mRNA levels of mesenchymal markers (CD105, CD90 and CD73) compared to hematopoietic markers (CD45 and CD34). MSC-MO doubled population in a shorter (P <0.01) time period compared to MSC-AT (2.9 vs. 4.4 days, respectively). Exposure of MSC-BM and MSC-AT to IFN γ activated the expression of IDO mRNA and increased (P <0.05) IDO-metabolite kinurenine concentration in conditioned medium of MSC. Both MSC lines expressed levels of IL-6, PGE2, TGF β 1 and IL-10 mRNA with or without IFN γ treatment. MSC-BM expresses higher (P <0.05) mRNA levels of MHC-II mRNA in comparison to MSC-AT. Conditioned medium of MSC cell lines suppress the proliferation of bovine PBL. In conclusion, the potential for proliferation and immunogenicity are tissue-source dependent, since MSC-MO has a high potential for proliferation and immunogenicity compared to MSC-TA. However, both MSC lines display similar potential for immunomodulation.

Key words: Mesenchymal stem cells, bone marrow, adipose tissue, proliferation, immunomodulation, immunogenicity.

I. Introducción

Las células madre mesenquimáticas (del inglés *Mesenchymal Stem Cells*, MSC), han centrado considerable interés durante las últimas décadas como potenciales agentes terapéuticos celulares para el tratamiento de variadas patologías (Eggenhofer *et al.*, 2014; Alcayaga-Miranda *et al.*, 2015). Este potencial se ha basado inicialmente en propiedades que incluyen su capacidad de diferenciación hacia linajes celulares osteogénico, condrogénico y adipogénico (Pittenger *et al.*, 1999; Cortes *et al.*, 2013). Adicionalmente, las MSC poseen propiedades de autorenovación, inmunomodulación y cuentan con una baja inmunogenicidad (Pérez-Serrano *et al.*, 2012; Elman *et al.*, 2014; Cortes *et al.*, 2013). El potencial de autorenovación se refiere a los mecanismos biológicos por los cuales las MSC preservan el estado indiferenciado en la progenie celular (Kyurkchiev *et al.*, 2014). La capacidad inmunomoduladora se debe a que las MSC son capaces de modular la inmunidad innata y adaptativa por contacto directo o mediante efectos paracrinos de factores solubles como indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO), interleuquina 6 (IL-6), factor de crecimiento transformante β 1 (TGF β 1), prostaglandina E2 (PGE₂) e interleuquina 10 (IL-10) que son secretados al medio extracelular (Elman *et al.*, 2014; Hsiao *et al.*, 2012). Finalmente, su escasa inmunogenicidad se debe a la expresión de bajos niveles de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad I y II (MHC-I y II) y a la ausencia de expresión de moléculas coestimuladoras de linfocito T (CD80 y CD86) (Zhang *et al.*, 2015). Esta baja inmunogenicidad permite evadir el reconocimiento por parte de células citotóxicas naturales (NK) e impedir la activación de linfocitos T en trasplantes a huéspedes (Mielcarek *et al.*, 2011). Estas cualidades determinan que las MSC sean un modelo único para la investigación en el área de la biomedicina y a la vez favorecen su aplicación en terapia celular y regeneración de tejidos en medicina veterinaria y humana (Alcayaga-Miranda *et al.*, 2015).

Las MSC han sido aisladas y caracterizadas desde diversos tejidos; sin embargo, la médula ósea (MO) y el tejido adiposo (TA) son las fuentes más utilizadas para

terapia autóloga (células provenientes del mismo individuo) o alogénica (células provenientes de otro individuo de la misma especie) (Hoogduijn *et al.*, 2013; Dueñas *et al.*, 2014). Diversos estudios demuestran que las capacidades de estos tipos celulares son dependientes del tejido de origen (Elman *et al.*, 2014; Hsiao *et al.*, 2012). El aislamiento de MSC se realiza principalmente en base a su capacidad de adherencia al plástico, propiedad que permite una separación eficiente y de bajo costo comparado con otras técnicas como la citometría de flujo asociada a clasificación de células (*cell sorting*) o esferas inmunomagnéticas (Hombach-Klonisch *et al.*, 2008).

Las MSC han sido aisladas desde varias especies de animales domésticos con el objetivo de generar modelos de investigación y de desarrollar aplicaciones terapéuticas para estas especies. En el caso del modelo bovino, el desarrollo de una terapia basada en MSC sería de gran utilidad para el tratamiento de diversas patologías que afectan a esta especie. En el último tiempo se han reportado estudios que describen el aislamiento de MSC bovinas desde MO, TA, líquido amniótico, placenta y sangre de cordón umbilical (Cortes *et al.*, 2013; Raoufi *et al.*, 2011; Corradetti *et al.*, 2013). En dichos estudios se ha caracterizado su morfología, la expresión de antígenos de superficie celular y el potencial de diferenciación hacia linajes mesodérmico, endodérmico y ectodérmico (Raoufi *et al.*, 2011; Cortes *et al.*, 2013; Dueñas *et al.*, 2014). Estos datos contribuyen a reforzar la importancia de MSC como potenciales herramientas de utilidad para la medicina del ganado bovino. Sin embargo, aún es desconocido el potencial de proliferación, inmunomodulación e inmunogenicidad de MSC bovinas, cuyas propiedades son importantes para determinar su capacidad terapéutica. Un alto potencial de proliferación celular facilitaría la disponibilidad inmediata de MSC que puede ser utilizado con fines terapéuticos. En cambio, una alta capacidad de inmunomodulación permitiría regular la respuesta inflamatoria en injuria tisular favoreciendo la pronta reparación del tejido. En tanto, una baja inmunogenicidad facilitaría la evasión de la respuesta inmune en el hospedero, especialmente en una terapia alogénica. La determinación de estas propiedades bajo condiciones *in*

in vitro, ayudarían a seleccionar la fuente de MSC con mejor potencial para aplicación terapéutica en ensayos *in vivo*. En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue comparar los potenciales de proliferación, inmunomodulación e inmunogenicidad *in vitro* de MSC derivadas de MO y TA fetal bovino.

II. Revisión bibliográfica

2.1. Células Madre Mesenquimáticas (MSC)

Las MSC fueron descritas por primera vez en ratones hace 40 años, mediante la caracterización de su morfología fibroblastoide, adherencia al plástico y capacidad clonogénica (Friedenstein *et al.*, 1976). Posteriormente se ha reportado ampliamente que las MSC poseen potencial de autorenovación y capacidad de diferenciación multipotente (Caplan y Correa, 2011; Pérez-Serrano *et al.*, 2012). Actualmente se ha determinado que las MSC producen sustancias bioactivas como parte de su secretoma, que poseen diversas propiedades que incluyen capacidades angiogénica, anti-apoptótica, anti-fibrótica, anti-inflamatoria e inmunomoduladora (Hsiao *et al.*, 2012; Hoogduijn *et al.*, 2013). Considerando estas propiedades, así como su fácil aislamiento, cultivo, manejo y proliferación *in vitro*, las MSC son consideradas como una poderosa herramienta terapéutica para la aplicación en variadas patologías (Elman *et al.*, 2014).

Aún no se ha establecido un perfil de expresión de marcadores de superficie celular que permita la caracterización de las poblaciones de MSC derivadas de animales domésticos. Sin embargo, la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT) ha propuesto tres criterios para definir las MSC humanas que incluyen: 1) adherencia al plástico bajo condiciones de cultivo estándar, 2) expresión de marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90 sumado a la ausencia de expresión de marcadores de linaje hematopoyético CD34, CD45 y CD19, y 3) capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica bajo condiciones de cultivo estándar *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006). En el modelo bovino se han demostrado varias propiedades de MSC derivadas de MO fetal que

incluyen capacidad de adherencia al plástico, expresión de marcadores de superficie mesenquimales CD105, CD29, CD90 y CD73 y ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos CD45 y CD34 (Dueñas *et al.*, 2014). Así mismo, se ha reportado el potencial de diferenciación mesodérmica (osteogénica, condrogénica, adipogénica y miogénica) de estas células (Cortes *et al.*, 2013) y se ha publicado evidencia sobre su capacidad *in vitro* de diferenciación endodérmica (hepatogénica) y ectodérmica (neurogénica) (Dueñas *et al.*, 2014).

2.2. Diferencias entre MSC derivadas de medula ósea y tejido adiposo

Diversos estudios han reportado que las MSC-TA y MSC-MO comparten características similares en cuanto a la expresión de marcadores de superficie mesenquimales (Vishnubalaji *et al.*, 2012). Sin embargo, se han observado importantes diferencias biológicas en relación a su morfología, tasa de proliferación y capacidad de diferenciación (Chung *et al.*, 2013; Vishnubalaji *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2008). Las MSC-MO en cultivo *in vitro* muestran una población heterogénea con morfología de forma espigada (denominada fibroblastoide) y poligonal con un núcleo grande, alargado y céntrico (Cortes *et al.*, 2013). En cambio, las MSC-TA tienen una morfología fibroblastoide circular con núcleos grandes de forma triangular u ovalada, con citoplasma grande que presentan crecimiento en colonias celulares (Magdalena, 2012). Ambas líneas celulares pueden mantenerse en estados indiferenciados hasta el pasaje 30 aproximadamente en cultivo estándar *in vitro*, luego alcanzan la etapa de senescencia replicativa (Zuk *et al.* 2001; Bosnakovski *et al.*, 2005). Una vez alcanzada la senescencia, el ciclo celular se suspende de manera permanente y las células quedan detenidas en la fase G0/G1. Estas células senescentes no responden a mitógenos aunque permanecen vivas y metabólicamente alteradas (Melissa *et al.*, 2004).

Se ha descrito que las MSC-TA cuentan con un potencial de autorenovación y proliferación elevado, debido a la actividad de la proteína factor promotor de la replicación (FPR) en la fase S del ciclo celular, que induce síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y adicionalmente como consecuencia del mayor tamaño de sus telómeros en comparación a las MSC-MO (Li *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2008). En cuanto a su potencial inmunomodulador, se ha reportado que las MSC-TA son más potentes inmunosupresoras de la diferenciación de células dendríticas (DC) derivadas de monocitos en comparación a las MSC-MO (Ivanova-Todorova *et al.*, 2009). En estudios *in vitro* se ha reportado que las MSC-TA suplementadas con lisado de plaquetas humanas en reemplazo de suero fetal bovino (SFB), producen mayor secreción de proteínas como factor crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), factor derivado de células madre 1 (SDF-1), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y poseen mayores efectos inmunomoduladores comparado con las MSC-MO (Li *et al.*, 2015). Estos datos pueden proporcionar información de utilidad para seleccionar la fuente celular con mejor potencial terapéutico.

2.3. Capacidad proliferativa de las MSC

Durante el cultivo *in vitro*, las MSC presentan una curva de crecimiento celular de tres fases (Serra y Perdomo, 2015). La primera fase de crecimiento después de que el cultivo se siembra es la fase de latencia o “fase LAG”, que corresponde a un período de crecimiento lento que se prolonga de 12 a 24 h. Durante este periodo las células se adaptan al entorno del cultivo, reconstituyendo el citoesqueleto y secretando proteínas de matriz extracelular para adherirse al plástico y prepararse para el crecimiento rápido. Luego prosigue la fase de crecimiento logarítmico o “fase LOG”, un período donde las células proliferan de manera exponencial hasta alcanzar una confluencia del 100%. Cuando se depletan los nutrientes del medio de crecimiento o cuando las células ocupan todo el sustrato o superficie disponible, las células entran en la fase estacionaria (*fase de meseta*), donde la proliferación se reduce en gran medida o cesa por completo (Serra y Perdomo, 2015; Freshney, 2005).

Para determinar la capacidad de proliferación durante el cultivo se evalúan tres indicadores: 1) número de duplicaciones celulares, que es la cantidad de duplicaciones que ocurren en las células cultivadas en un tiempo determinado (Vidal *et al.*, 2006); 2) tiempo de doblaje poblacional (PDT), que es el tiempo necesario para la duplicación de una célula y 3) una curva de crecimiento celular, que muestra el comportamiento de las células a lo largo del cultivo respecto a su capacidad de proliferación. En la especie ovina se reportan PDT de $31,3 \pm 2,4$ h y de $70,7 \pm 1,3$ h para MSC-TA y MSC-MO, respectivamente (Heidari *et al.*, 2013). En relación a MSC-MO equina se ha determinado un PDT de $4,9 \pm 1,6$ días en 1^{er} pasaje (Vidal *et al.*, 2006). Mientras que en MSC-MO y MSC-TA de ratas el PDT para la fase de crecimiento logarítmica es 61,2 h y 45,2 h, respectivamente (Peng *et al.*, 2008). Sin embargo, en MSC-TA humano adulto reportan el PDT 402.3 h (Christoloudou *et al.*, 2013). Hasta el presente no se han reportado estudios que evalúen la proliferación de MSC en la especie bovina.

2.4. Factores inmunomoduladores y antiinflamatorios producidos por las MSC

Las MSC ejercen efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios en casi todas las células de sistema inmune innato y adaptativo, a través de una variedad de mecanismos, en particular mediante la secreción moléculas bioactivas como IDO, IL-6, TGF β 1, PGE₂ e IL-10 (Elman *et al.*, 2014; Hsiao *et al.*, 2012). Cabe señalar que los efectos inmunomoduladores de las MSC se ejecutan por contacto directo de célula a célula, por efectos paracrinos o por una combinación de ambos mecanismos (Kyurkchiev *et al.*, 2014; Elman *et al.*, 2014). Por otro lado, el acoplamiento de receptores tipo Toll (TLR) expresadas por las MSC puede determinar sus efectos pro o anti-inflamatorios (DelaRosa *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2014). Las MSC secretan moléculas bioactivas, ya sea "espontáneamente" o después de su estimulación por otras citoquinas pro-inflamatorias como el interferón gamma (IFN γ) (Bernardo *et al.*, 2013; Dazzi *et al.*, 2011). El IFN γ es producido por linfocitos T y células NK y normalmente actúa como una señal de

impulso para la activación y expansión de células T (Krampera, 2011). IFN γ conduce a la supresión de proliferación de células T activando a MSC para promover la liberación de factores paracrinos antiinflamatorios (Schurch *et al.*, 2014). Por lo tanto, el bloqueo de los receptores de IFN γ en MSC, impide su acción inhibidora de la proliferación de células T (Krampera, 2011).

LaIDO es una enzima intracelular que cataliza triptófano hacia quinurenina y es activada por estímulos proinflamatorios para ejercer un efecto inmunomodulador (Kyurkchiev *et al.*, 2014; Curti *et al.*, 2009). IDO inhibe las funciones de células T y aumenta la función de células T reguladores (Treg) (Hsu *et al.*, 2013). Esta enzima es una de las moléculas inmunosupresoras secretadas por varias fuentes de MSC (Liu *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2014). Cuando las MSC son estimuladas con IFN γ , éstas aumentan la secreción de IDO y también de otros factores mediadores de la inflamación como TGF β 1 y PGE2 (Liang *et al.*, 2013). IDO no es un exclusivo inmunomodulador de MSC humanas en estados basales pero es esencial para la inmunomodulación de MSC en presencia de IFN γ (Yagi *et al.*, 2013). Su mecanismo de acción sobre las células T es por dos vías, la primera es directa mediante catálisis de triptófano que resulta en producción de quinurenina, la cual suprime la proliferación de células T (François *et al.*, 2012; Kyurkchiev *et al.*, 2014). La segunda vía es indirecta, mediada por la diferenciación de monocitos a macrófagos tipo 2 (M2) que secretan IL-10 contribuyendo a la inmunosupresión de células T (François *et al.*, 2012). En los modelos canino y humano se ha reportado que la expresión relativa de IDO en las MSC de tejidos fetales (placenta, matriz de cordón umbilical y amnios) tratadas con IFN γ es mayor en comparación con MSC-MO adulta (Saulnier *et al.*, 2016; Mareschi *et al.*, 2016).

La IL-6 es una citoquina que inhibe la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y a la vez induce la síntesis de IL-10, receptor antagonista IL-1 β y el receptor soluble para TNF α (Kimura y Kishimoto, 2010). La secreción de IL-6 en MSC ha sido demostrada tanto en ratones como en seres humanos (Bernardo *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014) y se detecta en forma espontánea o bien después de la inducción con interleuquina 1 β (IL-1 β), TNF α y IFN γ (Bernardo *et al.*, 2013; Dazzi *et al.*, 2011).

Por otro lado, esta citoquina sería responsable de los efectos inmunoreguladores de MSC, induciendo la generación de células CD8⁺ FoxP3⁺ (forkhead box P3) y CD4⁺ FoxP3⁺ (Kyurkchiev *et al.*, 2013; Bernardo *et al.*, 2013; Ivanova-Todorova *et al.*, 2012).

El TGFβ1 es una citoquina inmunomoduladora que juega un papel esencial en la iniciación y resolución de las respuestas inflamatorias (Yoshimura y Muto, 2011; Li *et al.*, 2015). Se ha reportado que en presencia de IFNγ, las MSC secretan TGFβ1 y que esta citoquina es capaz de suprimir la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) y de células T CD4⁺ y CD8⁺ (Groh *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2013). Además, TGFβ1 promueve la conversión de las células T CD4⁺ a células Treg que poseen la capacidad de suprimir la respuesta aloantígeno (Zheng *et al.*, 2007; English *et al.*, 2009). La vía por la que TGFβ1 ejerce su efecto anti-proliferativo es mediante el control de la expresión de reguladores del ciclo celular como p21 y p27 (Nelson *et al.*, 2003).

La PGE₂ es una molécula lipídica originada desde el ácido araquidónico (Aggarwal y Pittenger 2005). Las MSC producen niveles detectables de PGE₂ que tienen efectos inmunomoduladores superiores aIDO (Hsu *et al.*, 2013; Spaggiari *et al.*, 2009). Bajo condiciones inflamatorias, en presencia de lipopolisacáridos (LPS), y de moléculas IFNγ, TNFα, IL-1β, las MSC aumentan su secreción de PGE₂ para suprimir los mediadores inflamatorios en células del sistema inmune por contacto directo o de manera paracrina (Aggarwal y Pittenger 2005; Hsu *et al.*, 2013).

La IL-10 es una citoquina que induce tolerancia inmunológica sobre las células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *Antigen Presenting Cells*) (Ivanova-Todorova *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2013). En linfocitos T, la IL-10 induce anergia mediante la inhibición de la fosforilación de CD28 (Ivanova-Todorova *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2013). Existen reportes contradictorios con respecto a la secreción de IL-10 desde las MSC. Algunos autores demostraron su producción en MSC (Bernardo *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014; Engela *et al.*, 2012), mientras que otros

autores descartan tal posibilidad (Ivanova-Todorova *et al.*, 2012). Su secreción estaría dada en condiciones específicas como en ambiente inflamatorio y en presencia de citoquinas (IFN γ , IL-1 β y TNF α) que activan TLR (Dazzi *et al.*, 2011; DelaRosa *et al.*, 2012). Se ha demostrado que las MSC secretan factores para regular la secreción de IL-10 en macrófagos, además inducen la generación de DC tolerogénicos (produce tolerancia inmunológica) y células Treg (Eggenhofer *et al.*, 2014; Ivanova-Todorova *et al.*, 2012; Bassi *et al.*, 2011).

2.5. Potencial de inmunogenicidad de MSC sobre células del sistema inmune

Se ha descrito ampliamente que las MSC evaden el rechazo alógeno en modelos humanos y animales. Esta propiedad conocida como inmunoevasión es mediada por varias moléculas de superficie e intracelular que permiten inducir o suprimir la respuesta inmune (Bassi *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015). Este efecto estaría dado por tres mecanismos principales, en primer lugar diversos estudios atribuyen que las MSC expresan bajos niveles de antígenos de MHC-I y II y además carecen de moléculas coestimuladoras como B7-1(CD80) y B7-2 (CD86) (Ryan *et al.*, 2005; Yanez *et al.*, 2006; Mielcarek *et al.*, 2011). Particularmente, las células T requieren de estas moléculas y receptores para su activación y/o función efectora (Elgueta *et al.*, 2009; Mielcarek *et al.*, 2011; Rasmusson *et al.*, 2007). En forma alternativa se ha propuesto que las MSC previenen indirectamente la respuesta de células T a través de la modulación de CD y su acción directa es mediante la evasión del reconocimiento por parte de células NK y de la activación de linfocitos T (Spaggiari *et al.*, 2008; Kyurkchiev *et al.*, 2013; Mielcarek *et al.*, 2011). Por último se sugiere que las MSC inducen un microambiente local de inmunomodulación a través de la producción de PGE₂, IL-6, TGF β 1 y IL-10, así como por la expresión deIDO, el cual metaboliza y por lo tanto reduce el triptófano en el medio extracelular (Ryan *et al.*, 2005; De la Rosa *et al.*, 2010; Elman *et al.*, 2014). En modelos humano, canino y murino las MSC-TA no expresan MHC-II pero si MHC-I (Yanez *et al.*, 2006; Villatoro *et al.*, 2015). Sin

embargo, en modelos humano y murino se describe que las MSC-MO expresan los antígenos MHC-I y II y además moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, a pesar de que estas células suprimen la estimulación de células T en cultivos *in vitro* (Klyushnenkova *et al.*, 2005; Krampera *et al.*, 2003). También se ha descrito que las MSC fetales poseen una menor capacidad inmunogénica comparado con las adultas debido a una menor expresión de MHC-I y II no citosólico (Le Blanc *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). En estudios heterólogos se ha reportado que MSC humanas son capaces de evadir la inmunovigilancia luego de un trasplante celular en modelo ovino (Liechty *et al.*, 2000, Bartholomew *et al.*, 2002). Estos hallazgos provocaron que las MSC comenzaran a ser estudiadas con fines terapéuticos para el tratamiento de enfermedad de injerto contra el huésped (GVHD), dado que las características “inmunoevasivas” representan una enorme ventaja y abren las puertas para su uso clínico en trasplantes alogénicos como agentes inmunosupresores (Krampera *et al.*, 2003; Le Blanc *et al.*, 2005). Sin embargo, aún se desconoce si el rechazo de los donantes influye en la eficacia de las terapias alogénicas de MSC. Además, hasta el momento no se ha demostrado la ventaja de efecto clínico de las MSC autólogas frente a MSC alogénicas (Ankrum *et al.*, 2014).

2.6. Inmunomodulación de MSC sobre las células del sistema inmune

Las MSC poseen propiedades inmunomoduladoras tanto bajo condiciones *in vitro* como *in vivo*, que están mediadas por mecanismos complejos y que les permiten regular la función de células del sistema inmune innato y adaptativo (Shi *et al.*, 2011). Dentro de estas células inmunes se incluyen las APC, tales como las células B, DC y macrófagos, así como a diferentes células efectoras como las células NK (Spaggiari *et al.*, 2008; Kyurkchiev *et al.*, 2013), linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) y células T CD4⁺ y Treg (Maccario *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004). Muchos trabajos de investigación han demostrado el potencial inmunomodulatorio de MSC, a través de la función supresora en la activación de linfocitos T tanto *in*

vitro como *in vivo* (Bartholomew *et al.*, 2002; Groh *et al.*, 2005). Cuando las MSC son adicionadas a una reacción mixta linfocitaria (MLR) o a un cultivo de linfocitos activados por mitógenos, estas células suprimen la proliferación de linfocitos T en efecto dosis dependiente (Bartholomew *et al.*, 2002; Klyushnenkova *et al.*, 2005; Augello *et al.*, 2005). Además, su efecto inhibitorio no es apoptótico ya que al retirar las MSC y reestimar los linfocitos T, estos recuperan su capacidad proliferativa (Di Nicola *et al.*, 2002). La capacidad de supresión de las MSC a linfocitos estaría mediada por 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 (Augello *et al.*, 2005). También se ha demostrado que MSC-MO humanas, son activadas por monocitos de sangre CD14⁺ para secretar moléculas inhibitoras como TGFβ1 que suprime a las células T aloreactivas y linfocitos T (Groh *et al.*, 2005).

En estudios *in vitro* se demostró que las MSC-MO de modelo humano y murino, suprimen la proliferación, diferenciación y activación de células T CD4⁺ inducidas para diferenciarse en células Th1 y Th17 (Luz-Crawford *et al.*, 2013; Ghannam *et al.*, 2010). Así mismo, se comprobó la acción de MSC-MO humanas en células TH17 totalmente diferenciadas, observándose una población de células secretoras de IL-10, con fenotipo de Treg (Ghannam *et al.*, 2010). En el mismo modelo, las MSC-MO inhibieron la secreción de IFNγ en células activadas TH1, mientras que en células activadas TH2 favorecen la secreción de IL-4 (Aggarwal y Pittenger, 2005). Múltiples estudios han reportado la generación de células Treg por las MSC a partir de las PBMC humana, esplenocitos de ratón o aisladas de células T CD4⁺ (Engela *et al.*, 2012; Bassi *et al.*, 2011; Maccario *et al.*, 2005). Por otro lado, al cultivar células CD4⁺ en medio condicionado de MSC-TA, la fracción de linfocitos CD4⁺ FoxP3⁺ aumenta y este efecto sería inducido por efectos paracrinos de MSC-TA, como TGFβ1 y PGE₂ (Ivanova-Todorova *et al.*, 2012). Sin embargo, el mecanismo de acción por contacto directo MSC-células T generaría mayor expresión de células Treg (English *et al.*, 2009). Existe también una regulación de

retroalimentación entre células Treg y las MSC, donde las células Treg no alteran la secreción de IFN γ por las células inmunes y por lo tanto contribuyen a la activación del MSC (Engela *et al.*, 2012; Kyurkchiev *et al.*, 2014).

A través del receptor de células T (TCR, del inglés *T cell receptor*) y la influencia de señales coestimuladoras provenientes de APC, los linfocitos T proliferan y ejercen varias funciones efectoras, incluyendo la liberación de citoquinas proinflamatorias (Aggarwal y Pittenger, 2005). Sin embargo, las MSC a través de su función inmunomoduladora inhiben la proliferación de células T CD4⁺ (Th1 y Th17) y CD8⁺, mientras que induce la generación de célula T CD4⁺ (Th2) y Treg (Ren *et al.*, 2009; Ghannam *et al.*, 2010). La inhibición de la proliferación de los linfocitos T conlleva una disminución en la producción de IFN- γ tanto *in vivo* como *in vitro* y un incremento en la producción de citoquinas antiinflamatorias IL-4 y IL-10 por las células Th2 y Treg para regular el sistema inmune (Zhang *et al.*, 2015; Engela *et al.*, 2012).

A pesar del notable avance del estudio sobre MSC en distintas especies en referencia a sus múltiples propiedades, en el modelo bovino aún es desconocido el potencial de proliferación, inmunomodulación e inmunogenicidad de estas células, cuyas propiedades son importantes para determinar su potencial capacidad terapéutica.

III. Hipótesis

Las capacidades de proliferación, inmunomodulación e inmunogenicidad celular son dependientes de la fuente de origen tisular por lo que existen diferencias en estos potenciales entre MSC derivadas de MO y TA fetal bovino.

IV. Objetivos

4.1. Objetivo general

Comparar el potencial de proliferación, inmunomodulación e inmunogenicidad de MSC derivadas de MO y TA fetal bovino.

4.2. Objetivos específicos

1. Comparar el potencial de proliferación *in vitro* de MSC derivadas de MO y TA fetal bovino.
2. Comparar el potencial inmunomodulador de MSC-MO y MSC-TA mediante determinación de la actividad enzimática deIDO y los niveles de mRNA de factores inmunomoduladores (IDO, IL-6, TGF β 1, PGE₂ e IL-10) en MSC activadas *in vitro* con IFN γ .
3. Evaluar el potencial de inmunogenicidad de MSC-MO y TA mediante la determinación de la expresión relativa de los niveles de mRNA de MHC-I y II y de moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86.
4. Evaluar el efecto del medio condicionado de MSC-MO y MSC-TA fetal bovino activadas con IFN γ sobre la proliferación *in vitro* de PBL bovino.

V. Materiales y métodos

5.1. Aislamiento y cultivo de MSC derivadas de medula ósea fetal bovino

Las MSC-MO fueron obtenidas desde tejidos colectados de fetos bovinos de 8 a 9 meses de gestación provenientes de una planta faenadora. Los fetos fueron transportados en un contenedor térmico al laboratorio centralizado de investigación veterinaria (Laciv) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Los fémures fetales fueron separados de tejidos blandos y seccionados en la diáfisis utilizando una sierra. Posteriormente se realizó una aspiración de la MO mediante una aguja de 18 G conectada a una jeringa de 10 mL con medio de colección DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (alto en glucosa 4,5 gr/L; GIBCO, Grand Island, USA) suplementado con 100 µg/mL de estreptomina y 100 UI/mL de penicilina. Las MSC fueron aisladas mediante un protocolo descrito previamente (Bosnakovski *et al.*, 2005). Brevemente, el aspirado de MO se centrifugó dos veces en PBS (*Phosphate-buffered saline*) (pH 7,4; Hyclone Laboratories, Utah, USA) y dos veces en medio de colección a 750 g por 5 min. Una vez lavado, el pellet se aspiró y se suspendió en medio de expansión el cual consistió en DMEM alto en glucosa (4500 mg/L D-Glucosa; Hyclone Laboratories) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone Laboratories), 100 µg/mL de anfotericina B, 100 µg/mL de estreptomina y 100 UI/mL de penicilina en botellas de cultivo (T75, Falcon, New Jersey, USA), incubado a 38°C bajo una atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Luego de dos días las células no adherentes al plástico fueron removidas mediante cambio de medio de cultivo.

5.2. Aislamiento y cultivo de MSC derivadas de tejido adiposo fetal bovino

Se aislaron aproximadamente 10 g de TA desde el omento fetal, bajo condiciones de asepsia y el tejido fue depositado en un tubo de 20 mL de PBS suplementado con 100 µg/mL de estreptomycin y 100 UI/mL de penicilina. Posteriormente, el TA fue lavado 3 veces en PBS, luego se disgregó utilizando una tijera e incubado en 0.5% de colagenasa tipo I (Sigma-Aldrich) diluida en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (1 mL/g de tejido adiposo) durante 45 minutos a 38°C bajo atmosfera conteniendo 5% de CO₂. La colagenasa I fue neutralizada mediante la adición de igual volumen de DMEM suplementado con 10% de SFB. El tejido disgregado fue filtrado a través de poros de 100 µm y posteriormente centrifugado a 750 g durante 8 minutos. El sobrenadante y el pellet de células fue suspendido en medio de expansión, el cual consistió en DMEM alto en glucosa (4500 mg/L D-Glucosa; Hyclone Laboratories) suplementado con 10% de SFB (Hyclone Laboratories), 100 µg/mL de anfotericina B, 100 µg/mL de estreptomycin y 100 UI/mL de penicilina en botellas de cultivo (T75, Falcon, New Jersey, USA) e incubado a 38°C bajo una atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Luego de dos días, las células no adherentes al plástico fueron removidas mediante cambio de medio de cultivo. Al alcanzar un 80 a 90% de confluencia celular, las células fueron removidas mediante incubación en 1% de tripsina (Hyclone Laboratories).

5.3. Determinación del potencial de proliferación de MSC-MO y MSC-TA fetal bovino

En el presente estudio se determinó la curva de crecimiento para cada línea celular (MSC-MO y MSC-TA), con el fin de comparar el potencial de proliferación celular. Las MSC-MO y MSC-TA de 2^{do} y 3^{er} pasaje fueron sembradas en dos concentraciones de 5.000 y 8.500 células/cm² con el objetivo de establecer las curvas de crecimiento para cada línea celular. Las MSC fueron sembradas en botellas de cultivo de 25 cm², en medio DMEM alto en glucosa suplementado con

10% de SFB. El periodo de cultivo se extendió por 15 días (5000 células/cm²) y por 10 días (8500 células/cm²). Previamente, se realizó el recuento celular utilizando azul tripan para determinar la viabilidad celular. El cambio de medio se realizó cada 3 días y la cuantificación del número de células se determinó los días 0, 1 y 2, luego cada 2 días del cultivo utilizando una cámara de Neubauer. El volumen contenido en cada cuadrícula es de 1 mm³ (0,0001 mL) y para determinar la concentración de células se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ células/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células contadas} \times \text{factor de dilución} \times 10^4 \text{ mL}}{\text{N}^\circ \text{ cuadrantes contados}}$$

El tiempo de doblaje poblacional (PDT), se determinó utilizando la siguiente fórmula (Heidari *et al.*, 2013):

$$\text{PDT} = (\log 2 \times t) / (\log N_f - \log N_i)$$

En la ecuación (*t*) tiempo de cultivo, (*N_i*) número de células sembradas y (*N_f*) número de células contadas al final.

5.4. Determinación del potencial inmunomodulador de MSC-MO y TA

5.4.1. Determinar la actividad enzimática deIDO en medio condicionado de MSC preactivadas con IFN γ

MSC-MO y MSC-TA de 2^{do} a 3^{er} pasaje fueron sembradas en una concentración de 1x10⁴ células/cm² en medio DMEM alto en glucosa suplementado con 10, 20 y 40 ng/mL de IFN γ (R&D Systems, Minneapolis, USA) durante 72h. Posteriormente se recolectó el medio condicionado de MSC para determinar la actividad enzimática deIDO. Para este fin, se cuantificó la concentración N-formilquinurena en el medio utilizando un ensayo colorimétrico (Saulnier *et al.*, 2015) y comparándolo con una curva de concentración de D-Quinurena (Sigma-Aldrich, USA). Una vez colectado, el medio condicionado fue centrifugado a 750 g por 5

min y filtrado a través de poros de 0.22 μm . Una alícuota de 200 μL de medio condicionado de MSC fue mezclada con 100 μL de ácido tricloroacético al 30% (Sigma-Aldrich, USA) y la mezcla fue incubada a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Una vez centrifugado a 15.000 g por 1 min, se transfirieron 100 μL de sobrenadante a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano y se adicionó 100 μL de reactivo Ehrlich (100 mg de p-dimetilamino benzaldehído diluido en 5 ml de ácido acético glacial). A continuación, se determinó la densidad óptica a 450 nm con un lector de microplacas (Model 3550, Bio-Rad, Arizona, USA).

5.4.2. Niveles de mRNA de factores paracrinos inmunomoduladores en MSC-MO y MSC-TA preactivadas con IFN γ

El potencial inmunomodulador de MSC-MO y MSC-TA fue evaluado mediante la cuantificación de los niveles de mRNA de genes inmunomoduladores (IDO, IL-6, TGF β 1, PGE $_2$ e IL-10) mediante PCR cuantitativo (Q-PCR) en MSC tratadas con 10, 20 o 40 ng/mL de IFN γ . Como control se utilizaron MSC no tratadas con IFN γ . Se extrajo ARN total de las células, utilizando un kit GeneJET RNA Purification (Thermo Scientific, California, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total fue cuantificado utilizando un kit Qubit RNA HS (Life Technologies, New York, USA). El ADN genómico de las muestras fue removido utilizando el kit DNAsa I (Thermo Scientific, California, USA). Para la reacción de transcripción inversa (RT) se utilizó un kit Brilliant II SYBR Green de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) (Agilent Technologies, California, USA). La reacción se efectuó siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia de los partidores que se utilizaron se presenta en la Tabla 1. Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando un kit Brilliant SYBR Green Q-PCR Master mix (Stratagene, California, USA). Cada tubo de reacción contenía 12,5 μL de Master mix, 2,5 μL de partidor forward, 2,5 μL de partidor reverse, 0,375 μL de tinción de referencia Rox, 2 μL de cDNA y H $_2$ O hasta alcanzar un volumen total de 25 μL . El análisis de temperatura de desnaturalización teórica

(T_m) se realizó después de la amplificación mediante un ciclo que consistirá en aumentar la temperatura de 95° a una velocidad de 20 °C/s para la desnaturalización total de la doble hebra, luego bajando la temperatura a 65°C a una velocidad de 20 °C/s para la re-naturalización y finalmente elevando hasta 95°C a una velocidad de 0,1 C/s registrando la pérdida de fluorescencia cada 0,1 °C. Para asegurar que los amplicones fueron generados a partir de mRNA y no de la amplificación de ADN genómico, se incluyó controles sin transcriptasa reversa. Los datos de Q-PCR obtenidos se analizaron mediante el método comparativo de Ct, respecto del Ct de los genes endógenos gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y β-ACTINA (Schmittgen y Livak, 2008). A continuación, se estimaron el valor de Q para cada muestra, luego el factor de normalización (FN), para ello se calcularon la media geométrica con los valores de Q de los genes endógenos y se estimó la expresión normalizada (EN) cociente entre valor Q del gen interés y el factor de normalización (Vandosempele et Al., 2002).

Tabla 1. Secuencia de los partidores utilizados en el análisis de expresión génica

Genes		Secuencia nucleotídica (5'-3')	N° Acceso
Endógenos			
GAPDH	Forward	CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA	NM_001034034.2
	Reverse	TGGAAGATGGTGTATGGCCTTTCCATTG	
β -ACTINA	Forward	CGCACCACTGGCATTGTCAT	NM_173979.3
	Reverse	TCCAAGGCGACGTAGCAGAG	
Inmunomodulación			
IDO1	Forward	CGAATATACTTGTCTGGTTGG	NM_001101866.2
	Reverse	GGAGAACATCAAAGCACTG	
IL- 6	Forward	ATGACTTCTGCTTTCCTACCC	XM_015468553.1
	Reverse	GCTGCTTTCACACTCATCATTG	
TGF β 1	Forward	CTGAGCCAGAGGCGGACTAC	NM_001166068.1
	Reverse	TGCCGTATTCCACCATTAGCA	
PGE ₂	Forward	GAGCATGAGTCAAGCCATGT	NM_174588.2
	Reverse	TTTCCAGGGAAGGGTGTATG	
IL -10	Forward	GGTGATGCCACAGGCTGAG	NM_174088.1
	Reverse	AGCTTCTCCCCCAGTGAGTTC	
Inmunogenicidad			
MHC-I	Forward	TTGTGGAGACCAGGCCTTCAG	XM_015468948.1
	Reverse	GAGAACCAGGCCAACAATGATG	
MHC-II	Forward	GGAAGAAGGAGACGGTGT	NM_001012677.1
	Reverse	CAGGAAGACCGTCTGTGA	
CD80	Forward	ACTGGCAAGAATCCAAACCAACCC	XM_010801074.2
	Reverse	GCATTTCTGCAGGTCAGGCATGTT	
CD86	Forward	TGTGTCAGCTCTCAACAACAGGGA	XM_005201387.3
	Reverse	TTGACTGAGGCTTCTTCATCCGT	

5.5. Cuantificación de la expresión de genes de inmunogenicidad en MSC-MO y MSC-TA fetal bovino

La inmunogenicidad de MSC-MO y MSC-TA fue estimada mediante la cuantificación de los niveles de mRNA de MHC-I, MHC-II, moléculas co-estimuladoras CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) en MSC y como control biológico se utilizaron células de fibroblasto. Las muestras de MSC de 2^{do} a 3^{er} pasaje fueron fijadas como fue descrito anteriormente y se analizó la expresión de estos genes mediante Q-PCR (Tabla 1). Adicionalmente la expresión de MHC-II fue cuantificada mediante citometría de flujo utilizando un citómetro Gallios (Beckman Coulter, Brea, California, USA). Para este fin se utilizaron 2x10⁶ MSC de cada línea celular. Las células fueron removidas al alcanzar 90% de confluencia celular, mediante incubación en 4% ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA Hyclone Laboratories). Las MSC, FB y PBMC fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 20 minutos a 4°C, lavadas con PBS. Luego las células fueron permeabilizadas con Triton X100 (T878-50ML Sigma, Misuri, USA) al 1% en PBS durante 15 minutos. Se repitió el proceso de lavado anteriormente señalado y se procedió bloquear los sitios de unión inespecíficos en las células con Albúmina Sérica Bovina (A2152-10G Sigma, Misuri, USA) en PBS (PBS-BSA 5%) durante 1 hora. El MHC-II fue inmunodelectado mediante incubación por 24h a 4°C con anticuerpo primario IgG monoclonal anti-MHC-II DR (37.68) de ratón con un peso molecular de 29/34 kDa, que también es reactivo para bovinos (sc-59316 Santa Cruz Biotechnology, California, USA), en una concentración (1:50). Posterior a la incubación, las muestras se lavaron con solución de Tween-20 0,01% (P9416-50L Sigma, Misuri, USA) en PBS tres veces, durante 10 minutos cada lavado, para luego agregar 1 ml de solución con los anticuerpos secundarios en concentración 1:500 incubándose en oscuridad a 37°C durante 2 hora. Para ello se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón preparado en burro conjugado con Alexa fluor (A-21202 Thermo Fisher, Scientific, USA). El cual emite una fluorescencia color verde con una longitud de onda de 488 nm. Luego fue lavado con PBS/Tween-20, 3 veces por 10 minutos cada lavado, se agregó solución de Ioduro de Propidio

(1351916, Invitrogen Molecular Probes, Oregon, USA) en concentración 10:1000 durante 10 minutos. Esta se utilizó como indicador de ADN, para lograr discriminar las células de cualquier detrito celular o partículas que pueda pasar por el lector del citómetro. Su fluorescencia es de una longitud de onda de 617 nm. Como control negativo se utilizó la autofluorescencia basal de cada línea celular. Además, otro control negativo se utilizó para cada línea celular, pero tratadas solo con anticuerpo secundario anti-ratón de burro. Finalmente, las células se suspendieron en 500 μ L de buffer de citometría.

5.6. Determinación del efecto de medio condicionado de MSC-MO y MSC-TA preactivadas con IFN γ sobre de PBL bovino

El efecto de medio condicionado de MSC-MO y MSC-TA sobre la proliferación de linfocitos T activados por aloantígenos *in vitro*, fue evaluado mediante reacción mixta de leucocitos (MLR) (Bocharov *et al.*, 2013). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) bovina fueron aisladas por gradiente de densidad (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich). Se extrajo una muestra de 15 mL de sangre bovina a través de la vena coccígea utilizando tubos de vacutainer con heparina. Luego la sangre fue mezclada con PBS en partes iguales (1:1). Por otro lado, en un tubo falcón de 50 mL se agregaron 15 mL de Histopaque (Sigma-Aldrich) y sobre ello se adicionó sin mezclar la solución de sangre con PBS (30 mL). Posteriormente el tubo fue centrifugado a 900 g sin freno por 35 minutos. De esta forma se logró una separación en cuatro fases, plasma mas PBS, PBMC, Histopaque y en el fondo granulocitos y glóbulos rojos. Con una pipeta se extrajo la fase de PBMC, luego se lavó con 10 mL de PBS y se centrifugó dos veces a 1000 g por 10 minutos, para luego ser re-suspendida en RPMI suplementado.

Con fin de realizar la purificación de linfocitos de sangre periférica (PBL), las PBMC fueron re-suspendidas en medio RPMI 1640 con 10% de SFB (Hyclone Laboratories), 100 μ g/mL de anfotericina B, 100 μ g/mL de estreptomicina y 100

UI/mL de penicilina en una placa de 6 pocillos (Costar 3516, USA) e incubado a 38°C, con 5% de CO₂ durante 2 h. Posterior a ello las células no adherentes al plástico fueron removidas y lavadas con PBS. El PBL fue centrifugado y el pellet fue resuspendido en PBS (Quah *et al.*, 2007). Previamente, se realizó el recuento celular en cámara Neubauer utilizando azul tripan para determinar la viabilidad celular. Posteriormente se ajustó la concentración celular a 2x10⁶ células por mL.

El PBL fue posteriormente marcado con una sonda carboxifluoresceína succinimidil de ester fluorescente (CFSE) utilizando, un kit de proliferación de células (CellTrace, Thermo Fisher, California, USA). Cada vial de solución stock (5 mM) fue diluido con 18 µL de DMSO y desde esta dilución se utilizaron 2 µL (10 µM) para marcar un total de 1x10⁶ células de PBL en un 1mL de PBS en una suspensión que fue incubada por 20 min a 37°C mediante una agitación suave, protegido de luz (Quah *et al.*, 2007; Bocharov *et al.*, 2013). Posteriormente a esta solución se adicionó una proporción de cinco veces de medio con SFB y se volvió a incubar por 5 minutos, este proceso se hace para eliminar el colorante libre que se encuentra en la solución. Luego se centrifugó y el pellet fue resuspendido en medio de cultivo para los ensayos posteriores.

El PBMC fue tratado con mitomicina C para inhibir la síntesis de ADN, suprimiendo su proliferación pero manteniendo a las células viables y con capacidad de estimular la proliferación de PBL. Para ello 1x10⁶ de PBMC fueron tratadas previamente con 50 µg/mL de mitomicina C a 37 °C por 2 h y luego fueron lavadas tres veces con PBS con 5% de SFB. Para inducir la alo-proliferación, los PBL marcados con CFSE (CellTrace) como respondedor fueron coincubados con PBMC como estimulador alogénico tratados con mitomicina C en placa de cultivo con fondo U de 96 pocillos por 5 días (Bocharov *et al.*, 2013). Se incubaron distintas razones de estimulador y respondedor (1:1; 1:2 y 1:4) con el objetivo de estandarizar el método para bovino y trabajar con la proporción que estimula en mayor nivel la proliferación de PBL. Como control de la proliferación se utilizó PBMC más PBL sin medio condicionado. Posteriormente se recuperaron las células para análisis de proliferación mediante citometría de flujo. Los datos fueron

analizados utilizando un equipo de citómetro Gallios (Beckman Coulter, Brea, California, USA) y el programa Cell Quest.

5.7. Análisis de datos

Los datos obtenidos de los experimentos fueron analizados utilizando el “software” Info Stat (Córdoba, Argentina, 2008). Los efectos de las líneas celulares, días de cultivo y tratamientos fueron evaluados por ANOVA de una vía. Los datos obtenidos se presentaron como promedio y error estándar. Como variables dependientes se consideraron proliferación celular, niveles de mRNA, concentración de quinurenina, proliferación de linfocitos T y expresión de proteína (MHC-II). Las diferencias entre promedios para las variables independientes (línea celular, días de cultivo, tratamientos), fueron determinadas por medio del post test LSD Fisher con un valor de significancia ($P < 0.05$).

Modelo Estadístico

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + e_{ij}$$

Dónde:

Y_{ijk} = es la variable dependiente

μ = media poblacional

α_i = efecto fijo del i ésimo Línea celular $i = (1 \dots q)$

β_j = efecto del j ésimo de días $j = (1 \dots r)$

$\alpha\beta_{ij}$ = efecto de interacción i ésimo de días $j = (1 \dots r)$

e_{ijk} = efecto residual aleatorio independiente.

VI. Resultados

6.1. Aislamiento de MSC derivadas de MO y TA fetal bovino.

Las MSC-MO fueron aisladas desde la zona medular de hueso femoral fetal y las MSC-TA desde el omento fetal bovino. Estas células fueron aisladas en base a su capacidad de adherencia al plástico y a su morfología fibroblastoide. Las células no adherentes al plástico, principalmente células hematopoyéticas y adipocitos, fueron removidas mediante sucesivos cambios de medio. Los cultivos de MSC crecieron en monocapa hasta alcanzar 80 a 90% de confluencia celular. Posteriormente las MSC fueron expandidas mediante sucesivos pasajes. Las MSC-MO se caracterizaron por poseer una morfología fibroblastoide heterogénea, mientras que las MSC-TA presentaron una morfología fibroblastoide con subpoblaciones circulares con núcleos grandes de forma triangular u ovalada (Figura 1).

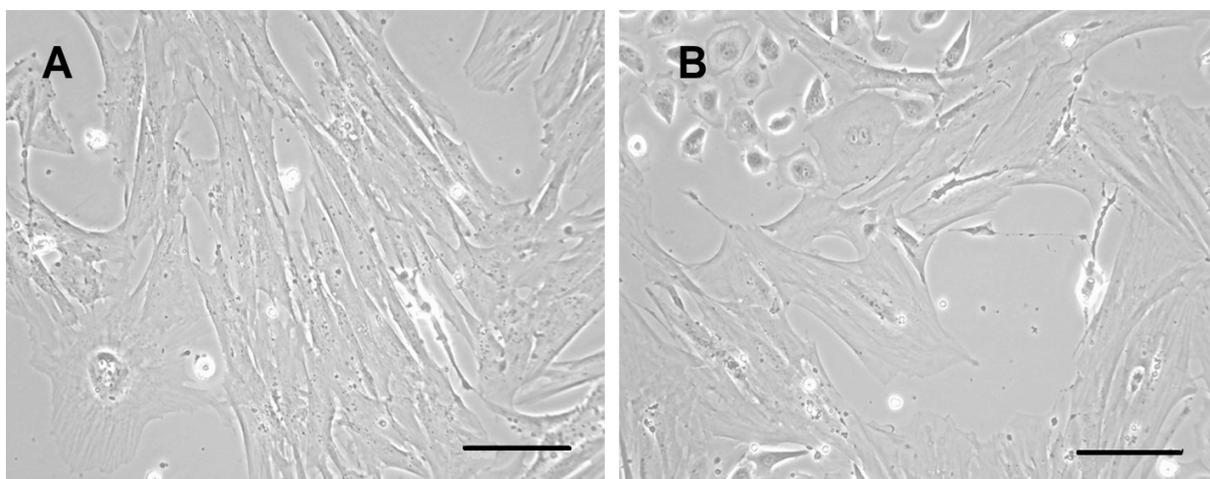


Figura 1. Microfotografías de contraste de fase de cultivos en monocapa de MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas. A) Las MSC-MO muestran una morfología fibroblastoide y poligonal con un núcleo alargado. B) Las MSC-TA poseen una morfología fibroblastoide con subpoblaciones circulares. Barra de escala = 100 μ m.

Los cultivos de ambas líneas celulares fueron caracterizados mediante Q-PCR con el objetivo de establecer la expresión de marcadores mesenquimales y hematopoyéticos en la población celular adherente al plástico. Las MSC-MO expresaron mayores ($P < 0,05$) niveles de mRNA de marcadores mesenquimales CD105, CD90 y CD73 (160,84; 176,26 y 128,17 veces, respectivamente) en comparación a los niveles de mRNA de marcadores hematopoyéticos CD45 y CD34 (1,66 y 1 vez) (Figura 2 y anexo 1). En forma similar, las MSC-TA expresaron mayores ($P < 0,05$) niveles de mRNA de marcadores mesenquimales CD105, CD90 y CD73 (320,97; 176,01 y 95,62 veces, respectivamente) en comparación a los niveles de marcadores hematopoyéticos CD45 y CD34 (0,14 y 1 vez).

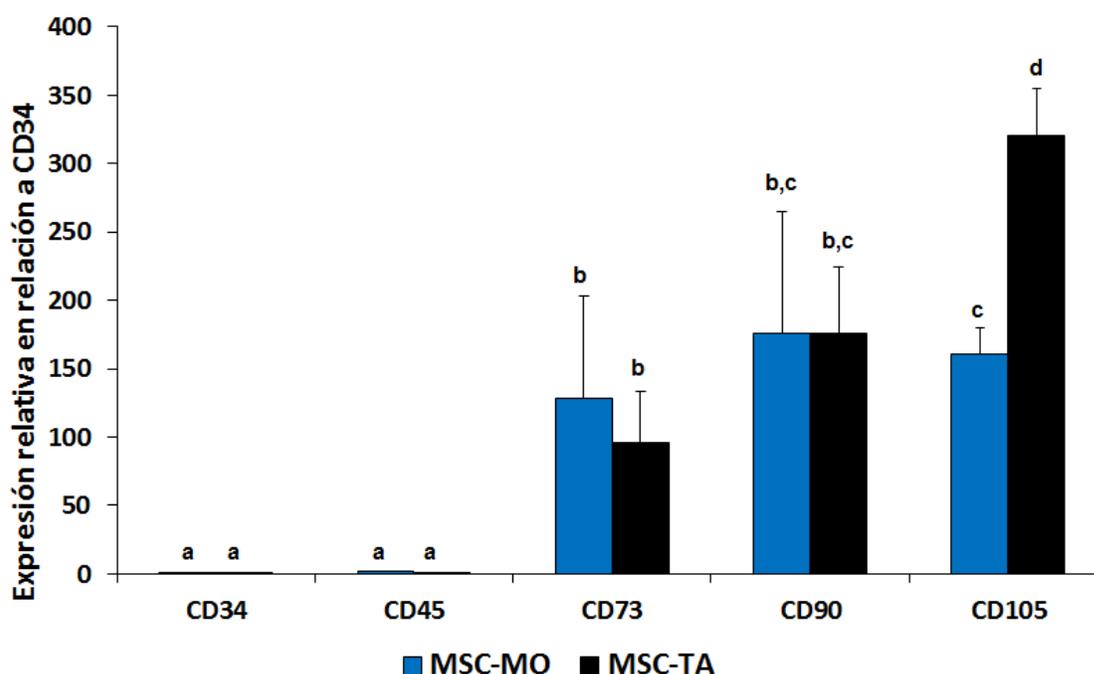
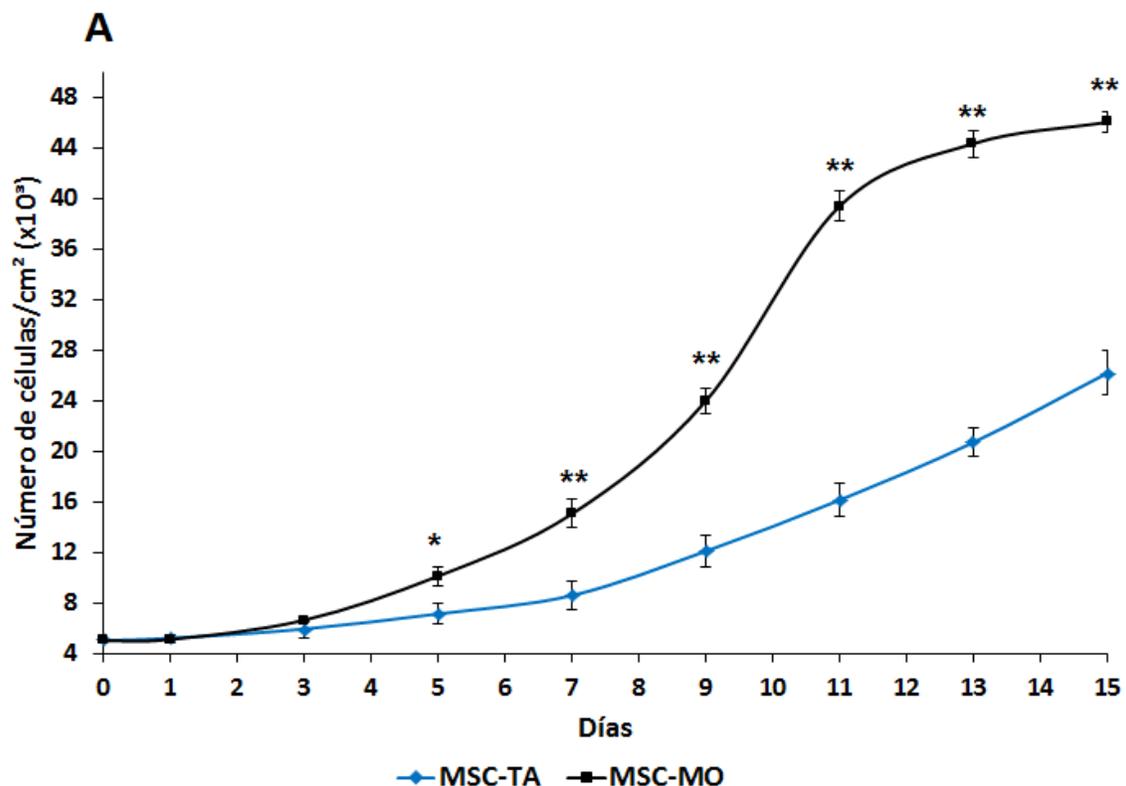


Figura 2. Niveles de mRNA de marcadores mesenquimales CD73, CD90 y CD105 y hematopoyéticos CD34 y CD45 en MSC-MO y MSC-TA. Ambas líneas celulares expresan mayores ($P < 0,05$) niveles de mRNA de marcadores mesenquimales en relación a marcadores hematopoyéticos. (a,b,c,d) superíndices distintos indican diferencia significativa ($P < 0,05$), entre marcadores de superficie mesenquimales y hematopoyéticos para cada línea celular.

6.2. Determinación de la curva de crecimiento de MSC-MO y MSC-TA fetal bovino

Las MSC-MO y MSC-TA de 2^{do} y 3^{er} pasaje fueron sembradas en dos concentraciones de 5.000 y 8.500 células/cm² con el objetivo de establecer las curvas de crecimiento para cada línea celular. Las MSC fueron sembradas en botellas de cultivo de 25 cm², en medio DMEM alto en glucosa suplementado con 10% de SFB. El periodo de cultivo se extendió por 15 días (5000 células/cm²) y por 10 días (8500 células/cm²), durante los cuales se realizaron conteos celulares a partir del día 1 y 2 y posteriormente cada 2 días. La curva de proliferación fue similar ($P > 0,05$) para ambas líneas celulares hasta el día 3 y 4 de cultivo (Figura 3). Sin embargo, desde el día 5 y 6 del cultivo, el número de MSC-MO fue mayor ($P < 0,05$) comparado con MSC-TA (40.920 vs. 27.580 y 10.100 vs. 7.125 células/cm², respectivamente). En forma similar, el número de células en los cultivos hasta el día 10 y 15 fueron mayor para MSC-MO comparado con MSC-TA (46.025 vs. 26.175 y 49.980 vs. 28.540 células/cm², respectivamente).



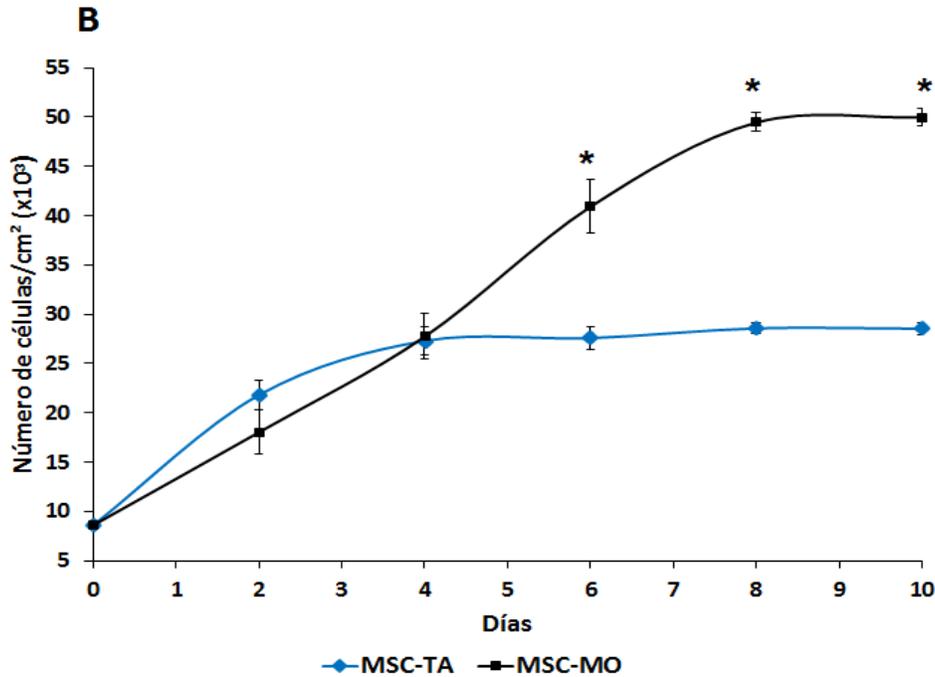


Figura 3. Curva de crecimiento de MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas con concentraciones de siembra de 5000 y 8500 células/cm². A) Con una siembra de 5000 células/cm², la proliferación de MSC-MO fue mayor ($P < 0,05$) desde el día 5 hasta el día 15 del cultivo en comparación a MSC-TA. B) Utilizando una siembra de 8500 células/cm² se observó una mayor ($P < 0,05$) proliferación de las MSC-MO desde el día 6 del cultivo en comparación a MSC-TA fetal bovino. Superíndices (*,**) indican diferencias significativas ($P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente) entre líneas celulares.

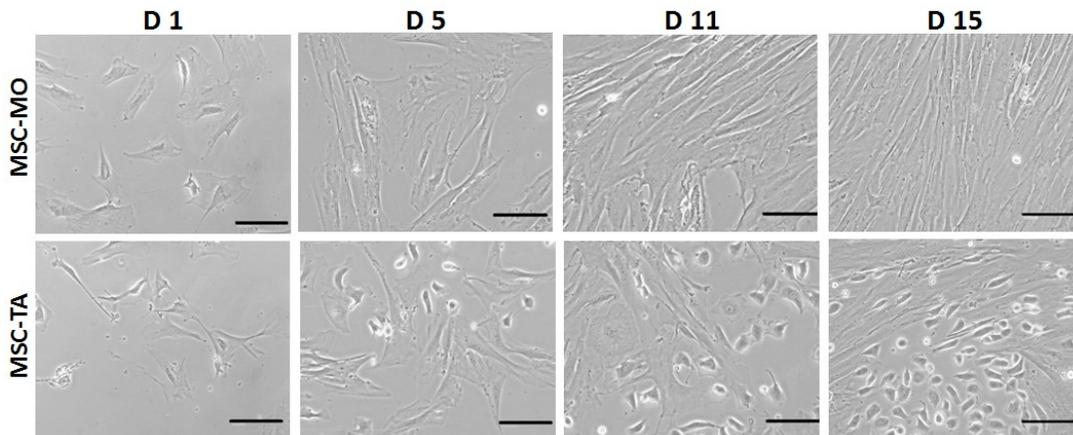


Figura 4. Microfotografías de contraste de fase de cultivos en monocapa de MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas en concentración de 5000 células/cm². Las MSC-MO muestran mayor confluencia celular a medida que avanza los días de cultivo (D1, D5, D11 y D15) en comparación a MSC-TA. Barra de escala = 100 μ m.

6.3. Determinación de tiempo de doblaje poblacional de MSC-MO y MSC-TA.

El PDT fue calculado en fase de crecimiento logarítmica, en ambas líneas de MSC sembradas a una concentración de 5000 células/cm². Las MSC-MO doblan su población en menor ($P < 0,01$) tiempo ($2,9 \pm 0,13$ días) en relación a MSC-TA ($4,4 \pm 0,4$ días) fetal bovino (Tabla 2).

Tabla 2. Tiempo de doblaje poblacional (PDT) en MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas sembradas a una concentración de 5000 células/cm². (d)=día, Superíndice (**) indica diferencia significativa ($P < 0,01$), entre línea celular.

MSC	PDT (d)**
Tejido adiposo	$4,4 \pm 0,4$
Médula ósea	$2,9 \pm 0,13$

6.4. Determinación del potencial de inmunomodulación de MSC-MO y MSC-TA fetal bovina

6.4.1. Expresión génica y actividad enzimática deIDO en MSC preactivadas con IFN γ

Con el fin de evaluar la expresión de factores inmunomoduladores, se utilizaron MSC-MO y MSC-TA de 2^{do} a 3^{er} pasaje para cada repetición. Las células fueron sembradas a una concentración de 1×10^4 células/cm² en medio DMEM alto en glucosa suplementado con 10, 20 y 40 ng/mL de IFN γ por 72h. Al analizar la expresión relativa de mRNA de IDO en MSC-MO y MSC-TA no suplementadas con IFN γ , no se encontraron niveles detectables utilizando Q-PCR (Figura 5 y anexo 2). Sin embargo, cuando las MSC de ambas líneas fueron tratadas con IFN γ se activó la expresión de mRNA de IDO. Para MSC-MO y MSC-TA tratadas con 40 ng/mL de IFN γ se detectó un aumento ($P < 0,05$) de expresión de mRNA comparado con MSC tratadas con 10 ng/mL de IFN γ (2,05 y 3,04 vs. 1 vez,

respectivamente). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre ambas líneas celulares. En los medios condicionados obtenidos de los mismos cultivos celulares se determinó la concentración de quinurenina a través de una reacción colorimétrica con reactivo de Ehrlich. La concentración de quinurenina en medio condicionado de MSC tratadas con 10 ng/mL de IFN γ (5,1 y 6,2 ng/mL para MSC-MO y MSC-TA, respectivamente) fue mayor ($P < 0,05$) en comparación a MSC no tratadas con IFN γ (1,5 y 1,4 ng/mL para MSC-MO y MSC-TA, respectivamente). Además, se detectaron mayores ($P < 0,05$) concentraciones de quinurenina en medio condicionado de las MSC tratadas con 40 ng/mL de IFN γ (8,2 y 8,9 ng/mL para MSC-MO y MSC-TA, respectivamente) en comparación a 10 ng/mL de IFN γ y MSC no tratadas con IFN γ . Así mismo, no se detectaron diferencias de concentración de quinurenina entre ambas líneas celulares.

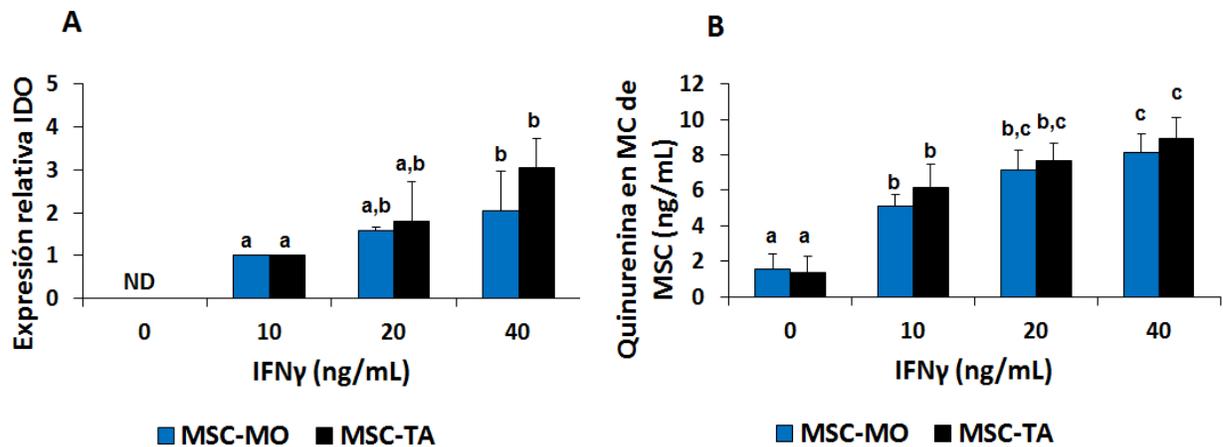
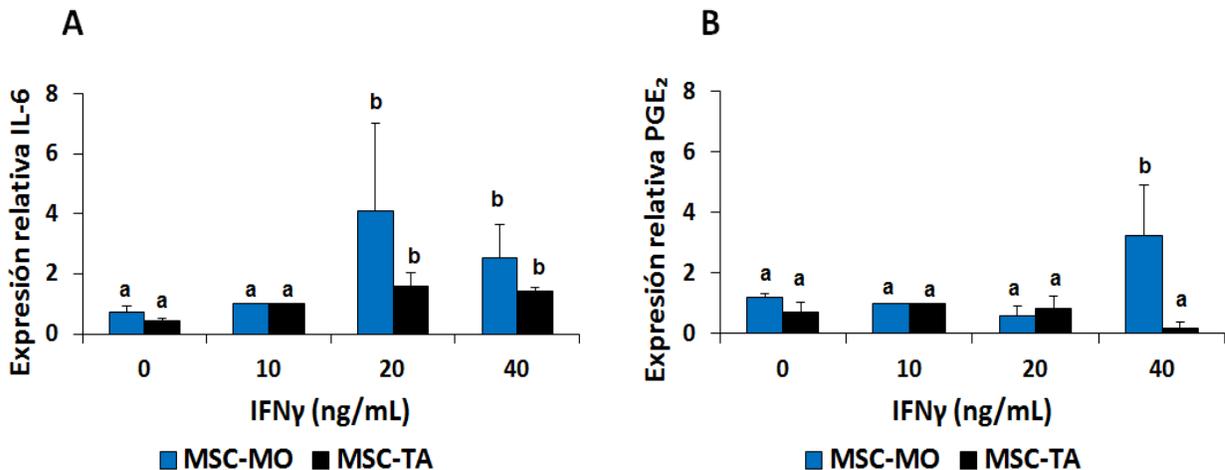


Figura 5. Niveles de mRNA de IDO y producción de quinurenina en medio condicionado de MSC-MO y MSC-TA preactivadas con IFN γ . A) Las MSC-MO y MSC-TA no tratadas con IFN γ no expresan niveles detectables mRNA de IDO. Sin embargo, MSC tratadas con 40 ng/mL de IFN γ expresan mayores ($P < 0,05$) niveles de mRNA comparado con MSC tratadas con 10 ng/mL de IFN γ . B) La concentración de quinurenina en medios condicionados de MSC tratadas con 10 ng/mL de IFN γ fueron mayores ($P < 0,05$) en comparación a MSC no tratadas con IFN γ . Además, se detectaron mayores ($P < 0,05$) concentraciones de quinurenina en MSC tratadas con 40 ng/mL de IFN γ en comparación a 10 ng/mL de IFN γ para ambas líneas celulares. Abreviación: IFN γ , Interferón γ ; ND, significa no detectado; Superíndices distintos (a,b,c) indican diferencia significativa ($P < 0,05$) entre tratamientos.

6.4.2. Niveles de mRNA de factores inmunomoduladores en MSC-MO y MSC-TA fetal bovino preactivadas con IFN γ

El potencial de inmunomodulación de las MSC-MO y MSC-TA fue determinado mediante la cuantificación de la expresión relativa de los genes inmunomoduladores IL-6, TGF β 1, PGE $_2$ y IL-10. Las muestras para Q-PCR fueron obtenidas desde MSC tratadas por 72 horas de cultivo con diferentes concentraciones de IFN γ y como control se utilizaron MSC tratadas con 10 ng/mL de IFN γ (Figura 6 y anexos 3,4,5 y 6). Las MSC-MO y MSC-TA tratadas con 20 y 40 ng/mL de IFN γ expresaron (4,1; 1,6 y 2,5; 1,4 veces, respectivamente) mayores ($P>0,05$) niveles de mRNA de IL-6 en relación al control MSC tratadas con 10 ng/mL de IFN γ . Por otra parte, las MSC-MO tratadas con 40 ng/mL de IFN γ expresaron 3,24 veces mayores ($P>0,05$) niveles de mRNA de PGE $_2$ en comparación a las MSC-MO tratadas con concentraciones más bajas de IFN γ y MSC no tratadas con IFN γ . Los niveles de mRNA de TGF β 1 y IL-10 no fueron distintos ($P>0,05$) al ser comparados entre MSC tratadas con distintas concentraciones de IFN γ .



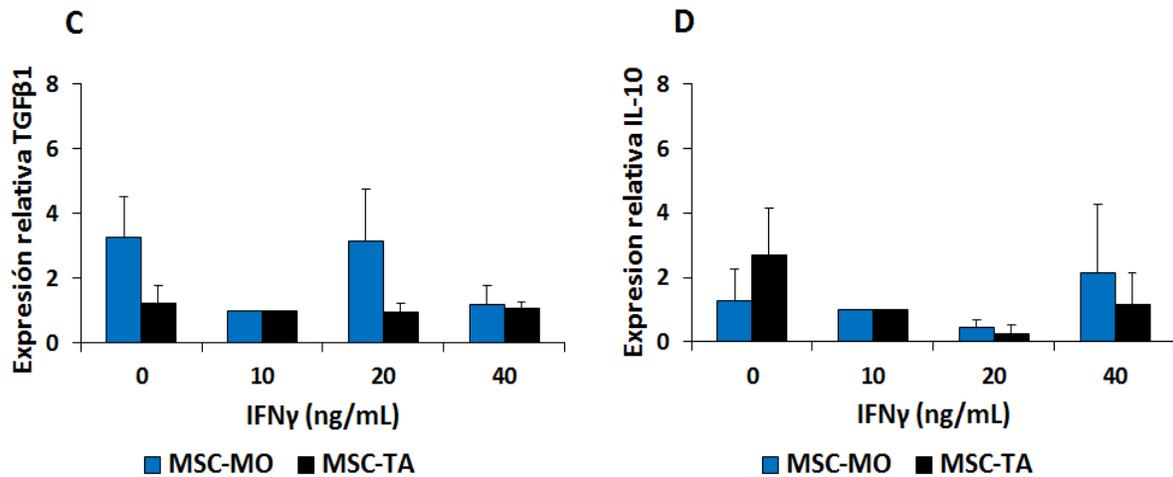


Figura 6. Expresión relativa de mRNA de genes inmunomoduladores IL-6, TGFβ1, PGE2 e IL-10 en MSC-MO y MSC-TA tratadas con IFNγ. A) Las MSC-MO y MSC-TA tratadas con 20 y 40 ng/mL de IFNγ expresaron mayores ($P < 0,05$) niveles de mRNA frente a los controles y MSC no tratadas con IFNγ. B) Los niveles de mRNA de PGE₂ en MSC-MO preactivadas con IFNγ (40 ng/mL) fue mayor ($P < 0,05$) en comparación a los controles y a MSC-TA. Los niveles de mRNA de TGFβ1 (C) y de IL-10 (D) fueron similares para los tratamientos y entre líneas celulares. Superíndices distintos (a,b) indican diferencia significativa ($P < 0,05$), entre tratamientos y/o líneas celulares. Abreviación: IFNγ, Interferón γ.

6.5. Cuantificación de los niveles de mRNA de genes de inmunogenicidad de MSC-MO y MSC-TA fetal bovino.

El potencial de inmunogenicidad de las MSC-MO y MSC-TA fue determinado inicialmente a través de la cuantificación de los niveles de mRNA de MHC de clase I y II y de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 utilizando Q-PCR (Figura y anexo 7). Como control biológico se utilizaron cultivos de fibroblastos obtenidos desde los mismos fetos. Los niveles de mRNA de MHC-I, CD80 y CD86 en las tres líneas celulares no fueron distintos ($P > 0,05$) entre líneas celulares. Sin embargo, los niveles de mRNA de MHC-II en MSC-MO fueron 3.51 veces mayores ($P < 0,05$) en comparación al control de fibroblastos.

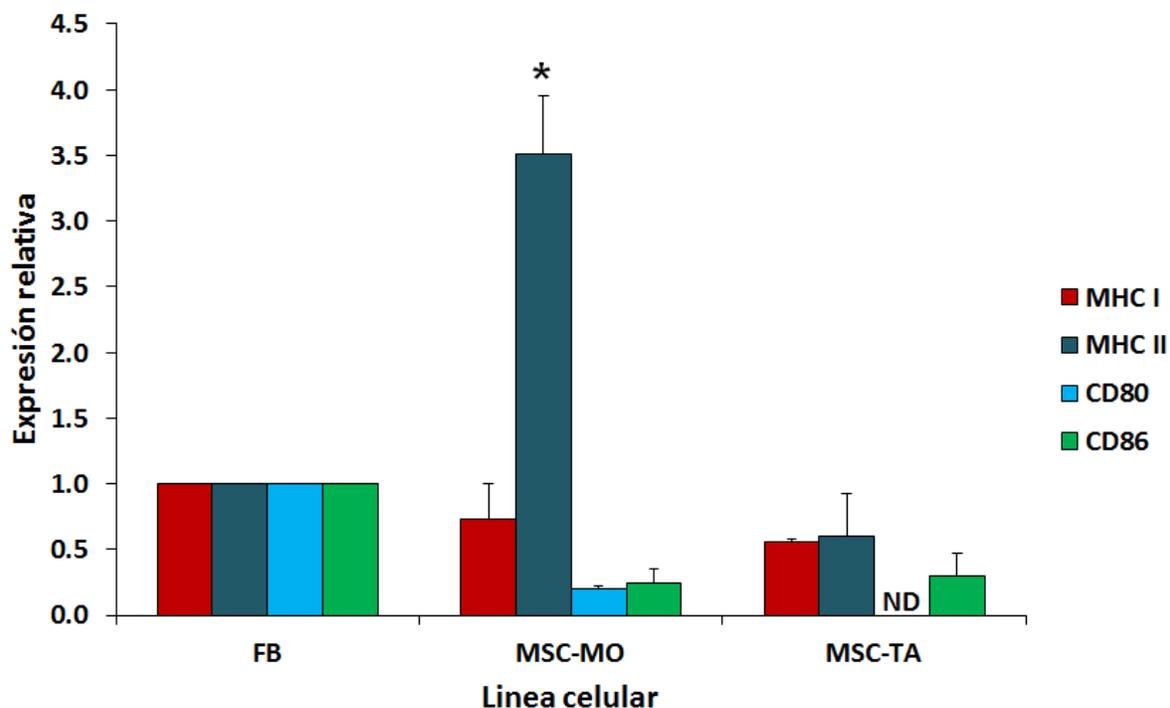
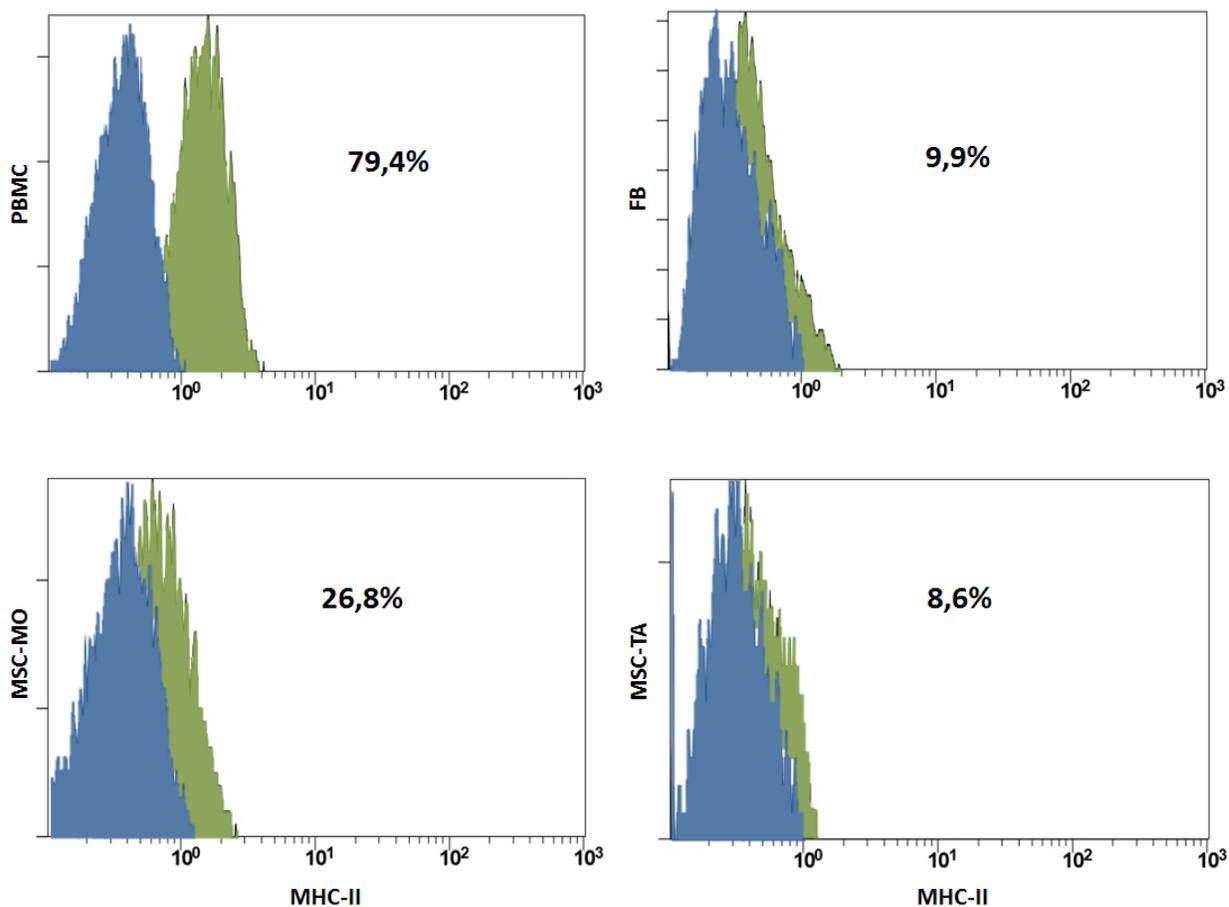


Figura 7. Niveles de mRNA de los genes de inmunogenicidad MHC-I y II, moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas. Los niveles de expresión de mRNA de MHC-I, CD80 y CD86 no fueron distintos ($P > 0,05$) en las tres líneas celulares. Sin embargo la expresión relativa de MHC-II en MSC-MO fue 3,51 veces superior ($P < 0,05$) en comparación a fibroblastos y MSC-TA (1 y 0,6 veces, respectivamente). Superíndice (*) indica diferencia significativa ($P < 0,05$), entre líneas celulares.

Además, la expresión de la proteína MHC-II fue determinada en MSC-MO y MSC-TA mediante citometría de flujo. Como control biológico se utilizaron PBMC (vacas adultas) y células de fibroblasto obtenidas desde los mismos fetos (Figura 8). Una mayor ($P < 0,001$) proporción (79,4%) de las PBMC expresaron MHC-II en relación a MSC-MO (26,8%), MSC-TA (8,6%) y FB (9,9%). Así mismo, una mayor ($P < 0,001$) proporción de la población de MSC-MO fue positiva a MHC-II en comparación a MSC-TA.



LINEA CELULAR	PBMC	MSC-MO	MSC-TA	FB
MHC-II (%)	79,4 ± 0,9 ^a	26,8 ± 1,3 ^b	8,6 ± 0,6 ^c	9,9 ± 6,5 ^c

Figura 8. Análisis de expresión de MHC-II en MSC-MO, MSC-TA, FB y PBMC bovinas mediante citometría de flujo. Una mayor ($P < 0,001$) proporción (79,4%) de las PBMC expresaron MHC-II (área verde) en relación a MSC-MO (26,8%), MSC-TA (8,6%) y FB (9,9%). Así mismo, una mayor ($P < 0,001$) proporción de la población de MSC-MO fue positiva a MHC-II en comparación a MSC-TA. Área azul, autofluorescencia; Superíndices distintos (a,b,c) indican diferencias significativas ($P < 0,05$), entre líneas celulares.

6.6. Determinación del efecto de medio condicionado de MSC preactivadas con IFN γ sobre la proliferación de PBL bovino

Para determinar la reacción mixta leucocitaria o cultivo mixto de PBL bovino activados con aloantígenos, se cultivaron distintas proporciones de PBMC (estimulador) y PBL (respondedor) (1:1, 1:2 y 1:4), con el objetivo de estandarizar el método para modelo bovino y trabajar con la proporción que estimula en mayor nivel la proliferación de PBL. Para este fin se utilizó 40% de medio condicionado de MSC-MO y MSC-TA preactivadas con 20 ng/mL de IFN γ durante 5 días. Como control positivo se utilizó un cocultivo de PBMC y PBL en RPMI sin medio condicionado de MSC (Figura 9). Al utilizar una proporción de PBMC y PBL de 1:1, en presencia de medio condicionado de ambas líneas celulares se suprimió ($P < 0,001$) la proliferación de PBL bovino (68,9 y 43,8% para MSC-MO y MSC-TA, respectivamente) en relación al control (100%). Además, el medio condicionado de MSC-TA disminuyó ($P < 0,001$) la proliferación de PBL en comparación a MSC-MO. De forma similar el medio condicionado obtenido de MSC-MO y MSC-TA preactivadas con 20 ng/mL de IFN γ indujo menor ($P < 0,001$) proliferación de PBL bovino (57,7 y 30,1% respectivamente) en relación al control. Sin embargo, cuando la proporción fue 1:2 la proliferación de PBL bovino en presencia medio condicionado sin o con IFN γ para ambas líneas celulares (22,2; 15,5 y 19,7; 10,1%, para MSC-MO y MSC-TA, respectivamente) fueron menores ($P < 0,05$) en comparación al grupo control (100%). De la misma manera para la proporción 1:4 fue menor ($P < 0,05$) la proliferación de PBL en medio condicionado de ambas líneas celulares preactivadas sin o con IFN γ , sin mostrar diferencias entre líneas celulares (-19,6; -19,8 y -14,6; -20,4%, para MSC-MO y MSC-TA).

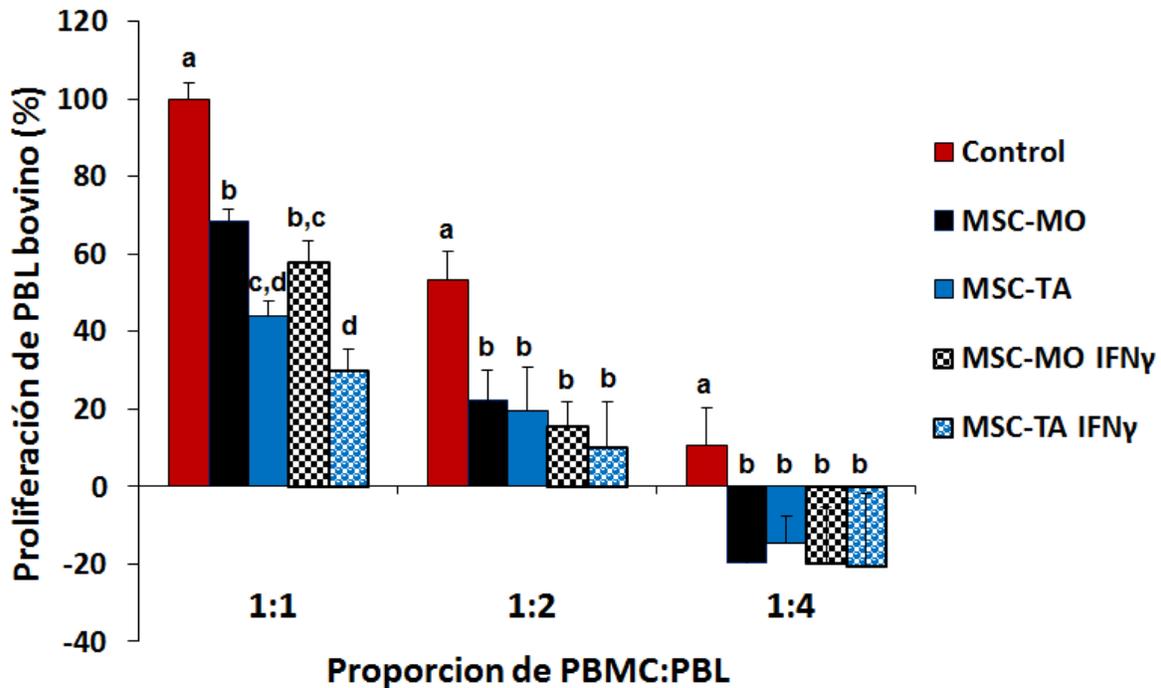
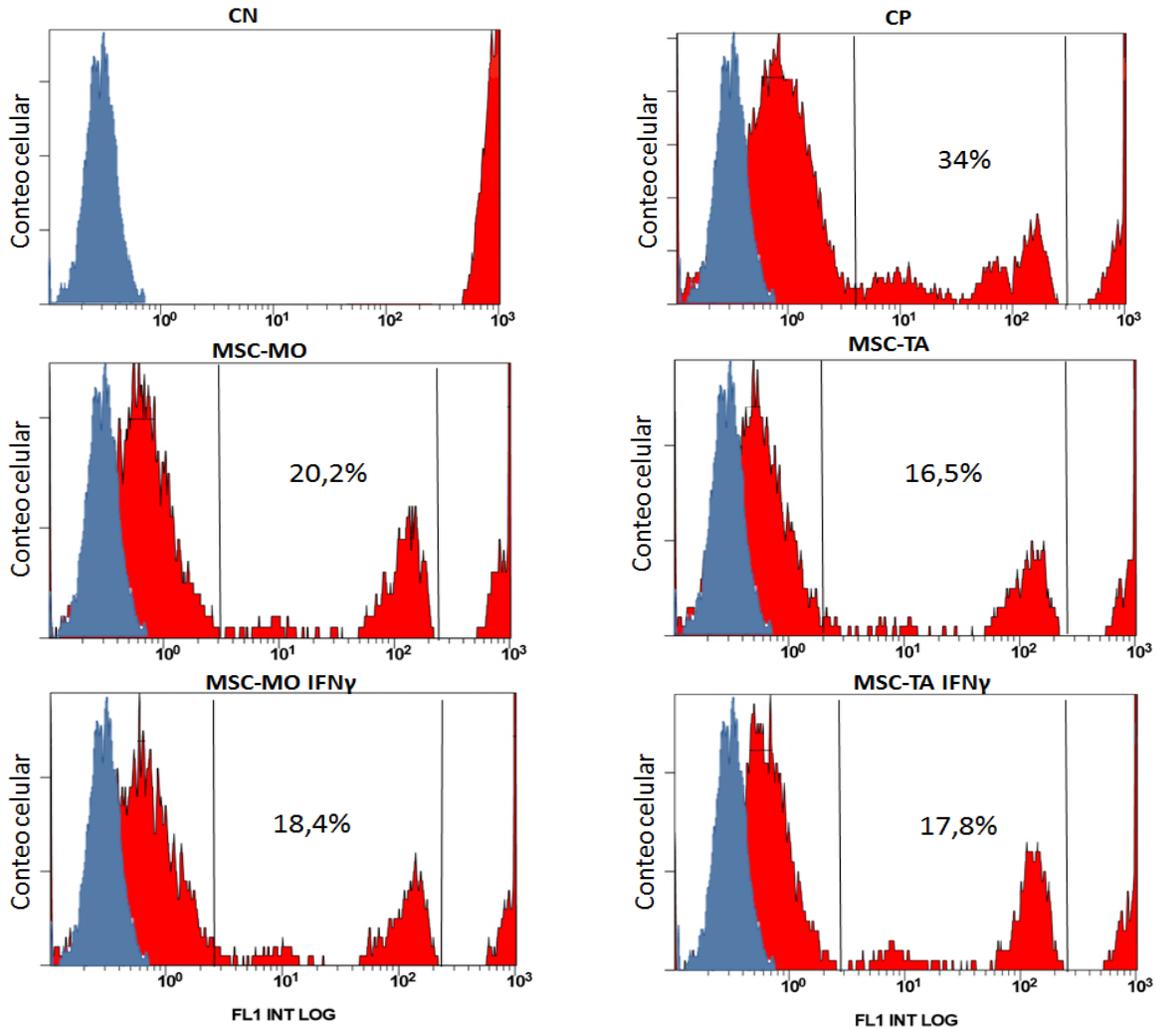


Figura 9. Efecto de medio condicionado de MSC-MO y MSC-TA preactivadas con IFN γ sobre la proliferación de PBL bovinas activadas con aloantígenos. Cuando PBMC y PBL fueron cultivadas a distintas proporciones como 1:1, 1:2 y 1:4, el medio condicionado de ambas líneas celulares suprimen la proliferación de PBL ($P < 0,05$) en relación al grupo control. Además, la proporción 1:1 resultó en una mayor ($P < 0,05$) supresión de PBL bovino por parte del medio condicionado MSC-TA preactivadas con o sin IFN γ en comparación a medio condicionado de MSC-MO. Superíndices distintos (a,b,c,d) indican diferencia significativa ($P < 0,05$), entre tratamientos y/o líneas celulares (dentro de cada proporción). Los números (1:1, 1:2 y 1:4) indican proporción de PBMC y PBL.

Posteriormente el PBL bovino fue marcado con CFSE (población celular de tercera década) y activado con aloantígenos en una proporción de 1:1, la población celular en azul corresponde a autofluorescencia (Figura 10). La población celular de control positivo (PBMC:PBL marcado con CFSE) sin medio condicionado obtuvo un mayor ($P < 0,01$) nivel de proliferación de PBL bovino (población celular de primera y segunda década), comparado a PBL bovino cultivados en medio condicionado de MSC-MO y MSC-TA tratadas sin o con IFN γ (34 vs 20,2, 15,4, 21,1 y 19,7%, respectivamente), sin mostrar diferencias entre líneas celulares.



Tratamiento	Control positivo	MSC-MO	MSC-TA	MSC-MO IFN γ	MSC-TA IFN γ
Proliferación de PBL (%)	34 \pm 1,9 ^a	20,2 \pm 2,4 ^b	15,4 \pm 1,9 ^b	21,1 \pm 2 ^b	19,7 \pm 1,8 ^b

Figura 10. Efecto de medio condicionado de MSC-MO y MSC-TA preactivadas con IFN γ sobre la proliferación de PBL marcados con CFSE y activadas con aloantígenos. La proliferación de PBL bovino (entre la primera y segunda década) en medio condicionado de ambas líneas celulares estimuladas con o sin IFN γ fue menor ($P < 0,01$) en comparación a control positivo. Superíndices distintos (a,b) indican diferencia significativa ($P < 0,01$), entre control positivo y el resto de tratamientos. CN y CP: control negativo y positivo, MSC-MO y MSC-TA; medio condicionado de MSC de médula ósea y tejido adiposo, MSC-MO IFN γ y MSC-TA IFN γ ; medio condicionado de MSC de tejido adiposo y médula ósea activadas con IFN γ .

VII. Discusión

Las propiedades de proliferación, inmunomodulación e inmunoevasión de las MSC podrían ser de utilidad para el desarrollo terapéutico y su aplicación clínica en diferentes modelos animales y humanos. Sin embargo, en el bovino existe escasa información sobre este tipo de propiedades en MSC. En el presente estudio se determinó el potencial de proliferación, inmunomodulación e inmunogenicidad de MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas bajo condiciones *in vitro*.

Las MSC de ambas líneas celulares fueron aisladas en base a su capacidad de adherencia al plástico, propiedad que no poseen la gran mayoría de las células hematopoyéticas y que permite generar un cultivo primario de MSC relativamente homogéneo (Cortes *et al.*, 2013). La pureza de los cultivos fue inicialmente evaluada mediante cuantificación de los niveles de mRNA de marcadores mesenquimales CD105, CD90 y CD73 y hematopoyéticos CD45 y CD34. Las MSC-TA expresaron mayores niveles de mRNA de CD105 en relación a MSC-MO, ello indica que las MSC-TA poseen mayor capacidad de diferenciación hacia linajes celulares. Por otro lado ambas líneas celulares expresaron elevados niveles de mRNA de marcadores de superficie mesenquimales en comparación a marcadores hematopoyéticos, lo que indica un alto grado de pureza y homogeneidad en las poblaciones de MSC utilizadas en los experimentos.

La proliferación de ambas líneas fue comparada mediante cuantificación del número de células durante el cultivo en dos curvas de crecimiento utilizando 5000 y 8500 células/cm². Los resultados indican que las MSC-MO poseen mayor potencial de proliferación, debido a que doblan su población celular en menor tiempo en comparación a MSC-TA fetal bovino. En forma similar, previamente se ha reportado una mayor capacidad de proliferación de MSC-MO en comparación con MSC-TA derivadas de tejidos ovinos (Heidari *et al.*, 2013). Sin embargo, estudios en humanos y murinos muestran que las MSC-TA poseen un mayor potencial de proliferación comparado con las MSC-MO (Peng *et al.*, 2008; Christoloudou *et al.*, 2013). A pesar de esto, el rango de valores del PDT para las

MSC-MO (1,5 – 6,5 días) y para las MSC-TA (1,8 – 4,5 días) en especies humana, equina y murina (Christoloudou *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2008) es similar al obtenido en nuestro estudio (2,9 y 4,4 días para MSC-MO y MSC-TA). El potencial de autorenovación y proliferación elevado de MSC, estaría relacionado con la actividad de la proteína factor promotor de la replicación (FPR), que induce síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y adicionalmente al tamaño de sus telómeros (Li *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2008). Las diferencias en cuanto a los potenciales de proliferación en MSC derivadas de distintos tejidos puede estar asociada a variaciones entre especies.

Las MSC ejercen efectos inmunomoduladores en una gran variedad de células del sistema inmune innato y adaptativo, a través de una diversidad de mecanismos que incluyen, la secreción de factores paracrinos como IDO, IL-6, TGF β 1, PGE₂ e IL-10 (Kyurkchiev *et al.*, 2014; Elman *et al.*, 2014; Hsiao *et al.*, 2012). En el presente estudio se determinó que las MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas requieren de estimulación previa con IFN γ para inducir la activación de la expresión de mRNA de IDO. Más aún, se detectaron diferencias entre la menor (10 ng/mL) y mayor (40 ng/mL) concentración de activación de IFN γ , a pesar de que los niveles de expresión de IDO no fueron distintos entre líneas celulares. Estos datos fueron corroborados mediante cuantificación de la producción de quinurenina en el medio de cultivo de MSC pre-expuestas a IFN γ . Previamente se ha reportado que el mecanismo de acción de IFN γ en MSC se inicia con su unión a un receptor de membrana y la posterior activación de síntesis de IDO que resulta en la metabolización del triptófano en quinurenina (François *et al.*, 2012). Por lo tanto, la actividad enzimática de IDO está relacionada directamente con la concentración de quinurenina (Kyurkchiev *et al.*, 2014). A través de este mecanismo se suprime la proliferación de linfocitos T y se favorece la conversión de monocitos a macrófagos M2 con capacidad de producción del factor inmunomodulador IL-10 (Krampera, 2011). En el humano y murino se ha reportado que las MSC-MO requieren pre-exposición a IFN γ para la producción de IDO y también de otros factores mediadores de la inflamación como TGF β 1, IL-6 y PGE₂

(Liang *et al.*, 2013, Schurch *et al.*, 2014). Los niveles de mRNA de IL-6 también aumentaron en ambas líneas celulares con concentraciones más altas de IFN γ , así mismo para PGE $_2$ en MSC-MO, ello indicando el potencial rol de estos mediadores como factores inmunomoduladores. A pesar de que la expresión de TGF β 1 y IL-10 también fue detectada tanto en MSC-MO como MSC-TA, sus niveles de mRNA no fueron afectados por la estimulación de IFN γ . Estas citoquinas al igual que IDO y IL-6 promueven la conversión de las células T CD4 $^+$ a células Treg que poseen la capacidad de suprimir la respuesta aloantígeno (Zheng *et al.*, 2007; Kyurkchiev *et al.*, 2013; English *et al.*, 2009). Previamente se ha reportado que las MSC en presencia de IFN γ aumenta su secreción de PGE $_2$ para suprimir los mediadores inflamatorios (Aggarwal y Pittenger 2005; Hsu *et al.*, 2013). Estos resultados indican que ambas líneas celulares expresan factores mediadores inmunes que podrían ejercer un rol inmunomodulador para el tratamiento terapéutico en el bovino.

Las MSC poseen propiedades inmunomoduladores tanto *in vitro* como *in vivo* que están mediadas por mecanismos complejos y que les permiten regular la función de células del sistema inmune innato y adaptativo (Shi *et al.*, 2011; Kyurkchiev *et al.*, 2013). La mayoría de los trabajos de investigación han demostrado el potencial inmunomodulatorio de MSC, a través de una función supresora en la proliferación de linfocitos T tanto *in vitro* como *in vivo* (Bartholomew *et al.*, 2002; Klyushnenkova *et al.*, 2005; Groh *et al.*, 2005). En nuestro estudio, la proliferación de PBL bovino es menor en presencia de medio condicionado de ambas líneas celulares tanto pre-activadas o no con IFN γ . Este mecanismo inmunomodulador podría ser mediado a través de la secreción al medio cultivo de factores paracrinós IDO, IL-6, TGF β 1, IL-10 y PGE $_2$, y que inhiben la proliferación de células T CD4 $^+$ (Th1 y Th17) y CD8 $^+$, mientras que inducen la generación de célula T CD4 $^+$ (Th2) y Treg (Ren *et al.*, 2009; Ghannam *et al.*, 2010). En un estudio previo se ha reportado que el cultivo de células T CD4 $^+$ en medio condicionado de MSC-TA, aumenta la fracción de linfocitos Treg que tiene como función ejercer tolerancia inmunológica (Ivanova-Todorova *et al.*, 2012). En humano y murino se ha reportado que las

MSC-MO suprimen la proliferación, diferenciación y activación de células T CD4⁺ inducidas para diferenciarse hacia células Th1 y Th17 (Luz-Crawford *et al.*, 2013; Ghannam *et al.*, 2010). Por otra parte en nuestro estudio se determinó que la proliferación de PBL bovino fue superior en medio condicionado de MSC-MO en comparación a MSC-TA. En forma similar se ha reportado que las MSC-TA humanas son más potentes inmunosupresoras sobre células del sistema inmune en comparación a las MSC-MO (Ivanova-Todorova *et al.*, 2009). Así mismo en un estudio *in vitro* se ha demostrado que las MSC-TA producen mayor secreción de proteínas como factor crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), factor derivado de células madre 1 (SDF-1) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) frente a MSC-MO (Li *et al.*, 2015). En consecuencia nuestros análisis indican que ambas líneas de MSC expresan factores paracrinos que ejercerían función inmunomoduladora disminuyendo la proliferación de linfocitos.

Actualmente las MSC son consideradas como células “inmunoevasivas” por su baja inmunogenicidad determinada por bajos niveles de expresión de MHC-I y II (Ankrum *et al.*, 2014). Adicionalmente, las MSC no expresan moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (Ryan *et al.*, 2005; Ankrum *et al.*, 2014). En nuestro estudio, ambas líneas celulares expresan bajos niveles de mRNA de MHC-I. Sin embargo, las MSC-MO expresan mayores niveles de mRNA de MHC-II en comparación a MSC-TA. Este resultado fue corroborado mediante citometría de flujo donde se determinó que una mayor población de MSC-MO expresa MHC-II en comparación con los controles y MSC-TA. Previamente se ha descrito el rol fundamental de estas moléculas que es la de unión de péptidos antigénicos y la presentación de estos péptidos a linfocitos T para activar su proliferación (Elgueta *et al.*, 2009). Además, estas moléculas pueden ser reconocidas como antígenos por los receptores de las células T durante el trasplante (Shi *et al.*, 2011). En humano, murino y canino se ha reportado la expresión de MHC-I en ambas líneas celulares, pero la molécula MHC-II solo para las MSC-MO humana y murina (Krampera *et al.* 2003; Klyushnenkova *et al.*, 2005; Yanez *et al.*, 2006; Villatoro *et*

al., 2015). Además en humano y murino se describe que las MSC-MO a pesar de expresar MHC-I y II suprimen la estimulación de células T en cultivos *in vitro* (Klyushnenkova *et al.*, 2005). En referencia a moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, en nuestro estudio ambas líneas celulares expresaron niveles muy bajos. Previamente se ha reportado en MSC-MO murino y humano su expresión de estas moléculas, a pesar de ello las MSC suprimieron la activación de linfocitos T (Krampera *et al.* 2003; Klyushnenkova *et al.*, 2005). Considerando estos resultados es posible concluir que el potencial de inmunogenicidad de las MSC es dependiente de la fuente de origen tisular, ya que las MSC-MO presentan una mayor expresión de MHC-II en comparación con MSC-TA lo que podría determinar un mayor rechazo inmune en una potencial aplicación en terapia alogénica.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio permiten indicar que las poblaciones de MSC adherentes al plástico poseen un alto grado de pureza y homogeneidad. Las MSC-MO poseen mayor potencial de proliferación, debido a que doblan su población en menor tiempo en comparación a las MSC-TA fetal bovino. Ambas líneas celulares expresan factores paracrinos que podrían estar mediando el rol inmunosupresor detectado en medio condicionado de MSC sobre la proliferación de PBL bovino *in vitro*. Adicionalmente, el potencial de inmunogenicidad de las MSC es dependiente de la fuente de origen tisular, ya que MSC-TA expresan menores niveles de MHC-II y por lo tanto tienen un menor riesgo de rechazo en una potencial aplicación terapéutica alogénica.

VIII. Bibliografía

ALCAYAGA-MIRANDA, F.; CUENCA, J.; MARTIN, A.; CONTRERAS, L.; FIGUEROA, F.; KHOURY, M. 2015. Combination therapy of menstrual derived mesenchymal stem cells and antibiotics ameliorates survival in sepsis. *Stem Cell Research & Therapy* 6:1-13.

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815-1822.

AKIYAMA, K.; CHEN, C.; WANG, D.; XU, X.; QU, C.; YAMAZA, T.; CAI, T.; CHEN, W.; SUN, L.; SHI, S. 2012. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* 10:544-555.

ANKRUM, J A.; ONG, JF.; KARP, JM. 2014. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology* 32:252-260.

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* 35:1482-1490.

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* 30:42-48.

BASSI, E. AITA, C.; CÂMARA, N. 2011. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World Journal of Stem Cells* 3:1-8.

BERNARDO, M.E.; FIBBE, W.E. 2013. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 13:392-402.

BOCHAROV, G.; LUZYANINA, T.; CUPOVIC, J.; LUDEWIG, B. 2013. Asymmetry of cell division in CFSE-based lymphocyte proliferation analysis. *Frontiers in immunology* 264:1-7

BOSNAKOVSKI, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; TAKAGI, S.; OKUMURA, M.; UJINAGA, T. 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Research* 319:243-253.

BRANDAU, S.; JAKOB, M.; BRUDEREK, K.; BOOTZ, F.; GIEBEL, B.; RADTKE, S.; MAUEL, K.; JÄGER, M.; FLOHÉ, S.; LANG, S. 2014. Mesenchymal stem cells augment the anti-bacterial activity of neutrophil granulocytes. *PLoS One* 9:e106903. doi:10.1371/journal.pone.0106903.

CAPLAN, A.; CORREA, D. 2011. The MSC: An injury drugstore. *Cell Stem Cell* 9:11-15.

CASSATELLA, M.; MOSNA, F.; MICHELETTI, A.; LISI, V.; TAMASSIA, N. 2011. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells* 29:1001-1011.

CORTES, Y.; OJEDA, M.; ARAYA, D.; DUEÑAS, F.; FERNÁNDEZ, M.S.; PERALTA, O.A. 2013. Isolation and multilineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived fetuses. *BMC Veterinary Research* 9:133-146.

CORRADETTI, B.; MEUCCI, A.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F.; LANGE-CONSIGLIO, A. 2013. Mesenchymal stem cells from amnion and amniotic fluid in bovine. *Reproduction and Fertility. Reproduction* 145:391-400.

CURTI, A.; TRABANELLI, S.; SALVESTRINI, V.; BACCARANI, M.; LEMOLI, R.M. 2009. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood* 113:2394-2401.

CHUNG, C.S.; FUJITA, N.; KAWAHARA, N.; YUI, S.; NAM, E.; NISHIMURA, R. 2013. A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Medical Science* 75:879-886.

CHRISTOLOUDOU, I.; KOLISIS, F.N.; PAPAEVANGELIOU, D.; ZOUMPOURLIS, V. 2013. Comparative evaluation of human mesenchymal stem cells of fetal and adult origin during prolonged in vitro expansion: Considerations for cytotherapy. *Stem Cells International* 70:150-162.

DAYAN, V.; YANNARELLI, G.; BILLIA, F.; FILOMENO, P.; WANG, X.H.; DAVIES, J.E.; KEATING, A. 2011. Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic Research Cardiology* 106:1299-1310.

DAZZI, F.; KRAMPERA, M. 2011. Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 24:49-57.

DELAROSA, O.; DALEMANS, W.; LOMBARDO, E. 2012. Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases. *Current Opinion Biotechnology* 23:978-983.

DESHMANE, S.L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B.E. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29:313-326.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.M. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317.

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* 99:3838-3843.

DUEÑAS, F.; BECERRA, V.; CORTES, Y.; VIDAL, S.; SÁENZ, L.; PALOMINO, J.; DE LOS REYES, M.; PERALTA, OA. 2014. Hepatogenic and neurogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Veterinary Research* 10:154-166.

EGGENHOFER, E.; LUK, F.; DAHLKE, M.H.; HOOGDUIJN, M.J. 2014. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Immunology* 5:1-6.

ELGUETA, M.; ARENAS, C.; NAVARRETE, C. 2009. "Laboratorio de histocompatibilidad y trasplante de órganos" Editores: Palomo, G.; Ferreira, V.; Sepulvera, C.; Roseblatt, S.; Vergara, C. Editorial Universidad de Talca. Talca-Chile. 42:685-696.

ELMAN, J.S.; LI, M.; WANG, F.; GIMBLE, J.M.; PAREKKADAN, B. 2014. A comparison of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation. *Journal Inflammation* 11:1-8.

ENGELA, A.U.; BAAN, C.C.; DOR, F.J.; WEIMAR, W.; HOOGDUIJN, M.J. 2012. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Frontiers in Immunology* 3:1-8.

ENGLISH, K.; RYAN, J.M.; TOBIN, L.; MURPHY, M.J.; BARRY, F.P.; MAHON, B.P. 2009. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play nonredundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+ CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clinical & Experimental Immunology* 156:149-160.

ERTAS, G.; URAL, E.; URAL, D.; AKSOY, A.; KOZDAG, G.; GACAR, G.; KARAÖZ, E. 2012. Comparative analysis of apoptotic resistance of mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow and adipose tissue. *The Scientific World Journal* 2012:1-8.

FRANÇOIS, M.; ROMIEU-MOUREZ, R.; LI, M.; GALIPEAU, J. 2012. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Molecular Therapy* 20:187-195.

FRESHNEY, R.I. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5th edition. Editorial Wiley-Liss. New Jersey. 38-358.

FRESHNEY, R.I. 2007. *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications*. 6th edition. Editorial Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 163-364.

FRIEDENSTEIN, A.J.; GORSKAJA, J.F.; KULAGINA, N.N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology* 4:267-274.

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* 185:302-312.

GONZALEZ-REY, E.; ANDERSON, P.; GONZALEZ, M.A.; RICO, L.; BUSCHER, D.; DELGADO, M. 2009. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 58:929-939.

GROH, M.E.; MAITRA, B.; SZEKELY, E.; KOÇ, O.N. 2005. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Experimental Hematology* 33:928-934.

HEIDARI, B.; SHIRAZI, A.; MEHDI, M.; HASSANPOUR, H.; BEHZADI, B.; MEHDI NADERI, M.; SARVARI, A.; BORJIAN, S. 2013. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 5:104-117.

HOMBACH-KLONISCH, S.; PANIGRAHI, S.; RASHEDI, I.; SEIFERT, A.; ALBERTI, E.; POCAR, P.; KURPISZ, M.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; MACKIEWICZ, A.; LOS, M. 2008. Adult stem cells and their trans-differentiation potential perspectives and therapeutic applications. *Journal of Molecular Medicine* 86:1301-1314.

HOOGDUIJN, M.J.; DOR, F.J. 2013. Mesenchymal stem cells: are we ready for clinical application in transplantation and tissue regeneration? *Frontiers in Immunology* 4:1-2.

HSIAO, S.T.; ASGARI, A.; LOKMIC, Z.; SINCLAIR, R.; DUSTING, G.J.; LIM, S.Y.; DILLEY, R.J. 2012. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem Cells & Development* 21:2189-2203.

HSU, W.T.; LIN, C.H.; CHIANG, B.L.; JUI, H.Y.; WU, K.K.; LEE, C.M. 2013. Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10+IFN- γ +CD4+ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. *The Journal of Immunology* 190:2372-2380.

IVANOVA-TODOROVA, E.; BOCHEV, I.; MOURDJEVA, M.; DIMITROV, R.; BUKAREV, D.; KYURKCHIEV, S.; TIVCHEV, P.; ALTANKOVA, I.; KYURKCHIEV, D. 2009. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunology Letters* 126:37-42.

IVANOVA-TODOROVA, E.; BOCHEV, I.; DIMITROV, R.; BELEMEZOVA, K.; MOURDJEVA, M.; KYURKCHIEV, S.; KINOV, P.; ALTANKOVA, I.; KYURKCHIEV, D. 2012. Conditioned medium from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces CD4+FOXP3+ cells and increases IL-10 secretion. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23251077>.

KIM, J.; HEMATTI, P. 2009. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology* 37:1445-1453.

KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. 2010. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology* 40:1830-1835.

KLYUSHNENKOVA, E.; MOSCA, J.D.; ZERNETKINA, V.; MAJUMDAR, M.K.; BEGGS, K.J.; SIMONETTI, D.W.; DEANS, R.J.; MCINTOSH, K.R. 2005. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *Journal of Biomedicine Science* 12:47-57.

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: 3722-3729.

KRAMPERA, M. 2011. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia* 25:1408-1414.

KYURKCHIEV, D.; BOCHEV, I.; IVANOVA-TODOROVA, E.; MOURDJEVA, M.; ORESHKOVA, T.; BELEMEZOVA, K.; KYURKCHIEV, S. 2014. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells* 6:552-570.

KYURKCHIEV, D.; IVANOVA-TODOROVA, E.; BOCHEV, I.; MOURDJEVA, M.; KYURKCHIEV, S. 2013. Differences between adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells as regulators of the immune response. In: *Hayat MA. Stem cells & cancer stem cells* 10:71-84.

LE BLANC, K.; RINGDÉN, O. 2005. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 11:321-334.

LIANG, C.; CHEN, S.; WANG, M.; ZHAI, W.J.; ZHOU, Z.; PANG, A.M.; FENG, S.Z.; HAN, M.Z. 2013. Synergistic immunomodulatory effects of interferon-gamma and bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 34:213-216.

LI, CH.; WU, X.; TONG, J.; YANG, X.; ZHAO, J.; ZHENG, Q.; ZHAO, G.; AND MA, J. 2015. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy* 6:55-68.

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* 6:1282-1286.

LIU, L.; ZHAO, G.; FAN, H.; ZHAO, X.; LI, P.; WANG, Z.; HU, Y.; HOU, Y. 2014. Mesenchymal stem cells ameliorate Th1-induced preeclampsia-like symptoms in mice via the suppression of TNF- α expression. *PLoS One* 9:e88036.

LU, W.; FU, C.; SONG, L.; YAO, Y.; ZHANG, X.; CHEN, Z.; LI, Y.; MA, G.; SHEN, C. 2013. Exposure to supernatants of macrophages that phagocytized dead mesenchymal stem cells improves hypoxic cardiomyocytes survival. *International Journal of Cardiology* 165:333-340.

LUO, C.; JIA, W.; WANG, K.; CHI, F.; GU, Y.; YAN, X.; ZOU, G.; DUAN, T.; ZHOU, Q. 2014. Human amniotic fluid stem cells suppress PBMC proliferation through IDO and IL-10-dependent pathways. *Current Stem Cell Research & Therapy* 9:36-45.

LUZ-CRAWFORD, P.; KURTE, M.; BRAVO-ALEGRÍA, J.; CONTRERAS, R.; NOVA-LAMPERTI, E.; TEJEDOR, G.; NOËL, D.; JORGENSEN, C.; FIGUEROA, F.; DJOUAD, F.; CARRIÓN, F. 2013. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells, *Stem Cell Research & Therapy* 4:65-77.

MA, S.; XIE, N.; LI, W.; YUAN, B.; SHI, Y.; WANG, Y. 2014. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation* 21:216-225.

MACCARIO, R.; PODESTA, M.; MORETTA, A.; COMETA, A.; COMOLI, P.; MONTAGNA, D.; DAUDT, L.; IBATICI, A.; PIAGGIO, G.; POZZI, S.; FRASSONI, F.; LOCATELLI, F. 2005. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 90:516-525.

MAGDALENA, C. 2012. Estudio cuantitativo del crecimiento de cultivo de células madre mesenquimales de tejido adiposo. *Universidad de Valladolid, Facultad de Medicina* 4:22-32.

MAGGINI, J.; MIRKIN, G.; BOGNANNI, I.; HOLMBERG, J.; PIAZZON, I.M.; NEPOMNASCHY, I.; COSTA, H.; CANONES, C.; RAIDEN, S.; VERMEULEN, M.; GEFFNER, J.R. 2010. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One* 5:e9252.

MARESCHI, K.; CASTIGLIA, S.; SANAVIO, F.; RUSTICHELLI, D.; MURARO, M.; DEFEDALE, D.; BERGALLO, M.; FAGIOLI, F. 2016. Immunoregulatory effects on T lymphocytes by human mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, amniotic fluid, and placenta. *Experimental hematology* 44:138-150.

MELISSA, A.; BAXTER, A.; ROBERT, F.; WYNN, A.; SIMON, N.; JOWITT, B.J.; ED, WRAITH, C.; LESLIE, J.; FAIRBAIRN, D. 2004. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following *in vitro* expansion. *Stem Cells* 22:675-682.

MIELCAREK, M.; STORB, R.; GEORGES, G.E.; GOLUBEV, L.; NIKITINE, A.; HWANG, B.; NASH, R.A.; TOROK-STORB, B. 2011. Mesenchymal stromal cells fail to prevent acute graft-versus-host disease and graft rejection after dog leukocyte antigen-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 17:214-225.

NELSON, B.H.; MARTYAK, T.P.; THOMPSON, L.J.; MOON, J.J.; WANG, T. 2003. Uncoupling of promitogenic and antiapoptotic functions of IL-2 by Smad-dependent TGF-beta signaling. *Journal of Immunology* 170:5563-5570.

NEMETH, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P.S.; MAYER, B.; PARMELEE, A.; DOI, K.; ROBEY, P.G.; LEELAHAVANICHKUL, K.; KOLLER, B.H.; BROWN, J.M.; HU, X.; JELINEK, I.; STAR, R.A.; MEZEY, E. 2009. Bone marrow stromal cells attenuate

sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine* 15:42-49.

NG, TH.; BRITTON, G.J.; HILL, E.V.; VERHAGEN, J.; BURTON, B.R.; WRAITH, D.C. 2013. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in Immunology* 4:1-13.

PENG, L.; JIA, Z.; YIN, X.; ZHANG, X.; LIU, Y.; CHEN, P.; MA, K.; ZHOU, CH. 2008. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage, and Adipose Tissue. *Stem cells & development* 17:761-774.

PÉREZ-SERRANO, R.; RAMÍREZ-ESPINOSA, J.; SHIMADA, A.; ANTARAMIAN, A.; PIÑA, E.; MORA, O. 2012. Mesenchymal stem cells: biology, characterization and future applications to animal health and livestock production. *Agrociencia* 46:371-382.

PERICO, N.; CASIRAGHI, F.; INTRONA, M.; GOTTI, E.; TODESCHINI, M.; CAVINATO, R.A.; CAPELLI, C.; RAMBALDI, A.; CASSIS, P.; RIZZO, P.; CORTINOVIS, M.; MARASÀ, M.; GOLAY, J.; NORIS, M.; REMUZZI, G. 2011. Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 6:412-422.

PITTINGER, M.; MACKAY, A.; BECK, S.; JAISWAL, R.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.; MOORMAN, M.; SIMONETTI, D.; CRAIG, S.; MARSHAK D. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.

QUAH, B.J.; WARREN, H.S.; PARISH, C.R. 2007. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols* 9:2049-2056.

RAFFAGHELLO, L.; BIANCHI, G.; BERTOLOTTO, M.; MONTECUCCO, F.; BUSCA, A.; DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L.; PISTOIA, V. 2008. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 26:151-162.

RAOUFI, M.F.; TAJIK, P.; DEGHAN, M.M.; EINI, F.; BARIN, A. 2011. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood. *Reproduction in Domestic Animals* 46:95-99.

RASMUSSEN, I.; UHLIN, M.; LE BLANC, K.; LEVITSKY, V. 2007. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 82:887-893.

RYAN, J.; BARRY, F.; MURPHY, M.; MAHON, B. 2005. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation* 26:2-8.

REN, G.; SU, J.; ZHANG, L.; ZHAO, X.; LING, W.; L'HUILLIE, A.; ZHANG, J.; LU, Y.; ROBERTS, A.I.; JI, W.; ZHANG, H.; RABSON, A.B.; SHI, Y. 2009. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 27:1954-1962.

SAULNIER, N.; LORIAU, J.; FEBRE, M.; ROBERT, C.; RAKIC, R.; BONTE, T.; BUFF, S.; MADDENS, S. 2016. Canine placenta: A promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells? *Veterinary Immunology & Immunopathology* 171:47-55.

SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 1813:878-888.

SERRA, E.; PERDOMO, V. 2015. Introducción al cultivo de células eucariotas, Argentina. Universidad Nacional de Rosario. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas – Universidad del Rosario 1:6-60.

SCHURCH CM, RIETHER C, OCHSENBEIN AF. 2014. Cytotoxic CD8+ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell* 14:460-472.

SHI, M.; LIU, S.; WANG, F. 2011. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clinical & Experimental Immunology* 164:1-8.

SPAGGIARI, G.M.; CAPOBIANCO, A.; ABDELRAZIK, H.; BECCHETTI, F.; MINGARI, M.C.; MORETTA, L. 2008. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111:1327-1333.

SPAGGIARI, G.M.; ABDELRAZIK, H.; BECCHETTI, F.; MORETTA, L. 2009. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 113:6576-6583.

SVOBODOVA, E.; KRULOVA, M.; ZAJICOVA, A.; POKORNA, K.; PROCHAZKOVA, J.; TROSAN, P.; HOLAN, V. 2012. The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population. *Stem Cells & Development* 21:901-910.

THIN LUU, N.; ED RAINGER, G.; BUCKLEY, C.; NEWSOME, P.; FRAMPTON, J.; NASH, G. 2011. Mesenchymal stem cells inhibit recruitment of flowing neutrophils and lymphocytes by endothelial cells: roles of interleukin-6 and transforming growth factor- β . *Heart* 97:e7.

VIDAL, M.A.; KILROY, G.E.; JOHNSON, J.R.; LOPEZ, M.J.; MOORE, R.M.; GIMBLE, J.M. 2006. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Veterinary Surgery* 35:601-610.

VILLATORO, AJ.; FERNÁNDEZ, V.; CLAROS, S.; RICO-LLANOS, GA.; BECERRA, J.; ANDRADES, JA. 2015. Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Keratoconjunctivitis Sicca in a Canine Model. *BioMed Research International*. ID 527926, 1-10.

VISHNUBALAJI, R.; AL-NBAHEEN, M.; KADALMANI, B.; ALDAHMAH, A.; RAMESH, T. 2012. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. *Cell & Tissue Research* 347:419-427.

YAGI, H.; SOTO-GUTIERREZ, A.; PAREKKADAN, B.; KITAGAWA, Y.; TOMPKINS, R.G.; KOBAYASHI, N.; YARMUSH, M.L. 2010. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant* 19:667-679

YANEZ, R.; LAMANA, ML.; GARCIA-CASTRO, J.; COLMENERO, I.; RAMIREZ, M.; BUEREN, JA. 2006. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 24, 2582-2591.

YOSHIMURA, A.; MUTO, G. 2011. TGF- β function in immune suppression. *Current Topics in Microbiology & Immunology* 350:127-147.

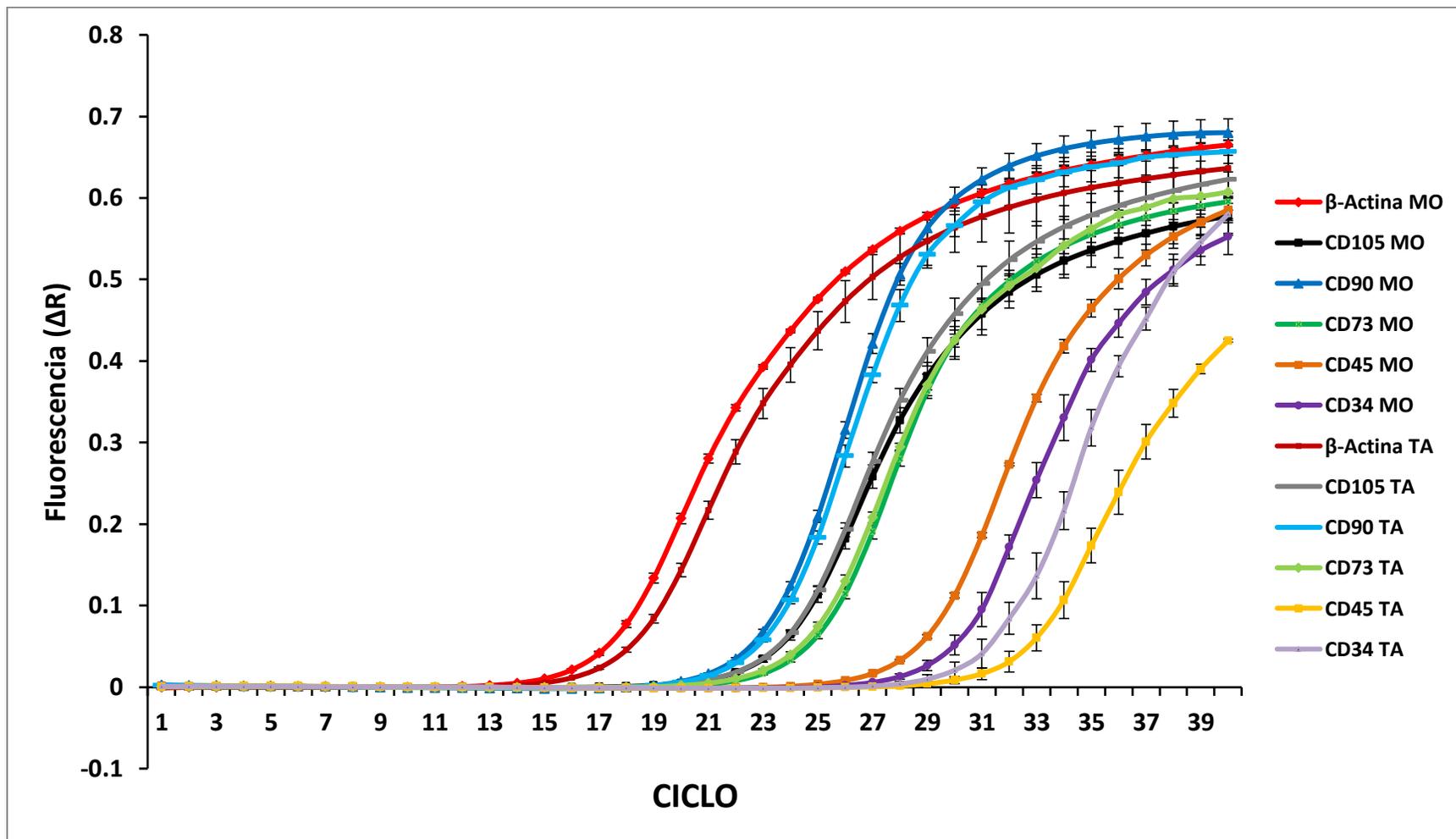
ZHANG, ZY.; TEOH, SH.; CHONG, MS.; SCHANTZ, JT.; FISK, NM.; CHOOANI, MA.; CHAN, J. 2009. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 27:126-137.

ZHANG, J.; HUANG, X.; WANG, H.; LIU, X.; ZHANG, T.; WANG, Y.; HU, D. 2015. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Research & Therapy* 6:334-340.

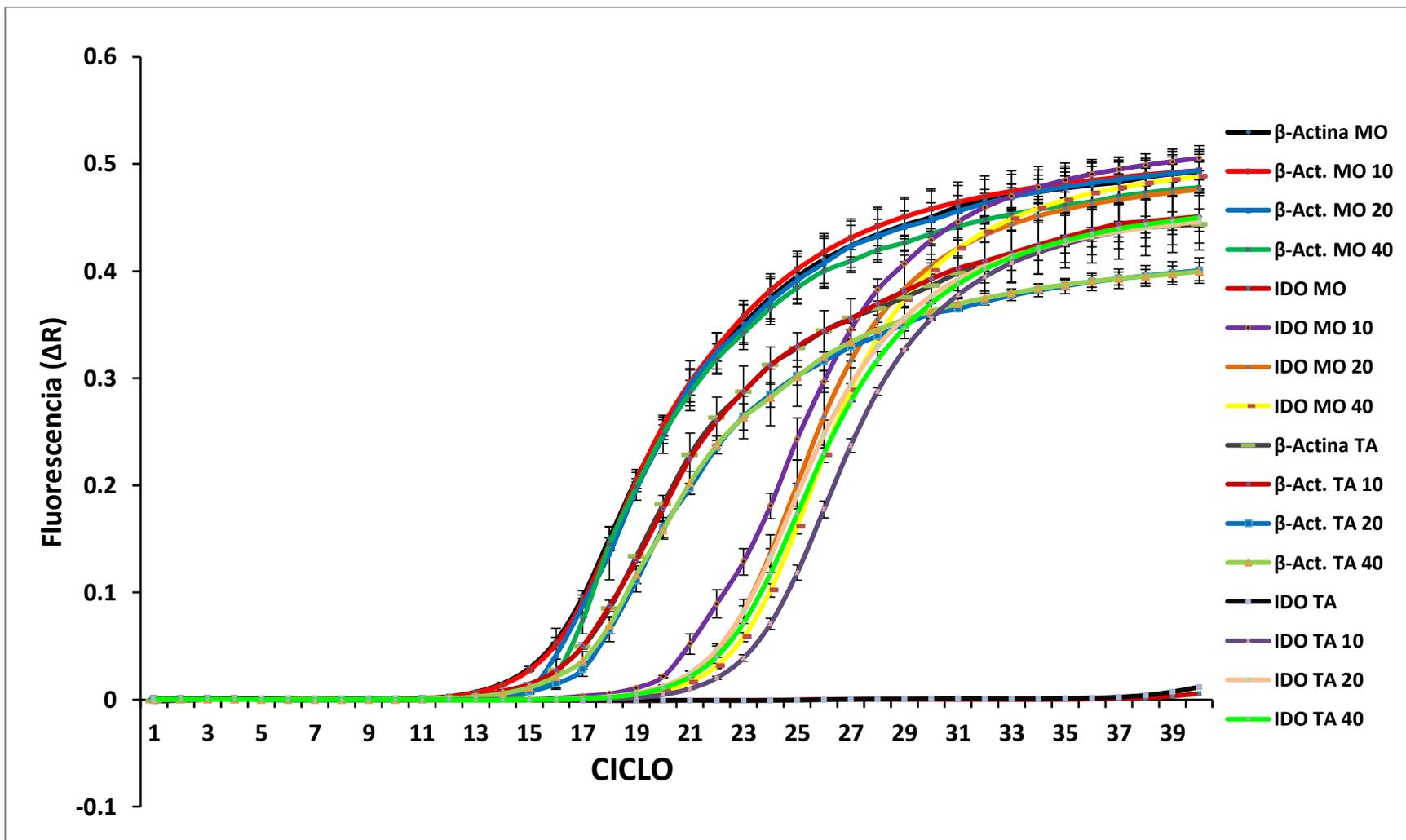
ZHENG, S.G.; WANG, J.; WANG, P.; GRAY, J.D.; HORWITZ, D.A. 2007. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4 CD25- cells to CD25 Foxp3 regulatory T cells and for expansion of these cells. *The Journal of Immunology* 178:2018-2027.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.I.; FUTRELL, W.J.; KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 7:211-226.

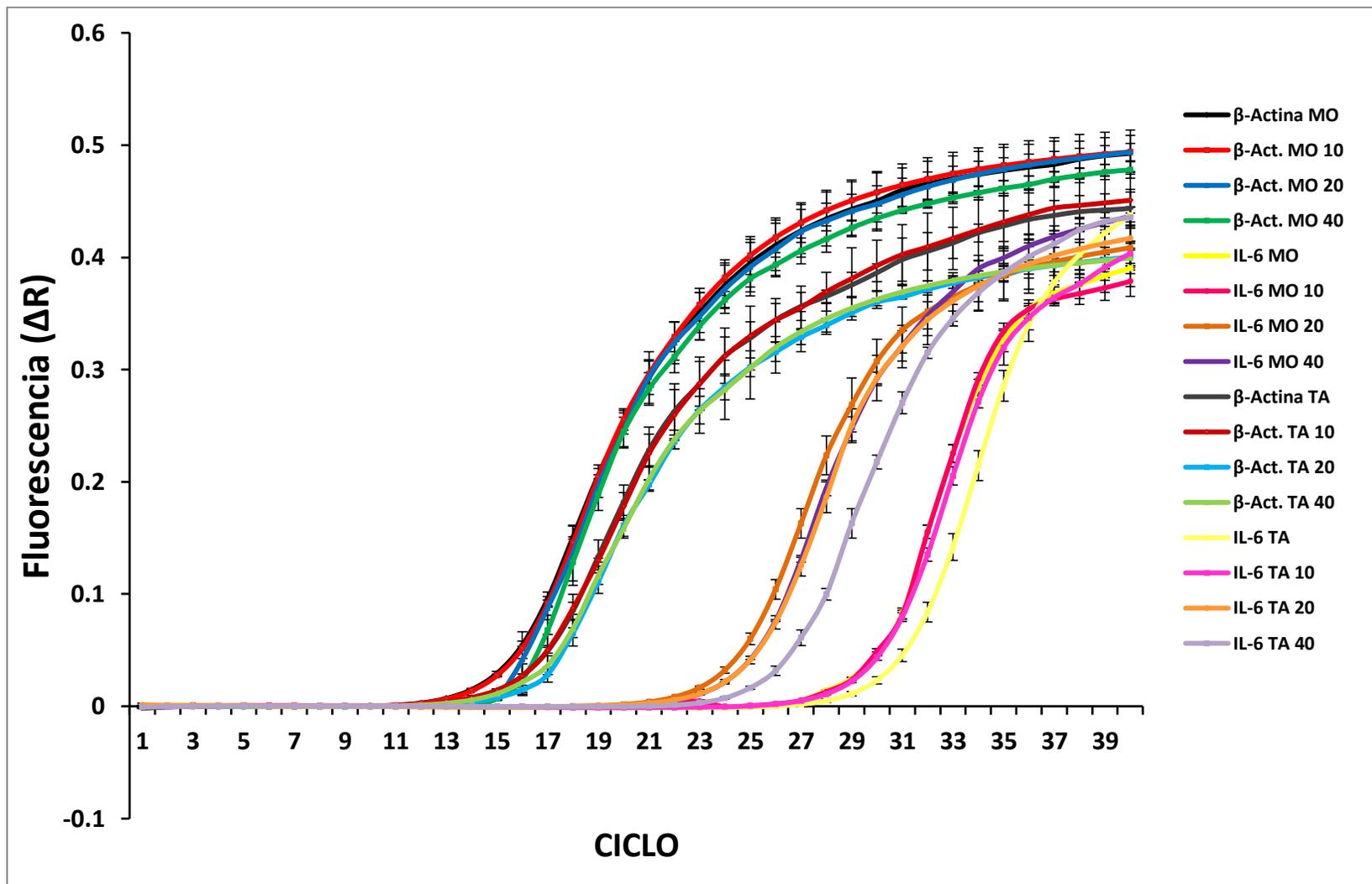
IX. Anexos



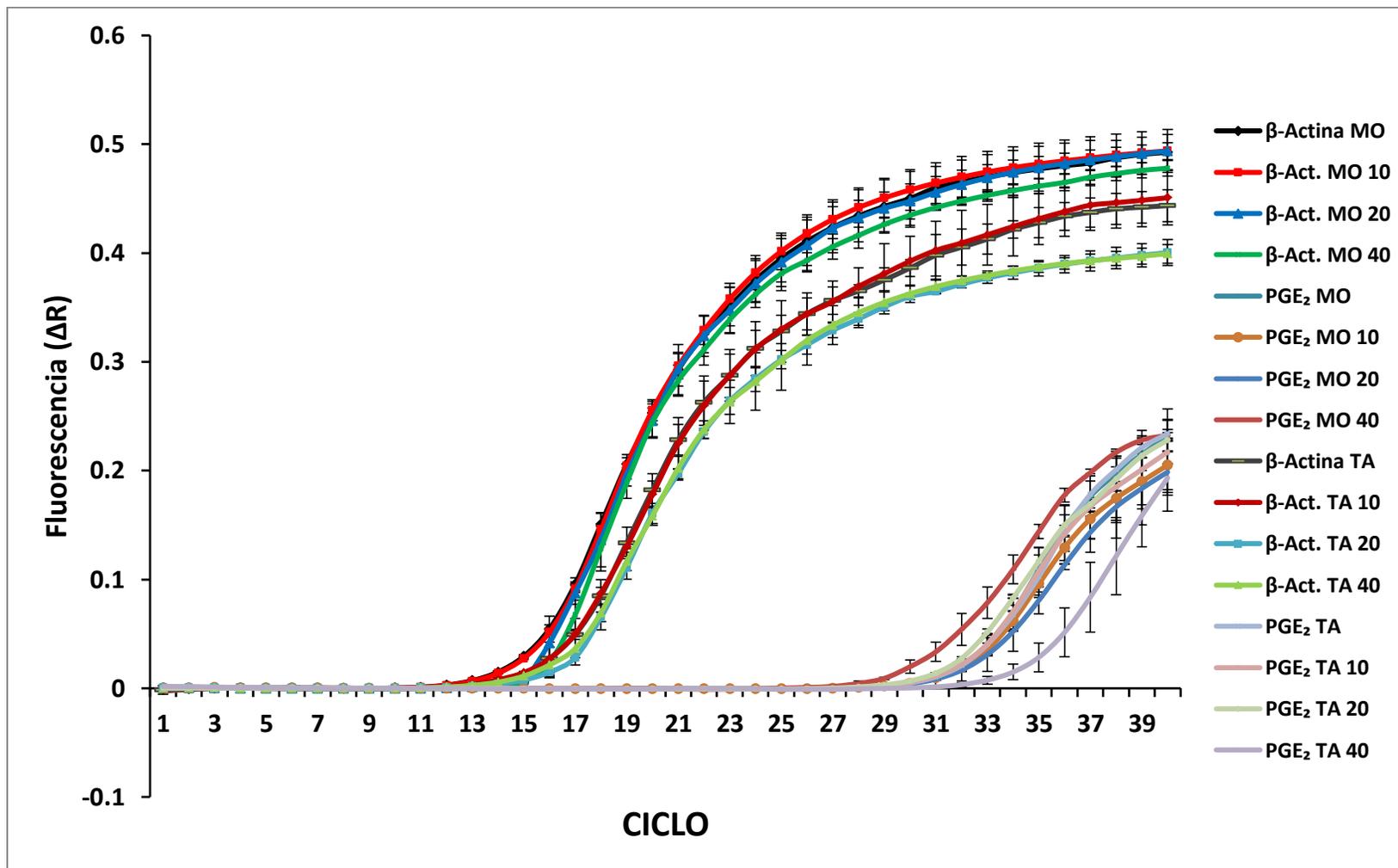
Anexo 1. Amplificación de cDNA de marcadores mesenquimales y hematopoyéticos en MSC-MO y MSC-TA fetal bovino



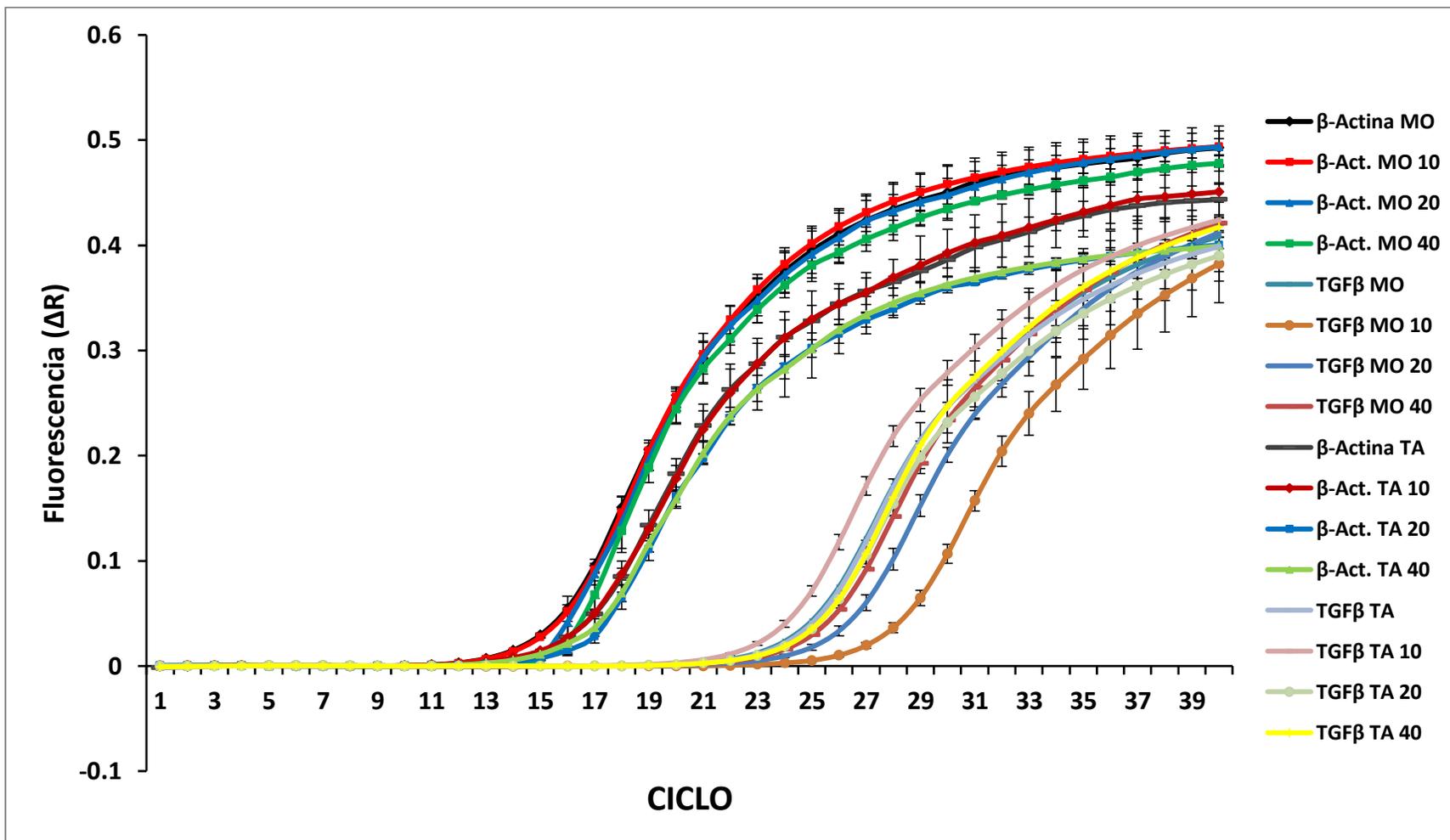
Anexo 2. Amplificación de cDNA del gen IDO en MSC-MO y MSC-TA fetal bovino preactivadas con IFN γ



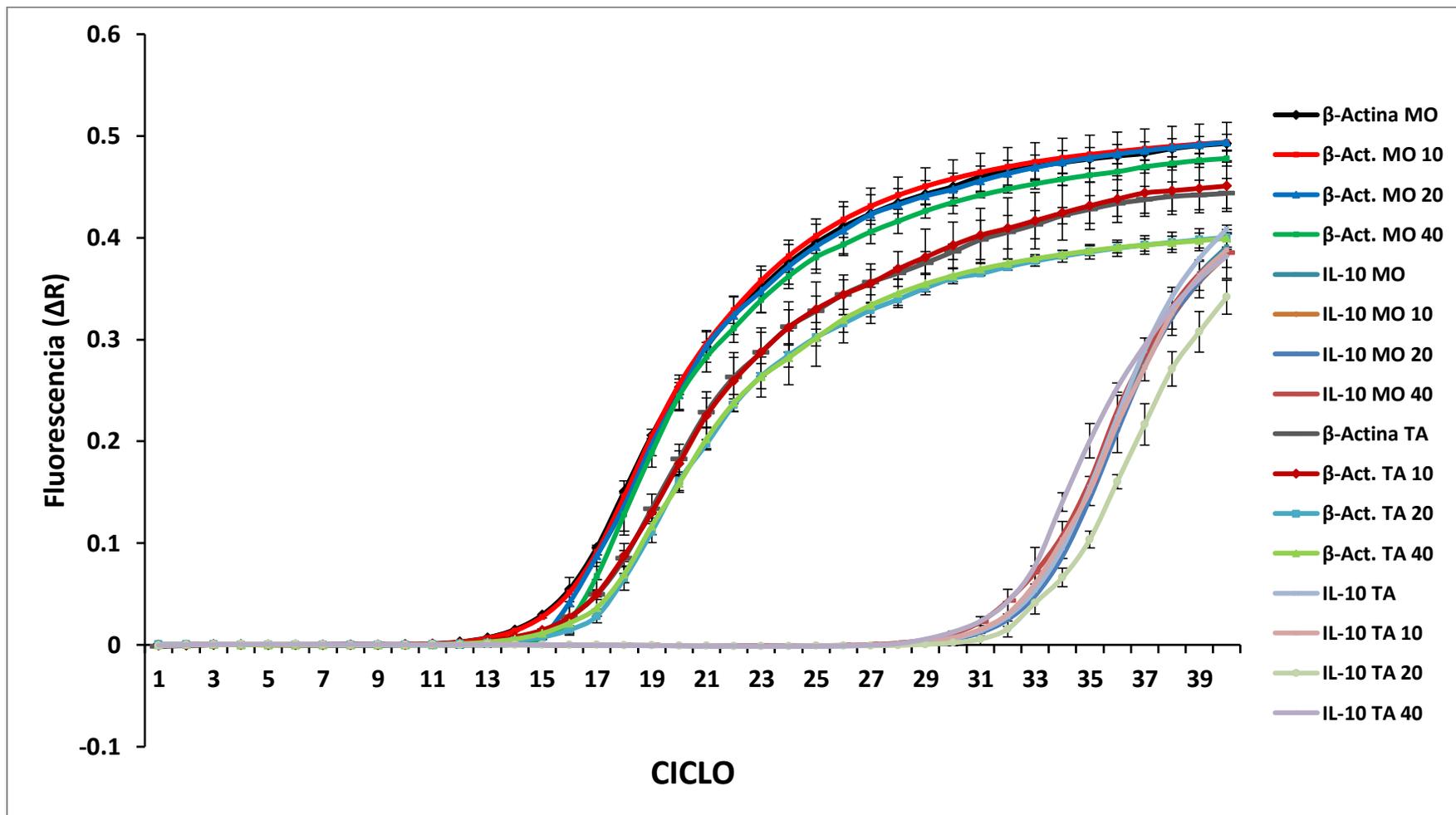
Anexo 3. Amplificación de cDNA del gen IL-6 en MSC-MO y MSC-TA fetal bovino preactivadas con IFN γ



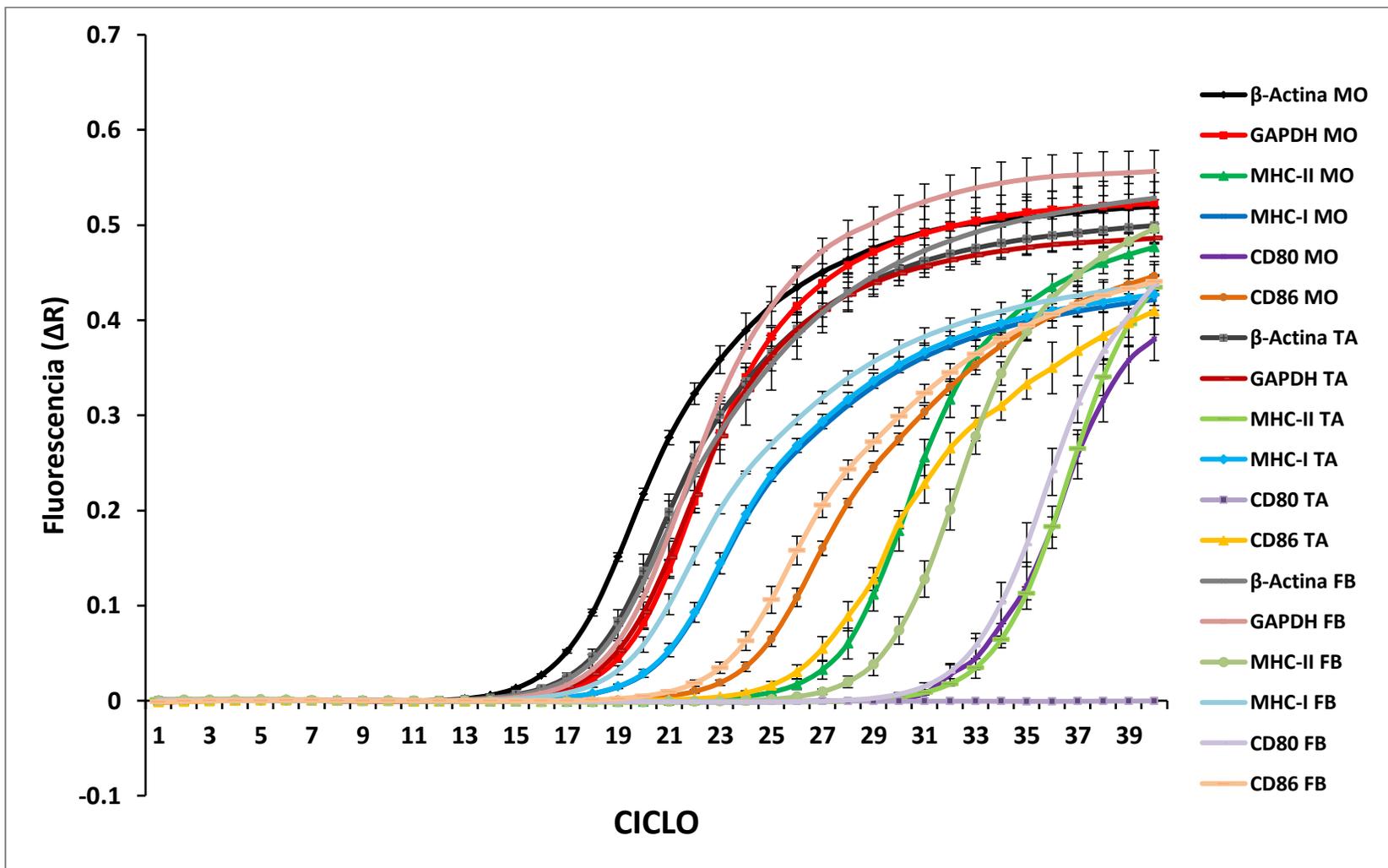
Anexo 4. Amplificación de cDNA del gen PGE₂ en MSC-MO y MSC-TA fetal bovino preactivadas con IFN γ



Anexo 5. Amplificación de cDNA del gen TGF β 1 en MSC-MO y MSC-TA fetal bovino preactivadas con IFN γ



Anexo 6. Amplificación de cDNA del gen IL-10 en MSC-MO y MSC-TA fetal bovino preactivadas con IFN γ



Anexo 7. Amplificación de cDNA del gen MHC-II, I, CD80 y CD86 en MSC-MO y MSC-TA fetal bovino