

UCh-FC
Biotecnología
T 324
C: 1

UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



“Efecto de IL-33 sobre células mesenquimales murinas derivadas de médula ósea y su potencial efecto inmunomodulador en poblaciones de linfocitos T CD4+”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Claudia Fernanda Terraza Aguirre

Director de Seminario de Título:

Dra. Karina Pino Lagos

Centro de Investigación Biomédica - Facultad de Medicina – Universidad de los Andes

Director Patrocinante:

Dr. Juan Bacigalupo Vicuña

Facultad de Ciencias – Universidad de Chile

Diciembre 2016

Santiago – Chile

UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE
PREGRADO



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Claudia Fernanda Terraza Aguirre:**

“Efecto de IL-33 sobre células mesenquimales murinas derivadas de médula ósea y su potencial efecto inmunomodulador en poblaciones de linfocitos T CD4+”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Karina de las Mercedes Pino Lagos
Directora Seminario de Título

Dr. Juan Domingo Bacigalupo Vicuña
Patrocinante Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dra. Daniela Sauma Mahaluf
Presidente Comisión

Dra. María Rosa Bono Merino
Evaluador



[Handwritten signature of Karina de las Mercedes Pino Lagos]
[Handwritten signature of Juan Domingo Bacigalupo Vicuña]

[Handwritten signature of Daniela Sauma Mahaluf]
[Handwritten signature of María Rosa Bono Merino]

Santiago, Diciembre 2016.

*Para mi mamá y hermana;
Gracias por acompañarme en este largo camino.
Y para esas personas maravillosas que ya no están físicamente;
Anita, Héctor y Teresa
Sé lo orgullosos que habrían estado en este momento.
Los amo.*

BIOGRAFÍA

Soy la mayor de dos hijas, de un matrimonio que, aunque ya no sigue junto como pareja, han sido unos excelentes padres. Crecí con mi abuelos, en un entorno lleno de atenciones y amor. Desde pequeña manifesté gran interés por aprender cosas nuevas y fue mi padre quien potenció esta curiosidad, incentivando la lectura. A lo largo de mi edad escolar, pasé por un gran número de colegios, por distintas circunstancias.



Sin embargo, esto me sirvió para aprender a relacionarme rápido con la gente, a hacer muchos amigos en el proceso y conocer distintos profesores, de los cuales descubrí que la biología era una ciencia apasionante.

Gracias a los esfuerzos de mi madre, pude entrar a estudiar a la Universidad de Chile, en donde conocí gente maravillosa que me ha ayudado a crecer como persona. Aunque no ha sido un proceso fácil, y ha estado lleno de altos y bajos, siempre he contado con gente que ha permanecido firme a mi lado, dándome el ánimo necesario para continuar, y de quienes he aprendido que la perseverancia es uno de los dones más valiosos que una persona puede tener.

Creo que la ciencia es algo fundamental en nuestras vidas, y que como tal, es nuestro deber como futuros profesionales, no solo contribuir al desarrollo de nuevos conocimientos, si no también el poder enseñar y transmitir a quienes no estén del todo familiarizados con el área, la importancia de estos descubrimientos, para así poder sentar las bases de una mejor sociedad en el futuro.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora Karina, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo, y por toda la paciencia y confianza que ha tenido a lo largo de este proceso.

Muchas gracias al grupo de Inmunología del Trasplante: Tania, Mauro, Karina, Pamina, Carla y Ricardo, no solo por la ayuda experimental que me hayan podido brindar en algún momento, si no también por los buenos momentos compartidos, esas conversaciones que terminan con ataques de risa, además de la confianza y complicidad que se ha generado, que hacen que trabajar con ustedes sea una experiencia gratificante.

Quiero agradecer de forma muy particular a Tania, quien tuvo la paciencia de enseñarme todo cuando no sabía nada, y porque además de toda la ayuda que me ha dado en este último tiempo, ha sido una amiga y compañera genial, con quien puedo pasar gratos momentos y compartir experiencias.

Y obviamente no puedo dejar de mencionar en forma muy especial a Mauro, quien ha sido un compañero, amigo, pololo y pilar fundamental en todo este último tiempo. Gracias por animarme cuando todo se ve negro y estar siempre dispuesto a ayudarme cuando más lo necesito.

A la gente del CIB en general, por hacer del día a día algo agradable. Mención especial a Paty, por sus consejos en lo académico y por todas las conversaciones felinas que alegran el día. A Rafael, por la buena onda. A Rodrigo, Mónica y Macarena por su buena disposición para ayudarme cuando lo he necesitado. Y a Juan Pablo y Camila por ser unos jefes comprensivos y buena onda, con quienes es muy grato trabajar.

Gracias a mis amigos de la Universidad de Chile, Biotecs y Ambientales, con quienes compartí muy buenos momentos a lo largo de la carrera. Esas conversaciones de

pasillo, los breaks en el kiosco de la tía o los viernes en “los pastos”. Son muy lindos recuerdos que atesoraré por siempre.

No puedo dejar de mencionar a la gente del grupo de pole dance, con quienes, además de poder liberar es estrés del día a día, he compartido momentos maravillosos y experiencias nuevas. Mención especial a Eva y Óscar, por ser unos excelentes profesores y por toda su buena onda.

A mis mejores amigos Constanza (Cono), Francisco (Polilla), Cristian (Cotito), Mauricio y Pancho, quienes siguen estando ahí en los momentos importantes, brindando su apoyo, alegría y amistad. Ya son varios años que llevamos compartiendo experiencias y espero que sigan siendo muchos más. Son geniales.

Por último, pero no por eso menos importante, quiero agradecer a mi familia por su invaluable apoyo a lo largo de este proceso. A mi papá, Luis, por ser quien fomentó desde que era pequeña mi amor por la lectura y la ciencia, aquel con quien puedo tener largas conversaciones y debates enriquecedores, de los cuales siempre aprendo algo nuevo. A mi hermana Carolina, mi Flaca, que ha sido mi *partner* desde siempre, una amiga, compañera inseparable y confidente, con quien puedo compartir todo y tener la certeza de que siempre estaremos la una para la otra. Y por supuesto a mi mamá, María Teresa, quien ha estado siempre ahí para apoyarme, y que gracias a todo su esfuerzo, sacrificio y enseñanzas, me ha sacado adelante y ha forjado la mujer que soy hoy. Espero que este logro los haga sentir orgullosos. Los amo. Y porque también son parte de la familia, no puedo dejar de mencionar a mis niños peludines Huevo, Titi, Betty, Negrito, Srta Mono, Pinky, Benito, Pollo, Tutu, Brunito, Michu, Flor, Yuyito, Niño y Pippín por acompañarme en esas largas noches de estudio y hacer los días más lindos. Aunque algunos ya no estén en este mundo, viven por siempre en mi corazón.

Gracias a todos, por ser parte de este proceso y haber aportado su granito de arena para que ahora pueda ser quien soy y estar donde estoy.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunología del Trasplante en las dependencias del Centro de Investigación Biomédica (CIB) de la Universidad de los Andes y contó con el financiamiento de los proyectos FONDECYT 11121309 y 1160347, y PMI UAN1301.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
FINANCIAMIENTO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1 RESUMEN	1
2 ABSTRACT	3
3 INTRODUCCIÓN	5
3.1 Trasplante y Rechazo	5
3.2 Células Mesenquimales.....	7
3.2.1 Licenciamiento.....	8
3.2.2 Mecanismos inmunomoduladores de MSCs	9
3.2.2.1 Óxido Nítrico (NO).....	9
3.2.2.2 Citoquinas	10
3.2.2.3 Contacto célula-célula	13
3.2.3 Plasticidad de las MSCs.....	13
3.2.4 MSCs en trasplante.....	14
3.3 Intereleuquina-33	16
4 HIPÓTESIS	18
5 OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo General	18
5.2 Objetivos Específicos.....	18

6	MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1	Ratones.....	19
6.2	Líneas celulares.....	19
6.3	Obtención de suspensiones celulares	20
6.4	Medio de cultivo	20
6.5	Cultivos in vitro.....	20
6.6	Citometría de Flujo.....	22
6.7	Test de ELISA.....	22
6.8	Detección de NO.....	23
6.9	qRT-PCR	23
6.10	Trasplante de piel y tratamiento.....	24
6.11	Experimentos de re-estimulación <i>ex vivo</i>	25
6.12	Análisis Estadístico	25
7	RESULTADOS.....	26
7.1	Caracterización fenotípica de MSCs	26
7.2	IFN- γ junto a IL-33 induce la expresión de moléculas inmunomodulatorias en MSCs.....	28
7.3	MSCs tratadas con IFN- γ e IL-33 afectan la proporción y fenotipo de linfocitos T CD4+ <i>in vitro</i>	32
7.4	Rol de MSCs moduladas con IFN- γ e IL-33 en la respuesta inmune a trasplante de piel ...	33
8	DISCUSIÓN	39
9	CONCLUSIONES	47
10	REFERENCIAS	48
11	FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Expresión de marcadores de superficie canónicos en MSC tratadas diferencialmente con IFN- γ e IL-33.	27
Figura 2	IL-33 no altera la expresión de MHC-II inducida por IFN- γ en MSCs.	28
Figura 3	IL-33 regula la expresión de algunos genes modulatorios en MSCs	30
Figura 4	IL-33 promueve la secreción de IL-6 y TGF- β en MSCs	31
Figura 5	MSCs pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33 afectan levemente la frecuencia y fenotipo de linfocitos T CD4+ <i>in vitro</i> .	32
Figura 6	Modelo de trasplante de piel de ratón.	34
Figura 7	Ratones tratados con MSC pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33 no aceptan completamente el injerto.	35
Figura 8	MSCs pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33 disminuyen número total de poblaciones de linfocitos en GLds.	36
Figura 9	Animales trasplantados y tratados con MSCs pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33 presentan un aumento en la frecuencia de linfocitos CD4+ IL-17A+ en GLds.	37
Figura 10	Animales trasplantados y tratados con MSCs pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33 presentan cambios en el patrón de citoquinas producidas en respuesta al aloinjerto.	38
Figura Supl. 1	Expresión de marcadores de superficie canónicos en MSC <i>wf</i> tratadas diferencialmente con IFN- γ e IL-33.	54
Figura Supl. 2	Expresión de MHC-II en MSCs <i>wf</i> tratadas con IFN- γ e IL-33.	54
Figura Supl. 3	Expresión de moléculas receptoras y producción endógena de IL-33 en MSCs.	55
Figura Supl. 4	Nitratos totales presentes en sobrenadantes de MSCs estimuladas diferencialmente con IFN- γ e IL-33.	55
Figura Supl. 5	Número total de células presentes en GLds en ratones trasplantados.	56
Figura Supl. 6	Frecuencia de poblaciones linfocitarias en GLds en ratones trasplantados.	56
Figura Supl. 7	Razón Treg/Tef en GLds de ratones trasplantados.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I	Lista de genes medidos por qRT-PCR y secuencias de partidores utilizados	24
----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Alofococianina
Arg1	Arginasa 1
CD	<i>Cluster</i> de Diferenciación
CPA	Célula presentadora de antígeno
cRPMI	RPMI complementado
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DC	Célula dendrítica
EIcH	Enfermedad del injerto contra huésped
ELISA	<i>Enzyme linked immunoabsorbent assay</i>
F1	Ratón descendiente de cruce de cepas C57Bl/6 x Balb/c
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (Proteína fluorescente verde)
GLd	Ganglios linfáticos drenantes
IL	Interleuquina
IFN-γ	Interferón – γ
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
iTregs	Células T reguladoras inducidas
MFI	<i>Median fluorescence Intensity</i> (Intensidad media de fluorescencia)
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex II</i> (Complejo principal de histocompatibilidad - clase II)
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> (Metaloproteínasa de matriz)
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO	Óxido nítrico
Nrp1	Neuropilina-1
nTregs	Células T reguladoras naturales
PE	Ficoeritrina

PBS	Buffer fosfato salino
PE-Cy5.5	Ficoeritrina cianina- 5.5
PE-Cy7	Ficoeritrina cianina-7
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PerCP	Peridinin-clorofila
PMA	Acetato de forbol miristato
RLT	Receptor de antígenos de Linfocitos T
RFP	<i>Red Flouescent Protein</i> (Proteína fluorescente roja)
RNA	Ácido Ribonucleico
RORyt	<i>Retinoic acid receptor-related orphan receptor y t</i>
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa, cuantitativa
SFB	Suero Fetal Bovino
ST2	Receptor de IL-33
Tefs	Células T efectoras
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i> (Factor de necrosis tumoral α)
TGF- β	<i>Tumor growth factor – β</i> (Factor de crecimiento tumoral β)
Th1	Célula T-helper 1
Th2	Célula T-helper 2
Th17	Célula T-helper 17
ToI-CD	Célula Dendrítica Tolerogénica
Tregs	Células T reguladoras
wt	<i>Wild type</i> (tipo silvestre)

1 RESUMEN

Interleuquina-33, citoquina miembro de la familia de IL-1, posee un efecto modulador en distintas poblaciones celulares del sistema inmune, que incluyen respuestas que van desde la inflamación hasta la tolerancia inmune. Se ha reportado que citoquinas de esta familia, en conjunto con IFN- γ , son capaces de licenciar a MSCs para que puedan desplegar su potencial inmuno modulador, el cual ha sido ampliamente abordado en la literatura. Por este motivo, se decidió evaluar cómo IFN- γ e IL-33 pueden afectar el fenotipo y función de MSCs. Los resultados indican que estas citoquinas, ya sea en conjunto o por sí solas, no afectan la expresión de marcadores clásicos de MSCs como CD29, CD44 y CD73, o la falta de expresión de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD11b y CD117, además, IL-33 no interfiere en el aumento de la expresión de MHC-II mediada por IFN- γ . También se evaluó la expresión de moléculas involucradas en las funciones reguladoras de MSCs, encontrando que el tratamiento combinado con estas citoquinas induce la expresión de iNOS y estimula la secreción de IL-6 y TGF- β .

Por este motivo, se decidió evaluar el efecto *in vivo* de MSCs pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33 en un modelo murino de trasplante de piel. Los resultados indican que, aunque en aquellos animales tratados con MSCs moduladas con IFN- γ e IL-33, no se previene totalmente el rechazo del aloinjerto, sí existe una disminución en el número de linfocitos T efectores y reguladores presentes en ganglios linfáticos drenantes del injerto (GLds), acompañado de un enriquecimiento en poblaciones CD4+IL-17A+ y CD4+IL-17A+Foxp3+. Tras una re-estimulación *ex vivo* de las células obtenidas de GLds, se observa que hay una menor producción de IFN- γ acompañado de un leve aumento en la secreción de IL-17. Esto sugiere que el tratamiento podría estar

potenciando la producción de IL-17 en células residentes en GLds, y/o promoviendo la desdiferenciación de linfocitos T CD4+Foxp3+ hacia linfocitos T CD4+IL-17+Foxp3+. En conjunto, estos datos sugieren que IFN- γ e IL-33 modulan la función de MSCs, principalmente al promover la inducción de un fenotipo Th17 *in vivo*, aunque se requieren más estudios para dilucidar los mecanismos asociados a este fenómeno.

2 ABSTRACT

Interleukin-33, a cytokine member of the IL-1 family has a modulatory effect on different cell populations of the immune system, including responses ranging from inflammation to immune tolerance. It has been reported that cytokines belonging to this family, in conjunction with IFN- γ , are able to license MSCs, deploying their immune modulator potential, which has been widely discussed in the literature. Therefore, we decided to evaluate whether IFN- γ and IL-33 can affect MSCs phenotype and function. The results indicate that these cytokines, either together or by themselves, do not affect the expression of classical markers of MSCs such as CD29, CD44 and CD73, or the lack of expression of hematopoietic markers such as CD45, CD11b and CD117. In addition, IL-33 does not prevent IFN- γ -induced MHC-II expression. Also, we studied the expression of certain molecules related to the regulatory function of MSC, and we found that the combined treatment with these cytokines enhanced the expression of iNOS and stimulated the secretion of TGF- β and IL-6 by MSCs.

Thus, we decided to evaluate the *in vivo* effect of cytokine pretreated-MSCs in a murine model of skin transplantation. Our results indicate that, although in those animals treated with IFN- γ + IL-33-modulated MSCs, allograft rejection is not fully prevented, there is a decrease in the number of effector and regulatory T cells present in draining lymph nodes (dLN), along with an enrichment of CD4+IL-17A+ and CD4+ IL-17A+Foxp3+ T cells populations. After *ex vivo* re-stimulation of these cells, we observed that there is a reduction in IFN- γ secretion but a slightly higher production of IL-17. These results suggest that the treatment may be enhancing the production of IL-17 by dLN-resident cells and/or favoring dedifferentiation of Foxp3+CD4+ T cells towards IL-17+Foxp3+CD4+ T cells. Altogether, our data suggests that IFN- γ and IL-33

modulate MSC function, most likely promoting Th17 phenotype *in vivo*, although further studies are required to elucidate the mechanisms associated with this phenomenon.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Trasplante y Rechazo

El correcto funcionamiento de un órgano o tejido es clave para la mantención de la homeostasis de un organismo. Cuando alguno de ellos falla, ya sea por alguna lesión o pérdida de función, puede provocar graves consecuencias en el organismo, e incluso la muerte. Actualmente, el trasplante de órganos surge como una alternativa para intentar restaurar las funciones normales a dicho nivel, mejorando con ello tanto la sobrevida como la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, pese a los avances en técnicas quirúrgicas, cuidados y tecnologías, uno de los grandes problemas asociados al trasplante de un órgano se relaciona con el sistema inmune, ya sea del receptor, como el caso del rechazo, o del donante, en el caso de enfermedad del injerto contra huésped (EICH).

Posterior al trasplante del tejido u órgano, se gatilla una compleja respuesta que involucra la acción conjunta de distintas células del sistema inmune como células presentadoras de antígeno (CPAs), linfocitos T y linfocitos B. Las CPAs, tanto del mismo receptor, como las del donante presentes en el injerto, presentan aloantígenos a los linfocitos T en los ganglios linfáticos drenantes (GLds); estos aloantígenos corresponden principalmente a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) que son reconocidas como agentes extraños, lo que gatilla un proceso de proliferación clonal en los linfocitos T alorreactivos, quienes finalmente migran hacia el injerto iniciando una respuesta inflamatoria (Abbas et al. 2012). Estos linfocitos secretan citoquinas pro-inflamatorias, como IFN- γ e IL-17, las cuales son características del rechazo a trasplantes (Atalar et al., 2009), y son

secretadas principalmente por células Th1 y Th17, respectivamente. Estos factores solubles activarán a otras células inflamatorias que a su vez lesionarán al injerto o iniciarán vías de señalización intracelular que finalmente desencadenarán la muerte de las células del injerto. Así mismo, se produce una acumulación de linfocitos T CD8+ citotóxicos, lo que conlleva a lisis de células del injerto y posterior rechazo. Por otra parte, anticuerpos producidos por linfocitos B, reconocen las paredes vasculares del aloinjerto, activando así al sistema del complemento, lo que conlleva a la necrosis de los vasos sanguíneos y una inflamación aguda en la zona (Abbas et al. 2012).

En la actualidad, el uso de drogas inmunosupresoras se presenta como la alternativa más ampliamente utilizada en pacientes, las cuales apuntan, principalmente, a inhibir la activación, expansión y producción de citoquinas por los linfocitos T. Sin embargo, el uso de éstos fármacos conlleva una serie de efectos secundarios no deseados, como una alta tasa de incidencia de infecciones y tumores dada la supresión inespecífica, problemas metabólicos como hipertensión o hiperglicemia, así como daño a otros órganos como hígado, corazón y riñones (Morales et al., 2012).

Por este motivo, uno de los grandes desafíos en la actualidad, es buscar terapias alternativas que permitan mejorar la aceptación o sobrevida del órgano trasplantado, disminuyendo los efectos secundarios asociados. En este contexto, la terapia celular se contempla como una forma de inducir un estado de tolerancia en el individuo trasplantado, siendo así una alternativa o complemento para las terapias actuales. De este modo, células mieloides supresoras, linfocitos T reguladores (Tregs), Tol-DC y células mensesquimales, se han presentado como posibles candidatos para desarrollar una terapia. En particular, esta última población celular ha mostrado efectos beneficiosos en la inducción de tolerancia, aumentando la sobrevida de injertos en

modelos animales de trasplante de corazón, hígado y riñón (Casiraghi et al., 2008; Ge et al., 2010; Ge et al., 2009; Wang et al., 2009), además de aumentar el número de otras células reguladoras como Tregs (Casiraghi et al., 2008; Ge et al., 2009).

3.2 Células Mesenquimales

Las células troncales mesenquimales (del inglés *Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) son una población celular que puede ser aislada desde numerosos tejidos adultos tales como médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical, sangre periférica, entre otros (Ma et al., 2014; Shi et al., 2010; Wang et al., 2014). De acuerdo a la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT por sus siglas en inglés) existen tres criterios mínimos que permiten diferenciar a estas células. En primer lugar, poseen capacidad de adherencia al plástico cuando son mantenidas en condiciones estándar de cultivo. Segundo, éstas células poseen la capacidad de auto-renovación y son consideradas multipotentes, debido a su potencial de diferenciación *in vitro* a diversos linajes celulares como osteoblastos, condrocitos y adipocitos, también conocido como "potencial trilineaje de diferenciación" (Dominici et al., 2006). Sin embargo, bajo condiciones específicas de cultivo, estas células tienen la capacidad de diferenciarse a múltiples linajes celulares pertenecientes a las 3 capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) que dan origen a tejidos y órganos adultos, tales como miocitos o neuronas (Ma et al., 2014). Como tercer criterio, al no existir un único marcador que permita diferenciar a estas células, se recurre a un panel de marcadores. En el caso de MSCs de ratón, éstas expresan los marcadores CD29, CD44, CD73, Sca-1 y carecen de los marcadores de linaje hematopoyético tales como CD11b o CD45; además, poseen una muy baja expresión en su superficie (<2%) de MHC clase I

y II, y moléculas coestimuladoras tales como CD80, CD86 o CD40 (Ankrum et al., 2014).

3.2.1 Licenciamiento

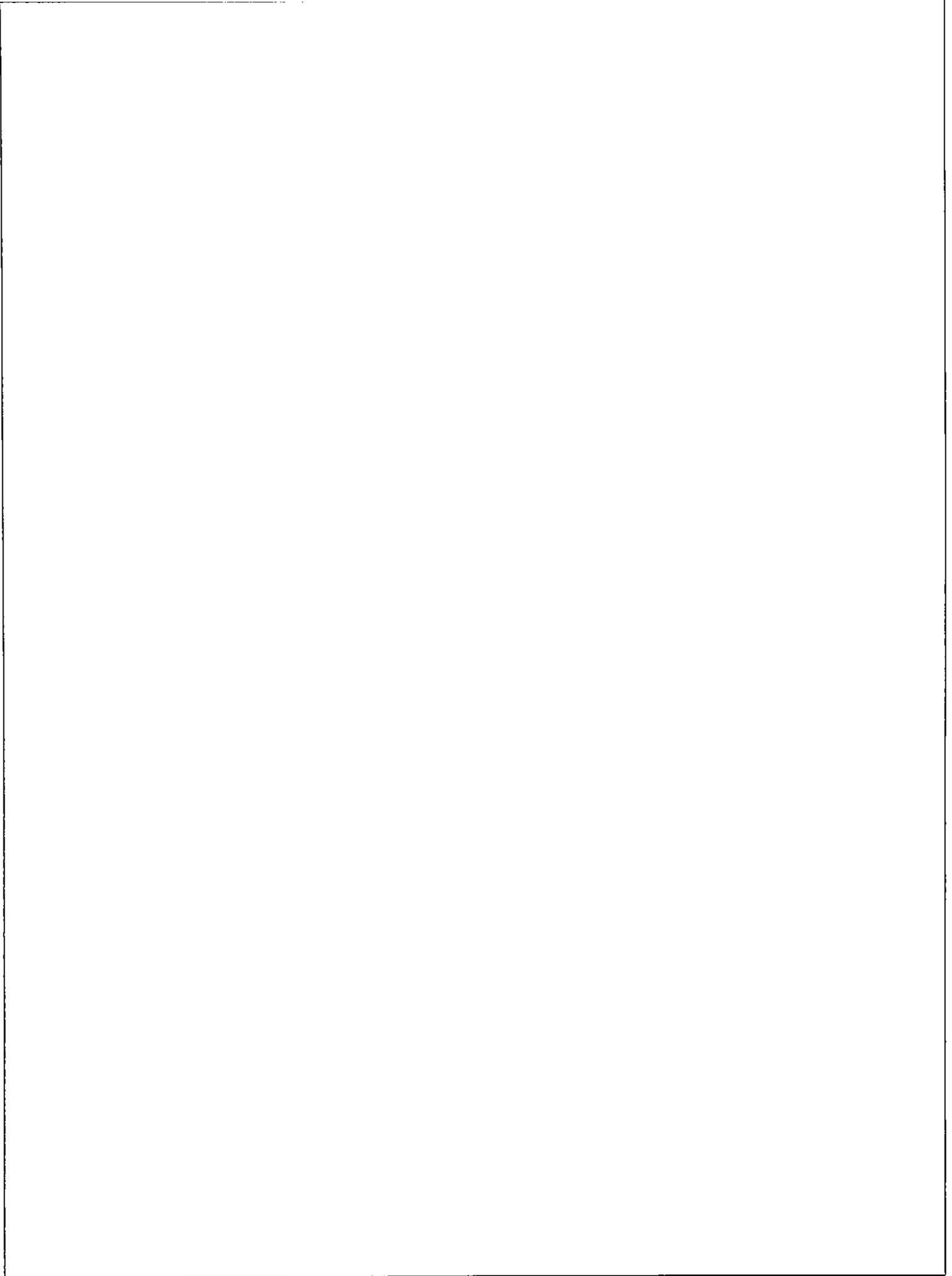
Aunque inicialmente los estudios relacionados con las MSCs se centraron en su potencial regenerativo y angiogénico, en 1998, Klyushnenkova *et al.* propusieron por primera vez que las MSC jugarían un importante rol inmuno regulador al suprimir la proliferación de células T (Klyushnenkova *et al.* 1998). A partir de ese momento, el potencial inmunomodulador de las MSCs comenzó a generar interés entre diversos grupos de investigadores por las posibles implicancias terapéuticas. Las MSCs, tanto humanas como murinas, son capaces de regular la función de células del sistema inmune innato y adaptativo, aunque esta propiedad no es ejercida de manera constitutiva, ya que se requiere de un estímulo pro-inflamatorio que la gatille, lo que es conocido como "licenciamiento". Se ha estudiado ampliamente el rol de IFN- γ en este proceso, el cual por sí solo ya es suficiente para desplegar las propiedades inmunomoduladoras de las MSC (Krampera et al., 2013; Ren et al., 2008). Sin embargo, se ha descrito que esta proteína actúa de forma sinérgica con otras citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF- α , IL-1 α o IL-1 β . Notablemente, estas últimas citoquinas no son capaces de licenciar a MSCs murinas cuando son administradas por sí solas, sin embargo, la combinación con IFN- γ aumenta considerablemente los efectos inmunosupresores de las MSCs, en comparación a los obtenidos sólo con IFN- γ (Ren et al., 2008). En la actualidad, para el caso de MSCs murinas, existe el consenso de que el tratamiento conjunto de 10 ng/mL de IFN- γ y 15 ng/mL de TNF- α por 40 horas es adecuado para una correcta activación de sus propiedades inmunosupresoras (Krampera et al., 2013).

3.2.2 Mecanismos inmunomodulatorios de MSCs

Las MSCs son capaces de ejercer su efecto modulador tanto en células del sistema inmune innato como del adaptativo, mediante la liberación de factores solubles, tales como citoquinas, factores de crecimiento, factores de diferenciación, quimioquinas, enzimas y metabolitos, así como también de manera contacto dependiente con las células blanco. Esto se traduce en un reclutamiento de distintas poblaciones celulares, con la consiguiente inhibición de su activación y proliferación, inhibición de la maduración de CPAs y, polarización a fenotipos reguladores de macrófagos, CD y linfocitos T. A continuación se describen algunos de los principales mecanismos involucrados en la inmunoregulación de las MSCs.

3.2.2.1 Óxido Nítrico (NO)

Es uno de los principales metabolitos involucrados en la función moduladora de las MSCs de origen murino. Esta molécula gaseosa es producida a partir de L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), la cual posee tres isoformas conocidas: i) iNOS, la cual es producida principalmente por macrófagos, por lo que se le asocia a la función supresora, cuya expresión es inducible y depende de factores pro-inflamatorios tales como LPS, IFN- γ , IL-1 o TNF- α (Coleman, 2001); ii) nNOS, producida en neuronas; y iii) eNOS, producida en células endoteliales. Se ha descrito que a altas concentraciones, NO inhibe la proliferación de linfocitos T efectores y es capaz de inducir la diferenciación de estos a Tregs (Niedbala et al., 2006; Sato et al., 2007).



En 2008, Ren *et al.* demostraron el rol crucial de iNOS en las capacidades inmunosupresoras de las MSCs murinas. Cuando las MSCs son licenciadas con citoquinas pro-inflamatorias, en particular IFN- γ , se induce una alta expresión de iNOS y una consecuente producción de NO, el cual es capaz de inhibir la respuesta efectora de linfocitos T *in vitro*. Esto se corroboró en un modelo *in vivo* de ElcH, observando resultados similares. Sin embargo, al usar inhibidores de esta enzima, así como MSCs derivadas de ratones *knock out* para iNOS (iNOS^{-/-}), o de ratones *knock out* para el receptor de IFN- γ (IFN γ R1^{-/-}), o anticuerpos contra esta citoquina, el efecto supresor resultó anulado, demostrando que el licenciamiento con IFN- γ es necesario para la producción de NO y que éste es capaz de inducir inmunosupresión.

3.2.2.2 Citoquinas

Una de las citoquinas involucradas en la modulación de las MSCs es la IL-6. Cuando CDs maduras son cultivadas en presencia de MSCs, se observa una disminución en la expresión de MHC-II, y de moléculas co-estimuladoras como CD40 y CD86 en la superficie de las primeras (Djouad *et al.*, 2007; Nauta *et al.*, 2006) lo que resulta en una disminución en la activación y proliferación de linfocitos T (Djouad *et al.*, 2007; Najjar *et al.*, 2009). En el trabajo de Djouad *et al.* se encontró una relación inversamente proporcional en la secreción de IL-6 (producida mayoritariamente por MSCs estimuladas) y citoquinas como IL-2, IFN- γ y TNF- α (producidas por esplenocitos totales). Cuando se adicionó un anticuerpo anti-IL-6 al medio de co-cultivo, se encontró una reversión parcial en la proliferación de linfocitos T, lo que indica que IL-6 es un mecanismo

inmunosupresor importante, aunque no es el único. Esto estaría en concordancia con el estudio de Mitani *et al*, en el cual se muestra que IL-6 es un factor clave que promueve la maduración de monocitos hacia macrófagos por sobre CDs (Mitani *et al.*, 2000). Se ha descrito también que la producción de IL-6 por parte de las MSCs permite polarizar a monocitos hacia macrófagos con perfil anti-inflamatorio (M2) productores de IL-10 (Eggenhofer and Hoogduijn, 2012).

Por otra parte, se ha descrito que las MSCs son capaces de secretar citoquinas antiinflamatorias en respuesta al licenciamiento, tales como IL-10 o TGF- β , ambas citoquinas relacionadas con una disminución de la respuesta de distintas poblaciones celulares del sistema inmune, en particular linfocitos T efectores, reduciendo su proliferación y capacidad efectora. Se han detectado altos niveles de IL-10 en los sobrenadantes de MSCs, tanto humanas como murinas, co-cultivadas *in vitro* con esplenocitos (Beyth *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2012). Sin embargo, no se ha detectado la presencia de esta citoquina en cultivos de MSCs solas o estimuladas con LPS o IL-3 (Ma *et al.*, 2014), por lo que, a la fecha, aun permanece sin dilucidar si la producción de IL-10 proviene de las MSCs o de células inmunes co-cultivadas. Pese a esto, se ha visto que las MSCs son capaces de inducir una mayor producción de IL-10 en macrófagos, gracias a la secreción de prostaglandina E₂ (PGE₂), lo que disminuye la mortalidad de ratones en un modelo de sepsis (Nemeth *et al.*, 2009). Así mismo, en el trabajo de Qu *et al.* se muestra que MSCs co-cultivadas con linfocitos T naïve, bajo condiciones de cultivos que favorecen la polarización a perfil Th17, son capaces de inhibir la diferenciación evidenciado

en una disminución de la expresión de Ror γ t, factor de transcripción maestro de este perfil, y una disminución en la secreción de IL-17 al medio, efecto que es revertido al utilizar anticuerpos anti-IL-10 o silenciando la expresión del gen mediante RNA de interferencia (Qu et al., 2012). Resultados similares fueron obtenidos por Ghannam *et al.* en donde además, se observó una inducción de los linfocitos a un fenotipo Treg, productor de IL-10 (Ghannam et al., 2010).

También, se ha descrito que TGF- β es un factor producido de forma constitutiva por las MSCs, y que es capaz de inhibir la activación de células NK (Patel et al., 2010), promover un cambio en el balance de linfocitos Th1/Th2/Th17/Treg (Kong et al., 2009; Nemeth et al., 2010), e inducir la diferenciación de Tregs *in vitro* (Kong et al., 2009; Nemeth et al., 2010; Patel et al., 2010; Tasso et al., 2012). Es más, numerosos trabajos describen que el TGF- β derivado de MSCs parece ser uno de los principales factores solubles involucrados en la inducción de Tregs antígeno específico en distintos modelos animales de enfermedades autoinmunes *in vivo* (Kong et al., 2009; Nemeth et al., 2010; Tasso et al., 2012; Zhao et al., 2008). También se ha descrito que TGF- β promueve la diferenciación de Tregs de forma indirecta. En co-cultivos de MSCs con PBMC humano, se observó que la secreción de TGF- β favorece la polarización de macrófagos M2 (anti inflamatorios), los cuales secretan IL-10 y CCL-18, induciendo finalmente la diferenciación de Tregs (Melief et al., 2013). Este efecto se ve revertido al eliminar la población de monocitos en el co-cultivo y al agregar anticuerpos neutralizantes anti TGF- β .



3.2.2.3 Contacto célula-célula

Además de la liberación de factores solubles, se ha descrito que la inmunomodulación de las MSCs depende del contacto directo con otras células. De las principales moléculas involucradas, FasL y PD-1/PD-L1 son las más ampliamente descritas, tanto en MSCs humanas como murinas. Las MSCs expresan en su superficie altos niveles de PD-L1 cuando son co-cultivadas con linfocitos T activados (Luz-Crawford et al., 2012; Sheng et al., 2008; Tipnis et al., 2010); esta molécula constituye un regulador negativo de la activación de linfocitos, inhibiendo su proliferación. Por otra parte, se ha descrito que las MSCs expresan FasL en su superficie, molécula que promueve la apoptosis en linfocitos T Fas+ (Akiyama et al., 2012). El uso de anticuerpos neutralizantes contra cualquiera de estas dos moléculas reduce de forma significativa el efecto inmunosupresor de las MSCs (Gu et al., 2013).

3.2.3 Plasticidad de las MSCs

Como se ha descrito hasta ahora, las MSCs son capaces de suprimir la respuesta de distintas poblaciones del sistema inmune, así como también de promover una respuesta de tipo reguladora. Sin embargo, también se ha descrito que las MSCs son capaces de promover la respuesta inmune. Esta dualidad en la función de las MSCs estaría condicionada por el estímulo pro-inflamatorio necesario para el licenciamiento. Por ejemplo, cuando MSCs derivadas de sangre de cordón umbilical son administradas semanalmente en ratones NOD/SCID previamente trasplantados con PBMC humano, son capaces de prevenir el desarrollo de ElCh (Tisato et al., 2007).

Por el contrario, cuando las MSCs son administradas al momento del trasplante de médula ósea en un modelo murino de EICH, no se observan beneficios terapéuticos (Sudres et al., 2006). Una de las explicaciones para este fenómeno se relaciona con la concentración de citoquinas pro-inflamatorias presentes: bajas concentraciones de éstas son suficientes para promover la secreción de quimioquinas necesarias para reclutar a células del sistema inmune, tales como CXCL-9, CXCL10 y CXCL11 (Ren et al., 2008); sin embargo, no son suficientes para gatillar una respuesta inmunosupresora, por ejemplo, mediada por iNOS, la cual requiere de altas concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias (Li et al., 2012b; Shi et al., 2012). Esto podría traducirse en un reclutamiento de células efectoras, pero no la supresión de ellas.

En 2010, Waterman *et al.* observaron que la respuesta de las MSCs también dependía de la estimulación con distintos ligandos de TLRs (del inglés *Toll-like receptors*), lo cual polarizaría a las MSCs a dos fenotipos distintos: uno pro-inflamatorio (MSC1) gatillado por la activación de TLR4, con ligandos como el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas; y uno anti-inflamatorio (MSC2) activado vía TLR3 por ligandos de RNA de doble hebra (dsRNA), como los presentes en ciertas cepas de virus (Waterman et al., 2010). La estimulación diferencial de estos TLRs conduciría distintos efectos inmuno-moduladores, así como un perfil de secreción de citoquinas distinto.

3.2.4 MSCs en trasplante

Como se ha mencionado hasta ahora, las MSCs pueden actuar a través de distintos mecanismos en diversas poblaciones del sistema inmune. En este sentido, diversos ensayos *in vivo* empleando modelos animales se han llevado a cabo, varios

de ellos relacionados con el trasplante de órganos sólidos. Uno de los primeros reportes fue realizado en 2002 por Bartholomew *et al.* en un modelo de trasplante de piel con babuinos. En este estudio se observó que la administración intravenosa de MSCs alogénicas promovía la sobrevida del injerto en comparación a la condición control sin MSC (Bartholomew *et al.*, 2002). Posterior a esto, numerosos estudios han sido llevado a cabo, mostrando la capacidad de las MSCs de prevenir el rechazo al aloinjerto.

Se ha observado que la administración de MSCs provenientes del donante promueve la sobrevida de trasplantes semi-alogénicos de corazón en ratones, acompañado de una disminución en la proliferación de linfocitos T efectores y un aumento en la proliferación de Tregs (Casiraghi *et al.*, 2008). Por otra parte, la administración de MSCs reduce la respuesta de hipersensibilidad a antígenos alogénicos y promueve la sobrevida de trasplantes de islotes pancreáticos alogénicos en ratones (Ding *et al.*, 2009). Además, se ha observado incluso la inducción de un estado de tolerancia en un modelo murino de trasplante de corazón, en donde la administración de MSCs en combinación con bajas dosis de Rapamicina, promueve la proliferación de Tregs y células dendríticas tolerogénicas (Tol-CD), acompañado de una disminución de la respuesta efectora de las células del donante, favoreciendo un perfil Th2 (Ge *et al.*, 2009). Adicionalmente, en un modelo murino de trasplante de riñón, se determinó que la infusión de MSCs previa al trasplante se acompaña de una proliferación de Tregs que permiten la sobrevida del injerto, efecto que no se observa al administrarlas luego de la cirugía (Casiraghi *et al.*, 2012).

Cabe destacar que en los estudios mencionados anteriormente, estas células no recibieron pre-estimulación *in vitro* y en todos los casos, los mejores resultados fueron obtenidos al inyectar las células previo al trasplante del órgano en cuestión. Además,

se evidencia la importancia de la generación de Tregs como mecanismo de inducción de tolerancia mediado por la administración de MSCs.

3.3 Intereleuquina-33

En el año 2005, Schmitz *et al.* describieron a esta citoquina, como un nuevo miembro de la familia de la IL-1, ligando del hasta entonces receptor huérfano, ST2. Mediante análisis bioinformático, se determinó que IL-33 posee una estructura similar a IL-18 e IL-1 β , otros dos miembros de la familia de la IL-1 (Schmitz *et al.*, 2005). En el año 2009, mediante resonancia magnética nuclear, Lingel *et al.* determinaron la existencia de dos dominios conservados: un N-terminal con un motivo corto de unión a cromatina y un C-terminal con una estructura β -*trefoil-fold*, compuesta por 12 láminas β entrelazadas, estructura característica de las citoquinas pertenecientes a la familia de la IL-1 (Lingel *et al.*, 2009). Fisiológicamente, IL-33 es expresada de forma abundante y constitutiva como pro-proteína en el núcleo de células endoteliales y epiteliales (Moussion *et al.*, 2008) y es liberada al medio en su forma madura en respuesta a daño tisular e infecciones, activando a células del sistema inmune innato y adaptativo, por lo que se propuso su rol de *alarmina* del sistema inmune.

Al igual que las otras citoquinas pertenecientes a la familia de la IL-1, a IL-33 también se le asoció una función inmune, inicialmente relacionada con una respuesta tipo Th2, puesto que, en su presencia, estas células aumentan significativamente la producción de IL-4, IL-5 e IL-13, citoquinas asociadas a este perfil (Schmitz *et al.*, 2005). También, se ha descrito que es capaz de actuar sobre células del sistema inmune innato tales como mastocitos, basófilos y eosinófilos (Ho *et al.*, 2007; Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009), promoviendo la secreción de citoquinas del perfil Th2. Debido a

su efecto en la polarización hacia el perfil Th2, se ha asociado a IL-33 como un factor promotor de alergias (Kurowska-Stolarska et al., 2008; Louten et al., 2011). Por otra parte, también se ha reportado que IL-33 es capaz de inducir respuestas pro inflamatorias asociadas a perfiles Th1 y Th17 en modelos de encefalomiелitis aguda experimental (Li et al., 2012b), artritis reumatoide (Palmer et al., 2009; Xu et al., 2008) y asma inducida (Cho et al., 2012).

Adicionalmente, se ha descrito que la administración exógena de IL-33 promueve un estado de tolerancia inmunológica, a través de la expansión de linfocitos Tregs Foxp3+ en modelos *in vivo* de trasplante alogénico de corazón (Brunner et al., 2011; Turnquist et al., 2011) y de piel (Gajardo et al., 2015), lo que finalmente se ve reflejado en un aumento de la sobrevida del injerto en ambos modelos.

A la fecha, no existen reportes que describan la acción de IL-33 en MSCs, ni los efectos en la modulación inmune de linfocitos T mediada por MSCs tratadas con esta citoquina. Por este motivo, como miembro de la familia de citoquinas de IL-1 (citoquinas característicamente pro-inflamatorias) y, por la evidencia mencionada anteriormente, resulta de particular interés estudiar la acción conjunta de IL-33 e IFN- γ en el licenciamiento de las MSCs, y el efecto en la plasticidad de éstas al inducir un fenotipo pro- o anti-inflamatorio. Para ello, se caracterizará el efecto conjunto de ambas citoquinas *in vitro* en el fenotipo y función de MSCs, tanto a nivel de mRNA como de proteína, de diversas moléculas ya descritas que participan en su función inmunomoduladora. Posteriormente evaluará su efecto sobre el fenotipo de poblaciones de linfocitos T CD4+ tanto en co-cultivos *in vitro*, como *in vivo* en un modelo murino de trasplante de piel.

4 HIPÓTESIS

MSCs tratadas con IFN- γ e IL-33 modifican su fenotipo y función inmunomoduladora, afectando la polarización de linfocitos T CD4+.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto conjunto del tratamiento con IFN- γ e IL-33 en el fenotipo y función de MSCs, determinando, además, el efecto de MSCs tratadas sobre poblaciones de linfocitos T CD4+.

5.2 Objetivos Específicos

- 5.2.1 Caracterizar fenotípica y funcionalmente MSCs cultivadas *in vitro* en presencia de IFN- γ y/o IL-33.
- 5.2.2 Analizar el fenotipo de linfocitos T CD4+ co-cultivados con MSCs pre-estimuladas con IFN- γ y/o IL-33.
- 5.2.3 Evaluar el efecto modulador de MSCs pre-tratadas con IFN- γ e IL-33 en un modelo murino de trasplante de piel.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ratones

Se usaron ratones de 6-8 semanas de edad, de las cepas C57Bl/6 (*wt*), BALB/c y reporteros Foxp3^{GFP} (con background C57Bl/6, y marcadores congénicos CD45.1 [o Ly5.2]). Los ratones reporteros Foxp3^{GFP} (Haribhai et al., 2007) fueron donados por el Dr. J. Rodrigo Mora (Harvard Medical School, Cambridge, MA, USA). Los ratones F1 (H2^{b/d}) se generaron a partir de la cruce de ratones C57Bl/6 (H2^b) con ratones BALB/c (H2^d). Los animales (reporteros Foxp3^{GFP}) fueron mantenidos en las instalaciones del Bioterio Central de la Facultad de Medicina, o en el Bioterio de Cells for Cells, ambos ubicados en la Universidad de los Andes, bajo los protocolos aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de los Andes.

6.2 Líneas celulares

Células mesenquimales (MSCs) derivadas de médula ósea de ratones C57Bl/6 entre pasajes 9-16 fueron usadas como control para los experimentos de caracterización descritos a continuación (MSCs *wt*). Estas células fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Rodrigo Fuentealba (Universidad de los Andes, Santiago, Chile). Adicionalmente, para todos los cultivos *in vitro* y ensayos *in vivo*, se trabajó con células reporteras MSCs/RFP¹ derivadas de médula ósea (Cyagen, CA, EEUU), las cuales expresan de forma constitutiva la proteína fluorescente roja (RFP), estas células fueron usadas entre pasajes 10-16.

¹ <http://www.cyagen.com/us/en/product/c57bl6-mesenchymal-stem-cells-rfp.html>

6.3 Obtención de suspensiones celulares

Para la obtención de células inmunes se extrajeron los ganglios linfáticos (GLd) drenantes del injerto de ratones C57Bl/6 trasplantados, y los bazos de ratones reporteros Foxp3^{GFP}, empleando material quirúrgico adecuado. Los órganos fueron macerados y disgregados utilizando *cell strainers* (BD Bioscience, EEUU) hasta obtener suspensiones celulares.

6.4 Medio de cultivo

Las MSCs fueron cultivadas en medio mínimo esencial alfa (α MEM, Corning, MA, EEUU) completo (α MEMc), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (SFB, Gibco, BRL, EEUU), 1% de antibióticos [100 U/ml penicilina + 10g/ml estreptomycin (Gibco)] y 2 mM de L-glutamina (Gibco).

Las células obtenidas de GL fueron cultivadas en medio RPMI completo (RPMIc) compuesto por: RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10% de SFB, 10mM HEPES (Gibco), 1% de antibióticos [100 U/ml penicilina + 100 μ g/ml estreptomycin (Gibco)], y 50 μ M de 2- β -mercaptoetanol (SigmaAldrich, EEUU).

6.5 Cultivos in vitro

Para los cultivos de caracterización de MSCs, se sembraron 2×10^5 células en placas de 6 pozos (día -1) y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ atmosférico, hasta que éstas se adhirieran al plástico e iniciaran su proliferación. Al día 0, las células fueron estimuladas con 20 ó 40 ng/mL de IFN- γ recombinante murina (Peprotech, NJ, EEUU); 20 ó 40 ng/mL de IL-33 recombinante murina (Peprotech) o una combinación de ambas citoquinas a una concentración final de 20 ng/mL cada una; además, como control, un pozo sin citoquinas. La estimulación se realizó por 24 horas, luego, se rescató el

sobrenadante de cada una de las condiciones y se almacenó a -20°C para posteriores análisis de cuantificación de citoquinas. Cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia, éstas fueron desprendidas de la placa usando tripsina (0,05%) + EDTA (0,53 mM), 1X (Corning). Las células en suspensión fueron lavadas con PBS 1X para remover trazas de tripsina; posteriormente, una fracción de las células fue separada para análisis fenotípico por citometría de flujo, mientras que a la otra fracción se le extrajo su RNA total, como es descrito más adelante.

Para los co-cultivos de MSCs con linfocitos T CD4^{+} , previamente se sembraron, expandieron y estimularon MSCs con $\text{IFN-}\gamma$ (20 ng/mL), IL-33 (20 ng/mL) y una combinación de ambas citoquinas (20 ng/mL cada una) por 24 horas, tras este tiempo, las células fueron despegadas usando tripsina según lo descrito anteriormente. Posteriormente, éstas fueron tratadas con 50 $\mu\text{g/mL}$ de Mitomicina C (SigmaAldrich, EEUU) durante 20 minutos para inhibir la proliferación celular, y luego de lavar las células para eliminar los restos del compuesto, se sembraron $2,5 \times 10^4$ MSCs en placas de 24 pozos. Paralelamente, los linfocitos T CD4^{+} fueron obtenidos a partir de suspensiones celulares derivadas de bazo de ratones reporteros $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}$, las cuales fueron purificadas mediante selección negativa usando el kit CD4^{+} T Cell Isolation Kit , mouse (Miltenyi Biotec, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las células T CD4^{+} purificadas fueron puestas en la placa con MSCs a una razón de 1:10 (MSC:CD4+) en medio αMEM y finalmente se activó a los linfocitos con 1 $\mu\text{g/mL}$ de Ionomicina (SigmaAldrich) y 50 ng/mL de PMA (SigmaAldrich), conservando condiciones sin activación como control. El cultivo se mantuvo a 37°C , 5% CO_2 atmosférico, por 3 días, momento en el cual se rescataron las células presentes en cada condición para un análisis fenotípico por citometría de flujo.

6.6 Citometría de Flujo

Los análisis fenotípicos de MSCs se realizaron mediante citometría de flujo utilizando los anticuerpos contra las siguientes moléculas murinas: CD11b (clon M1/70), CD29 (clon HA2/5), CD44 (clon IM7), CD45 (clon I3/2.3), CD73 (clon TY/11.8), CD117 (clon 2B8) y MHC-II (clon M5/114.15.2), todos ellos obtenidos desde Biolegend (San Diego, CA, EEUU). Para el análisis fenotípico de linfocitos T CD4⁺, se emplearon los anticuerpos: CD4 (clon RM4-5), CD8 (clon53-6.7), CD25 (clon PC61), IL-17 (clon TC11-18H10.1) todos Biolegend (San Diego, CA, EEUU) y anti Foxp3 (clon FJK-16S) de eBioscience (San Diego, CA, EEUU). Los anticuerpos se encontraban acoplados a los fluorocromos FITC, PE, PerCP, PE-Cy5.5, PE-Cy7, APC o Pacific Blue. Para la tinción intracelular de citoquinas, las células fueron previamente estimuladas con 50 ng/mL de PMA y 1 µg/mL de Ionomicina por 5 horas, en presencia de 3 µg/mL de Brefeldina-A. La tinción intracelular de Foxp3 se realizó usando el kit Fixation/Permeabilization Staining kit (eBioscience) según instrucciones del proveedor. La adquisición de los datos se realizó en el citómetro de flujo FACSCanto II™ (BD Bioscience, EEUU), usando el software BD FACSDiva™ (BD Biosciences, EEUU). Finalmente, el análisis de los datos se llevó a cabo con el software FlowJo (TreeStar, Canton, OH, EEUU).

6.7 Test de ELISA

Se analizó los sobrenadantes de los cultivos celulares mediante ensayo de ELISA tipo *sandwich*, con el fin de cuantificar las citoquinas TGF-β, IFN-γ, IL-6, IL-10 e IL-17 presentes en ellos. Para este propósito se utilizaron anticuerpos purificados y biotinilados para cada una de las citoquinas mencionadas (Biolegend, San Diego, CA, EEUU), además de citoquinas recombinantes de ratón para la elaboración de las

curvas estándar (Peprotech, NJ, EEUU). La medición de la absorbancia se realizó a 450 nm en el equipo Infinite F50 (Tecan, Männedorf, Suiza), con el software Magellan (Tecan).

6.8 Detección de NO

Para la cuantificación indirecta de NO en medio condicionado de cultivos de MSCs, bajo los distintos tratamientos, se utilizó el Reactivo Modificado de Griess (Sigma), según instrucciones del proveedor. Brevemente, el nitrato (NO_3) generado como compuesto químico secundario en la producción de NO por las MSCs, es convertido en nitrito (NO_2) por el Reactivo Modificado de Griess. Finalmente, la medición de la absorbancia se realizó a 550 nm en el equipo Infinite F50 (Tecan, Männedorf, Suiza), con el software Magellan (Tecan).

6.9 qRT-PCR

Luego de desprender las MSCs con tripsina, una fracción de ellas fue apartada para extraer el RNA total usando el kit de extracción E.Z.N.A. Total RNA kit y siguiendo las instrucciones del proveedor (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, EEUU). El cDNA fue preparado usando el kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). El nivel de expresión de los genes iNOS, Arg1, MMP2, MMP9, ST2, IL-33 y GAPDH (gen *housekeeping*) fue medido usando el sistema Mx3000P qPCR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU), utilizando el kit 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) como detector fluorescente. Los partidores utilizados para el análisis de cada uno de los genes se describen en la **Tabla 1**, los que fueron obtenidos desde IDT DNA (Coralville, Iowa, EEUU). El análisis fue realizado utilizando el método del delta- delta ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), empleando el gen de la gliceraldehído 3-fofato deshidrogenasa (GAPDH) como gen *housekeeping*.

Tabla I. Lista de genes medidos por qRT-PCR y secuencias de partidores utilizados. En la tabla se detalla la secuencia de partidores *Forward* y *Reverse* usados para los análisis de expresión génica mediante qRT-PCR de los distintos genes en estudio.

Gen	Forward	Reverse
Arg-1	TTT TAG GGT TAC GGC CGG TG	CCT CGA GGC TGT CCT TTT GA
iNOS	CCT TGG TGA AGG GAC TGA GC	CAA CGT TCT CCG TTC TCT TGC
IL-17RA	AAA TAC CAC AGT TCC CAA GCC	TGG GCG AAC TTT AGG ACC AC
IL-33	AAC AGG CCT TCT TCG TCC TT	GGA CCA GGG CTT CGC CT
GAPDH	CCA GGT TGT CTC CTG CGA CTT	CCT GTT GCT GTA GCC GTA TTC A
MMP2	ATG GCA AGT ATG GCT TCT GC	GAA GGG GAA GAC ACA TGG GG
MMP9	TCT AGG CCC AGA GGT AAC CC	CAC TGC AGG AGG TCG TAG G
ST2	GTG ATA GTC TTA AAA GTG TTC TGG	TCA AAA GTG TTT CAG GTC TAA GCA

6.10 Trasplante de piel y tratamiento.

El día previo a la cirugía (día -1) dos grupos de ratones fueron inyectados vía intraperitoneal con 1×10^6 MSCs. El primero de ellos, (desde ahora alogénico^{MSC(2X)}), recibió células pre- tratadas con IFN- γ e IL-33 (20 ng/ml cada una), tal como fue descrito anteriormente. El segundo, (desde ahora, alogénico^{MSC}), recibió células sin tratamiento, como control. Al día siguiente (día 0), piel de cola ($\sim 1 \text{ cm}^2$) de ratones donantes C57BL/6 (singénico) o F1 (alogénico) fue trasplantada en el área dorsal de ratones recipientes C57BL/6, los cuales se encontraban anestesiados con una solución de 27% ketamina (Ketamina) y 3% xilazina (Xylavet, ambos de Alfasan Lab, Woerden, Holanda), usando 100 μL por 20 g de peso corporal mediante inyección intraperitoneal. El estado de los injertos fue monitoreado tres veces por semana, considerándose rechazados cuando un 80% del injerto se encontraba necrótico o había sido eliminado. Al día 13 post-cirugía se colectaron los GLds para preparación de suspensiones celulares, según lo descrito anteriormente, las cuales fueron caracterizadas por citometría de flujo y re-estimuladas *ex vivo*.

6.11 Experimentos de re-estimulación *ex vivo*

La suspensión celular obtenida a partir de los GLDs de animales trasplantados fue llevada a una concentración de 1×10^6 células/mL en medio RPMIc y sembradas en placas de 24 pozos y activadas policlonalmente con 5 μ g/mL de anti-CD3 (clon 2c11; Biolegend, EEUU) al día 0. Después de 72 horas, los sobrenadantes fueron colectados y almacenados a -80°C para posteriores análisis por test de ELISA.

6.12 Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados usando un test t de Student no pareado (o test de Mann-Whitney) de 'dos colas'. Se consideró $p < 0.05$ como la significancia estadística. El análisis se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism Inc, CA, EEUU).

7 RESULTADOS

7.1 Caracterización fenotípica de MSCs

Como se mencionó anteriormente, las MSCs son células adherentes para las cuales no se ha descrito un marcador único y específico que permita distinguirlas, sin embargo, para el caso de MSCs murinas, se utiliza como consenso que éstas son positivas para los marcadores CD29, CD44 y CD73 y negativas para marcadores de linaje hematopoyéticos como CD11b, CD45 o CD117 (Dominici et al., 2006; Keating, 2012).

Aquí, se emplearon MSCs derivadas de médula ósea (MO) de ratón, las cuales expresan de forma constitutiva la proteína fluorescente roja RFP. Para verificar que no existieran diferencias en el fenotipo de estas células reporteras con relación a las MO-MSCs *wt*, se comparó la expresión de marcadores ya mencionados en MSCs murinas *wt* y reporteras mediante citometría de flujo. Adicionalmente, se incluyó el análisis tras la estimulación por 24 h con IFN- γ e IL-33 para evaluar el efecto que puedan tener en el fenotipo de las MSCs. Como se muestra en la **Figura 1**, el tratamiento con dichas citoquinas no afectó la expresión de marcadores canónicos de MSCs en las células reporteras. Resultados similares fueron observados en MSCs *wt* (**Figura Suplementaria 1**). Así mismo, en ambas líneas, >90% de las células mostraron ser positivas para los marcadores CD29, CD44 y CD73 y negativas para los marcadores de origen hematopoyético como CD11b, CD45 y CD117. Para efectos técnicos de los resultados descritos a lo largo de este trabajo, se consideró la expresión de CD44, CD45 y RFP para discriminar a las MSCs en los análisis que incluyen citometría de flujo.

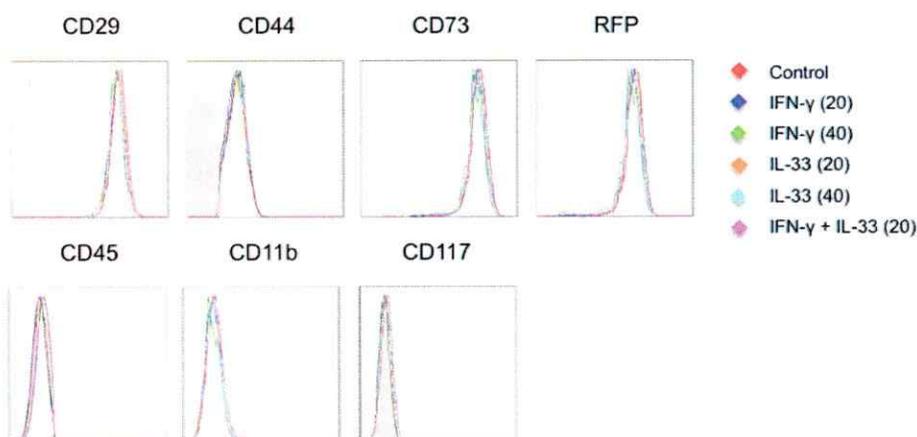


Figura 1. Expresión de marcadores de superficie canónicos en MSC tratadas diferencialmente con IFN- γ e IL-33. MSCs-RFP⁺ derivadas de médula ósea de ratón fueron cultivadas en medio α MEM completo, suplementado con 20 (azul) o 40 (verde) ng/ml de IFN- γ , o con 20 (naranja) o 40 (celeste) ng/ml de IL-33, o ambas (rosa) a 20 ng/mL por 24 horas. Histogramas representativos de la expresión de marcadores de superficie característicos analizados por citometría de flujo. n=8 experimentos independientes.

Se ha descrito que la estimulación con altas concentraciones de IFN- γ aumenta la expresión de MHC-II en la superficie de las MSCs (Krampera et al., 2013; Le Blanc et al., 2003), e incluso se ha sugerido que éstas podrían actuar como CPA bajo ciertas condiciones (Chan et al., 2006; Stagg et al., 2006). Por este motivo, se evaluó la expresión de MHC-II luego de la estimulación con las citoquinas ya mencionadas. Tal como se observa en la **Figura 2**, aquellos tratamientos que incluyen IFN- γ , aumentan de forma significativa la expresión de MHC-II en la superficie de MSC, tanto en la frecuencia de células CD45-CD44⁺MHC-II⁺, como en la cantidad de dicha molécula presente en la superficie, medida por la intensidad de fluorescencia media (MFI). Estos resultados no se ven alterados por la presencia de IL-33 en el tratamiento que incluye la combinación de ambas citoquinas. Resultados similares se observaron en MSCs *wt* (**Figura Suplementaria 2**).

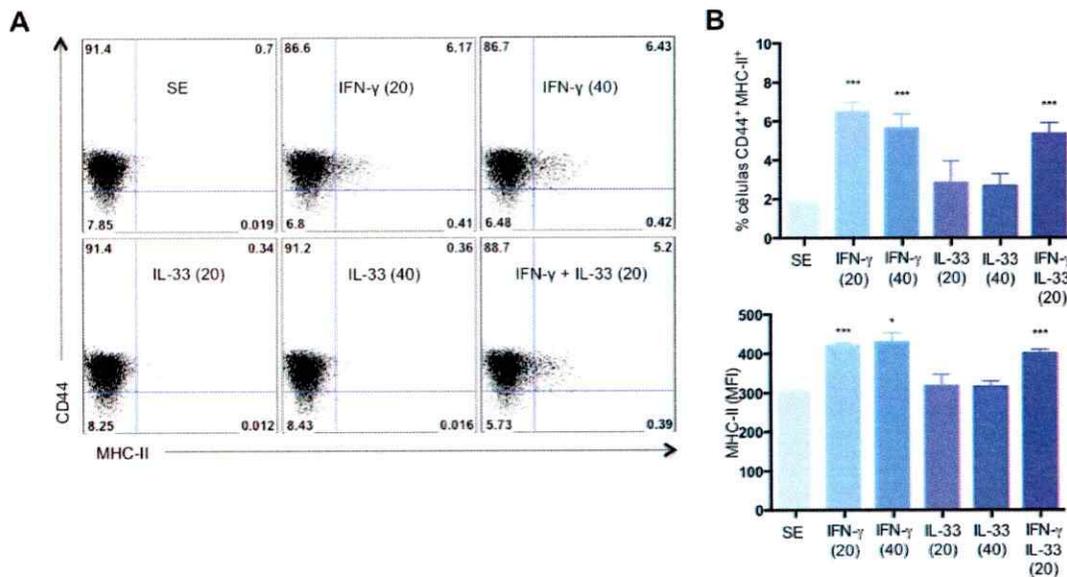


Figura 2. IL-33 no altera la expresión de MHC-II inducida por en IFN- γ en MSCs. (A) Células MSCs fueron tratadas diferencialmente como se explica en la *Figura 1*. La expresión de MHC-II fue estudiada por citometría de flujo bajo los distintos tratamientos, como lo indica el panel representativo de gráficos tipo *dot plot*. Todas las células analizadas son positivas para RFP y CD44 y negativas para CD45. (B) Tanto la frecuencia de células MSCs MHC-II⁺ (arriba), como la intensidad media de fluorescencia (MFI) (abajo) de la expresión de MHC-II fueron graficadas para cada condición. Las barras representan el error estándar de la media (SEM), la significancia estadística fue calculada mediante el análisis de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ versus condición control sin estimular (SE). N= 8 experimentos independientes.

7.2 IFN- γ junto a IL-33 induce la expresión de moléculas inmunomoduladoras en MSCs.

Nuestro grupo ha reportado previamente que IL-33 posee una función inmunomoduladora al promover la diferenciación de linfocitos Tregs *in vivo* (Gajardo et al., 2015). Basados en esta observación y en los diversos trabajos donde se describe el efecto regulador de esta citoquina en otros tipos celulares (Molofsky et al., 2015; Rivellese et al., 2015), además del hecho de ser una citoquina de la familia de la IL-1 (Schmitz et al., 2005), se decidió evaluar si el tratamiento de MSCs con IL-33 tendría un efecto en la producción de factores regulatorios en MSCs. Cuando las MSCs son expuestas a un estímulo pro-inflamatorio (como por ejemplo, IFN- γ solo o en conjunto



son TNF- α o IL-1 β), éstas responden liberando factores solubles al medio o promoviendo la expresión de enzimas capaces de modular la respuesta de distintas células del sistema inmune. En esta línea, se ha descrito que MSCs tratadas con IFN- γ aumentan la expresión de iNOS (Ren et al., 2008), enzima encargada de la producción de NO, que es capaz de afectar la proliferación de linfocitos T y, en algunos casos, inducir la diferenciación de Tregs (Niedbala et al., 2006; Sato et al., 2007).

Se ha descrito que en macrófagos existe una relación inversa entre la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo de la arginina Arg1 e iNOS (Rath et al., 2014). Mientras que Arg1 (enzima que hidroliza la arginina en ornitina y urea) se expresa en macrófagos M2 asociados a un perfil antiinflamatorio, iNOS (enzima que metaboliza arginina en NO y citrulina) se expresa en macrófagos M1, asociados a un perfil pro-inflamatorio. Por este motivo, resultó de interés analizar si existía una expresión diferencial de ambas enzimas en MSC pre-estimuladas, haciendo una analogía con lo ocurrido en macrófagos. En la **Figura 3**, se observa que los niveles de expresión de Arg1 disminuyen en todos los tratamientos en comparación a la condición basal sin estímulo (línea punteada). Por otra parte, el tratamiento de MSCs con sólo IFN- γ no modifica los niveles de expresión de iNOS, sin embargo IL-33 estimula la expresión de esta enzima de manera dramática a 40 ng/mL. Interesantemente, la combinación de IFN- γ e IL-33 induce un aumento significativo en la expresión de iNOS.

En el año 2009, un estudio por Ding y colaboradores describió un nuevo mecanismo de regulación por parte de las MSCs, el que involucra la producción de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP2 y MMP9) y su efecto en la activación de linfocitos T (Ding et al., 2009). En aquel trabajo se demuestra que la presencia del marcador de

activación CD25 (cadena α del receptor de IL-2) en la membrana de los linfocitos T es regulada a través de la acción de las metaloproteinasas 2 y 9, las cuales clivan a CD25 provocando la deficiencia en la captación de IL-2, resultando en linfocitos T incapaces de proliferar y ejecutar su función efectora. Por lo tanto, en este trabajo se incluyó el análisis de la expresión de MMP2 y MMP9, observando que IL-33 sólo induciría la expresión de MMP9, lo que sería anulado en presencia de IFN- γ , tal como se aprecia en la **Figura 3**.

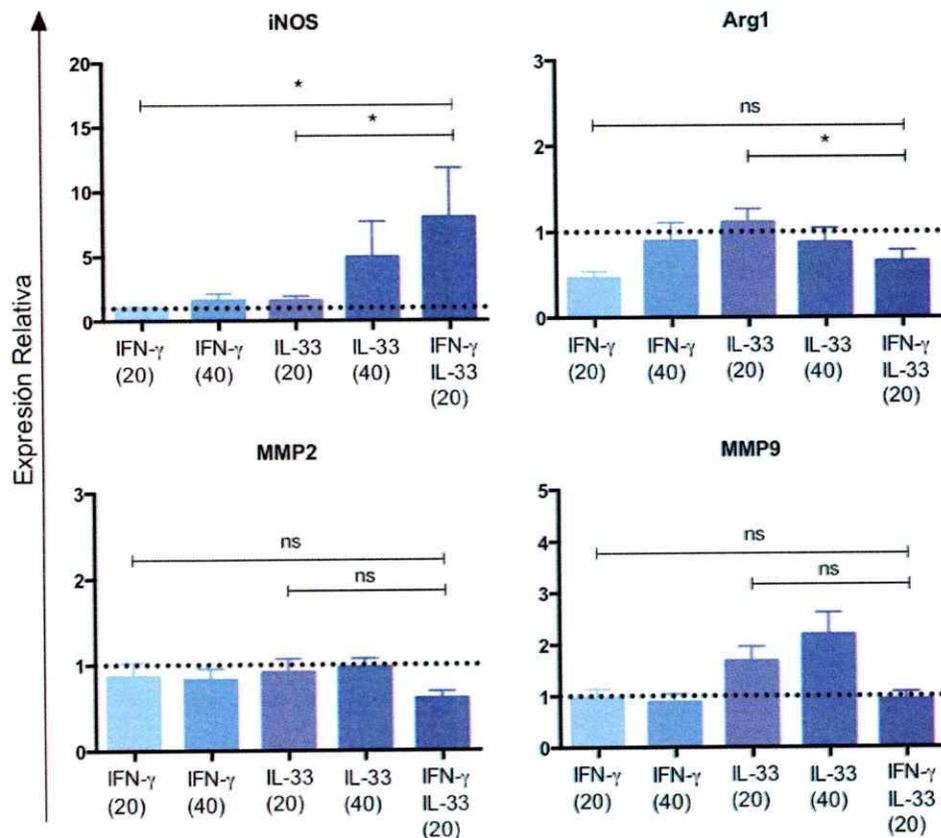


Figura 3. IL-33 regula la expresión de algunos genes moduladores en MSCs. La expresión relativa de los genes iNOS, Arg1, MMP2 y MMP9, relacionados con la función supresora de las MSCs, fue medida por qRT-PCR. Las células fueron tratadas como se explicó anteriormente, y el RNA total fue aislado para la consiguiente síntesis de cDNA. Los niveles de expresión fueron calculados mediante el método del delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), considerando como gen *housekeeping* a GAPDH. En los gráficos, la condición basal sin estimular es representada mediante una línea punteada. Las barras representan el error estándar de la media (SEM), la significancia estadística fue calculada mediante el análisis de Mann-Whitney. ns: no significativo; * $p < 0,05$. $n = 8$ experimentos independientes.

Por otra parte, se analizó el sobrenadante de los cultivos de células estimuladas para cuantificar, mediante test de ELISA, distintas citoquinas presentes en él. En la **Figura 4** (izquierda) se observa que IL-33 induce un aumento significativo en la secreción de IL-6, tanto por sobre los niveles basales (condición sin estimular), como en aquellos tratamientos que sólo reciben IFN- γ . Así mismo, los tratamientos que incluyen bajas dosis de IL-33 (20 ng/mL), inducen un aumento significativo en la secreción de TGF- β (**Figura 4**, derecha), efecto que es aminorado con la administración conjunta de IFN- γ a la misma concentración, pero que sigue representando un aumento significativo con relación a la condición basal sin estímulo. Este mismo ensayo fue realizado para medir la concentración de IL-10 e IL-17 en los sobrenadantes de las células tratadas, sin embargo, la presencia de estas citoquinas no fue detectada con este método.

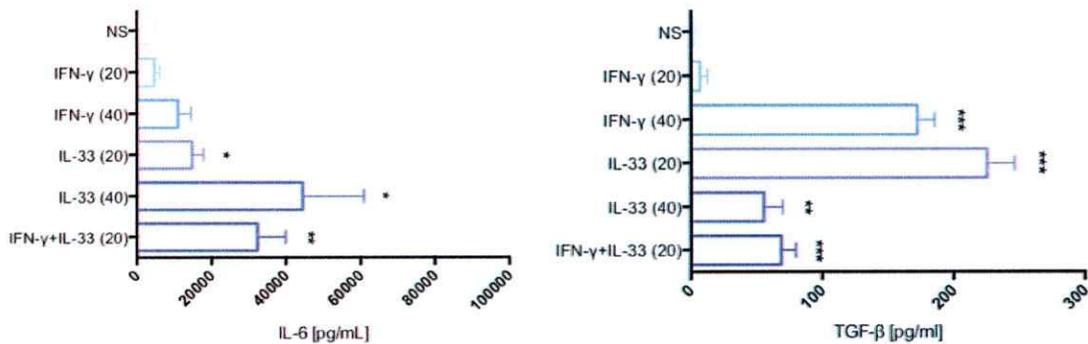


Figura 4. IL-33 promueve la secreción de IL-6 y TGF- β en MSCs. Patrón de secreción de IL-6 (izquierda) y TGF- β (derecha) presentes en los sobrenadantes de células MSCs estimuladas diferencialmente, como indican los gráficos. Las citoquinas fueron cuantificadas a través del test de ELISA. No se detectó presencia de IL-10 ni IL-17. Las barras representan el error estándar de la media (SEM), la significancia estadística fue calculada mediante el análisis de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus condición sin estimular (SE). $n = 8$ experimentos independientes.

7.3 MSCs tratadas con IFN- γ e IL-33 afectan la proporción y fenotipo de linfocitos T CD4+ *in vitro*.

Para evaluar el efecto *in vitro* de las MSCs pre-estimuladas sobre linfocitos T CD4+, se realizaron co-cultivos, los que se mantuvieron durante 3 días en presencia de PMA e Ionomicina. Al término de los co-cultivos, se recuperaron las células para su análisis a través de citometría de flujo. Los datos indican que, si bien no hay diferencias significativas, las MSCs estimuladas con IFN- γ disminuirían la frecuencia de linfocitos T CD4+ activados medidos por la frecuencia de CD25 (Figura 5, izquierda). Alternativamente, la presencia de IL-33 reduce el porcentaje de linfocitos T CD4+ CD25+Foxp3+ reguladores (Figura 5, derecha).

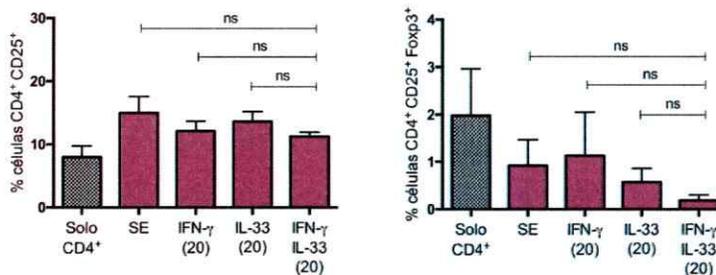


Figura 5. MSCs pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33 afectan levemente la frecuencia y fenotipo de linfocitos T CD4+ *in vitro*. MSCs pre-estimuladas con los tratamientos de citoquinas (IFN- γ y/o IL-33) durante 24 horas, fueron co-cultivadas con linfocitos T CD4+ (reporteros para Foxp3) a una razón 1:10 (MSC:CD4+T) durante 3 días. En los co-cultivos, los linfocitos fueron activados usando PMA (50 ng/mL) e Ionomicina (1 μ g/mL). Los gráficos muestran las frecuencias de linfocitos T CD4+CD25+ (izquierda) y linfocitos T CD4+CD25+Foxp3+ (derecha). Las barras representan el error estándar de la media (SEM), la significancia estadística fue calculada mediante el análisis de Mann-Whitney. ns: no significativo. n= 4 experimentos independientes.

7.4 Rol de MSCs moduladas con IFN- γ e IL-33 en la respuesta inmune a trasplante de piel

Como se mencionó inicialmente, las MSCs han sido probadas en distintos modelos de trasplante de órganos sólidos, en algunos casos, obteniendo resultados exitosos que promueven la sobrevivencia del injerto (Bartholomew et al., 2002; Casiraghi et al., 2008; Casiraghi et al., 2012; Ding et al., 2009); sin embargo, en otros casos se presentan resultados poco favorables (Koch et al., 2013; Mielcarek et al., 2011), lo cual en parte se atribuye a la diversidad de protocolos utilizados. Para evaluar el efecto *in vivo* de las MSCs pre-tratadas en respuesta a aloinjerto, se empleó un modelo de trasplante de piel en ratón, el cual ha sido estandarizado por nuestro laboratorio y permite evaluar la dinámica celular durante el rechazo al aloinjerto. Para ello, dos grupos de ratones de la cepa C57BL/6 fueron inyectados el día previo a la cirugía (d-1) con 10^6 células vía intraperitoneal: uno con células pre-estimuladas (Alogénico^{MSC(2x)}) por 24 horas con IFN- γ e IL-33 (20 ng/ml cada una) y otro grupo con células sin estimular (Alogénico^{MSC}). Al día cero (d0), estos ratones fueron trasplantados con injertos de piel alogénicos, y además se agregaron los grupos control con injerto alogénico sin inyección de células (Alogénico) y otro grupo control con injerto de piel singénico sin inyección de células (Singénico), tal como se muestra en la **Figura 6**.

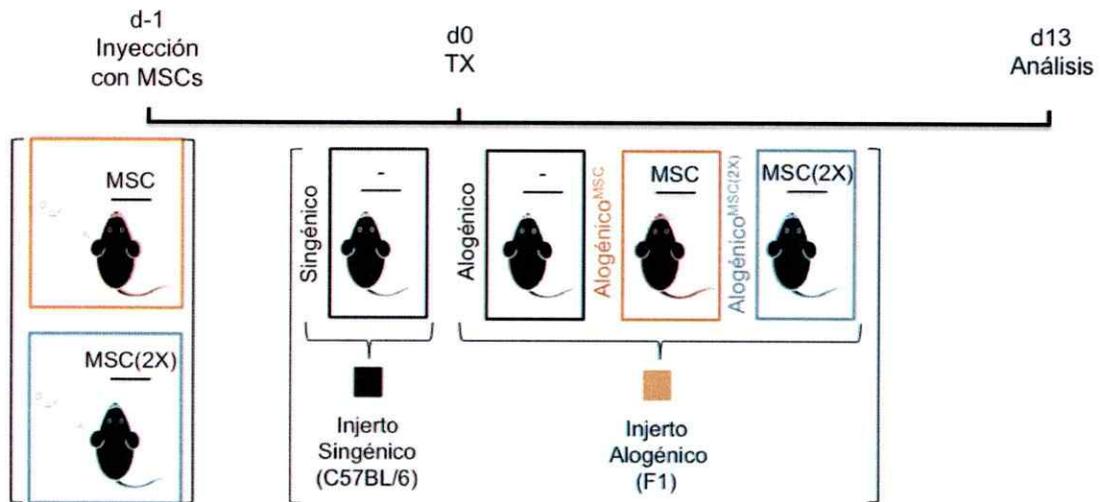


Figura 6. Modelo de trasplante de piel de ratón. El día previo a la cirugía (d-1), ratones C57BL/6 son inyectados intraperitonealmente con 10^6 MSCs sin estimular (MSC) ó pre-tratadas por 24 horas con 20 ng/mL de IFN- γ y 20 ng/mL IL-33 (MSC(2X)). Al día 0 (d0), ambos grupos reciben injertos de piel alogénicos de ratones F1 (C57BL/6 X BALB/c); paralelamente, dos grupos adicionales de ratones C57BL/6 reciben injertos alogénicos ó injertos control singénicos (provenientes de ratones C57BL/6). Trece días después (d13) de la cirugía, los ratones son eutanasiados para obtener suspensiones celulares a partir de los GLds del injerto, las cuales fueron analizadas por citometría de flujo o estimuladas *ex vivo*, para cuantificación de citoquinas.

Al día 13 post-trasplante (d13), los ratones fueron eutanasiados para analizar las poblaciones celulares presentes en GLds. También se registró la sobrevida de los trasplantes, pero aquellos grupos experimentales tratados con las distintas MSC no mostraron resultados concluyentes ya que todos los animales aceptaban los aloinjertos en cierto grado. Debido a esto, diseñamos una estrategia de análisis para así reportar cuantitativamente el efecto del tratamiento con MSC. Para ello, se consideró el segmento de piel trasplantado al inicio como un 100% del total; éste fue dividido en 9 cuadrantes iguales, como se esquematiza en la **Figura 7A**, y en base a esto se determinó qué fracción de estas divisiones aun permanecía en el animal al día 13 post-trasplante. La **Figura 7B** muestra el estado representativo de los injertos al momento del análisis. Como se aprecia en la **Figura 7C**, los ratones del grupo Alogénico^{MSC} presentan un mayor porcentaje de tejido remanente, lo cual es congruente con lo

reportado en la literatura. Sin embargo, los ratones del grupo Alogénico^{MSC(2x)} presentan un porcentaje mucho menor de tejido remanente, comparable a la de los ratones de la condición Alogénico.

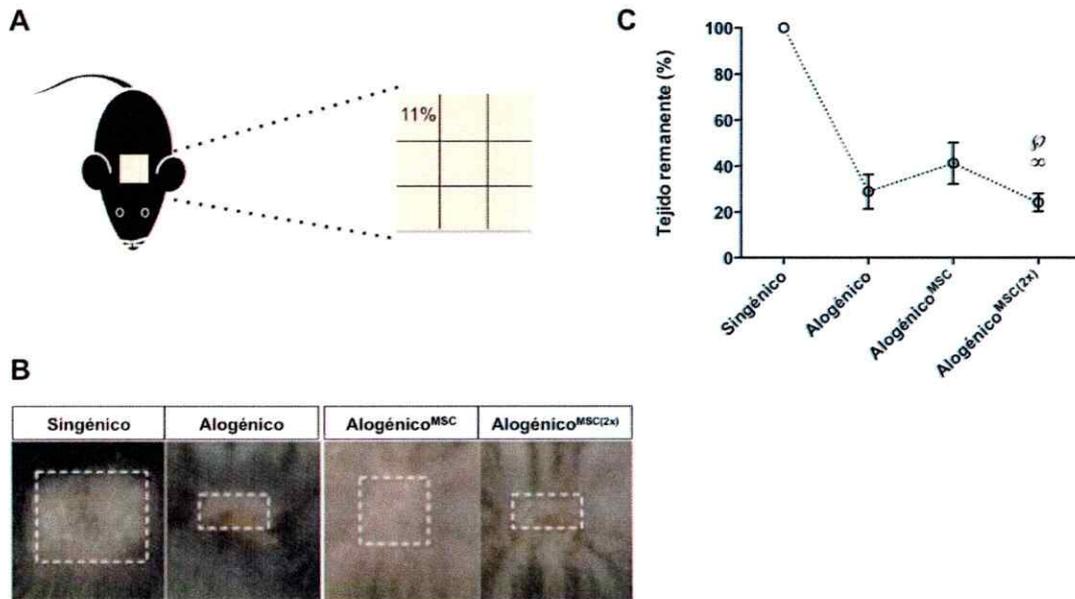


Figura 7. Ratones tratados con MSC pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33 no aceptan completamente el injerto. (A) Para determinar el porcentaje de tejido remanente al día 13 post-trasplante, se consideró el injerto inicial ($\sim 1\text{cm}^2$), dividido en 9 cuadrantes, como un 100% del total del injerto. Al momento del análisis, se evaluó el remanente del injerto considerando el porcentaje de tejido que aun permanecía en base a estas divisiones. (B) Estado representativo de los injertos en ratones de las distintas condiciones en estudio al día 13 post-trasplante (C) Porcentaje de tejido remanente al día 13 post-cirugía, en ratones trasplantados. Las barras representan el error estándar de la media (SEM), la significancia estadística fue calculada mediante el análisis de Mann-Whitney. φ : condición Alogénico versus Alogénico^{MSC(2x)}, $p > 0,05$; ∞ : condición Alogénico^{MSC} versus Alogénico^{MSC(2x)}, $p > 0,05$. Datos de 3 experimentos independientes, con $n = 8-10$ animales por grupo.

De forma paralela, las poblaciones celulares obtenidas de GLDs fueron analizadas por citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 8**, se observa una disminución estadísticamente significativa en el número total de Tregs y células T efectoras CD4+ y CD8+ presentes en GLDs al comparar las condiciones alogénico versus alogénico^{MSC(2x)}, lo que se condice con el número total de células presentes en GLDs (**Figura suplementaria 5**) en donde se observa la misma tendencia. No se

observó un cambio estadísticamente significativo en la frecuencia de dichas poblaciones en respuesta a los distintos tratamientos (**Figura suplementaria 6**). Al comparar la razón entre Tregs y Teff CD4+ (razón Tregs/Teff) se observa una disminución estadísticamente significativa en la condición Alogénico^{MSC(2x)} versus alogénico sin tratar (**Figura Suplementaria 7**), lo que sugiere que en los animales con injerto alogénico tratados con MSC^(2X) hay un enriquecimiento de células T CD4+ efectoras y una disminución en la población de células Tregs.

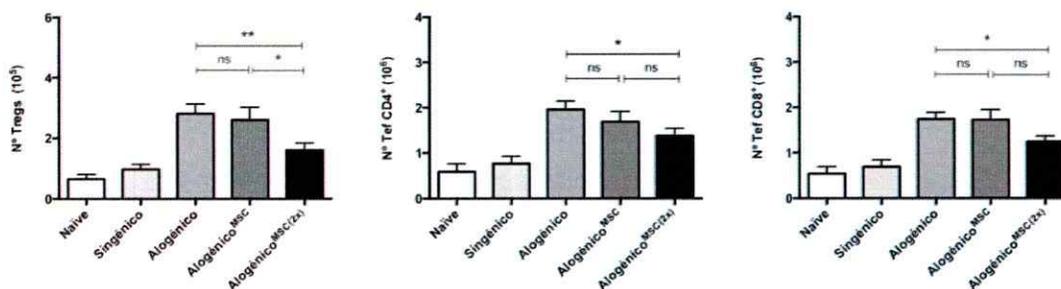


Figura 8. MSCs pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33 disminuyen número total de poblaciones de linfocitos en GLDs. Número de linfocitos T reguladores (CD8⁻ CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) (izquierda); linfocitos T CD4⁺ efectoras (CD8⁻ CD4⁺ Foxp3⁻) (centro); y linfocitos T CD8⁺ efectoras (CD8⁺ CD4⁻ Foxp3⁻) (derecha). Las barras representan el error estándar de la media (SEM), la significancia estadística fue calculada mediante el análisis de Mann-Whitney. * p<0,05; ns: no significativo. Datos de 4 experimentos independientes, con n= 2-5 animales por grupo.

En un experimento independiente, se midió por citometría de flujo la presencia de IL-17A intracelular en poblaciones de linfocitos T CD4+. Como se muestra en la **Figura 9A**, la condición Alogénico^{MSC(2x)} presenta un aumento en la frecuencia de células IL-17A+, aunque éste no alcanza a ser estadísticamente significativo. Por su parte, dentro de ésta población T CD4+ se analizó la expresión del factor de transcripción maestro de Tregs, Foxp3 (**Figura 9B**), encontrándose que aquellos

animales que recibieron MSCs pre-tratadas, presentan un aumento en la frecuencia de células que expresan conjuntamente IL-17A y Foxp3.

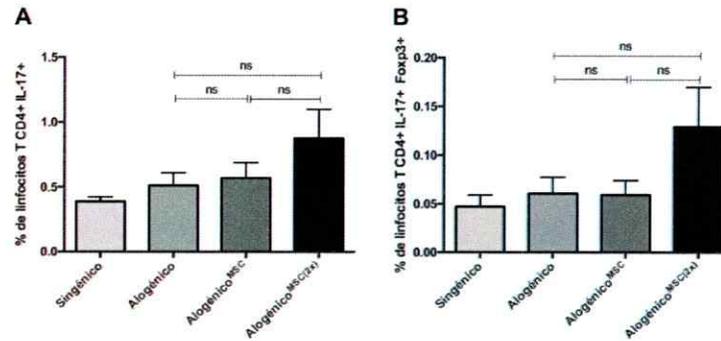


Figura 9. Animales trasplantados y tratados con MSCs pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33 presentan un aumento en la frecuencia de linfocitos CD4+ IL-17A+ en GLDs. (A) Frecuencia de células CD4+ IL-17A+ (C) Frecuencia de células CD4+ IL17+ Foxp3+. Las barras representan el error estándar de la media (SEM), la significancia estadística fue calculada mediante el análisis de Mann-Withney. ns: no significativo. Datos de un experimento independiente, con n= 2-3 animales por grupo.

Finalmente, se realizó una re-estimulación *ex vivo* de las células provenientes de GLDs durante 72 horas, para medir mediante test de ELISA el patrón de citoquinas presente en el sobrenadante de éstas. En este caso en particular, se analizó la presencia de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-17, ambas descritas como efectoras en el rechazo a trasplante. Adicionalmente se midió la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10.

Los resultados indican que existe producción de ambas citoquinas pro-inflamatorias en animales trasplantados, pero que los animales de la condición Alogénico^{MSC(2X)} presentan una tendencia a la disminución en la producción de IFN- γ (Figura 10A, izquierda), acompañada de un leve aumento en la secreción de IL-17

(Figura 10A, derecha), lo cual se condice con lo descrito en la literatura (Harbour et al., 2015; Liu et al., 2015). Por su parte, al analizar la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (Figura 10B), no se observan diferencias estadísticamente significativas, así como tampoco se logra apreciar alguna tendencia clara que demuestre diferencias entre los tratamientos.

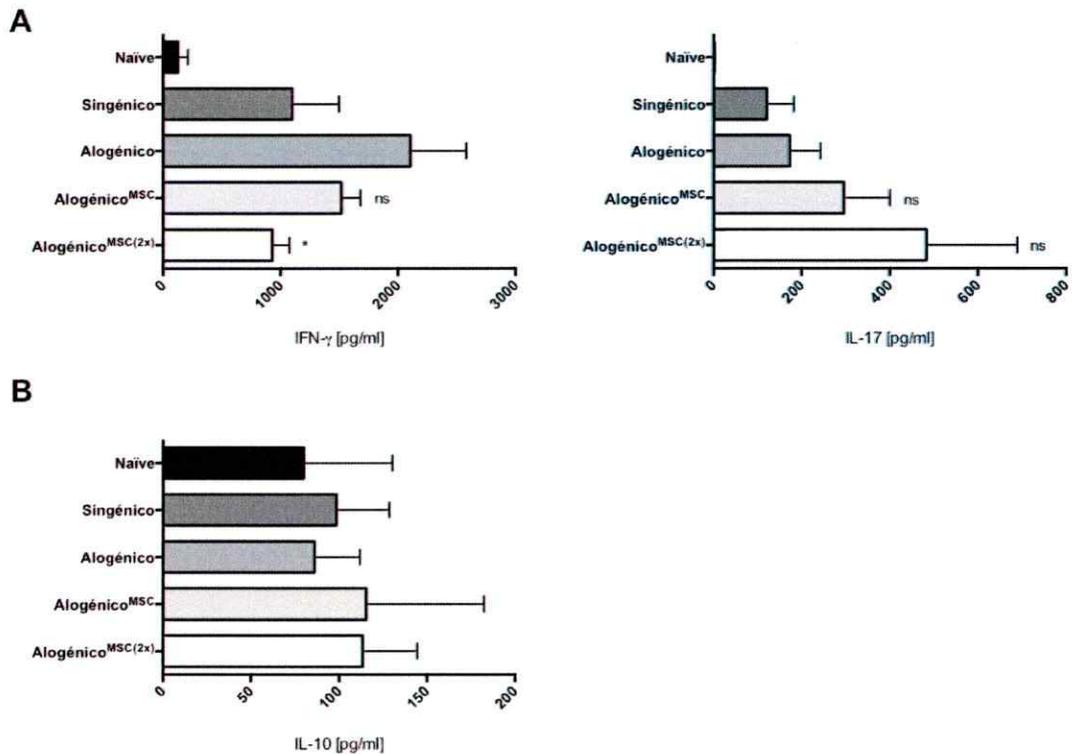


Figura 10. Animales trasplantados y tratados con MSCs pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33 presentan cambios en el patrón de citoquinas producidas en respuesta al aloinjerto. Células provenientes de GLds del injerto fueron activadas policlonalmente *ex vivo* con anti-CD3. Luego de 96 horas de estimulación, se recolectó el sobrenadante para cuantificar las citoquinas presentes mediante test de ELISA. **(A)** Niveles de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ (izquierda) e IL-17 (derecha). **(B)** Niveles de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Las barras representan el error estándar de la media (SEM), la significancia estadística fue calculada mediante el análisis de Mann-Whitney. ns: no significativo; * $p < 0,05$ versus condición alogénica sin tratamiento (Alogénico). Datos de un experimento independiente, con $n = 2-3$ animales por grupo.

8 DISCUSIÓN

En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios demostrando el potencial de las MSCs para modular diversas poblaciones del sistema inmune, mediante un gran número de mecanismos que involucran tanto la liberación de factores solubles al medio, como el contacto directo con la célula blanco. Estos estudios cobran especial importancia pensando en las posibles aplicaciones en el campo clínico, donde se requiera restaurar un estado de tolerancia inmunológica, como por ejemplo, el tratamiento de enfermedades autoinmunes o el rechazo a trasplantes. Se ha demostrado que para que las MSCs puedan desplegar su potencial regulador, requieren de un estímulo pro-inflamatorio. Es por esto, que resulta interesante estudiar el efecto de MSCs pre-moduladas, pensando en una posible terapia en donde puedan ser administradas antes de que los signos clínicos de la enfermedad comiencen a manifestarse.

Como primer objetivo de este trabajo, se realizó una caracterización *in vitro* de MSCs cultivadas en presencia de IFN- γ con IL-33 durante 24 horas, en donde se observó que no existen cambios significativos en la expresión de marcadores característicos de MSCs (**Figura 1**). Como se mencionó al inicio, las MSCs presentan una muy baja expresión de MHC-II en su superficie. Sin embargo, se ha descrito que IFN- γ es capaz de promover la expresión de esta molécula (Krampera et al., 2013; Le Blanc et al., 2003), lo cual se condice con lo observado en el presente estudio: todos los tratamientos que incluyen a IFN- γ aumentan de forma significativa la frecuencia de células MHC-II+ y la cantidad de esta molécula presente en la superficie de la células, evidenciado por aumento en la MFI (**Figura 2**). Los tratamiento que incluyen solo IL-33,

no aumentan de forma significativa la frecuencia de células MHC-II+, y cuando es incluida conjuntamente con IFN- γ , no parece alterar la acción de éste. Esto resulta importante, pensando en la posible capacidad de estas células de actuar como CPAs, afectando por ejemplo, la biología de otras poblaciones celulares como linfocitos T. No obstante, para corroborar dicha hipótesis, se requerirá medir la expresión de moléculas co-estimuladoras (como CD80 o CD86), las cuales son necesarias para una correcta presentación antigénica, al inducir la expresión de proteínas antiapoptóticas y estimular la síntesis de factores de crecimiento y citoquinas que favorecen la proliferación y diferenciación de linfocitos T (Abbas et al, 2012). Una presentación antigénica en ausencia de co-estimulación, conlleva a una falta de respuesta en linfocitos (anergia), o la inducción de apoptosis (Abbas et al, 2012), lo cual podría considerarse como un posible mecanismo mediante el cual estas células estén inhibiendo la respuesta inmune.

Por otra parte, resulta importante evaluar la expresión superficial de MHC-II en las MSCs, debido al posible rechazo celular que estas puedan generar luego de ser administradas. Diversos autores han catalogado a estas células como inmuno-privilegiadas, dada la baja expresión de MHC, tanto clase I como clase II, lo que resultaría en una baja inmunogenicidad al administrarlas alogénicamente. Sin embargo, algunos estudios plantean que la administración *in vivo* de MSCs alogénicas promueve una respuesta inmune en el receptor mediante la generación de anticuerpos alo-reactivos (Badillo et al., 2007) o el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos al sitio de inyección (Grinnemo et al., 2004; Xia et al., 2004), lo que promovería el rechazo de estas células. Se ha planteado también que dicha reacción estaría determinada por el contexto y la capacidad de las MSCs de expresar factores inmunosupresores (Ankrum

et al., 2014); es decir, un ambiente pro-inflamatorio, local o sistémico, permitiría a las MSCs desplegar sus capacidades supresoras o anti-inflamatorias debido al licenciamiento de éstas, lo que a su vez suprimiría la activación de linfocitos o la maduración de CPAs, retrasando o impidiendo su rechazo. En contraposición a ello, si no se logra un correcto licenciamiento, estas células pueden ser reconocidas y destruidas por células inmunes, y los restos de estas células muertas pueden ser procesados y presentados por las CPAs como señales de peligro o DAMPs (Ankrum et al., 2014).

En esta caracterización *in vitro* se evaluó también la expresión de algunas moléculas relacionadas con las propiedades inmunosupresoras de las MSCs. De todas las moléculas analizadas, luego del tratamiento combinado de citoquinas, la única que aumentó significativamente su expresión a nivel de mRNA fue iNOS (**Figura 3**). Sin embargo, esto no se asocia positivamente con la producción de NO medida en el sobrenadante, la cual es mucho menor a lo esperado (**Figura Suplementaria 4**). En 2014, Xu et al. encontraron que TGF- β puede actuar de forma autocrina sobre las MSCs, disminuyendo la expresión de iNOS de manera SMAD3-dependiente, con la consiguiente baja en la producción de NO, afectando la capacidad supresora de las MSCs (Xu et al., 2014). En el presente trabajo, se demostró que el tratamiento con IFN- γ e IL-33 induce una mayor secreción de TGF- β al medio por las MSCs, por lo que la disminución en la producción de NO podría ser explicada en parte por esta inhibición de iNOS.

Las células Tregs, como se ha mencionado anteriormente, son necesarias para mantener la homeostasis inmune, apagando la respuesta de linfocitos T efectores, y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Foxp3, el cual juega un rol crucial para mantener la estabilidad y función reguladora de estas células (Fontenot et al., 2005). Existen dos tipos de Tregs, los cuales se clasifican según su origen: los naturales (nTregs), originados en el timo, y los inducidos (iTregs) en tejidos periféricos por diversos factores solubles, como TGF- β (Zhou et al., 2009). Por otra parte, los linfocitos Th17 son un subtipo de células T efectoras que juegan un rol importante en la defensa contra patógenos extracelulares y hongos, además de estar involucrados en ciertas enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus (Korn et al., 2009) y el rechazo a trasplante (Atalar et al., 2009). Las células Th17 producen IL-17A, IL-17F e IL-22 como citoquinas efectoras. ROR γ t es el factor de transcripción maestro de este perfil, el cual juega un rol clave para la expresión constitutiva de IL-17, y que es inducido por TGF- β en combinación con otras citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 (Chen et al., 2007; Korn et al., 2009). Se evidencia entonces que TGF- β es un factor común en la diferenciación de iTregs y linfocitos Th17, por lo que el perfil adquirido dependerá de los niveles de otras citoquinas presentes en el medio.

Reportes anteriores mostraron que las MSCs producen metaloproteinasas (MMP2 y MMP9) capaces de clivar a los receptores CD25 presentes en la membrana de linfocitos T, afectando su proliferación (Ding et al., 2009). Por el contrario, como se muestra en la **Figura 3**, los niveles de ambas MMPs no muestran cambios de expresión génica bajo los distintos tratamientos, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos en los co-cultivos de linfocitos T CD4⁺ con MSCs pre-tratadas

(Figura 5). Del mismo modo, la frecuencia de células T CD4+CD25+ no mostró un cambio significativo entre tratamientos. Por otro lado, se observó que MSCs tratadas disminuyen la frecuencia de Tregs Foxp3+, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* (Figura 7 y Figura Suplementaria 6).

A partir de los sobrenadantes de MSCs, se evaluó por test de ELISA la presencia de citoquinas asociadas a sus funciones moduladoras. Se observó que el tratamiento conjunto de IFN- γ con IL-33, induce un aumento en la secreción de IL-6 y TGF- β . Diversos reportes mencionan que la combinación de dichas citoquinas favorecen la polarización de linfocitos T naïve a células efectoras Th17 (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006). Más aún, células Tregs también ven afectado su fenotipo al ser expuestas a estas citoquinas (Beriou et al., 2009; Xu et al., 2007). Se ha descrito que existe un fenómeno de plasticidad fenotípica asociada a los distintos subtipos de linfocitos T, en el cual células efectoras ya comprometidas en un determinado perfil, pueden cambiar su fenotipo bajo determinadas condiciones. Lo mismo ha sido demostrado para células Tregs: existe una alta plasticidad entre fenotipo Treg y fenotipo Th17. Por ejemplo, en estudios *in vivo* de Yurchenko et al. (2012), se observó que, particularmente en intestino o en sitios de infección parasitaria, nTregs poseen una gran plasticidad fenotípica y son altamente propensos a perder la expresión de Foxp3, reprogramando su perfil principalmente hacia un fenotipo Th17 (Yurchenko et al., 2012). En este estudio, se encontró que la producción de IL-17 ocurre antes de que disminuya la expresión de Foxp3, presentándose células dobles positivas que serían un intermediario en la transición de estos dos fenotipos. Esto ha llevado a plantear que, tras ser expuestos a un microambiente pro-inflamatorio, células Tregs aumentarían la expresión del factor de transcripción ROR γ t, característico del perfil Th17, lo que

promovería la producción de IL-17 en estas células, la desestabilización de Foxp3 y la pérdida de la función supresora (Du et al., 2014).

En los resultados del modelo *in vivo*, se observa que en aquellos ratones que recibieron células MSC pre-tratadas antes del trasplante alogénico (Algénico^{MSC2x}), existe una reducción en el número total de células T presentes en GLds, lo que involucra una disminución de poblaciones T efectoras (CD4+ y CD8+) y reguladoras (Tregs). Experimentos adicionales son necesarios para poder dilucidar si esta baja en el número de las poblaciones linfocitarias ocurre debido a un aumento en la migración hacia el injerto, o por inhibición de la proliferación celular, anergia o muerte celular.

Por otra parte, se observa que existe un enriquecimiento de células IL-17A+ en GLds, y que una fracción de ellas es positiva también para Foxp3. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en la re-estimulación *ex vivo*, en donde se evidenció un aumento en la secreción de IL-17A al medio en aquellos cultivos provenientes de ratones tratados con MSCs pre-estimuladas y que se correlaciona con una disminución en la secreción de IFN- γ al medio (Harbour et al., 2015; Liu et al., 2015). Esto permite hipotetizar que, al momento del análisis (13 días post cirugía), esté ocurriendo una transición entre los distintos subtipos de linfocitos T, favoreciendo una polarización hacia un perfil Th17, asociado con una desestabilización en el fenotipo de Tregs, los cuales estarían comenzando a producir IL-17 y, posiblemente, perdiendo su capacidad supresora, lo cual se vería reflejado a simple vista en el estado del injerto al día del análisis, el que, si bien no ha sido totalmente rechazado, no se encuentra completamente aceptado como uno singénico (**Figura 7B-C**).

Al inicio de este trabajo, se mencionó que las MSCs tienen la capacidad de suprimir la respuesta de linfocitos Th17 en un eje que involucra la secreción de IL-10 y la generación de Tregs productores de IL-10 (Ghannam et al., 2010; Qu et al., 2012). Sin embargo, en el año 2009, Guo et al. demostró mediante un análisis de citoquina intracelular, que en co-cultivos de PBMC humano con MSCs, pese a existir una supresión significativa en la proliferación de linfocitos T CD4+, hay un enriquecimiento en la frecuencia de células IL-17+, acompañadas de una disminución en la frecuencia de células Th1 IFN- γ + (Guo et al., 2009). Esto mismo se corroboró analizando el perfil de citoquinas presente en los sobrenadantes de los cultivos, encontrando un patrón similar. Los autores plantean que este efecto sería mediado en parte por un aumento de IL-6 en el microambiente, proveniente de las MSCs en co-cultivo, la cual favorece la polarización Th17, relacionándose con lo observado en los resultados del presente trabajo.

Estos resultados resultan de gran interés, puesto que se ha descrito que los linfocitos T IL-17+ Foxp3+ resultan ser más inmunosupresores que Tregs IL-17-, bajo condiciones en que el estímulo del receptor de linfocitos T (RLT) no es tan fuerte (Li et al., 2012a). Aunque no se han estudiado ampliamente los mecanismos supresores de los linfocitos T IL-17+ Foxp3+, sí se ha descrito que, al menos en células murinas, éstas poseen funciones citotóxicas mediadas por granzima B y perforina (Li et al., 2012a). Por otra parte, estas células doble positivas también poseen función efectora, ya que, además de secretar IL-17, también pueden secretar niveles moderados de IL-2 e IFN- γ (Kryczek et al., 2011). Esto convierte a estas células en una atractiva opción contra agentes patogénicos o antitumoral, pero al mismo tiempo incrementa la susceptibilidad a una respuesta autoinmune.

Por lo tanto, el tratamiento combinado de IFN- γ e IL-33 afecta el fenotipo y función de MSCs, las cuales, al ser administradas *in vivo*, modulan la respuesta inmune promoviendo una polarización Th17 y posiblemente afectando el eje Treg/Th17. Aunque se requieren estudios adicionales para dilucidar los mecanismos asociados a este fenómeno, la inducción *in vivo* de linfocitos Th17+ Foxp3+, promovida por la administración de MSCs pre-estimuladas con IFN- γ con IL-33, ofrece opciones promisorias en el campo clínico como tratamiento antitumoral o antibacteriano. Por este motivo, sería interesante probar otros modelos *in vivo*, como por ejemplo, modelos tumorales o infecciosos, en donde los efectos en el sistema inmune, gatillados por las MSCs pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33, pudiesen resultar en una mejoría de la enfermedad, permitiendo optimizar protocolos ya existentes o terapias establecidas, así como mejorar el pronóstico de la enfermedad, al mejorar la calidad de vida del paciente.

9 CONCLUSIONES

- 9.1 El tratamiento combinado de IFN- γ con IL-33 no altera la expresión de marcadores clásicos de MSCs (CD29, CD44, CD73) ni induce la expresión de marcadores hematopoyéticos (CD45, CD11b, CD117). Pese a esto, se observa un aumento en la frecuencia de células MHC-II+ mediado por la acción de IFN- γ .
- 9.2 El tratamiento conjunto de IFN- γ con IL-33 si bien, aumenta la expresión a nivel de mRNA de iNOS, no aumenta la secreción de NO al medio. Sin embargo, sí aumenta la secreción de IL-6 y TGF- β luego del tratamiento conjunto.
- 9.3 En animales trasplantados alogénicamente la infusión de MSCs pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33, no previene completamente el rechazo al injerto. No obstante, existe una disminución en el número total de células presentes en GLds, que involucra a poblaciones efectoras (CD4+ y CD8+) y reguladoras (Tregs).
- 9.4 En animales trasplantados alogénicamente la infusión de MSCs pre-estimuladas con IFN- γ e IL-33, se observa un enriquecimiento de células IL-17+ en GLds, y una fracción de ellas es también Foxp3+. Los sobrenadantes de cultivos de células aisladas de GLds de éstos animales, muestran un aumento en la secreción de IL-17, acompañada de una disminución de IFN- γ luego de una re-estimulación *ex vivo*, lo que sugiere que el tratamiento con MSCs pre-estimuladas, favorece la formación de células Th17 por sobre Tregs.

10 REFERENCIAS

- Abbas A. (2012). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*, 4th edition. Editorial Saunders.
- Akiyama, K., Chen, C., Wang, D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T., Cai, T., Chen, W., Sun, L., and 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, J.F., and Karp, J.M. (2014). Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol* 32, 252-260.
- Atalar, K., Afzali, B., Lord, G., and Lombardi, G. (2009). Relative roles of Th1 and Th17 effector cells in allograft rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 14, 23-29.
- Badillo, A.T., Beggs, K.J., Javazon, E.H., Tebbets, J.C., and Flake, A.W. (2007). Murine bone marrow stromal progenitor cells elicit an in vivo cellular and humoral alloimmune response. *Biol Blood Marrow Transplant* 13, 412-422.
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., *et al.* (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 30, 42-48.
- Beriou, G., Costantino, C.M., Ashley, C.W., Yang, L., Kuchroo, V.K., Baecher-Allan, C., and Hafler, D.A. (2009). IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 113, 4240-4249.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., and Rachmilewitz, J. (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105, 2214-2219.
- Brunner, S.M., Schiechl, G., Falk, W., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., and Fichtner-Feigl, S. (2011). Interleukin-33 prolongs allograft survival during chronic cardiac rejection. *Transpl Int* 24, 1027-1039.
- Casiraghi, F., Azzollini, N., Cassis, P., Imberti, B., Morigi, M., Cugini, D., Cavinato, R.A., Todeschini, M., Solini, S., Sonzogni, A., *et al.* (2008). Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J Immunol* 181, 3933-3946.
- Casiraghi, F., Azzollini, N., Todeschini, M., Cavinato, R.A., Cassis, P., Solini, S., Rota, C., Morigi, M., Inrona, M., Maranta, R., *et al.* (2012). Localization of mesenchymal stromal cells dictates their immune or proinflammatory effects in kidney transplantation. *Am J Transplant* 12, 2373-2383.
- Chan, J.L., Tang, K.C., Patel, A.P., Bonilla, L.M., Pierobon, N., Ponzio, N.M., and Rameshwar, P. (2006). Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood* 107, 4817-4824.
- Chen, Z., Laurence, A., and O'Shea, J.J. (2007). Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* 19, 400-408.
- Cho, K.A., Suh, J.W., Sohn, J.H., Park, J.W., Lee, H., Kang, J.L., Woo, S.Y., and Cho, Y.J. (2012). IL-33 induces Th17-mediated airway inflammation via mast cells in ovalbumin-challenged mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302, L429-440.

- Coleman, J.W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 1, 1397-1406.
- Ding, Y., Xu, D., Feng, G., Bushell, A., Muschel, R.J., and Wood, K.J. (2009). Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogenic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes* 58, 1797-1806.
- Djouad, F., Charbonnier, L.M., Bouffi, C., Louis-Plence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., and Noel, D. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 25, 2025-2032.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Du, R., Zhao, H., Yan, F., and Li, H. (2014). IL-17+Foxp3+ T cells: an intermediate differentiation stage between Th17 cells and regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 96, 39-48.
- Eggenhofer, E., and Hoogduijn, M.J. (2012). Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplant Res* 1, 12.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22, 329-341.
- Gajardo, T., Morales, R.A., Campos-Mora, M., Campos-Acuna, J., and Pino-Lagos, K. (2015). Exogenous interleukin-33 targets myeloid-derived suppressor cells and generates periphery-induced Foxp3(+) regulatory T cells in skin-transplanted mice. *Immunology* 146, 81-88.
- Ge, W., Jiang, J., Arp, J., Liu, W., Garcia, B., and Wang, H. (2010). Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation* 90, 1312-1320.
- Ge, W., Jiang, J., Baroja, M.L., Arp, J., Zassoko, R., Liu, W., Bartholomew, A., Garcia, B., and Wang, H. (2009). Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. *Am J Transplant* 9, 1760-1772.
- Ghannam, S., Pene, J., Moquet-Torcy, G., Jorgensen, C., and Yssel, H. (2010). Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol* 185, 302-312.
- Grinnemo, K.H., Mansson, A., Dellgren, G., Klingberg, D., Wardell, E., Drvota, V., Tammik, C., Holgersson, J., Ringden, O., Sylven, C., *et al.* (2004). Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127, 1293-1300.
- Gu, Y.Z., Xue, Q., Chen, Y.J., Yu, G.H., Qing, M.D., Shen, Y., Wang, M.Y., Shi, Q., and Zhang, X.G. (2013). Different roles of PD-L1 and FasL in immunomodulation mediated by human placenta-derived mesenchymal stem cells. *Hum Immunol* 74, 267-276.
- Guo, Z., Zheng, C., Chen, Z., Gu, D., Du, W., Ge, J., Han, Z., and Yang, R. (2009). Fetal BM-derived mesenchymal stem cells promote the expansion of human Th17 cells, but inhibit the production of Th1 cells. *Eur J Immunol* 39, 2840-2849.
- Harbour, S.N., Maynard, C.L., Zindl, C.L., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2015). Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 7061-7066.
- Haribhai, D., Lin, W., Relland, L.M., Truong, N., Williams, C.B., and Chatila, T.A. (2007). Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *J Immunol* 178, 2961-2972.



Ho, L.H., Ohno, T., Oboki, K., Kajiwara, N., Suto, H., Iikura, M., Okayama, Y., Akira, S., Saito, H., Galli, S.J., *et al.* (2007). IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcεRI signals. *J Leukoc Biol* 82, 1481-1490.

Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* 10, 709-716.

Klyushnenkova, E., Mosca, J.D., McIntosh, K.R. & Thiede, M.A. (1998). Human mesenchymal stem cells suppress allogeneic T cell responses in vitro: implications for allogeneic transplantation. *Blood* 92, 642a.

Koch, M., Lehnhardt, A., Hu, X., Brunswig-Spickenheier, B., Stolk, M., Brocker, V., Noriega, M., Seifert, M., and Lange, C. (2013). Isogeneic MSC application in a rat model of acute renal allograft rejection modulates immune response but does not prolong allograft survival. *Transpl Immunol* 29, 43-50.

Kong, Q.F., Sun, B., Bai, S.S., Zhai, D.X., Wang, G.Y., Liu, Y.M., Zhang, S.J., Li, R., Zhao, W., Sun, Y.Y., *et al.* (2009). Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF-beta. *J Neuroimmunol* 207, 83-91.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27, 485-517.

Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K., and Sensebe, L. (2013). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* 15, 1054-1061.

Kryczek, I., Wu, K., Zhao, E., Wei, S., Vatan, L., Szeliga, W., Huang, E., Greenson, J., Chang, A., Rolinski, J., *et al.* (2011). IL-17+ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *J Immunol* 186, 4388-4395.

Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Murphy, G., Russo, R.C., Stolarski, B., Garcia, C.C., Komai-Koma, M., Pitman, N., Li, Y., Niedbala, W., *et al.* (2008). IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol* 181, 4780-4790.

Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., and Ringden, O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 31, 890-896.

Li, L., Patsoukis, N., Petkova, V., and Boussiotis, V.A. (2012a). Runx1 and Runx3 are involved in the generation and function of highly suppressive IL-17-producing T regulatory cells. *PLoS One* 7, e45115.

Li, M., Li, Y., Liu, X., Gao, X., and Wang, Y. (2012b). IL-33 blockade suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 247, 25-31.

Lingel, A., Weiss, T.M., Niebuhr, M., Pan, B., Appleton, B.A., Wiesmann, C., Bazan, J.F., and Fairbrother, W.J. (2009). Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. *Structure* 17, 1398-1410.

Liu, H.P., Cao, A.T., Feng, T., Li, Q., Zhang, W., Yao, S., Dann, S.M., Elson, C.O., and Cong, Y. (2015). TGF-beta converts Th1 cells into Th17 cells through stimulation of Runx1 expression. *Eur J Immunol* 45, 1010-1018.

Louten, J., Rankin, A.L., Li, Y., Murphy, E.E., Beaumont, M., Moon, C., Bourne, P., McClanahan, T.K., Pflanz, S., and de Waal Malefyt, R. (2011). Endogenous IL-33 enhances Th2 cytokine production and T cell responses during allergic airway inflammation. *Int Immunol* 23, 307-315.

Luz-Crawford, P., Noel, D., Fernandez, X., Khoury, M., Figueroa, F., Carrion, F., Jorgensen, C., and Djouad, F. (2012). Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway. *PLoS One* 7, e45272.

- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., and Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 21, 216-225.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.
- Melief, S.M., Schrama, E., Brugman, M.H., Tiemessen, M.M., Hoogduijn, M.J., Fibbe, W.E., and Roelofs, H. (2013). Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 31, 1980-1991.
- Mielcarek, M., Storb, R., Georges, G.E., Golubev, L., Nikitine, A., Hwang, B., Nash, R.A., and 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.
- Mitani, H., Katayama, N., Araki, H., Ohishi, K., Kobayashi, K., Suzuki, H., Nishii, K., Masuya, M., Yasukawa, K., Minami, N., *et al.* (2000). Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *Br J Haematol* 109, 288-295.
- Molofsky, A.B., Van Gool, F., Liang, H.E., Van Dyken, S.J., Nussbaum, J.C., Lee, J., Bluestone, J.A., and Locksley, R.M. (2015). Interleukin-33 and Interferon-gamma Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. *Immunity* 43, 161-174.
- Morales, J.M., Varo, E., and Lazaro, P. (2012). Immunosuppressant treatment adherence, barriers to adherence and quality of life in renal and liver transplant recipients in Spain. *Clin Transplant* 26, 369-376.
- Moussion, C., Ortega, N., and Girard, J.P. (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* 3, e3331.
- Najar, M., Rouas, R., Raicevic, G., Boufker, H.I., Lewalle, P., Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M., Martiat, P., and Lagneaux, L. (2009). Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. *Cytotherapy* 11, 570-583.
- Nauta, A.J., Krusselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 177, 2080-2087.
- Nemeth, K., Keane-Myers, A., Brown, J.M., Metcalfe, D.D., Gorham, J.D., Bundoc, V.G., Hodges, M.G., Jelinek, I., Madala, S., Karpati, S., *et al.* (2010). Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5652-5657.
- Nemeth, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P.S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P.G., Leelahavanichkul, K., Koller, B.H., Brown, J.M., *et al.* (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 15, 42-49.
- Niedbala, W., Cai, B., and Liew, F.Y. (2006). Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann Rheum Dis* 65 Suppl 3, iii37-40.
- Palmer, G., Talabot-Ayer, D., Lamacchia, C., Toy, D., Seemayer, C.A., Viatte, S., Finckh, A., Smith, D.E., and Gabay, C. (2009). Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 60, 738-749.
- Patel, S.A., Meyer, J.R., Greco, S.J., Corcoran, K.E., Bryan, M., and Rameshwar, P. (2010). Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol* 184, 5885-5894.

- Pecaric-Petkovic, T., Didichenko, S.A., Kaempfer, S., Spiegl, N., and Dahinden, C.A. (2009). Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. In *Blood*, pp. 1526-1534.
- Qu, X., Liu, X., Cheng, K., Yang, R., and Zhao, R.C. (2012). Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion. *Exp Hematol* 40, 761-770.
- Rath, M., Muller, I., Kropf, P., Closs, E.I., and Munder, M. (2014). Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol* 5, 532.
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., and Shi, Y. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2, 141-150.
- Rivellese, F., Suurmond, J., Habets, K., Dorjee, A.L., Ramamoorthi, N., Townsend, M.J., de Paulis, A., Marone, G., Huizinga, T.W., Pitzalis, C., *et al.* (2015). Ability of Interleukin-33- and Immune Complex-Triggered Activation of Human Mast Cells to Down-Regulate Monocyte-Mediated Immune Responses. *Arthritis Rheumatol* 67, 2343-2353.
- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109, 228-234.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., *et al.* (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23, 479-490.
- Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., Cui, L., *et al.* (2008). A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res* 18, 846-857.
- Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., Chen, X., Huang, Y., Zhu, Z., *et al.* (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res* 20, 510-518.
- Shi, Y., Su, J., Roberts, A.I., Shou, P., Rabson, A.B., and Ren, G. (2012). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 33, 136-143.
- Stagg, J., Pommey, S., Eliopoulos, N., and Galipeau, J. (2006). Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood* 107, 2570-2577.
- Sudres, M., Norol, F., Trenado, A., Gregoire, S., Charlotte, F., Levacher, B., Lataillade, J.J., Bourin, P., Holy, X., Vernant, J.P., *et al.* (2006). Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 176, 7761-7767.
- Tasso, R., Ilengo, C., Quarto, R., Cancedda, R., Caspi, R.R., and Pennesi, G. (2012). Mesenchymal stem cells induce functionally active T-regulatory lymphocytes in a paracrine fashion and ameliorate experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 786-793.
- Tipnis, S., Viswanathan, C., and Majumdar, A.S. (2010). Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunol Cell Biol* 88, 795-806.
- Tisato, V., Naresh, K., Girdlestone, J., Navarrete, C., and Dazzi, F. (2007). Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* 21, 1992-1999.
- Turnquist, H.R., Zhao, Z., Rosborough, B.R., Liu, Q., Castellana, A., Isse, K., Wang, Z., Lang, M., Stolz, D.B., Zheng, X.X., *et al.* (2011). IL-33 expands suppressive CD11b⁺ Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L⁺ Foxp3⁺ cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J Immunol* 187, 4598-4610.

- Wang, Y., Chen, X., Cao, W., and Shi, Y. (2014). Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* 15, 1009-1016.
- Wang, Y., Zhang, A., Ye, Z., Xie, H., and Zheng, S. (2009). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit acute rejection of rat liver allografts in association with regulatory T-cell expansion. *Transplant Proc* 41, 4352-4356.
- Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., and Betancourt, A.M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5, e10088.
- Xia, Z., Ye, H., Choong, C., Ferguson, D.J., Platt, N., Cui, Z., and Triffitt, J.T. (2004). Macrophagic response to human mesenchymal stem cell and poly(epsilon-caprolactone) implantation in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *J Biomed Mater Res A* 71, 538-548.
- Xu, C., Yu, P., Han, X., Du, L., Gan, J., Wang, Y., and Shi, Y. (2014). TGF-beta promotes immune responses in the presence of mesenchymal stem cells. *J Immunol* 192, 103-109.
- Xu, D., Jiang, H.R., Kewin, P., Li, Y., Mu, R., Fraser, A.R., Pitman, N., Kurowska-Stolarska, M., McKenzie, A.N., McInnes, I.B., *et al.* (2008). IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10913-10918.
- Xu, L., Kitani, A., Fuss, I., and Strober, W. (2007). Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 178, 6725-6729.
- Yurchenko, E., Shio, M.T., Huang, T.C., Da Silva Martins, M., Szyf, M., Levings, M.K., Olivier, M., and Piccirillo, C.A. (2012). Inflammation-driven reprogramming of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells into pathogenic Th1/Th17 T effectors is abrogated by mTOR inhibition in vivo. *PLoS One* 7, e35572.
- Zhao, W., Wang, Y., Wang, D., Sun, B., Wang, G., Wang, J., Kong, Q., Wang, Q., Peng, H., Jin, L., *et al.* (2008). TGF-beta expression by allogeneic bone marrow stromal cells ameliorates diabetes in NOD mice through modulating the distribution of CD4+ T cell subsets. *Cell Immunol* 253, 23-30.
- Zhou, L., Chong, M.M., and Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30, 646-655.

11 FIGURAS SUPLEMENTARIAS

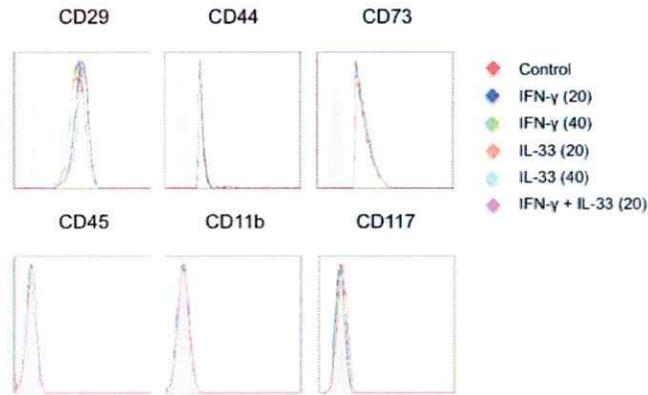


Figura Suplementaria 1. Expresión de marcadores de superficie canónicos en MSC wt tratadas diferencialmente con IFN- γ e IL-33. MSCs derivadas de médula ósea de ratón *wild type* fueron cultivadas en medio α MEM completo, suplementado con 20 (azul) o 40 (verde) ng/ml de IFN- γ , o con 20 (naranja) o 40 (celeste) ng/ml de IL-33, o ambas (rosa) a 20 ng/mL por 24 horas. Histogramas representativos de la expresión de marcadores de superficie característicos analizados por citometría de flujo. n=4 experimentos independientes.

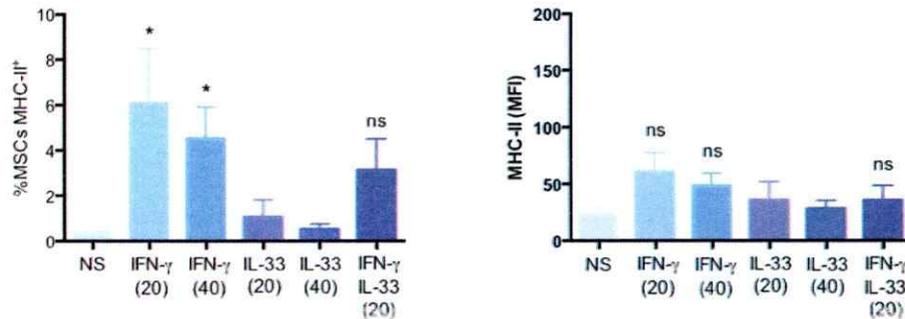


Figura Suplementaria 2 Expresión de MHC-II en MSCs wt tratadas con IFN- γ e IL-33. Frecuencia de células MSCs MHC-II⁺ (izquierda) e intensidad media de fluorescencia (MFI) de la expresión de MHC-II en MSC wt tratadas diferencialmente con IFN- γ e IL-33 según se indica. Las barras representan el error estándar de la media (SEM), la significancia estadística fue calculada mediante el análisis de Mann-Whitney. ns: no significativo; * $p < 0,05$; versus condición control sin estimular (SE). n= 4 experimentos independientes.

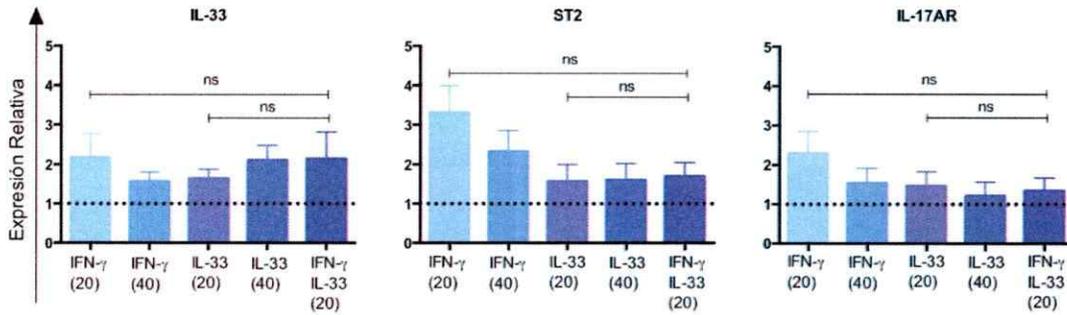


Figura Suplementaria 3. Expresión de moléculas receptoras y producción endógena de IL-33 en MSCs. La expresión relativa de los genes IL-33, ST2 e IL-17AR, fue medida por qRT-PCR. Las células fueron tratadas como se explicó anteriormente, y el RNA total fue aislado para la consiguiente síntesis de cDNA. Los niveles de expresión fueron calculados mediante el método del delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), considerando como gen *housekeeping* a GAPDH. En los gráficos, la condición basal sin estimular es representada mediante una línea punteada. Las barras representan el error estándar de la media (SEM), la significancia estadística fue calculada mediante el análisis de Mann-Whitney, versus condición control sin estimular (SE); ns: no significativo. n= 8 experimentos independientes.

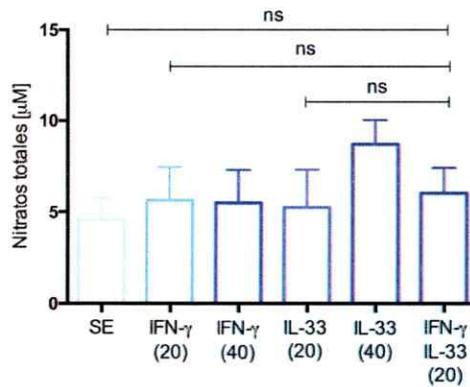


Figura Suplementaria 4. Nitratos totales presentes en sobrenadantes de MSCs estimuladas diferencialmente con IFN-γ e IL-33. MSCs fueron tratadas con IFN-γ (20 o 40 ng/mL), IL-33 (20 o 40 ng/mL) o una combinación de ambas citoquinas (20 ng/mL cada una) durante 24 horas. Se midió la presencia de nitratos totales en los sobrenadantes mediante el reactivo modificado de Griess. Las barras representan el error estándar de la media (SEM). n= 8 experimentos independientes.

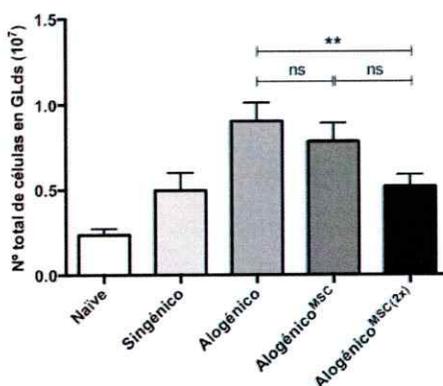


Figura Suplementaria 5. Número total de células presentes en GLDs en ratones trasplantados. Las barras representan el error estándar de la media (SEM), y la significancia estadística fue calculada mediante el análisis de Mann-Whitney. ** $p < 0,01$; ns: no significativo. Datos de 4 experimentos independientes, con $n = 2-5$ animales por grupo.

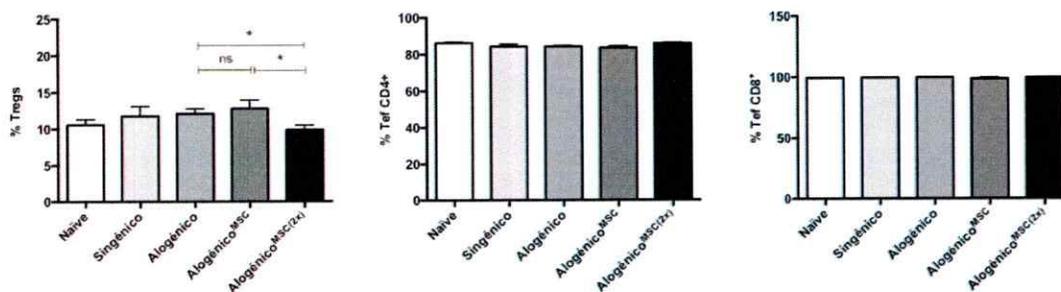


Figura Suplementaria 6. Frecuencia de poblaciones linfocitarias en GLDs en ratones trasplantados. Se muestra la frecuencia de linfocitos T reguladores ($CD8^- CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$) (izquierda); linfocitos T $CD4^+$ efector ($CD8^- CD4^+ Foxp3^-$) (centro); y linfocitos T $CD8^+$ efector ($CD8^+ CD4^+ Foxp3^-$) (derecha). Las barras representan el error estándar de la media (SEM), la significancia estadística fue calculada mediante el análisis de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; ns: no significativo. Datos de 4 experimentos independientes, con $n = 2-5$ animales por grupo.

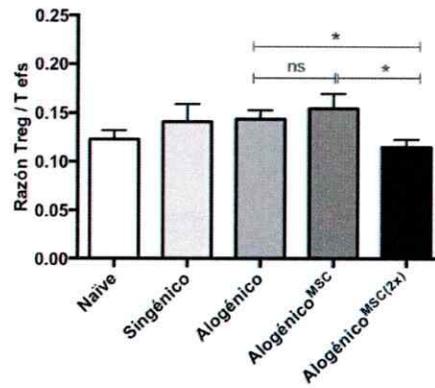


Figura Suplementaria 7. Razón Treg/Tef en GLds de ratones trasplantados. Razón entre frecuencia de linfocitos T reguladores ($CD8^- CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$) y linfocitos T $CD4^+$ efectores ($CD8^- CD4^+ Foxp3^-$). Las barras representan el error estándar de la media (SEM), la significancia estadística fue calculada mediante el análisis de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; ns: no significativo. Datos de 4 experimentos independientes, con $n = 2-5$ animales por grupo.