



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

PERFIL FENOTÍPICO Y CAPACIDAD INMUNOMODULADORA DE
DISTINTOS CLONES DE CÉLULAS TRONCALES MESENOQUIMALES

Pascual Martínez Peinado



Tesis

Doctorales

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



*Departamento de Biotecnología
Facultad de Ciencias*

**PERFIL FENOTÍPICO Y CAPACIDAD INMUNOMODULADORA DE
DISTINTOS CLONES DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES**

Pascual Martínez Peinado

Tesis presentada para aspirar al grado de:

Doctor por la Universidad de Alicante

Doctorado en Ciencias Experimentales y Biosanitarias

Dirigida por:

Dr. José Miguel Sempere Ortells

La productividad del presente trabajo se refleja en las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

PUBLICACIONES:

1. Sempere JM, Martínez-Peinado P, Arribas MI, Reig JA, De La Sen ML, Zubcoff JJ, Fraga MF, Fernández AF, Santana A, & Roche E. "Single Cell-Derived Clones from Human Adipose Stem Cells Present Different Immunomodulatory Properties." *Clinical and Experimental Immunology*. 2014;176(2):255–265.
2. "Unveiling the Differences in the Effects of Clonogenic Human Adipose Stem Cells on the Immune System". En preparación.

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

1. "Efecto inmunomodulador de distintos clones de células madre mesenquimales sobre PBMC humanas", 36 Congreso Nacional de la SEI, Pamplona, 2011.
2. "Immunomodulatory effects of different MSC clones on human PBMNC" XVI Congreso de la SEBC, 12-15 de diciembre de 2011.
3. "Immunomodulatory effects of different hASC clonogenic populations on human PBMNC", 3rd European Congress of Immunology, Glasgow, 2012.
4. "Differences between hASC clonogenic populations according to their immunomodulatory properties", Jornadas de Investigación Departamental San Alberto Magno, UA, 2012.
5. "Comparative immunomodulatory effect of clonogenic hASCs on PBMCs vs isolated CD3⁺ lymphocytes", 4th European Congress of Immunology ECI, Viena, 2015.
6. "CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ expression and supernatant cytokines in clonogenic hASC/PBMCs co-cultures. Effect of hASCs conditioned media on PBMCs proliferation", 39 Congreso de la SEI, 2016.
7. "Modification of FoxP3⁺ expression in hASCs/PBMCs co-cultures. Effect of the hASCs secretome on Treg population", XXI Jornadas de Investigación Departamental San Alberto Magno, UA, 2016.

AGRADECIMIENTOS

No sería justo presentar esta Tesis sin nombrar antes a todos y cada uno por los que siento un profundo y sincero agradecimiento, por su ayuda y apoyo desinteresado a lo largo de este trabajo, sin los que hubiese sido imposible empezarlo, desarrollarlo y terminarlo, tanto a nivel científico y académico, como moral e inmaterial.

En primer lugar, a José Miguel Sempere. Sin duda, ha sido su esfuerzo y dedicación el principal impulsor de este trabajo. Él ha creído en mí, incluso más que yo. *Gracias José Miguel.*

Al personal del Servicio de Inmunología del Hospital General de Alicante, especialmente a Mari Luz y a Geles. *Mil gracias*, una por cada vez que me habéis ayudado.

A Sandra. Por su ayuda en los experimentos, por escucharme y por su compañerismo ejemplar. *Gracias* compañera.

A todas y cada una de las personas que han pasado fugazmente por el Laboratorio de Inmunología. He aprendido tanto o más de lo que os he podido enseñar. *Gracias.*

Al PAS y al PDI del Departamento de Biotecnología. Por sus ánimos, sus consejos y su respaldo. *Gracias* compañeros.

Al personal del animalario. Por ayudarme en momentos críticos de la investigación. *Gracias.*

A todos los compañeros del Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología y también del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Ellos han puesto el humor, la amistad y me han transmitido su pasión por la ciencia. En definitiva, han puesto la guinda. *Gracias.*

A Carmen y María Ángeles. Vosotras despertasteis la ciencia en mí. Nadie os quitará nunca el título de mejores profesoras. *Gracias.*

A mis amigos de Elda, Petrer y Alicante, porque estuvisteis, estáis y sé que estaréis ahí cuando os necesite. *Gracias.*

A Rubén, aunque te marchaste antes de tiempo, nunca te fuiste en realidad. *Gracias* por vivir siempre con esa sonrisa en la cara. Ya nos veremos amigo.

A la familia Pérez Vera, mi segunda familia durante mi niñez. Tere y Lolo, *gracias* por ser un ejemplo de humanidad, fuerza y amor.

Finalmente, a mi familia, peculiar como todas, pero luchadora como ninguna. Gracias por enseñarme a levantarme en vez de a no caerme. De vosotros he aprendido que el esfuerzo es la base de todo, y ha sido el vuestro durante años, el que ha hecho que hoy pueda escribir estas palabras. *Gracias*[∞].



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

A Gema,

por su comprensión

por su paciencia

por su cariño

por su amor

A mis padres,

por crearme

por criarme

por crecerme

por creerme

Gracias

ABREVIATURAS _____	17
ÍNDICE DE FIGURAS _____	21
ÍNDICE DE TABLAS _____	23

I. INTRODUCCIÓN

1.1. CÉLULAS TRONCALES. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA _____	27
1.1.1. DEFINICIÓN DE CÉLULA TRONCAL _____	27
1.1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS TRONCALES _____	32
1.1.2.1. CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES SEGÚN SU ORIGEN _____	32
1.1.2.2. CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES SEGÚN SU POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN _____	35
1.1.3. CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS _____	36
1.1.4. CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS _____	38
1.1.5. TRANSDIFERENCIACIÓN _____	39
1.1.6. NICHOS CELULARES _____	39
1.1.7. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES (MSC) _____	41
1.1.7.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS MSC _____	42
1.1.7.2. MARCADORES FENOTÍPICOS _____	43
1.1.7.3. MIGRACIÓN DIRIGIDA _____	44
1.1.7.4. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO _____	44
1.1.7.5. POBLACIONES CLONALES DE MSC _____	46
1.2. EL SISTEMA INMUNITARIO _____	49
1.2.1. INMUNOMODULACIÓN _____	51
1.2.1.1. MSC Y NEUTRÓFILOS _____	51
1.2.1.2. MSC Y MONOCITOS _____	54
1.2.1.3. MSC Y CÉLULAS DENDRÍTICAS _____	55
1.2.1.4. MSC Y CÉLULAS NK _____	56
1.2.1.5. MSC Y SISTEMA DEL COMPLEMENTO _____	57
1.2.1.6. MSC Y LINFOCITOS B _____	59
1.2.1.7. MSC Y LINFOCITOS T _____	60
1.2.1.7.1. Th1 _____	61
1.2.1.7.2. Th2 _____	62
1.2.1.7.3. TREG _____	62
1.2.1.7.4. Th17 _____	63
1.2.2. ENSAYOS CLÍNICOS _____	64

II. OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS _____	69
2.2. OBJETIVOS _____	71

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y MUESTRAS BIOLÓGICAS DE SANGRE PERIFÉRICA _____	75
3.2. OBTENCIÓN DE PBMC _____	76
3.3. PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS CD3 ⁺ , CD4 ⁺ Y CD8 ⁺ _____	77
3.4. OBTENCIÓN DE LOS CLONES DE ASC _____	78
3.5. DESCONGELACIÓN, MANTENIMIENTO Y EXPANSIÓN DE LOS CLONES DE ASC _____	79
3.6. CRIOPRESERVACIÓN DE LOS CLONES DE ASC _____	80
3.7. OBTENCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO CONDICIONADOS POR LOS CLONES DE ASC _____	80
3.8. ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE MEMBRANA DE LOS CLONES DE ASC _____	80
3.9. ANÁLISIS DE CITOCINAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVO _____	81
3.9.1. ANÁLISIS DE CITOCINAS EN EL SECRETOMA DE LOS CLONES DE ASC _____	81
3.9.2. ANÁLISIS DE CITOCINAS EN SOBRENADANTES DE COCULTIVOS DE LOS CLONES DE ASC Y PBMC _____	81
3.10. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS MEDIANTE CFSE _____	84
3.11. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA _____	86
3.11.1. EN COCULTIVOS DE LOS CLONES DE ASC Y DISTINTAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS _____	86
3.11.2. EN CULTIVOS DE ASC-DMEM ⁺ Y PBMC _____	87
3.12. ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE FOXP3 Y CD25 EN PBMC _____	87
3.12.1. EN COCULTIVOS DE LOS CLONES DE ASC Y PBMC _____	87
3.12.2. EN CULTIVOS DE PBMC CON ASC-DMEM ⁺ _____	88
3.13. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS CLONES DE ASC SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS PBMC _____	88
3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS _____	88

IV. RESULTADOS

4.1. FENOTIPO DE MEMBRANA DE LAS ASC _____	93
4.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE CITOCINAS TH1/TH2 _____	96
4.2.1. CINÉTICA DE CITOCINAS IL-6 E IL-8 SIN ESTÍMULO _____	96
4.2.2. CINÉTICA DE CITOCINAS Th1/Th2 TRAS ESTIMULACIÓN _____	97
4.3. CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS EN SOBRENADANTES DE COCULTIVOS ASC-PBMC _____	100
4.4. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA _____	108
4.4.1. EFECTO DE LAS ASC SOBRE PBMC _____	108
4.4.2. EFECTO DE LAS ASC SOBRE LINFOCITOS CD3 ⁺ PURIFICADOS _____	109
4.4.3. EFECTO DE LAS ASC SOBRE LINFOCITOS CD4 ⁺ PURIFICADOS _____	112
4.4.4. EFECTO DE LAS ASC SOBRE LINFOCITOS T CD8 ⁺ PURIFICADOS _____	112
4.4.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO CD11b EN COCULTIVOS DE ASC Y LINFOCITOS CD8 ⁺ PURIFICADOS _____	114
4.4.6. EFECTO DE LOS ASC-DMEM ⁺ SOBRE PBMC _____	116
4.5. ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DE LOS VALORES DE FOXP3 Y CD25 EN PBMC COCULTIVADAS CON LOS CLONES DE ASC _____	117
4.6. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL ASC-DMEM ⁺ SOBRE LA EXPRESIÓN DE FOXP3 Y CD25 EN PBMC _____	118
4.7. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS ASC SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS PBMC _____	119

V. DISCUSIÓN

5.1. DISCUSIÓN _____	123
----------------------	-----

VI. CONCLUSIONES

6.1. CONCLUSIONES _____	141
-------------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS¹

- A ▷ ANOVA** , del inglés *analysis of variance*, análisis de la varianza
- APC** , del inglés *allophycocyanin*, alofocianina
- ASC** , del inglés *adipose stem cell*, célula troncal mesenquimal derivada de tejido adiposo
- ASC-DMEM⁺**, medio condicionado por ASC
- B ▷ BLC** , del inglés *B-lymphocyte chemoattractant*, quimioatrayente del linfocito B
- BCR** , del inglés *B cell receptor*, receptor del linfocito B
- BLR** , del inglés *Burkitt lymphoma receptor*, receptor del linfoma de Burkitt
- C ▷ CCL** , del inglés *C-C motif chemokine ligand*, ligando del motivo C-C de la quimiocina
- CD-(Nº)** , del inglés *cluster of differentiation*, cúmulo de diferenciación
- CFDA-SE** , del inglés *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*, carboxifluorescein diacetato succinimidil éster
- CFSE** , del inglés *carboxyfluorescein succinimidyl ester*, carboxifluorescein succinimidil éster
- CFU-F** , del inglés *colony-forming units fibroblastic*, unidad fibroblástica formadora de colonias
- CTLA-4** , del inglés *cytotoxic T-lymphocyte antigen*, antígeno 4 del linfocito T citotóxico
- Cy** , del inglés *cyanine*, cianina
- D ▷ DMEM** , del inglés *Dulbecco's modified eagle medium*, medio eagle modificado por Dulbecco
- DMSO** , del inglés *dimethyl sulfoxide*, dimetilsulfóxido
- DNA** , del inglés *desoxiribonucleotic acid*, ácido desoxirribonucleico

¹ Siguiendo las recomendaciones de la IUPAC-IUB, las abreviaturas utilizadas en este trabajo han sido elegidas en su versión inglesa. *Abbreviations and Symbols for Chemical Names of Special Interest in Biological Chemistry: Revised Tentative Rules* (1965), IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature, *J. Biol. Chem.* 1966 241: 527

-
- E** ▷ **EDTA** , del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*, ácido etilendiaminotetraacético
- EGF** , del inglés *epidermal grow factor*, factor de crecimiento epidérmico
- EGFR** , del inglés *epidermal growth factor receptor*, receptor del factor de crecimiento epidérmico
- ESC** , del inglés *embryonic stem cell*, célula troncal embrionaria
- F** ▷ **FBS** , del inglés *fetal bovine serum*, suero de ternera fetal
- FGF** , del inglés *fibroblast grow factor*, factor de crecimiento de fibroblastos
- FITC** , del inglés *fluorescein isothiocyanate*
- FOXP3** , del inglés *forkhead box P3*, factor de transcripción 3 de la familia Fox
- G** ▷ **GITR** , del inglés *glucocorticoid-induced TNFR-related*, glucocorticoide inducido relacionado con el receptor del TNF
- GM-CSF**, del inglés *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos
- H** ▷ **HEPES** , del inglés [2-(4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl) ethanesulfonic acid], ácido [2-(4-(2-hidroxietyl) piperazin-1-il] etanosulfónico
- HGF** , del inglés *hepatocyte grow factor*, factor de crecimiento de los hepatocitos
- HLA** , del inglés *human leukocyte antigen*, antígeno leucocitario humano
- HSC** , del inglés, *haematopoietic stem cell*, célula troncal hematopoyética
- I** ▷ **IDO** , del inglés *indoleamine 2,3-dioxygenase*, indolamina 2,3-dioxigenasa
- IFN** , interferón
- Ig** , del inglés *immunoglobulin*, inmunoglobulina
- IL-(Nº)** -(número), interleucina
- Io** , del inglés *ionomycin*, ionomicina
- iPSC** , del inglés *induced pluripotent stem cell*, célula troncal pluripotente inducida
- ISCT** , del inglés *International Society for Cellular Therapy*, Sociedad Internacional para la Terapia Celular
- L** ▷ **LPS** , del inglés *lipopolysaccharide*, lipopolisacárido
- LSD** , del inglés *least significant difference*, diferencia mínima significativa

-
- M** ▷ **MFI** , del inglés *median fluorescence intensity*, intensidad mediana de fluorescencia
- MHC** , del inglés *major histocompatibility complex*, sistema mayor de histocompatibilidad
- MIF** , del inglés *macrophage migration inhibitory factor*, factor inhibidor de la migración de macrófagos
- MSC** , del inglés *mesenchymal stem cell*, célula troncal mesenquimal
- N** ▷ **NK** , del inglés *natural killer*, asesinas naturales
- P** ▷ **P/S** , del inglés *penicilin/streptomycin*, penicilina/estreptomicina
- PBS** , del inglés *phosphate buffer saline*, tampón fosfato salino
- PBMC** , del inglés *peripheral blood mononuclear cell*, célula mononuclear de sangre periférica
- PE** , del inglés *phycoerythrin*, ficoeritrina
- PerCP** , del inglés *peridinin chlorophyll*, clorofilperidina
- PGE** , del inglés *prostaglandin*, prostaglandina E
- PHA** , del inglés *phytohemagglutinin*, fitohemaglutinina
- PMA** , del inglés *phorbol myristate acetate*, forbol miristato acetato
- R** ▷ **RPMI** , del inglés *Roswell Park Memorial Institute*, Instituto en memoria de Roswell Park
- dsRNA** , del inglés *double-stranded ribonucleic acid*, RNA bicatenario
- S** ▷ **SD** , del inglés *standard deviation*, desviación estándar
- SDF** , del inglés *stromal cell-derived factor*, factor estromal derivado de células
- T** ▷ **Tc** , del inglés *T-cytotoxic*, T citotóxico
- Th** , del inglés *T-helper*, T colaborador
- TREG** , T reguladores
- TCR** , del inglés *T cell receptor*, receptor del linfocito T
- TGF** , del inglés *transforming growth factor*, factor de crecimiento transformante
- TLR** , del inglés, *Toll-like receptor*, receptor tipo Toll
- TNF** , del inglés *tumor necrosis factor*, factor de necrosis tumoral

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ontogenia de las células hematopoyéticas.	28
Figura 2. <i>Stemtree</i> de Haeckel, en el que el autor representa la evolución de los organismos a partir de un precursor único.	29
Figura 3. Esquema original de Pappenheim, que representa la teórica formación de las células hematopoyéticas a partir de una sola célula.	31
Figura 4. Clasificación de células troncales en función de su origen.	33
Figura 5. Ontogenia de las células troncales embrionarias.	35
Figura 6. Diferenciación de las células troncales pluripotentes inducidas (ipsc).	37
Figura 7. Mecanismo de acción y resultado de las posibles terapias antitumorales sobre las células troncales cancerosas.	38
Figura 8. Representación de las divisiones de células troncales en el nicho celular.	40
Figura 9. Componentes del nicho celular.	41
Figura 10. A. J. Friedenstein.	41
Figura 11. Proceso de migración y diapédesis de los leucocitos y el propuesto para las msc.	45
Figura 12. Efectos de las MSC sobre neutrófilos.	53
Figura 13. Efectos de las MSC sobre monocitos.	58
Figura 14. Interacciones de las MSC sobre el sistema del complemento.	64
Figura 15. Esquema sobre la interacción de las MSC sobre las poblaciones de linfocitos.	77
Figura 16. Detalle de la reacción entre las pbmc no deseadas y los anticuerpos tetraméricos.	79
Figura 17. Fotografías de contraste de fases de los cinco clones utilizados en este trabajo.	83
Figura 18. Detalle de la selección de poblaciones de esferas.	83
Figura 19. Microesferas recubiertas por distintos anticuerpos y representación de la determinación de la concentración según sus distintas intensidades de fluorescencia.	85
Figura 20. Representación esquemática de los distintos estadios en el marcaje con cfse.	85
Figura 21. Detalle de la selección de poblaciones de linfocitos para el análisis de proliferación.	89
Figura 22. Detalle de la selección de poblaciones de linfocitos para el análisis de la variación de la expresión de FoxP3.	93
Figura 23. Histogramas de frecuencia y porcentajes de expresión de los distintos antígenos de membrana en los cinco clones de ASC.	95
Figura 24. Porcentaje de células con coexpresión de los marcadores CD44, CD73, CD90 y CD105 en los distintos clones de ASC.	95
Figura 25. Intensidad mediana de fluorescencia (MFI) de los antígenos analizados en los distintos clones.	97
Figura 26. Cinética de producción de IL-6 e IL-8.	99
Figura 27. Cinética de producción de citocinas Th1 para los cinco clones analizados.	101
Figura 28. Cinética de producción de citocinas Th2 para los cinco clones analizados.	101
Figura 29. Picos máximos de producción de citocinas tras estimulación con LPS.	104
Figura 30. Concentraciones de citocinas Th1/Th17 en sobrenadantes de cocultivos ASC.	106
Figura 31. Concentraciones de citocinas Th2 en sobrenadantes de cocultivos ASC.	110
Figura 32. Proliferación de las distintas poblaciones linfocitarias en cocultivos de PBMC.	111
Figura 33. Proliferación linfocitaria en cocultivos de linfocitos CD3 ⁺ purificados.	112
Figura 34. Proliferación linfocitaria en cocultivos de linfocitos CD4 ⁺ purificados.	113
Figura 35. Proliferación linfocitaria en cocultivos de linfocitos CD8 ⁺ purificados.	114
Figura 36. Histogramas 3D del análisis de los cocultivos de ASC y linfocitos CD8 ⁺ purificados.	115
Figura 37. Diagrama de puntos de las distintas condiciones de cultivo para el análisis de la expresión del antígeno de superficie CD11b en linfocitos CD8 ⁺ purificados.	115
Figura 38. Tasa de cambio en la expresión del antígeno de superficie CD11b en linfocitos cd8 ⁺ purificados.	116
Figura 39. Proliferación linfocitaria en cultivos de PBMC y ASC-DMEM ⁺ .	117
Figura 40. Tasa de cambio en la expresión de los marcadores FoxP3 y CD25 en cocultivos de PBMC con ASC.	118
Figura 41. Tasa de cambio en la expresión de los marcadores FoxP3 y CD25 en cultivos de PBMC con ASC-DMEM ⁺ .	118
Figura 42. Tasa de cambio en la mortalidad de PBMC pretratadas con ASC, y estimuladas con luz UV.	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de p obtenidos mediante ANOVA de las distintas comparaciones interclonales para las medias de porcentajes de células con coexpresión de los marcadores CD44, CD73, CD90 y CD105.	94
Tabla 2. Valores de p obtenidos mediante anova de las distintas comparaciones entre los valores medios de citocinas.	107
Tabla 3. Valores de p para las comparaciones interclonales de los cocultivos de PBMC con los distintos clones.	111
Tabla 4. Valores de p para las comparaciones interclonales de los cocultivos de clones con las distintas poblaciones linfocitarias purificadas	115
Tabla 5. Valores estadísticamente significativos, resultantes del análisis ANOVA para las comparaciones interclonales de los cocultivos de ASC-DMEM ⁺ y PBMC.	116
Tabla 6. Valores resultantes del análisis ANOVA para las comparaciones en cuanto a la expresión de los marcadores FoxP3y CD25 de cocultivos de PBMC y ASC.	117



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

I. INTRODUCCIÓN



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1.1. CÉLULAS TRONCALES. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

1.1.1. DEFINICIÓN DE CÉLULA TRONCAL

Una *célula troncal*, comúnmente llamada en castellano célula madre, es una célula indiferenciada con capacidad de autorrenovación. Es la responsable de generar la amplia diversidad de tejidos, órganos y células existentes en los organismos pluricelulares, a través de un mecanismo denominado *diferenciación* (Liu *et al.* 2009), dando lugar a la generación de diferentes tipos celulares maduros. Son también responsables de renovar los tejidos y de reparar los distintos daños que éstos puedan sufrir durante la vida del organismo adulto (Smith, 2006). Todos los organismos pluricelulares tienen alguna forma de célula troncal. El ejemplo más representativo y estudiado es el de la célula troncal hematopoyética (HSC, del inglés, *haematopoietic stem cell*), capaz de dividirse y formar todos los tipos celulares que se encuentran representados en el tejido sanguíneo (Figura 1).

La propiedad de *autorrenovación* implica que cada vez que una célula troncal se divide, lo hace de forma simétrica, generando dos células hijas iguales; mientras que la propiedad de *diferenciación* implica una división asimétrica, que genera dos células distintas, una igual a la célula troncal y otra con un marcado destino de diferenciación (Knoblich, 2008). Estas dos propiedades están determinadas directamente por el microambiente en el que ocurre la división celular, denominado *nicho celular* (Moore *et al.* 2013), que se detallará más adelante.

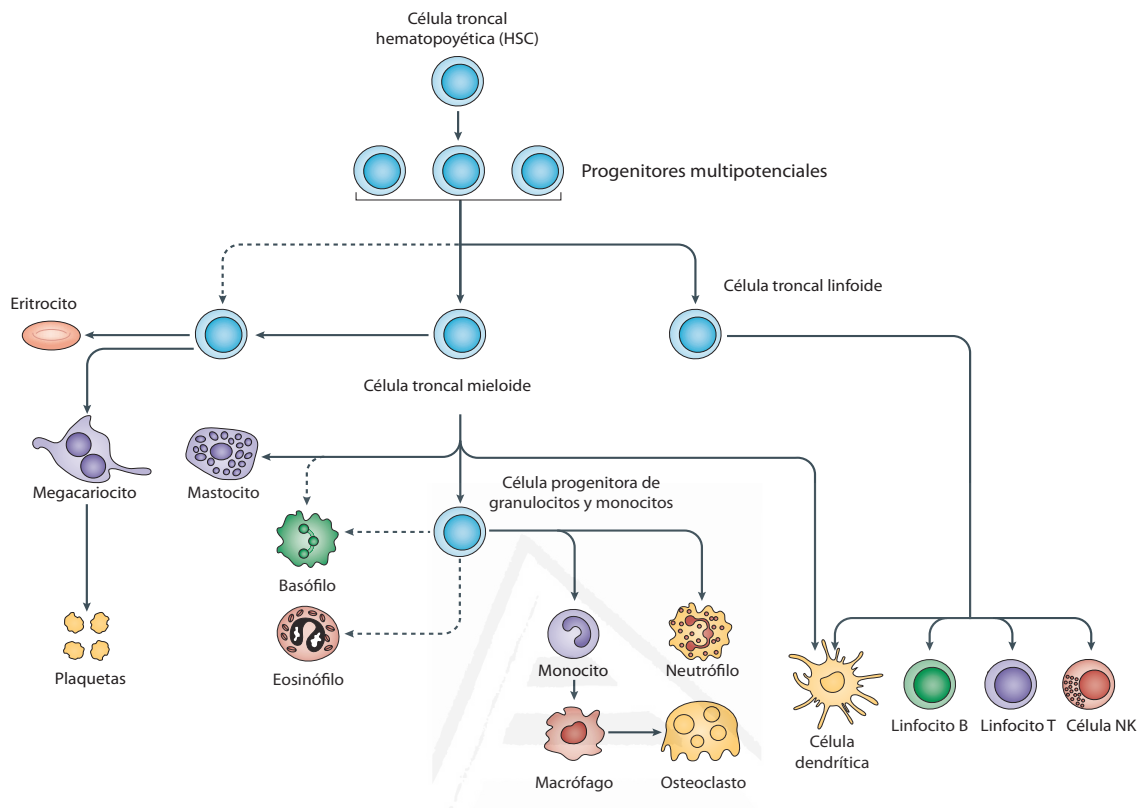


Figura 1. Ontogenia de las células hematopoyéticas (modificado de Wang & Wagers, 2011).

Aunque la autoría de su descubrimiento es difícil de asignar, la primera vez que apareció el término *célula troncal* en la literatura científica fue en el libro *Natürliche Schöpfung-Geschichte*, del biólogo alemán Ernst Haeckel (Haeckel, 1868). En él, Haeckel introdujo el término alemán *stammzelle* (Ramalho-Santos & Willenbring, 2007), traducido al inglés como *stem cell* y al castellano como *célula troncal* o *célula madre* (Figura 2), haciendo apología de los esquemas en forma de árbol (en inglés, *stem tree*) que explicaban la evolución de los organismos a partir de un ancestro común. Con este término definió al organismo unicelular ancestral del que derivan todos los organismos pluricelulares. Más tarde, Haeckel también propuso dicho término para definir al cigoto, encargado de dar lugar a todos los tipos celulares que forman el organismo (Haeckel, 1877).

HAECKEL'S EVOLUTION OF MAN.

PLATE XV.

PEDIGREE OF MAN.

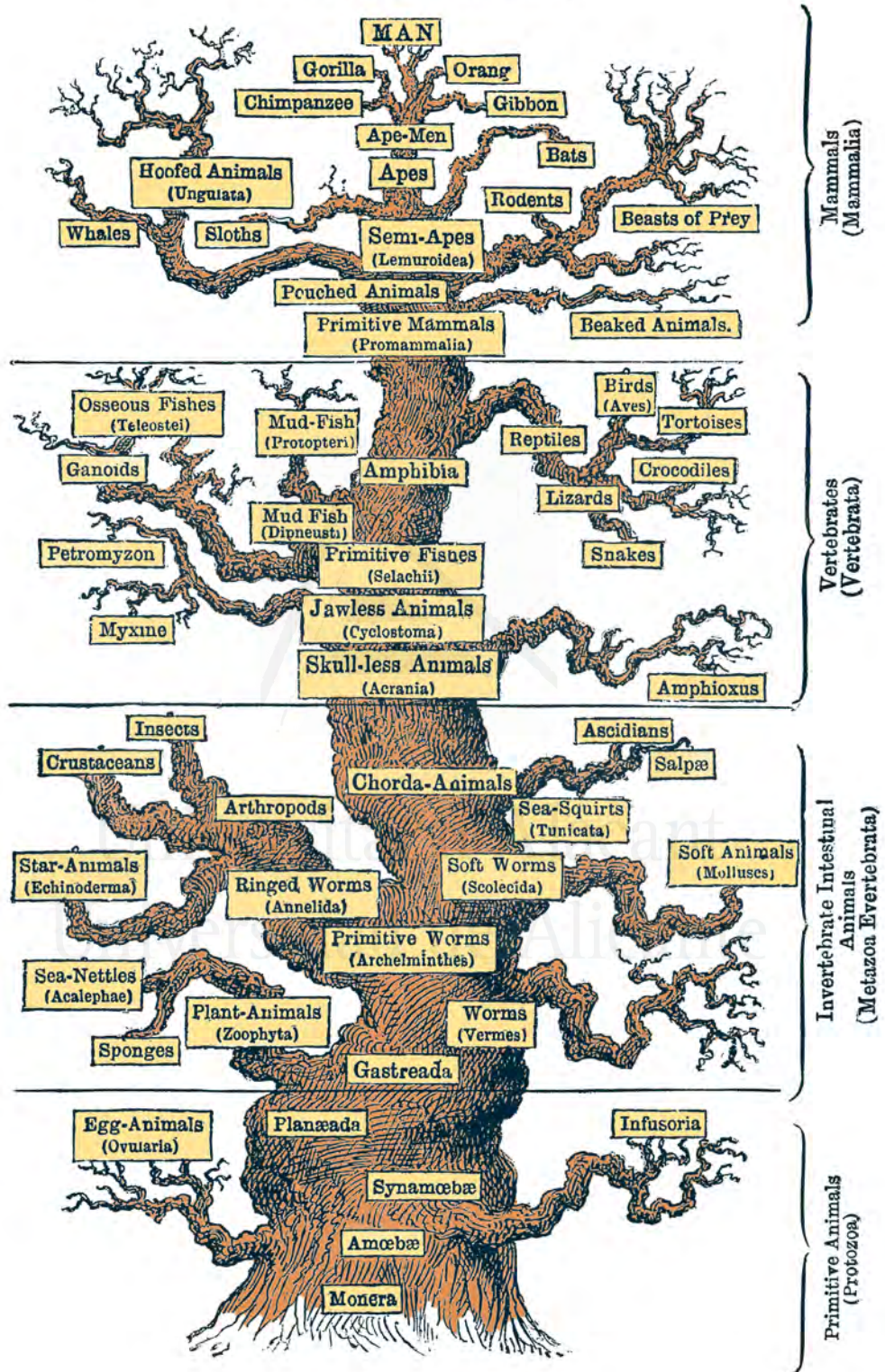


Figura 2. Stemtrees de Haeckel, en el que el autor representa la evolución de los organismos a partir de un precursor único (modificado de Haeckel, 1868).

El término *célula troncal* se fue popularizando, pero su existencia en el organismo adulto no se demostró hasta años más tarde, cuando Florence Sabin, pionera en muchos campos de la biomedicina, postuló en el artículo «*The production of osteogenic sarcomata and the effects on lymph nodes and bone marrow of intravenous injections of radium chloride and mesothorium in rabbits*», la existencia de una HSC en el conejo, cuya cromatina, afectada por la radiación, llevaba al animal a un estado de anemia (Sabin *et al.*, 1932). Posteriormente, la propia Sabin describió los múltiples cambios que ocurrían en las células de la médula ósea y de la sangre debido a la radiación, confirmando la existencia de la HSC, aunque ésta no fuera aislada hasta 31 años después, y relacionándola con las aportaciones previas de Pappenheim (Sabin *et al.*, 1936). La importancia de los estudios de Pappenheim, radica en su ingeniosa idea de posicionar a un solo precursor común para todas las células hematopoyéticas (Ramalho-Santos & Willenbring, 2007). Basándose en esta premisa, ideó un esquema con dicho precursor central, encargado de formar todas las células presentes en el tejido sanguíneo (Pappenheim, 1905) (Figura 3). Esta idea contrastaba con las hipótesis dualistas de la época, que postulaban distintos orígenes para hematíes y glóbulos blancos, debido a las grandes diferencias fenotípicas. No fue hasta 1946 cuando apareció el término *stem cell* en el título de un artículo científico. En dicho estudio se describía, por primera vez, un tipo particular de linfoma congénito (Arrick, 1946).

Existen otros autores a destacar en la historia de las células troncales. Por ejemplo, muchos consideran a Becker, Tim y McCulloch como sus descubridores, aunque lo que realmente describieron estos autores, no por ello menos importante, fue que la HSC tenía una función multipotente y que formaba colonias clonales (Becker *et al.* 1963).

Son ya miles los estudios relacionados con las células troncales, en los que dichas células se han conseguido aislar a partir de multitud de tejidos de organismos adultos, postulándose, a día de hoy, como una gran esperanza de futuro para el tratamiento de multitud de enfermedades. De hecho, existen actualmente numerosos ensayos clínicos y terapias celulares diseñados con células troncales, que detallaremos más adelante.

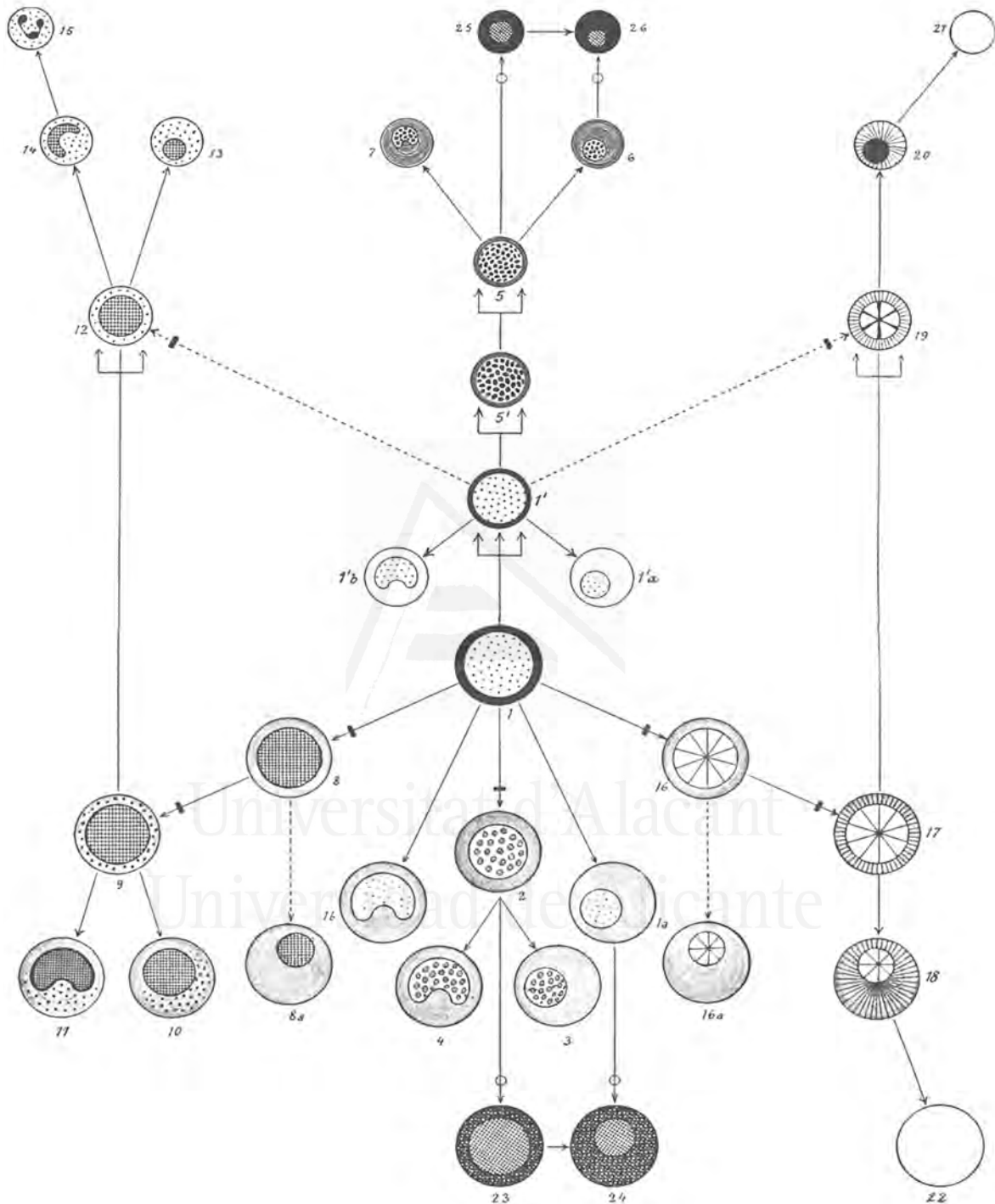


Figura 3. Esquema original de Pappenheim, que representa la teórica formación de las células hematopoyéticas a partir de una sola célula (Ramalho-Santos & Willenbring, 2007).

1.1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS TRONCALES

La clasificación de las células troncales no está exenta de dificultades. Aunque las propiedades de autorrenovación y de diferenciación de las células troncales, se asumieron inicialmente como procesos ilimitados, hoy en día sabemos que no lo son siempre, dado que existen células troncales que solamente pueden dar lugar a ciertos tipos celulares.

El hecho de que, recientemente, algunos autores consideren a las células cancerosas como un tipo de célula troncal, debido a su proliferación indiscriminada (Liu *et al.*, 2009), aumenta también la dificultad a la hora de clasificar a dichas células troncales. Sumado al hecho de la posibilidad, relativamente novedosa, de generar la llamada *célula troncal pluripotente inducida* (iPSC, del inglés *induced pluripotent stem cell*), célula somática adulta que ha sido reprogramada para volver a un estado menos diferenciado (Takahashi & Yamanaka, 2006). Todas estas peculiaridades generan ciertos conflictos con la definición estándar de célula troncal, y complica la tarea de clasificar dichas células. Por ello, no existe una clasificación exacta y consensuada, aunque las más comunes y aceptadas suelen ser las que agrupan a las células troncales en función de su localización u origen, o bien, de su potencial de diferenciación.

Por otro lado, el descubrimiento de la transdiferenciación añade aún más dificultad a su clasificación. A través de dicho proceso, una célula, en principio comprometida para desarrollar un tipo celular de algún linaje embrionario específico, puede «saltar» de linaje y generar células de otro distinto (Ries & Egea, 2012).

De todo lo anteriormente expuesto, es fácil deducir que cualquier clasificación que se haga de las células troncales, siempre va a tener algún grado de ambigüedad o sesgo.

1.1.2.1. CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES SEGÚN SU ORIGEN

La existencia de un determinado tipo de célula troncal procedente del embrión, denominada *célula troncal embrionaria* (ESC, del inglés *embryonic stem cell*), tiene como consecuencia una primera clasificación básica que divide a las células troncales en dos grandes

grupos: células troncales embrionarias y células troncales adultas (Can, 2008; Jones & Matsui, 2007). Una clasificación más profunda implica establecer más diferencias en los dos grupos anteriores. Así, en la clasificación propuesta por Bongso y Lee se diferencian cuatro subgrupos: embrionarias, fetales, de cordón umbilical y adultas (Bongso & Lee 2007) (Figura 4).

Las **células troncales embrionarias** están formadas por el conjunto de las células del blastocisto, tanto del trofoblasto como de la masa celular interna, y de las células germinales embrionarias, presentes en la cresta gonadal seis semanas después de la fecundación. Estas últimas quedan en un estado de «arresto» en las gónadas, para generar los gametos en el organismo adulto. Aunque similares en su potencial de diferenciación, ambas tienen ligeras diferencias. Por ejemplo, las células germinales embrionarias tienen una menor capacidad de proliferación, pero no generan tumores cuando son utilizadas en trasplantes (NIH, 1998).

Las **células troncales fetales** están formadas por el conjunto de las células encargadas de la organogénesis en el nuevo individuo. Ejemplos de dichas células son las células troncales de la cresta neural (Teng & Labosky, 2006) o las células troncales hematopoyéticas fetales (Mikkola, 2006).

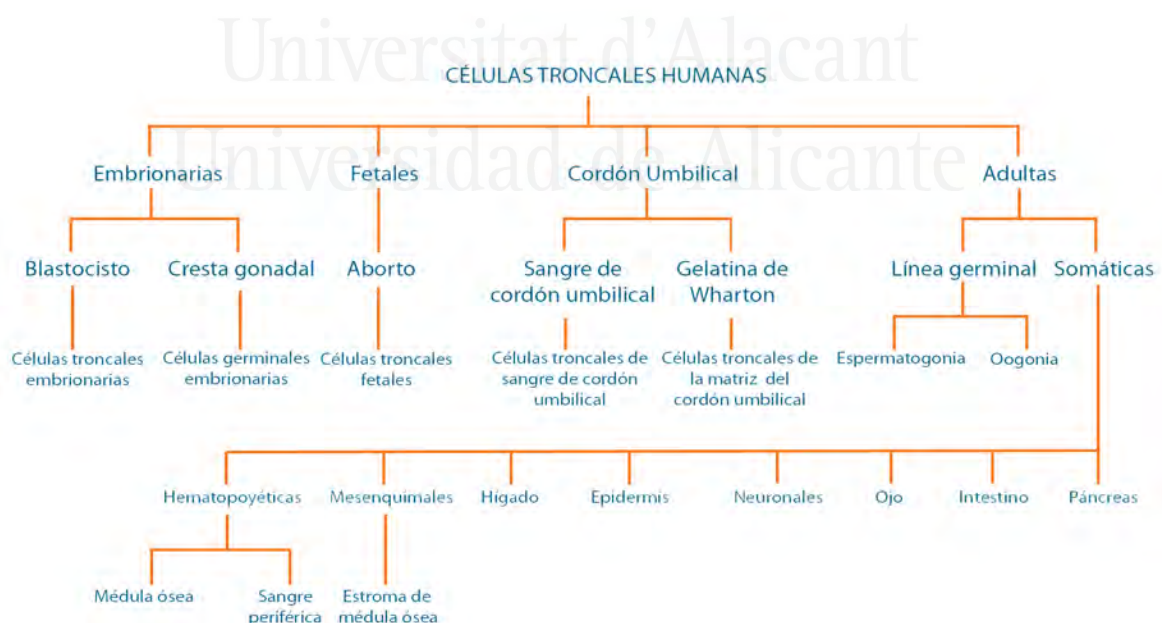


Figura 4. Clasificación de células troncales en función de su origen (modificado de Bongso & Lee, 2007)

Las **células troncales de cordón umbilical** pueden aislarse de la sangre del propio cordón umbilical (Erices *et al.*, 2000), de los tejidos que rodean los vasos sanguíneos de dicho cordón, como la gelatina de Wharton, y de áreas perivasculares (Weiss & Troyer, 2006), así como de la placenta (Fukuchi *et al.*, 2004) y del líquido amniótico (in`t Anker *et al.* 2003). Este grupo de células posee características similares a las células troncales mesenquimales (MSC, del inglés *mesenchymal stem cell*), comentadas más adelante.

Finalmente, las **células troncales adultas** se encuentran en los distintos órganos y tejidos del organismo adulto, donde se encargan de renovar y de reparar los posibles daños que en ellos se produzcan. Son células que en algún momento del desarrollo fetal del individuo dejaron de madurar, quedando parcialmente diferenciadas, residiendo en ciertos nichos y con capacidad de reparar los tejidos a los que pueden dar lugar (Kolios & Moodley, 2013). Entre ellas, las más conocidas son, en primer lugar, la HSC, encargada de formar todos los tipos celulares presentes en la sangre y que se localiza en la médula ósea (Till & McCulloch, 1961; Becker *et al.*, 1963). El otro tipo principal de este grupo celular es la MSC, descubierta por Friedenstein en los estudios realizados en médula ósea de ratón y cobaya a finales de los años 60 (Friedenstein *et al.*, 1966; Friedenstein *et al.*, 1968; Friedenstein *et al.*, 1970; Afanasyev *et al.*, 2009). Otro tipo de célula troncal adulta a destacar, es la célula troncal neural, localizada en el encéfalo y en la médula espinal, y capaz de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage & Temple, 2013). Son ya numerosos los estudios que a día de hoy han conseguido identificar y aislar células troncales adultas a partir de, prácticamente, todos los tejidos, tales como sangre periférica (Xu & Li, 2014), órganos linfoides (Krampera *et al.*, 2007), hígado (Najimi *et al.*, 2007), dermis (Haniffa *et al.*, 2007), pulpa dental (Gronthos *et al.* 2000), tejido adiposo (Zuk *et al.*, 2001), periostio (Zarnett & Salter, 1989), sangre menstrual y endometrio (Hida *et al.*, 2008), leche materna (Patki *et al.*, 2010) y un larguísimo etcétera, además de tumores sólidos (Yan *et al.*, 2012).

Muchos investigadores prefieren trabajar con las ESC debido a su mayor potencial de diferenciación, aunque otros prefieren utilizar las adultas por su menor controversia bioética. Ambos tipos celulares son igualmente importantes y, de momento, y a pesar de la polémica

en torno a las ESC, éstas no tienen aún una alternativa real que permita evitar su uso. No obstante, los recientes avances que han llevado a la generación de iPSC, tanto en ratón (Takahashi & Yamanaka, 2006) como en humanos (Takahashi *et al.*, 2007), han generado entre el colectivo científico una auténtica esperanza para evitar, posiblemente a corto o medio plazo, el uso de las ESC.

1.1.2.2. CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES SEGÚN SU POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN

Otra de las clasificaciones comunes que permite separar las distintas células troncales, es la que las organiza en función de su potencial de diferenciación, entendiendo éste como la cantidad de distintos tipos celulares a los que puede dar lugar dicha célula troncal. Esta clasificación está magistralmente ilustrada en el esquema de Thomas Graf y Tariq Enver (Figura 5). En él se representan las distintas fases de la diferenciación celular, como si fuera el recorrido del agua a través de una montaña, en el que las células están obligadas por el ambiente que las rodea, a «desembocar» en un tipo celular u otro, perdiendo en su descenso potencial de diferenciación (Graf & Enver, 2009).

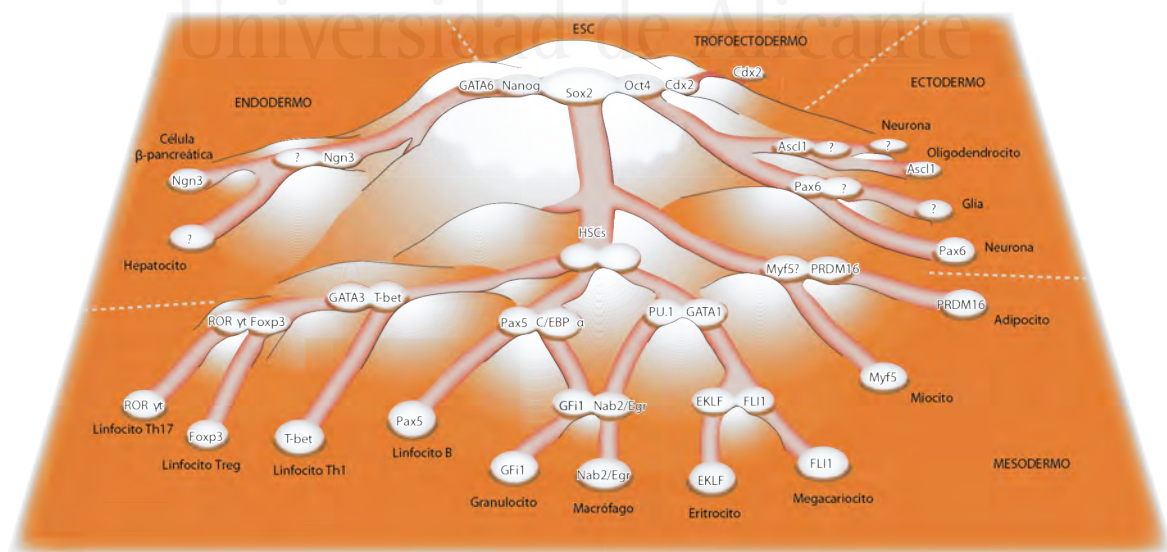


Figura 5. Ontogenia de las células troncales embrionarias, con los factores de transcripción característicos de cada célula (modificado de Graf & Enver, 2009).

En el momento de la fecundación a partir de los gametos haploides, se genera una célula diploide, el cigoto, con una capacidad de diferenciación **totipotente**, que va dividiéndose en sucesivas mitosis generando blastómeros. Dichos blastómeros formarán posteriormente las capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) que darán lugar al organismo y, también, al trofoectodermo, una capa epitelial que rodea el cigoto y que da lugar a la placenta y a los tejidos extraembrionarios. Aunque la capacidad de los blastómeros iniciales es totipotente, la inclusión de éstos como células troncales no es del todo correcta, ya que carecen de la capacidad de autorrenovación (Bongso & Richards, 2004).

Con una capacidad de diferenciación ligeramente menor, encontramos a las células **pluripotentes**, representadas principalmente por las células de la masa celular interna del blastocisto, que pueden dar lugar a células de las tres capas germinales y por lo tanto a todas las células del organismo. No pueden, sin embargo, formar tejidos extraembrionarios, necesarios para dar el soporte materno vital al feto. Este tipo celular correspondería con las ESC, mencionadas anteriormente.

Las células **multipotentes** estarían un escalón por debajo, pudiendo diferenciarse en varios tipos celulares, pero en este caso, pertenecientes a una misma capa embrionaria. Son células que residen en tejidos específicos del organismo adulto (Can, 2008). Hasta ahora, tan sólo se han encontrado células troncales con esta capacidad o menor en el individuo adulto, siendo el ejemplo más estudiado y representativo el de la HSC.

En último lugar se situarían las células **unipotentes**, con capacidad para generar únicamente un tipo celular.

1.1.3. CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS

Gracias a su pluripotencia, las ESC son una fuente óptima para el tratamiento de enfermedades, el estudio de los mecanismos celulares de las mismas y el cribado de ciertos tratamientos (Takahashi *et al.*, 2007). Sin embargo, además de la obvia controversia éti-

ca que genera el uso de embriones para obtener las ESC, es complicado establecer terapias específicas para un paciente, debido a las diferencias genéticas interindividuales.

Como consecuencia de lo anterior, la búsqueda de células multipotentes en el organismo adulto ha sido un continuo reto, que ha quedado parcialmente resuelto con la generación, mediante ingeniería genética, de las iPSC (Takahashi & Yamanaka, 2006). Dicho logro llevó a su autor, junto a John B. Gurdon y tan sólo 6 años después, a obtener el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2012. Estas células son pluripotentes y se generan a partir de fibroblastos aislados de un organismo adulto, mediante un proceso de transducción retroviral de factores de transcripción (Figura 6). Presentan similitudes con las ESC, tales como la morfología, la capacidad proliferativa, los marcadores de superficie, la diferenciación e incluso, la capacidad de generar teratomas (Takahashi *et al.*, 2007). Inicialmente se generaron a partir de fibroblastos de ratón (Takahashi & Yamanaka, 2006) y, un año después, a partir de fibroblastos humanos (Takahashi *et al.*, 2007). Su creación ha sido, por tanto, el mayor hito de los últimos tiempos en cuanto a la terapia celular se refiere, y es donde se hallan depositadas las mayores esperanzas para el tratamiento futuro de enfermedades que, a día de hoy, continúan siendo incurables.

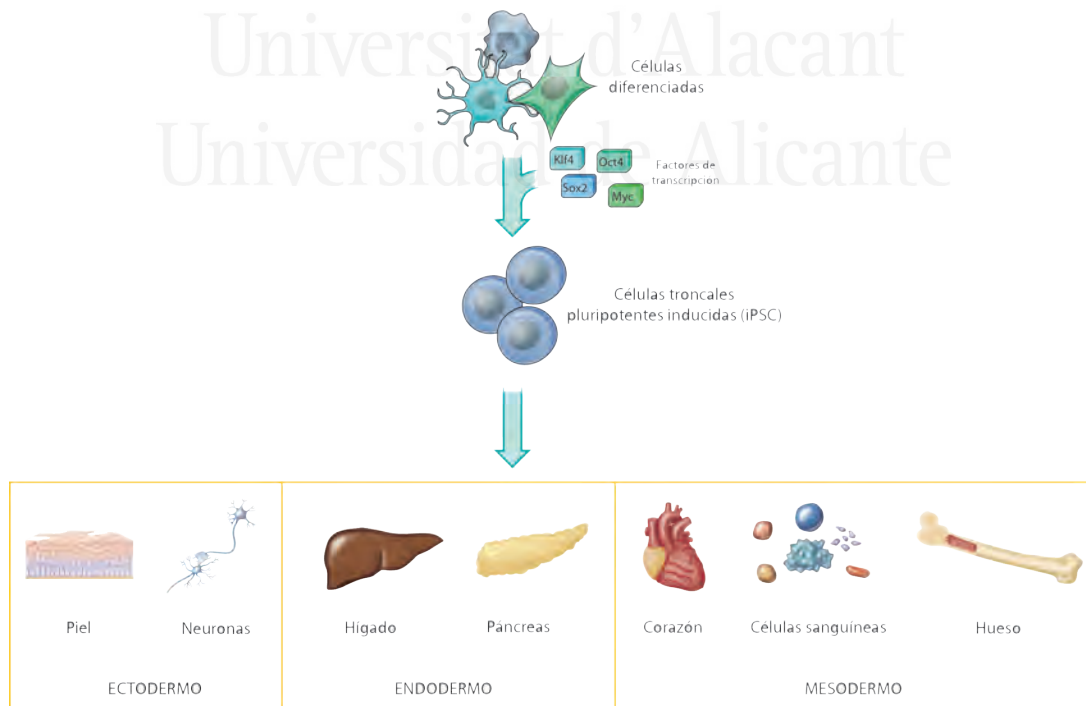


Figura 6. Diferenciación de las células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) (modificado de Loh & Lim, 2013).

1.1.4. CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS

Otro aspecto a tener en cuenta es que, siguiendo la definición clásica de célula troncal, las células troncales cancerosas podrían encajar perfectamente en las distintas clasificaciones anteriormente comentadas; de hecho, muchos autores lo consideran así. Simplificando, un tumor es un órgano aberrante formado por células con una elevada capacidad de proliferación y diferenciación. Dichos tumores tienen, normalmente, un origen clonal (Fialkow, 1976), y están formados por un conjunto heterogéneo de células con distintos grados de diferenciación, aunque algunas de ellas pierden la capacidad de proliferar. Esto lleva a establecer distintos modelos para explicar la estructura y fisiología de los tumores. En parte, estos modelos explicarían el porqué del éxito o fracaso de algunos tratamientos (Reya *et al.*, 2001) (Figura 7).

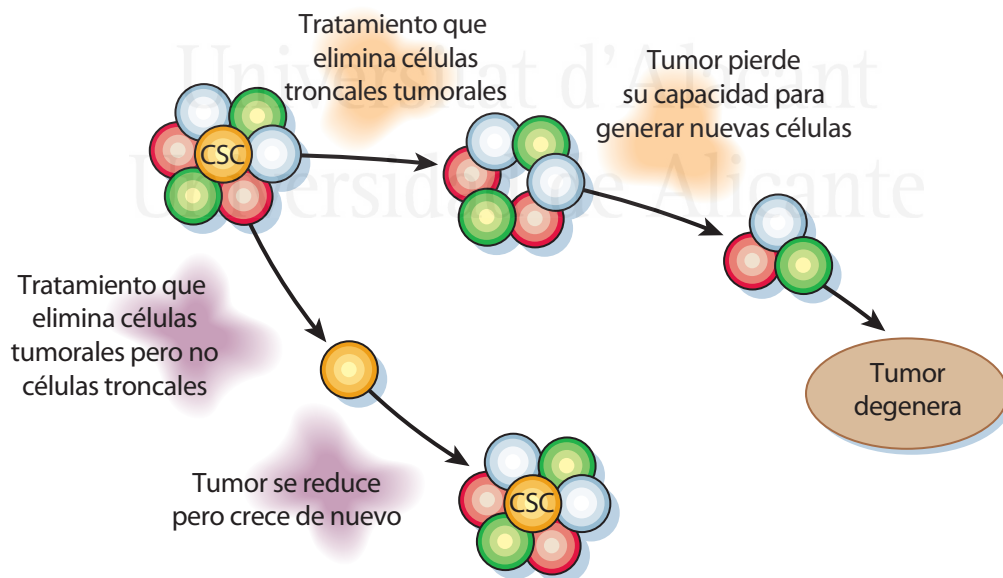


Figura 7. Mecanismo de acción y resultado de las posibles terapias antitumorales sobre las células troncales cancerosas (modificado de Reya *et al.*, 2011).

1.1.5. TRANSDIFERENCIACIÓN

Como se ha comentado anteriormente, la *transdiferenciación* es un proceso mediante el cual una célula troncal puede generar células y tejidos de un linaje distinto al que pertenece. Este proceso se puede llevar a cabo mediante distintas estrategias. Por ejemplo, las MSC, que son células de linaje mesodérmico, han sido satisfactoriamente transformadas en células de linaje ectodérmico, como astroglia o neuronas, mediante la simple adición al medio de cultivo de moléculas como β -mercaptoetanol o hidroxibutilanisol (Woodbury *et al.* 2000), de factores de crecimiento como el epidérmico (EGF, del inglés *epidermal grow factor*) o el de fibroblastos (FGF, del inglés *fibroblast grow factor*) (Hermann *et al.*, 2006), o mediante transfección genética (Dezawa *et al.*, 2004). Esta posibilidad de cambiar el destino de las MSC, abre la puerta a posibles tratamientos de enfermedades degenerativas del sistema nervioso u otras enfermedades, y facilita el proceso frente al uso de células como las troncales neurales, que aunque no necesitan del proceso de transdiferenciación, son sin embargo más difíciles de obtener. Todo ello convierte a la transdiferenciación en una herramienta con gran potencial terapéutico.

1.1.6. NICHO CELULAR

En castellano, la palabra nicho tiene como significado «*hueco practicado en un muro para alojar algo dentro, especialmente el que sirve para depositar cadáveres o sus cenizas en un cementerio*». Sin embargo, el concepto de nicho celular, en biología, no está relacionado con la muerte celular, ni tan siquiera con un hueco, sino todo lo contrario. Su existencia teórica fue postulada en 1978 (Schofield, 1978) y demostrada más tarde en estudios con *Drosophila* (Lin, 2002). El *nicho celular* es una unidad estructural, un microambiente único, formado por células, señales y material extracelular. La sola presencia de una célula troncal no implica, pues, la existencia del nicho, sino que éste está formado por un conjunto de células y factores que permiten a dicha célula troncal mantenerse en un estado indiferenciado. Estos factores mantie-

nen a las células troncales lejos de los estímulos de proliferación, diferenciación y apoptosis, lo que les permite mantener la homeostasis tisular (Moore *et al.* 2013; Rompolas *et al.*, 2013).

Funcionalmente, el nicho puede determinar el destino de una división de una célula troncal. Si ésta se divide con una mitosis paralela a la dirección de las señales que le proporciona el nicho, la división resultará en dos células troncales idénticas, mientras que si la posición del eje de los cromosomas en la mitosis es perpendicular a las señales, el resultado será el de dos células distintas, una célula troncal y otra más diferenciada (Figura 8). Por tanto, la célula troncal no es una unidad independiente predestinada a diferenciarse en otras células, sino que son los factores presentes en el nicho celular los principales responsables del destino de la misma. Por ejemplo, las MSC tienen su propio nicho celular y, además, forman parte del nicho de las HSC (Méndez-Ferrer *et al.*, 2010).

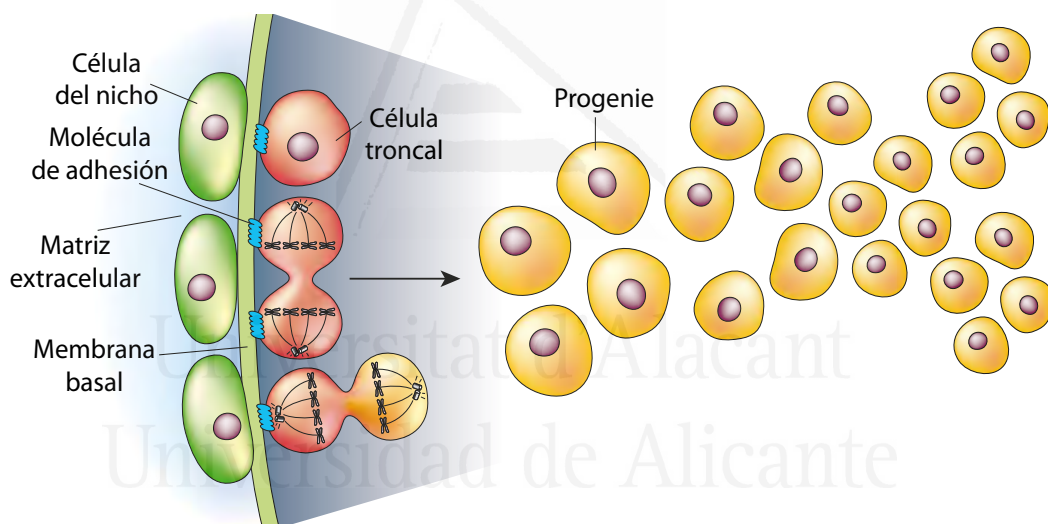


Figura 8. Representación de las divisiones de células troncales en el nicho celular (modificado de Spradling *et al.*, 2001).

Los componentes básicos del nicho celular son la propia célula troncal, las células estromales, la matriz extracelular, los vasos sanguíneos y las conexiones neurales. Todos estos componentes interactúan entre ellos, regulando positiva o negativamente la actividad de la célula troncal en el tiempo y en el espacio (Figura 9). Las células estromales interactúan con la célula troncal a través de receptores, uniones *gap* y factores solubles; la matriz extracelular proporciona la estructura, la organización y las señales mecánicas; los vasos sanguíneos

proporcionan señales sistémicas y vías de reclutamiento de células y, finalmente, las conexiones neurales proporcionan información fisiológica distante al nicho (Jones & Wagers, 2008).

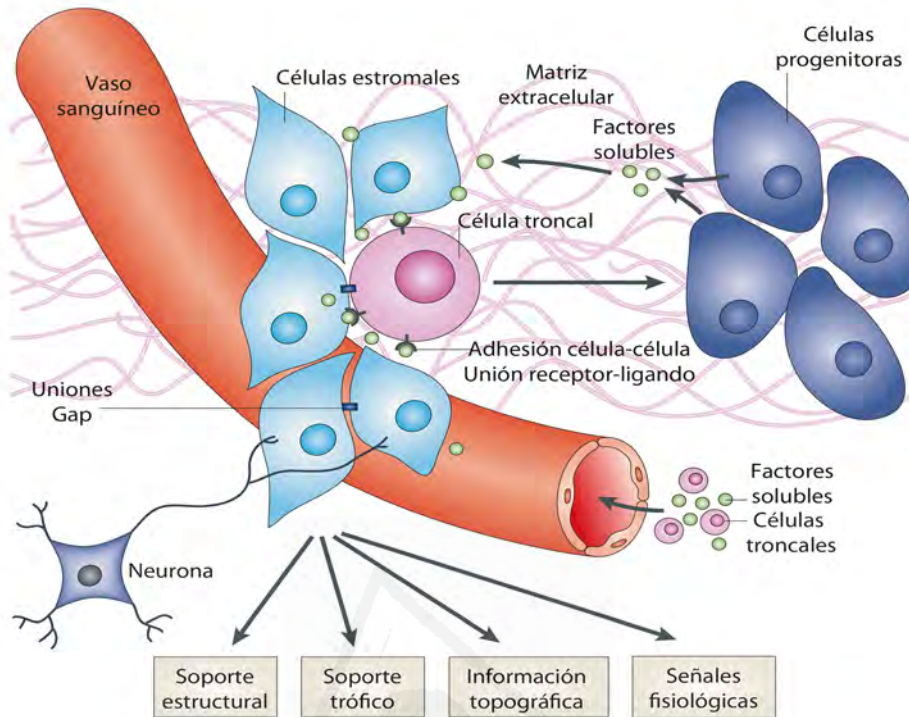


Figura 9. Componentes del nicho celular (modificado de Jones & Wagers, 2008)

1.1.7. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES (MSC)

Las MSC fueron descubiertas en la médula ósea de ratón y de cobaya por A. J. Friedenstein (Figura 10), en estudios realizados a finales de la década de los 60. Friedenstein descubrió que, además de las células hematopoyéticas, también existía un tipo celular con propiedades adherentes, similar a los fibroblastos, con un núcleo alargado, un nucléolo segmentado en dos o tres partes y, además, con la capacidad de formar colonias y de diferenciarse en osteocitos (Friedenstein *et al.*, 1966; Friedenstein *et al.*, 1968; Friedenstein *et al.*, 1970). Dichas células existían en una proporción 1:10000 respecto a las HSC, y Friedenstein las definió como unidades fibroblásticas formadoras de colonias



Figura 10. A. J. Friedenstein © Elena Elstner.

(CFU-F, del inglés *colony-forming units fibroblastic*), debido al crecimiento en forma circular de los distintos clones adheridos. Más tarde, Owen sugirió que dichas células eran, en realidad, células estromales (Owen, 1988). Posteriormente, Caplan propuso llamarlas MSC, por su capacidad de generar células pertenecientes a tejidos del linaje mesodérmico, como el hueso, el tendón, el ligamento, el tejido adiposo, el músculo, etc. (Caplan, 1991). En los últimos años, varios investigadores postulan que las MSC son realmente pericitos, células que rodean vasos sanguíneos, lo que explicaría la multitud de fuentes de obtención de dichas células (Caplan, 2008; Crisan *et al.*, 2008).

1.1.7.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS MSC

Hasta 2006, habían sido numerosos los investigadores que desarrollaron técnicas para aislar MSC, pero sus resultados fueron muchas veces inconsistentes y mostraban diferencias significativas. Además, el hecho del descubrimiento de MSC en una gran variedad de tejidos, establecía la duda de si todas esas células eran realmente el mismo tipo celular. Tampoco existe, o no se ha descubierto aún, un marcador fenotípico propio y exclusivo de las MSC. Con el objetivo de poder identificar homogéneamente a las MSC por parte de los investigadores, la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT, del inglés *International Society for Cellular Therapy*) estableció en 2006 tres criterios mínimos para identificarlas, en base a ciertas características.

En primer lugar, las MSC deben tener la capacidad de adherirse al plástico en condiciones estándar de cultivo. En segundo lugar, deben expresar los marcadores de membrana, CD105¹, CD73 y CD90 y, adicionalmente, no expresar marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y MHC-II (del inglés *major histocompatibility complex*). Finalmente, las MSC tienen que ser capaces de diferenciarse en osteocitos, adipocitos y condrocitos (Dominici *et al.*, 2006).

1. La nomenclatura cúmulo de diferenciación o CD (del inglés *cluster of differentiation*) es una terminología clásica de la Inmunología, en la que se nombran, mediante números correlativos, los distintos antígenos característicos de las células del sistema inmunitario. Dichos antígenos pueden tener otros nombres alternativos, como por ejemplo CD152, que también se denomina CTLA-4 (del inglés *cytotoxic T-lymphocyte antigen*).

1.1.7.2. MARCADORES FENOTÍPICOS

A pesar de que el fenotipo de las MSC ha sido ampliamente caracterizado, sigue sin existir un marcador único que permita diferenciarlas. Dichas MSC expresan de una forma casi homogénea los antígenos de membrana CD29, CD44, CD73, CD90, y CD105. También expresan proteínas que las protegen de los efectos del complemento, como CD46, CD55 y CD59; moléculas reguladoras de la apoptosis, como CD77 y CD95; proteínas con distintas actividades enzimáticas, como CD10, CD13, CD26, CD73 y CD143 y receptores con actividad tirosina quinasa, como CD140b, CD340, así como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *epidermal growth factor receptor*) (Donnenberg *et al.*, 2015).

Es importante destacar que estos marcadores pueden variar ligeramente según el tejido del que proceden las MSC, así como del tiempo que lleven en cultivo, lo que indica que su inmunofenotipo es heterogéneo y dinámico (Mosna & Sensebe, 2010). Estos cambios pueden alterar sus funciones biológicas; por ejemplo, los marcadores CD146 y CD271, también presentes en las MSC, desaparecen gradualmente con el tiempo en cultivo, mientras que marcadores como CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90 y CD166, aumentan. CD34 también disminuye, aunque más rápidamente que los anteriormente mencionados, al igual que CD146, un marcador de pericitos. Finalmente, es importante recalcar que las MSC no poseen antígenos sanguíneos ABO, lo que las hace compatibles con la sangre (Moll *et al.*, 2014).

Todo esto pone de manifiesto la necesidad de encontrar un marcador único para seleccionar las MSC, lo que implicaría una mayor estandarización y eficacia de la terapia celular, al poder seleccionar poblaciones más homogéneas y con propiedades similares (Busser *et al.*, 2015). Mientras dicho marcador no exista, una de las opciones viables para usar poblaciones con propiedades más homogéneas, es el uso de poblaciones clonales de MSC, *temática que constituye el objeto principal de estudio del presente trabajo.*

1.1.7.3. MIGRACIÓN DIRIGIDA

La vía de administración de las MSC en terapia celular puede ser intravenosa, intraarterial o local, es decir, directamente en el tejido de interés. La parte negativa de estas vías de administración es que, cuando se usa la vía intravenosa, la mayor parte de las MSC quedan atrapadas en los pulmones (Gao *et al.*, 2001). Este proceso se reduce cuando se usa la vía intraarterial, aunque ésta tiene más riesgos, tanto por la cirugía invasiva como por la posible aparición de trombos en la microvasculatura. En el caso de la vía local, la supervivencia de las MSC disminuye debido a la falta de O₂ y nutrientes (De Becker & Riet, 2016).

Independientemente de la vía de administración, una de las propiedades de las MSC que se ha puesto de manifiesto en los distintos ensayos clínicos en los que se han utilizado, es la capacidad de dichas células de migrar al foco de inflamación (Hocking & Gibran, 2010; Karp & Leng Teo, 2009). Aunque con ligeras diferencias, este proceso es similar al que utilizan los leucocitos, ya que expresan en superficie proteínas de unión a selectinas, receptores de citocinas e integrinas (Teo, 2012; De Becker & Riet, 2016). Todo esto les permitiría realizar la diapédesis, es decir, atravesar el endotelio para abandonar el torrente sanguíneo (Figura 11) (Zhao & Zhang, 2016). Dicho proceso se ve alterado, disminuyendo su eficacia conforme aumenta el tiempo de cultivo de las MSC, probablemente por una reducción de la expresión de las proteínas nombradas anteriormente (Rombouts & Ploemacher, 2003).

1.1.7.4. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO

Como ya se ha comentado, las MSC pueden aislarse de prácticamente todos los tejidos. De todos ellos, uno de los que presenta más ventajas respecto a los demás, es el tejido adiposo. Este último, es un tipo de tejido derivado del mesénquima, formado principalmente por adipocitos y con función de reserva de energía, entre otras. Se sitúa bajo la

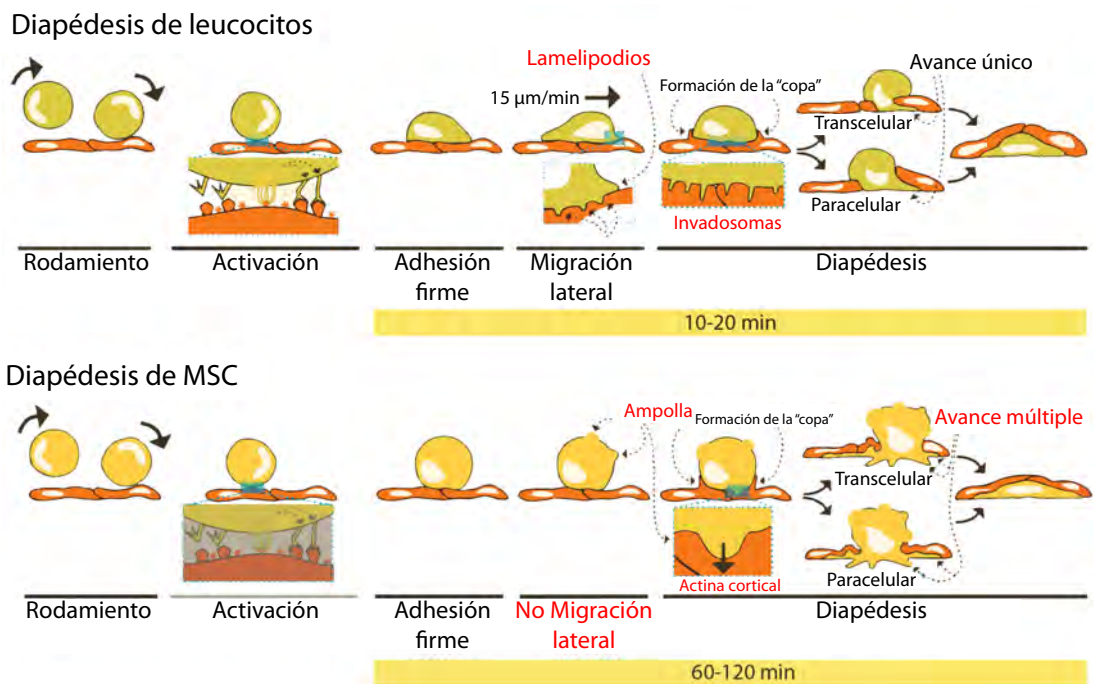


Figura 11. Proceso de migración y diapédesis de los leucocitos y el propuesto para las MSC. En rojo, las principales diferencias (modificado de Teo, 2012).

piel, recubriendo órganos, y en la médula ósea, por lo que su acceso es más sencillo y su disponibilidad es mayor respecto a otros tejidos que contienen MSC.

El hallazgo de las células troncales derivadas de tejido adiposo (ASC, del inglés *adipose stem cell*) data de 2001 (Zuk *et al.*, 2001). En dicho trabajo se postuló que el tejido adiposo, dado que al igual que la médula ósea procede del mesodermo y contiene un elevado número de células estromales (Hausman & Campion, 1982), debía contener también MSC. El método que se desarrolló para aislar a las ASC consistía, brevemente, en una anestesia local seguida de liposucción, posterior lavado y tratamiento con colagenasa, centrifugación y finalmente cultivo *ex vivo* (Zuk *et al.*, 2001).

Precisamente, una de las mayores ventajas de las ASC es su facilidad de obtención, especialmente de cara a obtener cantidades suficientes de células para posibles tratamientos. Por otro lado, la cirugía necesaria para su obtención es menos invasiva y menos molesta para los pacientes. Finalmente, la relativa menor función vital del tejido adiposo, en comparación con la médula ósea, así como su abundancia y distribución, constituyen ventajas adicionales a favor de las ASC.

1.1.7.5. POBLACIONES CLONALES DE MSC

A pesar de que las MSC fueron denominadas en primer lugar como CFU-F, por su crecimiento clonal, la mayoría de los estudios realizados sobre estas células se han centrado en las propiedades de poblaciones no clonales de MSC. La alta heterogeneidad de estas poblaciones se ha demostrado en numerosos estudios (Janicki *et al.*, 2011) y hace referencia, sobre todo, a los factores solubles secretados, perfiles de metilación, y potencial de diferenciación. Probablemente, es esta heterogeneidad la responsable de que la modulación ejercida por estas células varíe de una población a otra en función del tejido de origen de las MSC o del tiempo que lleven en cultivo; en relación con esto último, el uso de pases tardíos conllevaría el manejo de poblaciones cada vez más homogéneas, que estarían formadas por aquellos clones que poseyeran cierta ventaja proliferativa.

Sin embargo, a día de hoy, son pocos los estudios centrados en investigar las posibles diferencias interclonales de las MSC, así como la variabilidad interindividual entre donantes, siendo prácticamente anecdóticos estudios que incluyen variables como el sexo del donante (François *et al.*, 2012), la edad (Landgraf *et al.*, 2011), la obesidad (Baptista *et al.*, 2009; Oñate *et al.*, 2013; Oliva-Olivera *et al.*, 2015; Pachón-Peña *et al.*, 2016), etc. No obstante, en los pocos estudios realizados hasta la fecha, se ha demostrado que sí que existe una variación funcional entre distintos clones (Pittenger *et al.*, 1999; Muraglia *et al.*, 2000; Tremain *et al.*, 2001), especialmente en lo relacionado a su capacidad de diferenciación en determinadas líneas celulares (Paredes *et al.*, 2011). Sin embargo, dicha variabilidad aún no se ha dilucidado desde la perspectiva de la capacidad que estas células tienen para modular distintas poblaciones del sistema inmunitario, aspecto de vital importancia que será comentado con detalle más adelante.

Aunque es cierto que al aislar y cultivar *ex vivo* las células troncales las estamos separando de su nicho y, por lo tanto, variando su situación de equilibrio, estas diferencias inter e intraindividuales en las características de las MSC dependen, en gran medida, del nicho específico del cual proceden, que aunque relativamente similares, tienen diferencias.

Por lo tanto, es importante estudiar y analizar poblaciones clonales de MSC para determinar fielmente estas diferencias inter e intraindividuales, con el objetivo último de poder identificar con mayores garantías aquellos clones con un mayor potencial terapéutico. Esta búsqueda también se puede establecer a partir de sus diferentes propiedades inmunomoduladoras, trascendentales para su papel en terapia celular.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1.2. EL SISTEMA INMUNITARIO

El *sistema inmunitario* es el encargado de mantener la homeostasis del organismo frente a cualquier agresión, ya sea física, química o biológica. El correcto funcionamiento del mismo depende de que la relación entre las distintas poblaciones del sistema inmunitario y el resto del organismo, ya sea tanto mediante contacto directo célula-célula o a través de factores solubles, sea la más adecuada en cada caso, permitiendo a dicho sistema mantener en todo momento su capacidad de discernir entre lo propio y lo extraño. Se compone histológicamente de órganos como la médula ósea, el bazo, el timo, los ganglios linfáticos y el sistema de vasos linfáticos que los conectan.

En cuanto a su fisiología, podemos distinguir dos tipos de respuesta, la *innata*, que constituye la primera barrera de defensa y que responde a las agresiones de una forma menos elaborada y con la misma intensidad en posteriores respuestas frente a un mismo antígeno; y la *adaptativa*, más evolucionada, y que responde a estímulos y objetivos más específicos, de una forma más eficiente y añadiendo la capacidad de memoria inmunológica, que conlleva un incremento en la intensidad de respuesta ante contactos sucesivos. Esta memoria inmunológica ha permitido uno de los mayores avances médicos en la Historia, la obtención de las vacunas. Aunque con fines didácticos se hable de dos sistemas inmunitarios distintos, estos dos sistemas no trabajan independientemente, sino en total sincronía, a través de la interacción de múltiples componentes celulares y solubles.

La parte celular de la inmunidad innata la forman los neutrófilos, los basófilos, los eosinófilos, el sistema monocito-macrófago, las células dendríticas y las células asesinas na-

turales (NK, del inglés *natural killer*). La parte soluble principal está formada por un conjunto de proteínas con distintas funciones, que se denomina sistema del complemento. Por otro lado, la inmunidad adaptativa en su parte celular, se compone de linfocitos T¹ y linfocitos B²; y en su parte soluble, de anticuerpos.

Ambos tipos de inmunidad utilizan en sus respuestas el contacto directo entre células, o entre componentes solubles (como el sistema del complemento o los anticuerpos) y células. También utilizan una red propia, y prácticamente exclusiva, de comunicación mediante secreción de ciertas proteínas solubles, que se denominan *citocinas*. Estas citocinas actúan como mensajeros intercelulares y son capaces de modular, activando o inhibiendo, la respuesta inmunitaria. Desequilibrios, tanto por exceso como por defecto, en la respuesta de cualquiera de estos dos sistemas o en su relación entre ellos, provocan enfermedades como las inmunodeficiencias o las enfermedades autoinmunes. Otros desequilibrios pueden llevar, directa o indirectamente, al cáncer. Además, la capacidad de distinguir entre los componentes propios y los extraños, a través del sistema mayor de histocompatibilidad, convierten al sistema inmunitario en el principal responsable del que depende el éxito o fracaso de los trasplantes.

Con esta visión global de la estructura y función del sistema inmunitario, podemos hacernos a la idea de cuan importante es encontrar terapias que, utilizando distintas moléculas y/o células del propio sistema inmunitario, sean capaces de recuperar el equilibrio del mismo cuando éste esté alterado. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la eficacia de distintas terapias que modifican las respuestas del sistema inmunitario y, entre ellas, una de las que más potencial tiene es el uso de MSC.

Las MSC tienen la capacidad, como se ha explicado previamente, de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Aparte de dicho potencial regenerativo, también son capaces de secretar citocinas y responder a ellas, interaccionando con las células del sistema inmunitario y modificando su respuesta, en un proceso denominado *inmunomodulación*.

1. El nombre *linfocito T* proviene del órgano donde madura, en latín e inglés *thymus*.

2. El nombre *linfocito B* proviene del órgano donde madura en aves, la bolsa de Fabricio, en latín *bursa cloacalis* o *bursa fabricii*, y en inglés *bursa of Fabricius*. Aunque el ser humano no posee dicho órgano, se mantuvo la nomenclatura B, al madurar en médula ósea (en inglés *bone marrow*).

La combinación de dicha capacidad inmunomoduladora, junto con la posibilidad de transdiferenciarse, su fácil aislamiento y su baja capacidad inmunogénica, debida a la reducida expresión del MHC-II y de moléculas coestimuladoras, aumentan las posibilidades de éxito de trasplantes alogénicos de dichas células. Es importante destacar también su capacidad de migración hacia tejidos dañados y focos de inflamación. El conjunto de todos estos factores otorga a las MSC su enorme potencial terapéutico.

1.2.1. INMUNOMODULACIÓN

Los mecanismos mediante los cuales las MSC realizan la inmunomodulación, aún no están totalmente caracterizados. Sin embargo, sí se puede afirmar que las MSC secretan un gran número de citocinas, factores de crecimiento y otras moléculas capaces de modificar la respuesta inmunitaria, además de ejercer funciones por contacto directo y de favorecer procesos vitales como la hematopoyesis. Estos efectos ocurren sobre la práctica totalidad de poblaciones del sistema inmunitario, que se detalla en este apartado.

1.2.1.1. MSC Y NEUTRÓFILOS

Las células polimorfonucleares o granulocitos, son el principal componente celular del sistema inmunitario, constituyendo aproximadamente el 70% de los leucocitos. Reciben su nombre por la curiosa forma de su núcleo y se dividen en neutrófilos (los más numerosos), basófilos y eosinófilos. Aunque son leucocitos con una esperanza de vida muy baja, juegan un papel vital en la lucha contra microorganismos, de tal forma que su ausencia provocaría la muerte del individuo en horas.

Los neutrófilos abandonan la sangre para llegar al tejido dañado, en cuestión de minutos. Participan en la inflamación aguda y tienen como principal función fagocitar elementos extraños que, de forma natural, están ausentes en el propio organismo. Estos elementos son reconocidos mediante receptores, denominados TLR (del inglés, *Toll-like receptor*), como

por ejemplo, el TLR4, que se une al lipopolisacárido presente en las bacterias gram-negativas, o el TLR3, que se une al RNA bicatenario (dsRNA, del inglés *double-stranded ribonucleic acid*) de algunos virus. Una vez fagocitados, dichos elementos son destruidos mediante un proceso que se denomina estallido respiratorio, en el que se generan moléculas reactivas de oxígeno y nitrógeno, extremadamente tóxicas. Entre ellas, el ion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HClO), componente principal de la lejía doméstica.

La médula ósea, aparte de la hematopoyesis, tiene una función de reserva de neutrófilos maduros, unas 30 veces superior a los circulantes, listos para su liberación en el caso de que se produzca una demanda de los mismos (Boxio *et al.* 2004). La coexistencia de neutrófilos con MSC en la médula ósea, conlleva obligatoriamente a interacciones entre ellos.

Ex vivo, las MSC inhiben la apoptosis de los neutrófilos, de una forma dosis-dependiente, tanto en cocultivo como con medio condicionado por las MSC, mediante la acción de, al menos, la interleucina 6 (IL-6) (Raffaghello *et al.*, 2008). En cuanto a los procesos de migración, reclutamiento y activación de los neutrófilos al tejido dañado, las MSC son capaces de aumentarlos al secretar factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), interferón beta (IFN- β), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF, del inglés *macrophage migration inhibitory factor*) e IL-8 (Figura 12). Esta última es el principal elemento quimiotáctico para los neutrófilos, que actúa regulando la expresión de CD11b en los mismos y aumentando así la extravasación. Además, el conjunto de factores solubles liberados por las MSC, provoca un aumento en la actividad bactericida de los neutrófilos, potenciando de este modo la fagocitosis (Brandau *et al.*, 2014). Hay que destacar que las MSC expresan también los receptores de la inmunidad innata TLR, lo que les permite responder ante los mismos elementos que los neutrófilos y secretar una serie de citocinas que los activan y que permiten el rápido reclutamiento de éstos. Por otro lado, las MSC pueden provocar indirectamente dicho reclutamiento, a través de la inducción de IL-17 por parte de linfocitos CD4 de memoria (Hsu *et al.*, 2013).

Existe heterogeneidad de resultados en cuanto al efecto de las MSC sobre el estallido respiratorio. Mientras que algunos estudios muestran un aumento en su intensidad (Cassatella *et al.*, 2011), otros han identificado una disminución de la misma (Raffaghello *et al.*, 2008). Por otro lado, y como se ha comentado previamente, cuando las MSC son perfundidas por vía sanguínea, la mayor parte de ellas quedan atrapadas en los pulmones (Gao *et al.*, 2001), donde adoptan el fenotipo de las células pulmonares. Esta desventaja para la terapia celular, es sin embargo aprovechada con éxito en el tratamiento de condiciones que conlleven daño pulmonar, como es el caso de la ventilación asistida. La ventilación mecánica provoca un daño pulmonar que promueve un ambiente proinflamatorio, capaz de reclutar y activar nuevos neutrófilos en el pulmón. Este proceso es atenuado con la administración de MSC, especialmente cuando estas células se administran previamente a la ventilación (Lai *et al.*, 2015).

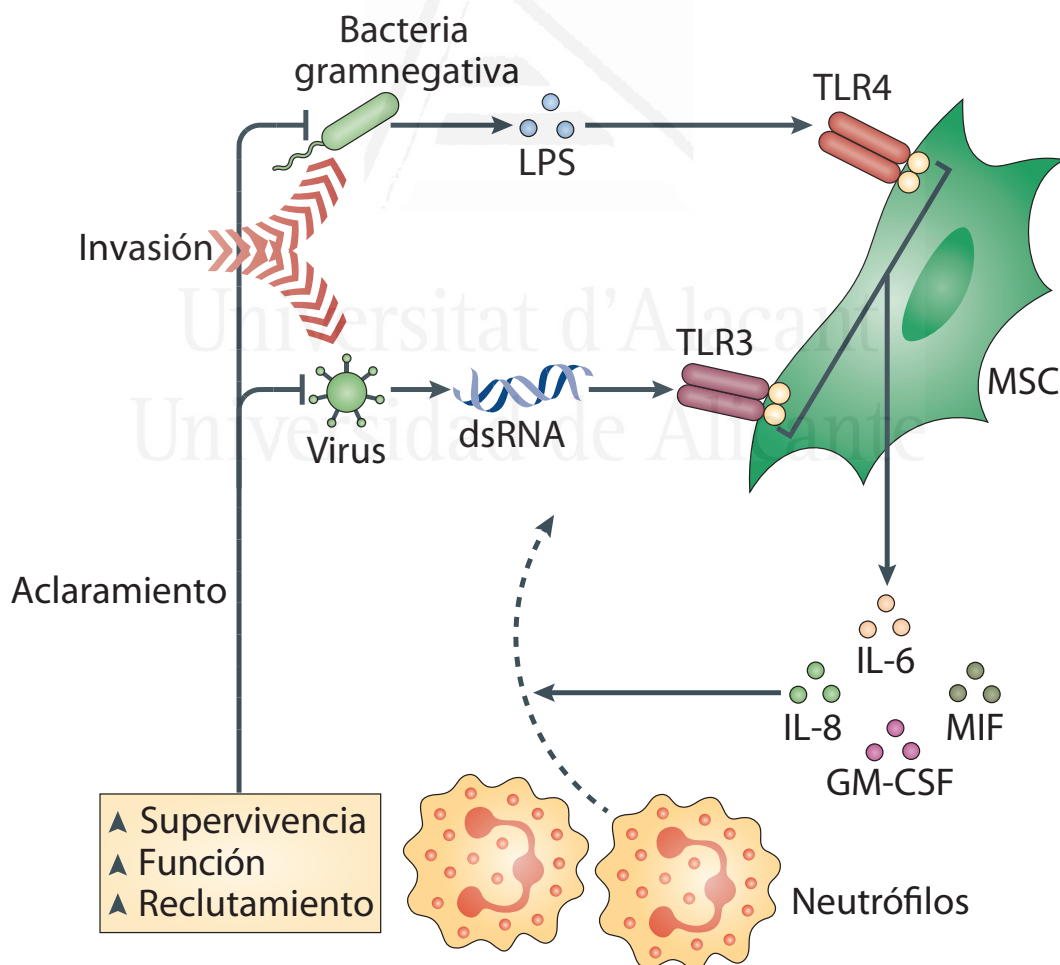


Figura 12. Efectos de las MSC sobre neutrófilos (modificado de Le Blanc & Mougiakakos, 2012).

1.2.1.2. MSC Y MONOCITOS

El sistema monocito-macrófago está formado por células encargadas de fagocitar elementos extraños y presentarlos a las células de la inmunidad adaptativa. Los monocitos son células circulantes y se pueden diferenciar en macrófagos o en células dendríticas, cuando migran a los tejidos. Se les puede conocer con distintos nombres según su localización, como células de Kupffer en el hígado, o microglía en el sistema nervioso. Además, se pueden clasificar en dos tipos: M1, con una potente actividad bactericida y con un perfil inflamatorio, y M2, que ayudan a resolver procesos inflamatorios y promueven la regeneración de tejidos mediante IL-10.

Las MSC son capaces de aumentar la supervivencia de los monocitos, mediante la regulación a la baja de genes apoptóticos (Melief *et al.*, 2013). En ambientes inflamatorios, el IFN gamma (IFN- γ) modula la expresión de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO, del inglés *indoleamine 2,3-dioxygenase*) en MSC (Croitoru-Lamoury *et al.*, 2011) que, por un lado inhibe directamente a linfocitos T y, junto con otros factores, también promueve la diferenciación de los monocitos hacia un fenotipo M2, inmunosupresores *per se* de los linfocitos T y de la respuesta inflamatoria (François *et al.*, 2012) (Figura 13). Mediante la secreción del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF, del inglés *hepatocyte grow factor*), las MSC son también capaces de aumentar la síntesis de IL-10 por parte de los monocitos, así como de disminuir la producción del factor de necrosis tumoral (TNF- α , del inglés *tumor necrosis factor*) (Chen *et al.*, 2014).

Por último, son capaces de inhibir, pero de manera reversible, la diferenciación de los monocitos hacia células dendríticas (Jiang *et al.*, 2005), limitando la expresión de CD1a, CD40, CD8, CD86 y HLA-DR (del inglés *human leukocyte antigen*) (Wei Zhang *et al.*, 2013), a través de, al menos, IL-6. En cocultivos con un ratio MSC:monocitos de 1:10, los factores solubles son capaces de producir estos efectos (Melief *et al.*, 2013), mientras que a ratios más bajos es necesario el contacto celular (Jiang *et al.*, 2005).

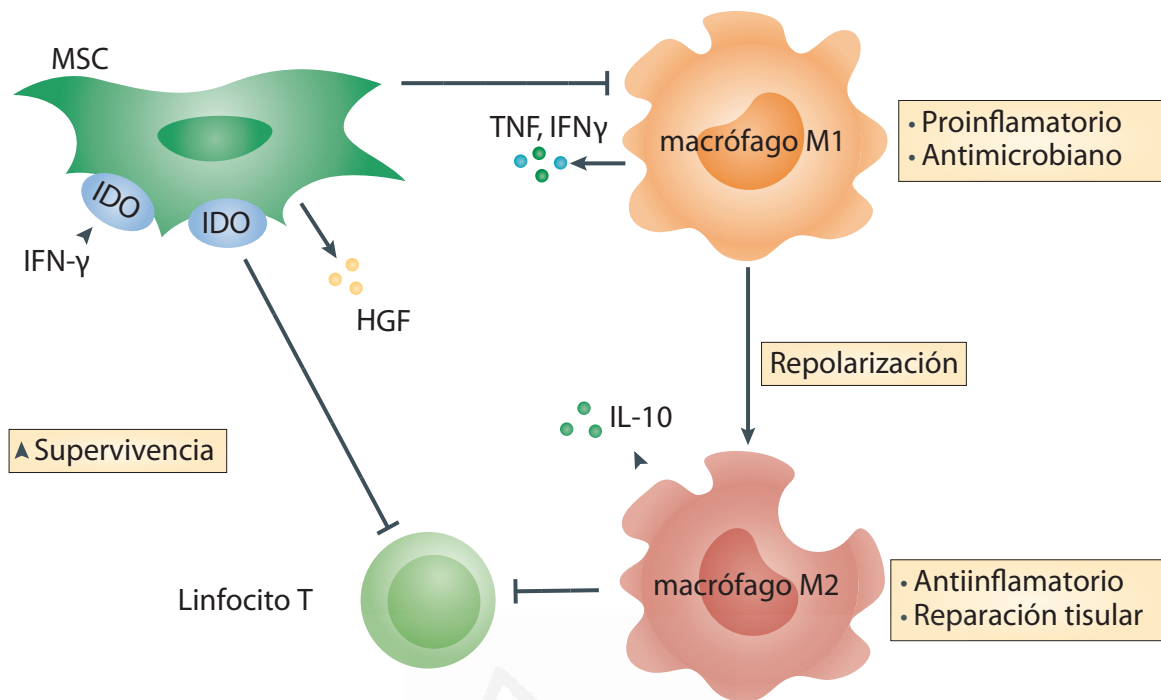


Figura 13. Efectos de las MSC sobre monocitos (modificado de Le Blanc & Mougiakakos, 2012).

1.2.1.3. MSC Y CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas, descubiertas por Langerhans en 1868 y cuyas funciones fueron caracterizadas por Ralph Steinman (Steinman & Cohn, 1973), reciben su nombre por la similitud en sus extensiones a las dendritas neuronales. Residen en tejidos y son capaces de capturar elementos extraños mediante fagocitosis, endocitosis mediada por receptor y pinocitosis, para posteriormente digerirlos. A continuación, maduran y adquieren un fenotipo especializado en presentar antígenos, a través del MHC-II y de la expresión de moléculas coactivadoras de linfocitos T, a la vez que ven mermadas sus capacidades de captura. Tras dicha maduración, abandonan el tejido y, a través del torrente sanguíneo, viajan a los órganos linfoides para exponer dichos elementos procesados en su superficie, con el objetivo último de que los linfocitos T puedan reconocerlos y activarse, por lo que son las principales responsables del destino de las células T. Son, por tanto, las células presentadoras de antígeno por excelencia. Esta función es optimizada por sus múltiples extensiones, que permiten aumentar la superficie de contacto y así aumentar la probabilidad de presentación del antígeno a los

linfocitos. Existen varios tipos, que se generan desde la vía de diferenciación linfoide, menos conocidas, y también a través de la vía de diferenciación mieloide. Básicamente, en su maduración pueden diferenciarse en los tipos 1 y 2, que promueve la formación de linfocitos Th1 y Th2, respectivamente. La presencia de $\text{IFN-}\gamma$ promueve las primeras, con gran capacidad de síntesis de IL-12 y $\text{TNF-}\alpha$, mientras que la presencia de prostaglandina E2 (PGE2) promueve las segundas, con una mayor capacidad para producir IL-6.

Como se ha comentado previamente, las MSC inhiben la formación de células dendríticas a partir de monocitos. Además, en las células dendríticas inmaduras provocan una disminución de la expresión de MHC-II, así como de moléculas coestimuladoras necesarias para la presentación de antígenos, como CD80 o CD86, manteniéndolas en una especie de arresto inmaduro, con poca capacidad de presentación de antígeno (Wei Zhang *et al.*, 2013), inhibiendo también la producción de citocinas proinflamatorias como IL-12 y aumentando la de citocinas antiinflamatorias como IL-10 (Jiang *et al.*, 2005). Estos efectos ocurren principalmente mediante factores solubles cuando son producidos por una gran cantidad de MSC, mientras que a ratios menores, el contacto celular es necesario (Jiang *et al.*, 2005).

1.2.1.4. MSC Y CÉLULAS NK

Las células NK son un tipo de linfocitos con un papel fundamental en la respuesta temprana contra infecciones y cáncer. Parte de su función es ejercida mediante citocinas como el $\text{IFN-}\gamma$, la IL-10 y el GM-CSF, entre otras. Además, presentan actividad citotóxica dependiente de anticuerpo y actividad citolítica mediante granzimas y perforinas. Interaccionan también con el sistema inmunitario adaptativo, principalmente mediante interacción con las células dendríticas. Todas estas características les otorgan un papel muy importante en la inmunomodulación. Por lo tanto, modificaciones en las mismas tienen repercusiones tanto en el sistema inmunitario innato, como en el adaptativo.

Las MSC inhiben la proliferación de células NK activadas, de una forma dosis-dependiente, cuando se encuentran en cocultivo (Aggarwal & Pittenger, 2005; M Krampera *et al.*,

2006; Spaggiari *et al.*, 2006). Del mismo modo, también provocan un descenso en la expresión de CD56, así como de receptores de activación en las mismas, como el receptor 2B4, la cadena gamma común (CD132), NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D o CD69 (Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2008). En cuanto a su efecto sobre las citocinas, son capaces de disminuir la secreción de IL-10, TNF- α (Sotiropoulou *et al.*, 2006) e IL-12 (Thomas *et al.*, 2014). Respecto a su modulación sobre la síntesis de IFN- γ , necesario para la respuesta efectiva contra infecciones y para la regeneración de tejidos, existen estudios que reportan un aumento de su producción (Spaggiari *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2014), mientras que otros muestran una disminución de dicha citocina (Spaggiari *et al.*, 2008). La actividad citotóxica de las células NK también se ve afectada. Ensayos con distintas líneas celulares demuestran una disminución de dicha actividad (Spaggiari *et al.*, 2008). Adicionalmente, la síntesis de proteínas citolíticas, como la granzima y perforina, disminuye en presencia de MSC (Ribeiro *et al.*, 2013).

1.2.1.5. MSC Y SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El sistema del complemento es un conjunto de proteínas del sistema inmunitario innato, que se pueden activar mediante tres vías distintas (clásica, alternativa y de las lectinas). Dicha activación libera distintos péptidos con funciones quimiotácticas, de activación de leucocitos y de estimulación de la fagocitosis. Algunos de estos péptidos también son responsables de la formación del complejo de ataque a la membrana, mecanismo mediante el cual se pueden lisar células diana o patógenos. Adicionalmente, la activación del sistema del complemento también juega un papel importante en el rechazo alógeno. Los componentes centrales de dicho sistema son C3 y C5, independientemente de cualquiera de las tres vías de activación del mismo. C3 es escindido en C3a y C3b, y por otro lado, C5 en C5a y C5b, por sus respectivas convertasas. Los fragmentos C3a y C5a liberados son anafilatoxinas que, entre otras funciones, tienen la capacidad de actuar como elementos quimiotácticos, es decir, son moléculas capaces de atraer a otras células, siendo los leucocitos su principal reclamo.

Las MSC presentan en su membrana los receptores C3aR y C5aR, para las anafilatoxinas C3a y C5a, respectivamente (Schraufstatter *et al.*, 2009). Estos receptores contribuyen a reclutar a las MSC en los tejidos dañados, donde existe una mayor concentración de anafilatoxinas (Schraufstatter *et al.*, 2009). No sólo presentan receptores para C3a y C5a, sino que, por otro lado, también pueden activar el sistema del complemento y formar así más C3a y C5a, además de poder adherir a sus membranas nuevas moléculas activadas de dicho sistema (Moll *et al.*, 2011). Expresan en su membrana el marcador de superficie CD59, capaz de inhibir el efecto del complejo de ataque a la membrana, lo que hace que estas células sean resistentes al sistema del complemento cuando se encuentran en el torrente sanguíneo (Figura 14) (Moll *et al.*, 2011). Finalmente, también son capaces de secretar factor H, capaz de inhibir el sistema del complemento (Tu *et al.*, 2010). Todas estas propiedades hacen que las MSC sean compatibles con la sangre, siendo moderadamente resistentes a la lisis por parte del complemento.

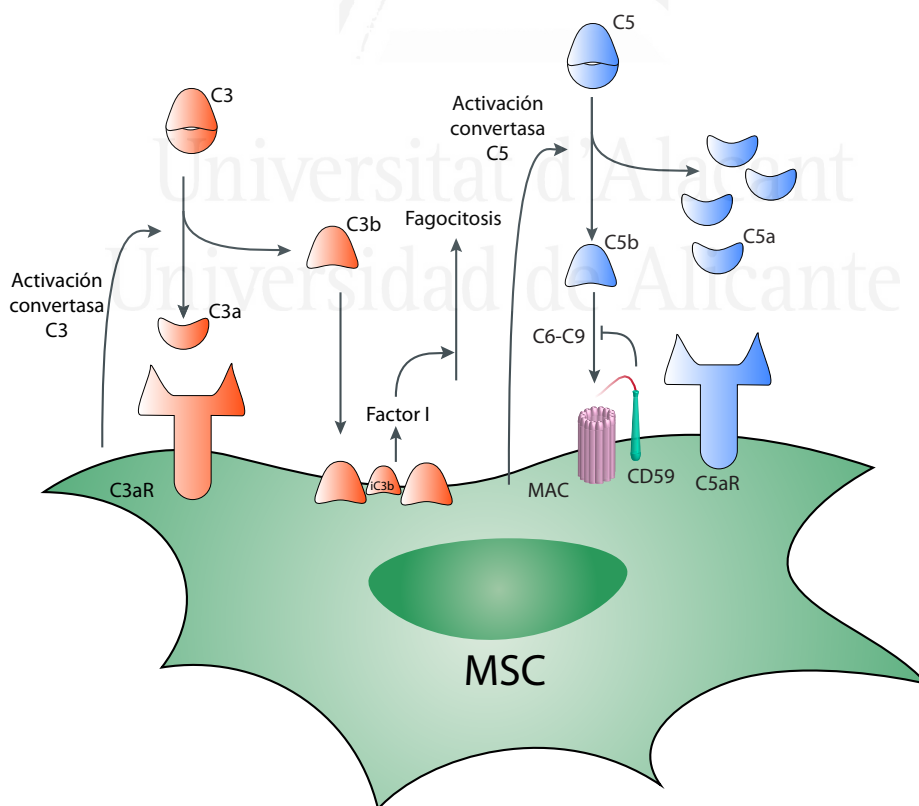


Figura 14. Interacciones de las MSC sobre el sistema del complemento.

1.2.1.6. MSC Y LINFOCITOS B

Los linfocitos B son los responsables finales de la respuesta humoral de la inmunidad adaptativa. Presentan en su membrana el receptor del linfocito B (BCR, del inglés *B-cell receptor*), capaz de unirse a proteínas y glicoproteínas solubles o particuladas. Esta respuesta está mediada por los anticuerpos que secretan una vez activados, y que a su vez se unen a estructuras altamente específicas, normalmente de patógenos, «marcándolas» para facilitar la fagocitosis de las mismas por parte de la inmunidad innata. Además, estas células también poseen la capacidad de presentar antígenos, aunque en menor medida que las células dendríticas.

Para una correcta respuesta humoral, un linfocito B activado que haya localizado alguna estructura extraña, prolifera para generar una gran población clonal de células plasmáticas. Esta población clonal sintetiza una gran cantidad de anticuerpos. También se diferencian en células de memoria para, en posteriores contactos con el mismo antígeno, generar una respuesta mucho más rápida e intensa.

Las MSC disminuyen de una forma notable la proliferación de estos linfocitos, provocando un arresto de los mismos en las fases G_0/G_1 del ciclo celular. También provocan una disminución en la formación y secreción de anticuerpos, así como una reducción en la expresión de receptores de citocinas, tales como CXCR¹, CXCR5² y CCR7³, mediadoras de la quimiotaxis. Empero, al contrario de lo que ocurre con las células dendríticas, no reducen la expresión de moléculas coestimuladoras en los linfocitos B, por lo que la capacidad de presentación de antígenos de estas células no se vería afectada significativamente. Finalmente, la síntesis y secreción de citocinas claves en su función, como TNF, IFN- γ , IL-4, e IL-10, no se ve afectada (Corcione *et al.*, 2006).

1. Receptor para la citocina SDF-1 (del inglés *stromal cell-derived factor 1*), también conocido como CD184

2. Receptor para la citocina BLC (del inglés *B-lymphocyte chemoattractant*), también conocido como CD185 o BLR1 (del inglés *Burkitt lymphoma receptor 1*)

3. Receptor para las citocinas CCL19 (del inglés *C-C motif chemokine ligand 19*) y CCL21, también conocido como CD197 o BLR2 (*Burkitt lymphoma receptor 2*)

1.2.1.7. MSC Y LINFOCITOS T

Los linfocitos T actúan tanto en la inmunidad celular como en la humoral. Al igual que los linfocitos B, también tienen un receptor específico en su membrana, el TCR (del inglés *T-cell receptor*). A diferencia del BCR, el TCR sólo puede unirse a elementos proteicos procesados por las células presentadoras de antígeno, a través del MHC-I o MHC-II, específicamente. Existen principalmente dos grupos. Por un lado están los linfocitos T colaboradores (Th, del inglés *T-helper*), conocidos por presentar en su membrana el antígeno CD4 y, por otro, los linfocitos T citotóxicos (Tc, del inglés *T-cytotoxic*), que presentan en su membrana el antígeno CD8.

El antígeno CD4 interacciona con el MHC-II, presente en las células presentadoras de antígeno profesionales, y facilita que el linfocito T reconozca a través del TCR fragmentos proteicos pequeños. Dichos fragmentos son resultantes de la digestión, por parte de la célula presentadora de antígeno, de elementos extracelulares fagocitados. Esta interacción activa al linfocito y le permite secretar una serie de citocinas que regulan la inflamación y la acción del resto de células del sistema inmunitario.

El antígeno CD8 interacciona con el MHC-I, presente en la práctica totalidad de las células del organismo, que es el encargado de presentar a los linfocitos elementos internos de las células. Si el MHC-I presenta un fragmento alterado (proveniente de una expresión aberrante debida a un tumor), un fragmento extraño (proveniente de un patógeno intracelular), o fragmentos de MHC distintos (provenientes de un injerto o de un trasplante no singénico), el linfocito T CD8 los reconocerá, se activará y pondrá en marcha un sistema especializado para eliminar la célula diana, mediante la secreción de elementos citotóxicos y proapoptóticos.

De forma general, y con la excepción de la subpoblación de células T reguladoras, las MSC inhiben la proliferación de los linfocitos T en cocultivo, de una forma dosis dependiente, tanto si son añadidas a los linfocitos antes de ser activados, como posteriormente (Nicola *et al.*, 2002). Este efecto se produce por un arresto en fase G0/G1 de los linfocitos por parte de las MSC (Glennie *et al.*, 2005). HGF,IDO y PGE2 parecen tener también un papel muy impor-

tante en la inhibición de la actividad de los linfocitos T (Di Nicola *et al.* 2002; Meisel *et al.*, 2004; Aggarwal S, & Pittenger. 2005).

Aunque no de una forma tan intensa como en presencia de las MSC, los factores solubles son suficientes para provocar estas respuestas, en especial IFN- γ , e IL-1 (Krampera *et al.*, 2006; Groh ME *et al.*, 2005), aunque muchos autores consideran el contacto celular como requisito básico para una correcta inmunomodulación (Krampera 2003).

Dentro de la población de linfocitos T colaboradores, existen varias subpoblaciones con distintas funciones, como los linfocitos Th1, Th2, Th17 o los linfocitos T reguladores (TREG). *Grosso modo*, los linfocitos Th1 y Th17 regulan la respuesta celular y activan la respuesta humoral, que ayuda a la primera, promoviendo la formación de anticuerpos que favorecen la citotoxicidad, como la IgG2. Los linfocitos Th2 median en la respuesta humoral frenet a patógenos extracelulares, promoviendo la formación de IgE y TREG. Existe cierta plasticidad entre ellos, sobre todo entre Th1 y Th2 y, por otro lado, entre Th17 y TREG, y promueven ambientes pro o antiinflamatorios, según el número y la intensidad con la que actúen. Los linfocitos Th1 median respuestas a patógenos intracelulares; los Th2, a extracelulares; los Th17, llamados así por su capacidad de secretar IL-17, median en la respuesta innata a hongos y helmintos y, finalmente, los linfocitos TREG, median respuestas supresoras.

1.2.1.7.1. Th1

Los linfocitos Th1 son activados en presencia de IFN- γ o IL-12, y producen principalmente IFN- γ y TNF- α , ayudando a reclutar macrófagos y a sintetizar, por parte de los linfocitos B, anticuerpos IgG2a. Median en la respuesta inmunitaria celular. Estos efectos tienen la potencialidad de dañar tejidos, y en el caso de que exista una mala regulación en su función, pueden desempeñar un papel importante en enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus tipo I y otras enfermedades autoinmunes organoespecíficas.

Las MSC son capaces de disminuir la secreción de IFN- γ por parte de las células Th1 (Aggarwal & Pittenger, 2005), lo que produce una disminución de su actividad, que a su vez

provoca un aumento de la producción de IL-4 (Krampera *et al.* 2003) e IL-10 (González *et al.*, 2009) por parte de las células Th2 (Figura 15).

1.2.1.7.2. Th2

Los linfocitos Th2 se activan en presencia de IL-4 y producen la propia IL-4, además de IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. El efecto de estas citocinas es predominantemente antiinflamatorio y median sobre todo en la inmunidad humoral. Permiten la lucha contra parásitos extracelulares, cambiando el isotipo formado por los linfocitos B a IgG1 e IgE, además de reclutar eosinófilos. Esta respuesta está asociada a enfermedades alérgicas, asma y enfermedades autoinmunes sistémicas.

Como se ha comentado anteriormente, las MSC aumentan la producción de IL-4 a partir de la inhibición de las células Th1, lo que favorece la generación de una respuesta antiinflamatoria del tipo Th2 (Figura 15).

1.2.1.7.3. TREG

Los linfocitos TREG son esenciales en la modulación de la respuesta inmunitaria, siendo capaces de prevenir la aparición de procesos autoinmunes y de resolver procesos inflamatorios. Expresan constitutivamente el receptor para la IL-2 (CD25) y el factor de transcripción FoxP3 (del inglés *forkhead box P3*), además de muchas otras moléculas de membrana y citoplasmáticas, como GITR (del inglés *glucocorticoid-induced TNFR-related*), CTLA-4 o Helios. Provocan una potente supresión de los procesos inflamatorios mediante contacto celular y/o citocinas. Pueden ejercer su función mediante cuatro vías principales: la secreción de IL-10, el agotamiento del IL-2, citotoxicidad o inhibiendo a células presentadoras de antígeno. Su formación ocurre a partir de células CD4 *naïve*, que se activan por la acción del TGF- β . Estas células activadas pueden diferenciarse en células TREG si existe TGF- β e IL-2

o bien en células Th17, en presencia de IL-6 e IL-21, existiendo plasticidad entre ellas según varíe el microambiente que las rodea.

Las MSC provocan un aumento de esta subpoblación de linfocitos T, secretores de IL-10 y con funciones reguladoras, tanto en cocultivo con el conjunto de células mononucleares (Aggarwal & Pittenger, 2005; Ribeiro *et al.*, 2013), como en medio condicionado (Melief *et al.*, 2013). La presencia de monocitos para poder ejercer este aumento de TREG es objeto de debate. Así como se ha conseguido aumentar la proporción de TREG en cultivos de linfocitos CD4 purificados, con el uso único de medio condicionado con células CD4 aisladas, lo que impediría su activación por parte de otras células (Ivanova-Todorova *et al.*, 2012), otros autores afirman que la presencia de monocitos es obligatoria (Melief *et al.*, 2013). Adicionalmente, este aumento es menor en condiciones ambientales de saturación de O₂, respecto de saturaciones más bajas, fisiológicamente más cercanas al ambiente natural de las MSC derivadas de tejido adiposo (Frazier *et al.*, 2014). Como se ha comentado anteriormente, también se ha demostrado la capacidad de las MSC para generar células TREG en ambientes inflamatorios, óptimos para la diferenciación de linfocitos T a Th1 y Th17 (Luz-Crawford *et al.*, 2013) (Figura 15).

1.2.1.7.4. Th17

Los linfocitos Th17, además de secretar IL-17A, también son capaces de secretar IL-17F, IL-21, e IL-22, generando ambientes proinflamatorios que permiten reclutar neutrófilos. Su desajuste se relaciona con enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple.

Las MSC son capaces de inhibir la acción de las células Th17 y promover la formación de TREG en detrimento de las Th17, inhibiendo citocinas tales como IL-17, IL-22, IFN- γ o TNF- α , y aumentando la producción de IL-10, la expresión de FOXP3 y la actividad supresora (Ghannam *et al.*, 2010). Dichas MSC son capaces, por tanto, de inhibir la acción inflamatoria de Th17, sin afectar a la diferenciación de las TREG.

Sin embargo, y como se ha comentado previamente en el apartado de la modulación de las MSC sobre los neutrófilos, otros estudios han mostrado la capacidad de las MSC de promover la liberación de IL-17 por parte de los linfocitos CD4 (Hsu *et al.*, 2013) (Figura 15).

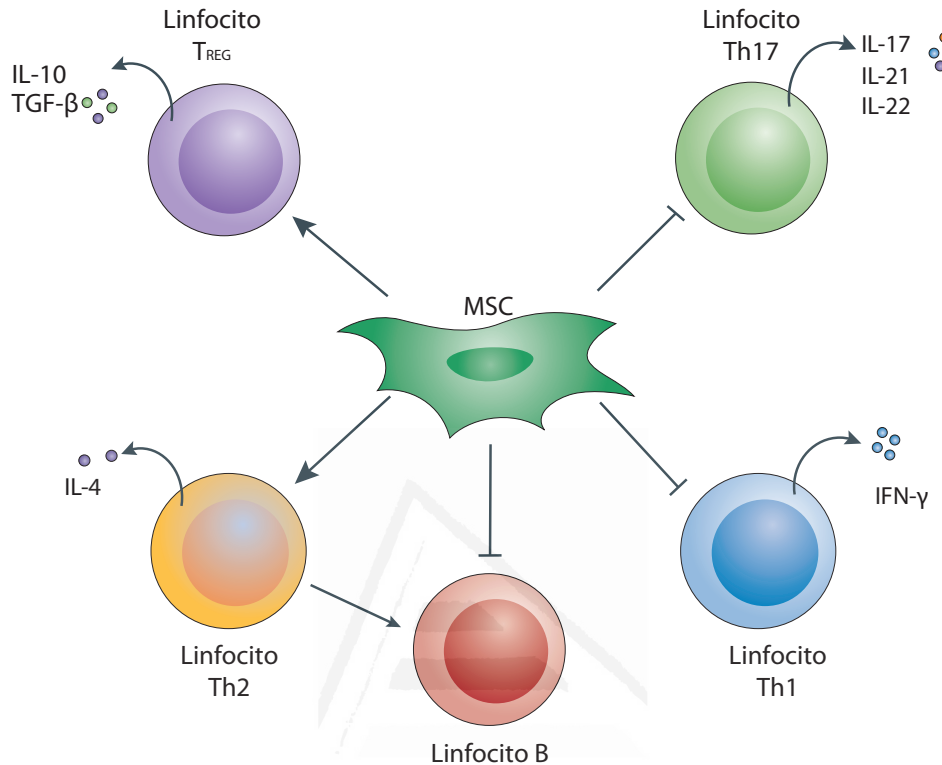


Figura 15. Esquema sobre la interacción de las MSC sobre las poblaciones de linfocitos.

1.2.2. ENSAYOS CLÍNICOS

La potencialidad de estas células se ve plasmada por el número de ensayos clínicos que, a día de hoy, se han realizado o están realizándose. En estos momentos, existen 652 ensayos con células troncales mesenquimales en distintas patologías, como enfermedades musculoesqueléticas, isquemia o enfermedades del sistema nervioso central.

Las enfermedades con una gran participación del sistema inmunitario, como la enfermedad injerto contra huésped, enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple o autoinflamatorias como la enfermedad de Crohn, también son objeto de investigación en distintos ensayos clínicos.

Por ejemplo, la enfermedad injerto contra huésped ocurre en trasplantes de médula ósea, donde el sistema inmunitario del injerto, responsable en última instancia de generar las poblaciones celulares sanguíneas en el huésped, detecta como extraño al huésped. Está mediado sobre todo por la respuesta de linfocitos T, por lo que la administración de MSC debería en principio evitarlo. De hecho, varios ensayos ya han finalizado y algunos de ellos han obtenido resultados positivos (Wang *et al.*, 2012).

Con todo lo anteriormente comentado, y dada la heterogeneidad de las MSC y su efecto sobre prácticamente todas las células del sistema inmunitario, queda patente la necesidad de caracterizar correctamente aquellas poblaciones con distintas capacidades inmunomoduladoras. Esta búsqueda, a falta de un marcador exclusivo para las mismas, debe realizarse basándose en sus propiedades *ex vivo* de modular y modificar el comportamiento de las distintas poblaciones de células del sistema inmunitario. Para ello, la clonación a partir de una sola célula es la manera más sencilla y óptima de generar poblaciones homogéneas, identificar su potencial inmunomodulador y, finalmente, elegir el clon más adecuado para realizar una terapia celular dirigida y eficaz.

Para concluir con este apartado, y dado el efecto de las MSC sobre prácticamente todas las células del sistema inmunitario, queda patente la necesidad de caracterizar al máximo dichas poblaciones, especialmente en el caso de querer utilizarlas en protocolos de terapia celular. Esta búsqueda, a falta de marcadores específicos, debiera realizarse basándose en sus propiedades ex vivo para modular y modificar el comportamiento de las distintas poblaciones de células del sistema inmunitario. Dada la enorme heterogeneidad de las MSC, la clonación a partir de una sola célula se antoja como la manera más sencilla y óptima de generar poblaciones homogéneas, que nos permitan por un lado identificar con la máxima fiabilidad su potencial inmunomodulador y, por otro lado, elegir el clon más adecuado en cada caso para realizar una terapia celular dirigida y eficaz.

II. OBJETIVOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

2.1. HIPÓTESIS

Estudios previos muestran la distinta capacidad de diferenciación tisular presentada por clones diferentes de MSC, aunque son pocos los estudios que hasta la fecha han demostrado que esas diferencias afecten también a su capacidad inmunomoduladora en humanos. Nosotros postulamos que clones procedentes de una población heterogénea de ASC de un individuo concreto, van a ser funcionalmente diferentes entre sí, en cuanto a su capacidad para modular el sistema inmunitario, pero a su vez pueden ser similares en su comportamiento a clones procedentes de otro individuo. Basándonos precisamente en esas diferencias o particularidades de cada clon, sería factible disponer de un banco de clones bien caracterizados, que podrían utilizarse en protocolos de terapia celular con el principal objetivo de predecir, con más fiabilidad, los resultados esperables en un individuo concreto, y de disminuir la variabilidad de resultados que suele acontecer cuando se manejan poblaciones heterogéneas de MSC.

2.2. OBJETIVOS

El *principal objetivo* de este trabajo fue demostrar que los clones procedentes de poblaciones heterogéneas de ASC, presentan diferentes capacidades inmunomoduladoras. Para ello decidimos caracterizar fenotípica y funcionalmente cinco clones de ASC procedentes de dos donantes sanos diferentes. Para llevar a cabo dicha caracterización, nos planteamos desarrollar *ex vivo* los siguientes *objetivos específicos*:

1. Caracterizar el fenotipo de membrana de los distintos clones de ASC, de acuerdo al porcentaje de expresión e intensidad mediana de fluorescencia de los antígenos CD44, CD73, CD90 y CD105.
2. Caracterizar el perfil de citocinas de los secretomas procedentes de cada uno de los clones de ASC.
3. Caracterizar el balance de citocinas Th1/Th2/Th17, en los sobrenadantes de cocultivos de los distintos clones de ASC con PBMC.
4. Analizar el efecto de los clones de ASC sobre la proliferación de distintas poblaciones y subpoblaciones de PBMC totales, así como su efecto sobre distintas subpoblaciones de linfocitos T purificados.
5. Evaluar la capacidad moduladora de los distintos clones de ASC, sobre la población de células TREG.
6. Analizar el efecto de los secretomas de cada uno de los clones de ASC, sobre la proliferación de PBMC totales, así como su efecto modulador sobre la población de células TREG.
7. Determinar el efecto de los distintos clones de ASC sobre la viabilidad de PBMC.
8. Establecer diferencias interclonales basadas en el conjunto de los objetivos anteriores, que nos permitan caracterizar patrones de comportamiento diferentes que, potencialmente, pudieran utilizarse en la optimización de los protocolos de terapia celular con MSC.

III. MATERIALES Y MÉTODOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

3.1. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y MUESTRAS BIOLÓGICAS DE SANGRE PERIFÉRICA

En este apartado se detalla la composición y las propiedades de los medios de cultivo, reactivos y muestras biológicas más utilizados en este trabajo.

-Medio de cultivo para células mesenquimales, en adelante, DMEM⁺, formado por DMEM (del inglés *Dulbecco's modified eagle medium*); glucosa 25 mM; HEPES (de su nombre molecular en inglés [2-(4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl) ethanesulfonic acid]) (Gibco); 10% suero de ternera fetal (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) (Gibco); 1% penicilina/estreptomicina (P/s, del inglés *penicilin/streptomycin*) (Gibco) y 1% glutamina (Sigma).

-Medio de cultivo para células mononucleares, en adelante, RPMI⁺: RPMI (del inglés *Roswell Park Memorial Institute*) (Gibco), 10% FBS (Gibco), 1% P/s (Gibco), 1% glutamina (Sigma).

-Tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffer saline*), sin Ca⁺² ni Mg⁺² (Hyclone). Es una solución tampón con un pH de 7,4, es salina (9 g NaCl/L), isotónica y no tóxica.

-Tripsina 0,05% con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*) 0,02% (Gibco). Contiene una solución de la enzima peptidasa tripsina, que permite separar células adherentes en recipientes de cultivo, al romper las cadherinas que las mantienen unidas al recipiente, y entre ellas. Se inhibe en presencia de Ca⁺² y Mg⁺², de ahí el uso del EDTA, quelante para dichos iones. Puede desactivarse añadiendo los medios de cultivo utilizados en este trabajo, ya que poseen dichos iones.

-Medio de separación de linfocitos: Ficoll-Hypaque (GEHealthcare). Permite separar poblaciones celulares mediante técnicas en gradiente de densidad. Su densidad es 1,074 g/L, siendo mayor que la de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cell*) y menor que la del resto de poblaciones sanguíneas, lo que provoca una separación física entre ellas tras una centrifugación, permitiendo la purificación de las primeras.

-Medio de criopreservación: 90% de FBS y un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO, del inglés *dimethyl sulfoxide*) (Sigma-Aldrich). El DMSO es un criopreservante que previene la formación de cristales durante el enfriamiento y descongelación de criotubos con células, manteniendo en cierto grado la presión osmótica y disminuyendo así la mortalidad celular al conservar la integridad de los orgánulos y de las células.

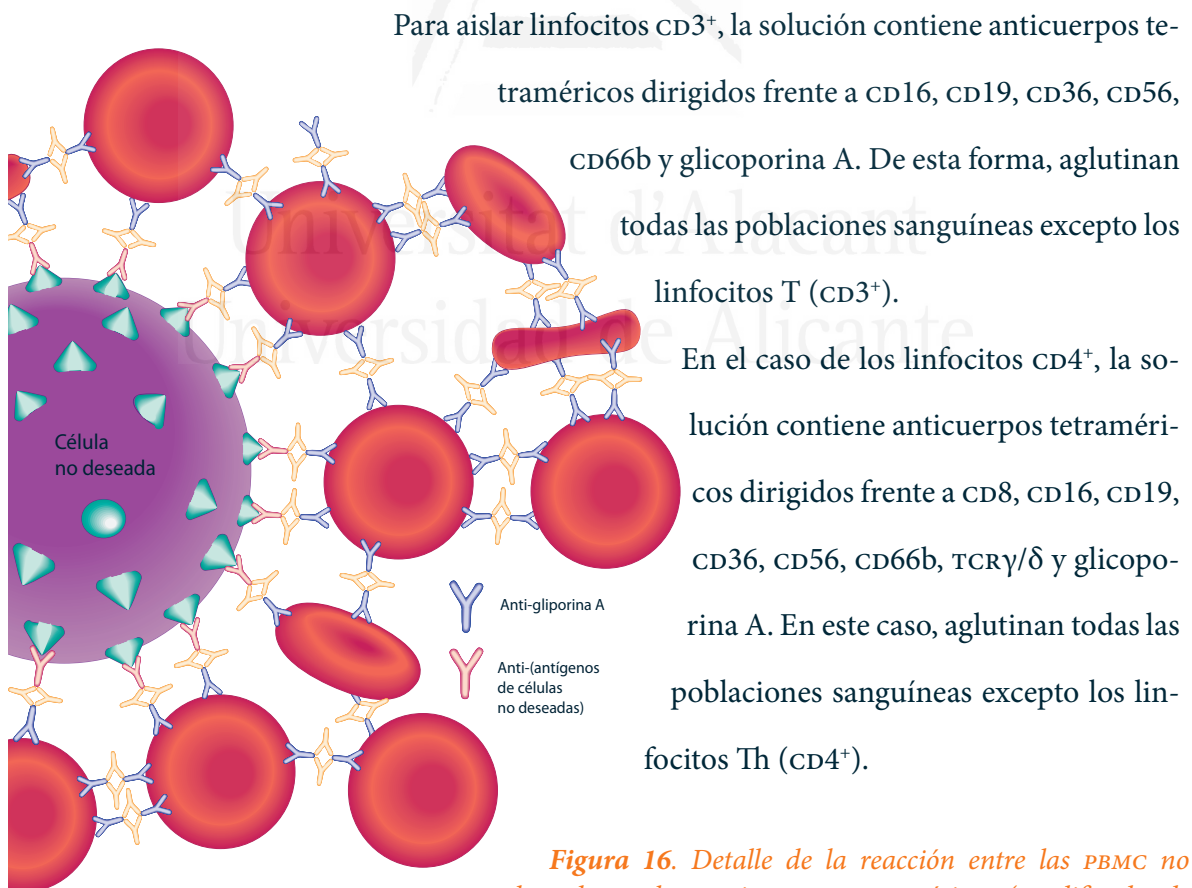
-Las muestras de sangre periférica utilizadas en este estudio fueron recogidas por los facultativos del servicio del Laboratorio de Inmunología del Hospital General Universitario de Alicante. Se realizó mediante extracción en la vena antecubital a voluntarios sanos, bajo consentimiento informado, en tubos estériles de 3 mL con EDTA, que actúa como quelante del Ca^{+2} inhibiendo la cascada de la coagulación.

3.2. OBTENCIÓN DE PBMC

El aislamiento de PBMC se realizó mediante centrifugación en gradiente de densidad. Siempre en condiciones de esterilidad, se añadieron 3 mL de Ficoll-Hypaque en el fondo de un tubo de 10 mL. A continuación se depositaron 6 mL de sangre anticoagulada diluida 1:1 con PBS sobre el Ficoll-Hypaque, suavemente, para no destruir el gradiente de densidad. Tras una centrifugación de 30 minutos a 360g, se recogió el halo situado en la parte inmediatamente superior al Ficoll-Hypaque, donde se sitúan las PBMC, y se traspasó a otro tubo de 10 mL. Se realizaron 3 lavados con 10 mL de PBS para eliminar cualquier resto de Ficoll-Hypaque, plasma y/o plaquetas.

3.3. PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS CD3⁺, CD4⁺ Y CD8⁺

Las distintas sub-poblaciones linfocitarias fueron purificadas mediante los kits RosetteSep (StemCell Technologies). Este método permite aislar las células de interés mediante selección negativa. Consiste en incubar la sangre anticoagulada con una solución de dos tipos de anticuerpos tetraméricos, previamente a la separación en gradiente de densidad. El primer tipo de anticuerpo tetramérico se une por uno de sus extremos a las proteínas de membrana de las células que queremos eliminar y, por el otro, a la glicoporina A presente en la superficie de los hematíes. El segundo anticuerpo tetramérico se une por ambos extremos a la glicoporina A. Todo ello permite la aglutinación entre las células a eliminar y los hematíes. De esta forma, al realizar una posterior centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque, los hematíes «arrastran» a las células no deseadas, quedando en el halo las células de interés (Figura 16).



Para aislar linfocitos CD3⁺, la solución contiene anticuerpos tetraméricos dirigidos frente a CD16, CD19, CD36, CD56, CD66b y glicoporina A. De esta forma, aglutinan todas las poblaciones sanguíneas excepto los linfocitos T (CD3⁺).

En el caso de los linfocitos CD4⁺, la solución contiene anticuerpos tetraméricos dirigidos frente a CD8, CD16, CD19, CD36, CD56, CD66b, TCR γ/δ y glicoporina A. En este caso, aglutinan todas las poblaciones sanguíneas excepto los linfocitos Th (CD4⁺).

Figura 16. Detalle de la reacción entre las PBMC no deseadas y los anticuerpos tetraméricos (modificado de RosetteSep[®] Human CD4⁺ T Cell Enrichment Cocktail Catalog).

Finalmente, para aislar linfocitos CD8⁺, la solución contiene anticuerpos tetraméricos dirigidos frente a CD4, CD16, CD19, CD36, CD56, CD66b, CD123, TCR γ/δ y glicoporina A. En este último caso, aglutinan todas las poblaciones sanguíneas excepto los linfocitos Tc (CD8⁺).

El primer paso fue añadir 50 μ L del cóctel de anticuerpos tetraméricos por cada mL de sangre, e incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se realizó la separación celular de la misma forma que se ha explicado en el apartado 3.2.

3.4. OBTENCIÓN DE LOS CLONES DE ASC

Los clones de ASC utilizados en este trabajo, fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. Enrique Roche Collado (Departamento de Biología Aplicada, Área de Nutrición y Bromatología, Universidad Miguel Hernández). Dichos clones se aislaron a partir de lipoaspirados, siguiendo el protocolo de Zuk y colaboradores (Zuk *et al.*, 2001).

El proceso de clonación de las ASC, mediante la técnica de anillos de clonación, permitió establecer colonias celulares que procedían de una única célula. Posteriormente, los clones obtenidos fueron expandidos y criopreservados hasta su uso en este trabajo.

A lo largo de este trabajo se utilizaron cinco clones de ASC (Figura 17), con pases entre 6 y 15, provenientes de dos individuos. Dichos clones se identificaron siguiendo la siguiente nomenclatura:

Donante 1 (tres clones): Clones, 1.10, 1.22 y 1.7

Donante 2 (dos clones): Clones 3.10 y 3.5

Con el objetivo de establecer diferencias interindividuales, en ocasiones nos referiremos al conjunto de los clones 1.10, 1.22 y 1.7 como clones 1.x; y al conjunto de los clones 3.10 y 3.5, como clones 3.x.

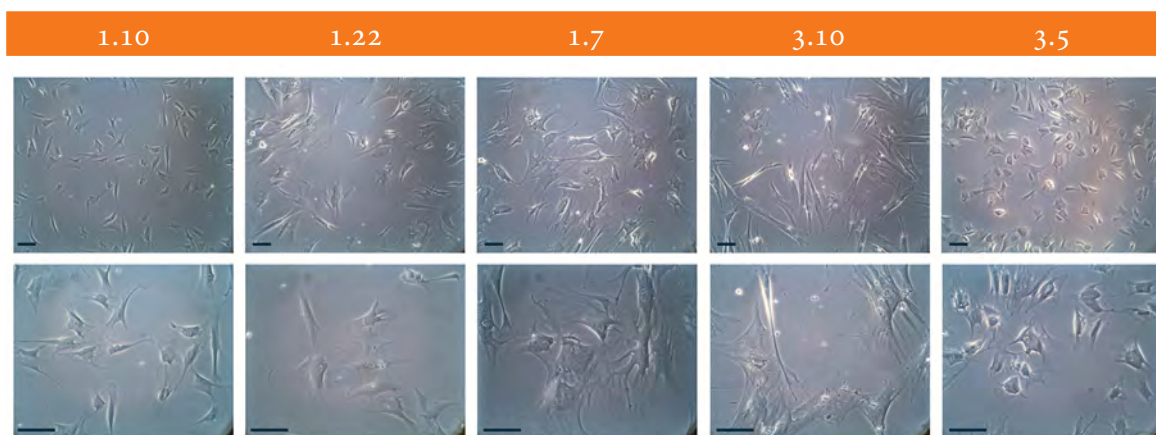


Figura 17. Fotografías de contraste de fases de los cinco clones utilizados en este trabajo. Escala 100 μm .

3.5. DESCONGELACIÓN, MANTENIMIENTO Y EXPANSIÓN DE LOS CLONES DE ASC

Los criotubos que contenían las ASC criopreservadas, se introdujeron en un baño a 37°C durante un minuto aproximadamente, hasta que quedó una pequeña pieza de hielo. En ese momento, se traspasó el contenido del criotubo a un tubo de 10 mL, donde se añadieron 8 mL de DMEM⁺. Posteriormente, se centrifugó a 100g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendieron en 10 mL de DMEM⁺ y se traspasaron a frascos de cultivo de 75 cm² (TPP), a razón de 5000 células/cm². Dichas células se introdujeron en una incubadora de CO₂ al 5% y 37 °C. El DMEM⁺ se renovó dos veces por semana, hasta el momento de su tripsinización.

Cuando las células alcanzaron un 90% de confluencia, se tripsinizaron para separarlas del frasco de cultivo y resembrarlas en nuevos frascos, con el objetivo de expandirlas. El proceso de tripsinización consistió en realizar primero dos lavados con PBS para eliminar cualquier resto de medio de cultivo. Posteriormente se añadieron 0,5 mL/75 cm² de una solución de tripsina 0,05% EDTA 0,02%. Las células se incubaron durante 5 minutos a 37 °C y, pasado ese tiempo y tras comprobar mediante microscopía que las células se habían despegado, se inhibió la reacción de la tripsina añadiendo 3,5 mL/75 cm² de DMEM⁺. Posteriormente se traspasó todo el contenido a un tubo de 10 mL, se contaron las células totales en un hemocitómetro y se resembraron en nuevos frascos de cultivo, a razón de 5000 células/cm².

3.6. CRIOPRESERVACIÓN DE LOS CLONES DE ASC

En algunos casos, tras el crecimiento y tripsinización de los cultivos de ASC, fue necesario conservar células de los clones excedentes, para su uso posterior en caso de necesidad. Para ello, tras una tripsinización, se centrifugaron a 100g durante 5 minutos y se resuspendieron en medio de congelación a 4°C a razón de $0,5-1 \cdot 10^6$ células/mL. Una vez resuspendidas las células, se traspasaron a un criotubo y se introdujeron en cajas de poliestireno extruido (*styrofoam*) a -80 °C. Las cajas de *styrofoam* permiten una bajada gradual de la temperatura del medio de congelación que continene las células, disminuyendo con ello la muerte celular por este proceso.

3.7. OBTENCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO CONDICIONADOS POR LOS CLONES DE ASC

Con el objetivo de analizar el efecto del secretoma de los cinco clones de ASC sobre las distintas poblaciones leucocitarias, se obtuvieron los medios de cultivo condicionados (ASC-DMEM⁺) de los distintos clones. Tras una tripsinización, se cultivaron $1 \cdot 10^5$ células de ASC de cada clon en frascos de 25 cm², en 4 mL de DMEM⁺. Pasadas 96 horas se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 360g durante 5 minutos. Posteriormente se congelaron a -80 °C hasta su uso.

3.8. ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE MEMBRANA DE LOS CLONES DE ASC

Las células de los distintos cultivos celulares de clones de ASC se despegaron del frasco de cultivo mediante tripsinización, se concentraron a 10^7 células/mL mediante centrifugación y se traspasaron a dos tubos de 12x75mm, a razón de 100 µL de células por tubo. A un

tubo se le añadió un *pool* de distintos anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos¹ que contenía anti-CD34-FITC, anti-CD44-PE-Cy7, anti-CD73-PE, anti-CD90-PerCP-Cy5 y anti-CD105-APC. A otro tubo se le añadió anti-CD45-FITC. Todos los anticuerpos monoclonales fueron adquiridos de eBioscience y Becton Dickinson. Posteriormente, se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Se lavaron dos veces con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo y se procedió al análisis del fenotipo de membrana mediante inmunofluorescencia directa y citometría de flujo (n=3) (FACSCantoII, BD Bioscience).

3.9. ANÁLISIS DE CITOCINAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVO

3.9.1. ANÁLISIS DE CITOCINAS EN EL SECRETOMA DE LOS CLONES DE ASC

Para el análisis del secretoma de los distintos clones de ASC, se sembraron las células de cada clon en placas de 96 pocillos de fondo plano, a razón de 20000 células por pocillo, en un volumen final de 200 µL de DMEM⁺. Se estimularon con lipopolisacárido² (LPS, del inglés *lipopolysaccharide*) 0,2 µg/ml. Se recogieron los sobrenadantes a 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo. Posteriormente, se conservaron a -20°C hasta su análisis (n=3). Se utilizó también la condición de cultivo sin estímulo.

3.9.2. ANÁLISIS DE CITOCINAS EN SOBRENADANTES DE COCULTIVOS DE LOS CLONES DE ASC Y PBMC

Por otro lado, se realizaron cocultivos de ASC y PBMC, con y sin el estímulo fitohemaglutinina (PHA, del inglés *phytohemagglutinin*) 10 µg/mL, en un ratio ASC:PBMC³ 1:10 (10000 y 100000 células, respectivamente). Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano, en 200

1. Los fluorocromos utilizados en este trabajo han sido PerCP, del inglés *peridinin chlorophyll*, FITC, del inglés *fluorescein isothiocyanate*, PE, del inglés *phycoerythrin*; cy7, del inglés *cyanine*; cy5 y APC, del inglés *allophycocyanin*.

2. En experimentos preliminares se observó que los clones de ASC secretaban espontáneamente las citocinas IL-6 e IL-8, mientras que otras citocinas sólo se detectaban cuando los clones eran sometidos a estímulos como LPS o éster de forbol (PMA, del inglés *phorbol myristate acetate*) e ionomicina (Io, del inglés *ionomycin*). Dicho estímulo no afectaba significativamente a la síntesis de IL-6 e IL-8.

3. En experimentos preliminares se observó que el ratio 1:10 era el óptimo para provocar una disminución de la proliferación sobre la población de PBMC.

μL de RPMI⁺ y se recogieron los sobrenadantes tras 3 días de cultivo, que también se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis ($n=3$).

En ambos casos, los sobrenadantes fueron analizados mediante el kit Flowcytomix (eBioscience). Este kit permite analizar mediante citometría de flujo la concentración de hasta 20 citocinas en una muestra. El método consistió en añadir en una placa de 96 pocillos con filtro *millipore* en el fondo, 25 μL de la muestra a analizar. En un segundo paso se añadieron 50 μL de un cóctel de anticuerpos anti-citocinas (conjugados con biotina), y 25 μL de un cóctel de una serie de esferas que se pueden diferenciar por tamaño (4 y 5 μm) (Figura 18A) y por fluorescencia a 690 nm. Con el ensayo se incluyen una serie de diluciones de concentración conocida de las citocinas, con el objetivo de realizar una recta de calibrado y poder establecer así las concentraciones en la muestra (Figura 18B-I). Esto permite seleccionar mediante citometría cada grupo de esferas por separado. Las diferentes esferas están recubiertas por anticuerpos dirigidos frente a una citocina concreta, de forma que cada tipo de esfera se une única y exclusivamente a una de ellas. Los anticuerpos conjugados con biotina también se unen a las mismas citocinas, de modo que cada citocina estaría recubierta por un lado por el anticuerpo específico biotinilado, y por otro lado por la esfera conjugada a los mismos anticuerpos específicos (Figura 19).

Pasadas dos horas en agitación orbital a 500 min^{-1} , a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavaron tres veces los pocillos con tampón de ensayo mediante un *manifold* para placas multipocillo (Pall). Tras este paso se añadieron a cada pocillo 100 μL de tampón de ensayo y 50 μL de una solución de estreptavidina-ficoeritrina. La estreptavidina se une constitutivamente a la biotina y la ficoeritrina emite un valor de fluorescencia proporcional a la cantidad de citocina. Las muestras se procesaron mediante citometría de flujo (FacsCantoII, BD Bioscience), y se analizaron los archivos resultantes mediante el software FlowCytomix™ Pro 2.4 Software (eBioscience).

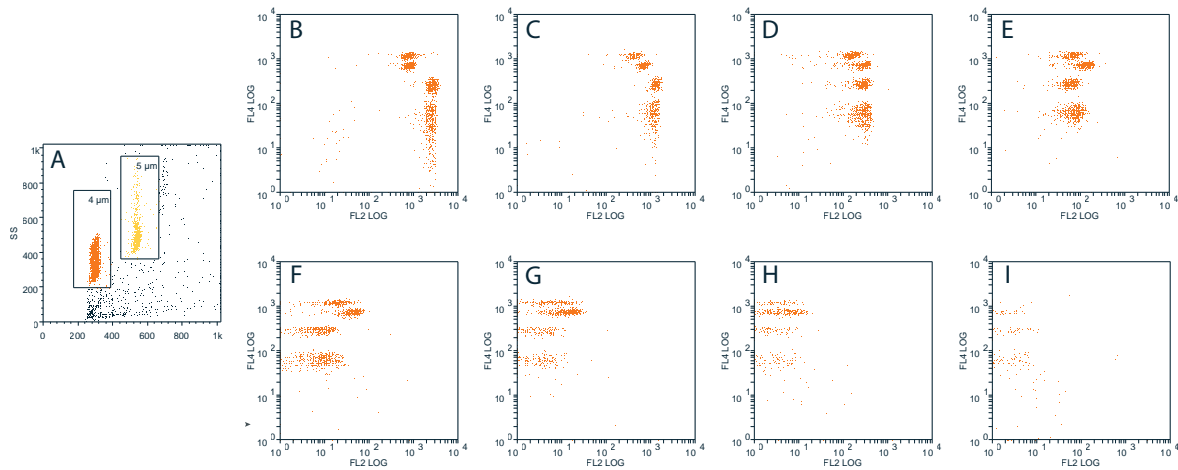


Figura 18. Detalle de la selección de poblaciones de esferas. A: Selección por tamaño. B-I: Concentraciones decrecientes de varias citocinas dentro de la población de 4 μm.

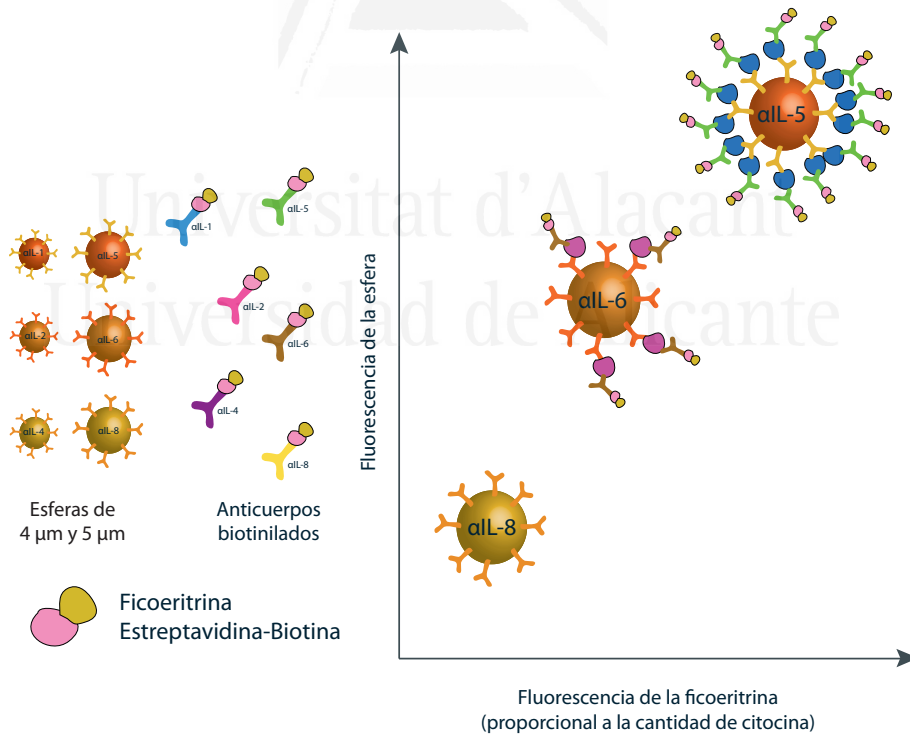


Figura 19. A la izquierda, detalle de las microesferas recubiertas por distintos anticuerpos y del resto de reactivos utilizados en el ensayo. A la derecha, representación de la determinación de la concentración según sus distintas intensidades de fluorescencia.

3.10. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS MEDIANTE CFSE

Para evaluar la proliferación de las PBMC y de las subpoblaciones linfocitarias purificadas en las distintas condiciones de cultivo, tras la separación con Ficoll-Hypaque se tiñeron las células con diacetato de carboxifluoresceína succinimidilo-éster (CFDA-SE) (Sigma). El CFDA-SE se transforma, por acción de las esterasas intracelulares, en carboxifluoresceína succinimidilo-éster CFSE (CFSE). Éste último es un tinte fluorescente verde con un máximo de excitación a 494 nm (azul) y de emisión a 521 nm (verde). El CFDA-SE es muy permeable a la membrana plasmática, por lo que entra y sale de la célula de forma pasiva y rápida. Una vez dentro, las esterasas intracelulares eliminan los dos grupos acetato, convirtiéndolo en CFSE, mucho menos permeable a la membrana (Figura 20). El radical succinimidilo tiene elevada reactividad con los grupos amino y se puede unir a moléculas intracelulares, las cuales, por un lado, pueden salir de la célula o ser degradadas o, por otro, pueden quedarse atrapadas dentro de ella. Las que salen de la célula o se degradan son las responsables de una pérdida de fluorescencia tras varios días de marcaje, pero esta pérdida no impide un marcaje estable de las células, gracias a las que permanecen.

En primer lugar, seleccionamos la población de linfocitos de interés según su tamaño y granularidad (Figura 21A), y construimos un histograma de esas células para el detector de fluorescencia verde. Si no ha existido proliferación obtendremos un pico de elevada fluorescencia, ya que las células contienen la máxima cantidad de CFSE posible (Figura 21B). Si por el contrario ha habido proliferación, la primera generación de células resultantes de la primera división, contendrá la mitad de CFSE y, por lo tanto, la mitad de fluorescencia. Si éstas a su vez se han dividido, la segunda generación contendrá la mitad de fluorescencia que la primera y la cuarta parte de las que no se han dividido y así sucesivamente (Figura 21C). Para el caso de la proliferación de PBMC (siguiente apartado), este análisis se realizó seleccionando las subpoblaciones leucocitarias, gracias al marcaje con anticuerpos monoclonales específicos para cada una de ellas, de forma similar al marcaje realizado para las ASC en el apartado 3.8.

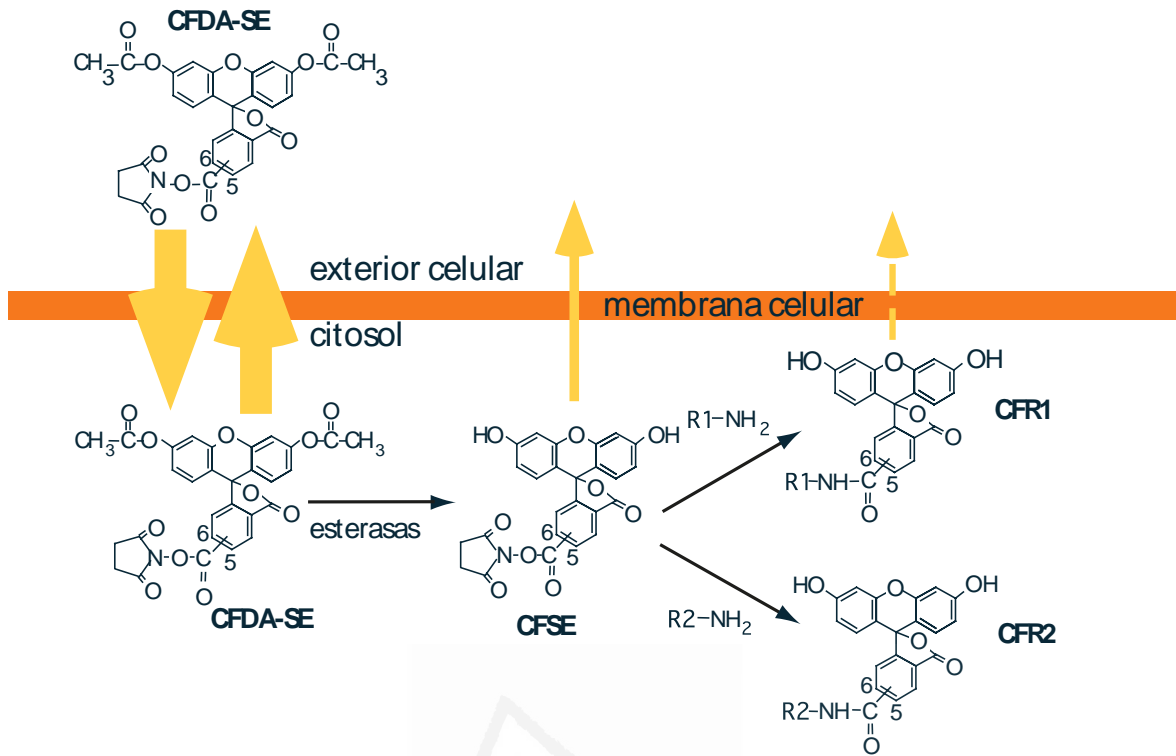


Figura 20. Representación esquemática de los distintos estadios en el marcateo con CFSE. El tamaño de las flechas es proporcional a la tasa de difusión de las moléculas a través de la membrana (modificado de Parish, 1999).

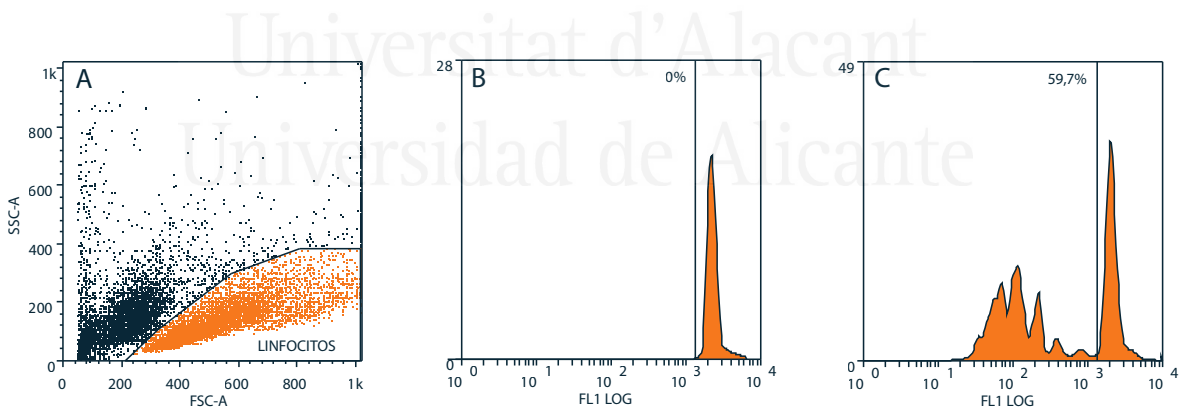


Figura 21. Detalle de la selección de poblaciones de linfocitos para el análisis de proliferación. A: Selección de linfocitos por tamaño y granularidad. B: Histograma de frecuencias de linfocitos en ausencia de estímulo, donde se observa un único pico de fluorescencia. C: Histograma de frecuencias de linfocitos en presencia de estímulo, donde se observan varios picos resultantes de las divisiones celulares. Cada pico representa una generación de células. En la parte superior se detalla el porcentaje de células totales que han proliferado.

3.11. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA

3.11.1. EN COCULTIVOS DE LOS CLONES DE ASC Y DISTINTAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS

Por un lado, se realizaron cocultivos de ASC y PBMC ($n \geq 4$) y, por otro lado, de ASC con distintas poblaciones de linfocitos T purificadas [$CD3^+$ ($n \geq 3$), $CD4^+$ ($n=4$) y $CD8^+$ ($n=8$)]. Tanto las PBMC como las poblaciones linfocitarias purificadas, fueron marcadas previamente con CFDA-SE. Para ello se resuspendieron las células en 1 mL de RPMI⁺, se les añadieron 0,5 μ L de CFDA-SE 10 mM y se incubaron 5 minutos a 37 °C. Tras el marcaje se lavaron tres veces mediante centrifugación, para eliminar el CFDA-SE excedente. Los cocultivos consistieron en cultivar primero 10000 ASC de cada clon en placas de 96 pocillos de fondo plano. Posteriormente, se añadieron 100000 PBMC o 100000 células de las poblaciones linfocitarias purificadas, procedentes de distintos individuos, con un ratio final 1:10 de ASC:PBMC/poblaciones purificadas. Se estimularon con PHA 10 μ g/mL y se incubaron durante 5 días a 37 °C y 5% de CO₂ en medio RPMI⁺. También se utilizaron cultivos de las PBMC o de las poblaciones linfocitarias purificadas, sin ASC. Del mismo modo se analizó el valor de proliferación de las distintas condiciones de cultivo, sin mitógeno. Todas las condiciones de cultivo se realizaron por duplicado. Las distintas poblaciones cultivadas fueron purificadas mediante los métodos explicados en el apartado 3.3.

En el caso de los cocultivos con PBMC, se recuperaron las células tras 5 días de cultivo, se concentraron mediante centrifugación a 10⁷ células/mL y se traspasaron a varios tubos de 12x75 a razón de 100 μ L por tubo. Para el análisis de las PBMC, se añadió a cada tubo un *pool* con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD16 y anti-CD56 (eBioscience y BD Bioscience), para poder seleccionar y analizar posteriormente las distintas subpoblaciones linfocitarias. Posteriormente, las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, en oscuridad. Se lavaron dos veces con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo y se proce-

dió al análisis de la proliferación y del fenotipo de membrana, mediante inmunofluorescencia directa y citometría de flujo (EPICS-XL, Coulter). El análisis de los archivos resultantes se realizó con el software Weasel (Frank Battye). Para el análisis de las poblaciones purificadas, se procedió de manera similar, pero sin realizar el marcaje previo a su procesamiento. Para el caso de los linfocitos T CD8⁺ purificados, también se realizaron cocultivos con los clones 1.10 y 3.5, en los que se analizó la expresión del antígeno de membrana CD11b mediante marcaje con un anticuerpo específico (Becton Dickinson) y citometría (EPICS-XL, Coulter)(n=4).

3.11.2. EN CULTIVOS DE ASC-DMEM⁺ Y PBMC

El efecto inhibitor del secretoma de los distintos clones de ASC sobre la proliferación de PBMC, se analizó realizando ensayos de proliferación similares a los anteriores, pero sustituyendo los clones por ASC-DMEM⁺. Los ensayos de proliferación consistieron en sembrar 100000 PBMC, separadas mediante gradiente de centrifugación y marcadas con CFDA-SE, en placas de 96 pocillos de fondo plano, estimuladas con PHA (10 µg/mL). El volumen final de cada pocillo fue de 200 µL. Dicho medio fue la combinación de 100 µL de medio de cultivo para células mononucleares y 100 µL de cada uno de los medios condicionados correspondientes a cada clon. Como control, se utilizaron 100 µL de DMEM⁺. Pasados 5 días, las células se procesaron por citometría de flujo (EPICS-XL, Coulter) (n=9). El análisis informático se realizó de la misma forma que en el apartado anterior.

3.12. ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE FoxP₃ Y CD25 EN PBMC

3.12.1. EN COCULTIVOS DE LOS CLONES DE ASC Y PBMC

En primer lugar, se realizó un nuevo cocultivo con los distintos clones de ASC y PBMC (n=6), similar a los anteriores, con 100000 PBMC y 10000 ASC por pocillo, usando como es-

tímulo PHA 10 µg/mL. En este caso, pasadas 72 horas se recuperaron las PBMC cocultivadas con los distintos clones de ASC. Se traspasaron a *ependorfs* de 1,5 mL, se lavaron mediante centrifugación con PBS y se concentraron en 20 µL de PBS. A continuación se incubaron durante 30 minutos con un *pool* de anticuerpos monoclonales (anti-CD4-FITC y anti-CD25-PE-cy5). El objetivo de este primer marcaje es poder seleccionar durante el análisis la población de linfocitos Th (CD4⁺) que expresen en su membrana el receptor para la IL-2, denominado CD25 o IL-2R. Trascurrido ese tiempo, se lavaron de nuevo y se les añadieron 100 µL de una solución fijadora/permeabilizadora (eBioscience). Tras 30 minutos, se lavaron nuevamente y se incubaron otros 30 minutos con un anticuerpo anti-FoxP3-PE (eBioscience). Todas las incubaciones se realizaron a 4°C. Posteriormente, se lavaron y se analizaron las células mediante citometría de flujo (EPICS-XL, Coulter), de acuerdo con la **Figura 22**. Finalmente, se procesaron los archivos resultantes mediante el software para citometría Weasel (Frank Battye).

3.12.2. EN CULTIVOS DE PBMC CON ASC-DMEM⁺

Este ensayo se llevó a cabo con el objetivo de analizar en las PBMC, el efecto de los factores solubles secretados por las ASC sobre la expresión de FoxP3. Para ello, se realizó un cultivo de 100000 PBMC en un volumen de 100 µL de RPMI⁺ y se añadieron 100 µL de ASC-DMEM⁺ de cada uno de los clones. A continuación se estimularon o no con PHA 10 µg/mL, por duplicado. De nuevo, tras 72 horas de cultivo, se recuperaron las células y se analizaron de forma similar al cocultivo anterior (n=7).

3.13. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS CLONES DE ASC SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS PBMC

Para valorar el efecto de las ASC sobre la supervivencia de las PBMC, se cocultivaron 100000 PBMC con 5000 células de los clones 1.10 o 3.5 (ratio ASC:PBMC 1:20), en placas de 96 pocillos de fondo plano, en un volumen final de 200 µL de RPMI⁺. Se incubaron durante 6 días

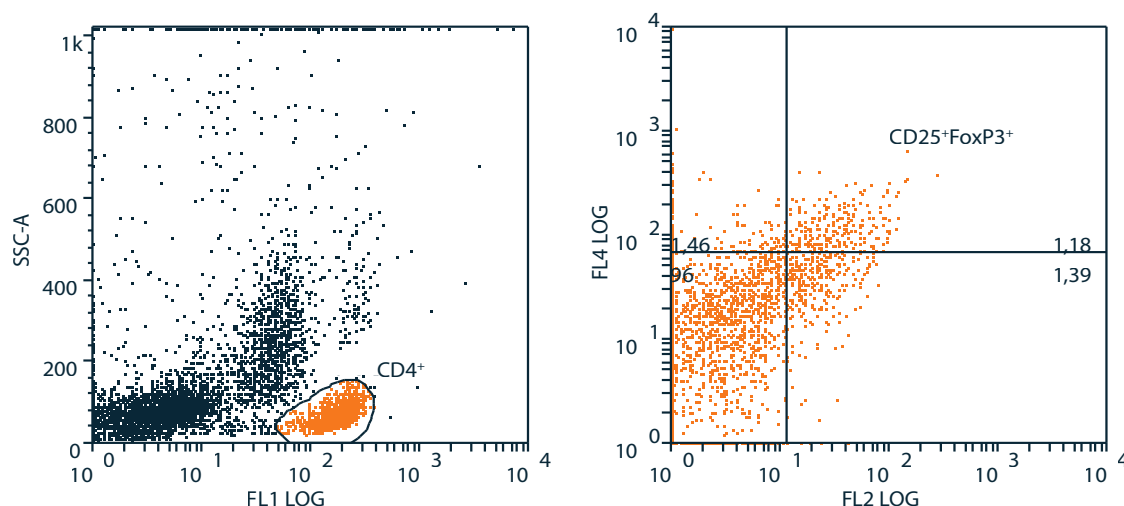


Figura 22. Detalle de la selección de poblaciones de linfocitos para el análisis de la variación de la expresión de FoxP3. A: Selección de linfocitos Th, positivos para CD4 (FL1). B: Selección de la población Th con expresión positiva para CD25 (FL4) y FoxP3 (FL2).

y, pasado ese tiempo, se les irradió luz UV mediante un transiluminador durante 30 segundos. Veinticuatro horas después se procesaron mediante citometría de flujo. Para determinar la mortalidad celular y previo a su procesamiento mediante citometría, las células se marcaron con yoduro de propidio a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=6$). El yoduro de propidio es una molécula impermeable a la membrana de células viables, pero que penetra en las necróticas, intercalándose en su ácido desoxirribonucleico (DNA, del inglés *desoxiribonucleotic acid*). Una vez intercalado, emite fluorescencia roja (635 nm) tras ser estimulado con luz azul (488 nm). Se utilizó la condición sin UV como control de mortalidad basal. El análisis informático se realizó mediante el software Weasel.

3.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La estadística descriptiva, así como la inferencia estadística, se realizó mediante el paquete de análisis estadístico informático GraphPad Prism (GraphPad). En todos los casos se comprobó la normalidad de los resultados mediante el test Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, se analizó si existían diferencias significativas entre las distintas condiciones de cultivo mediante la prueba t de Student, para parejas de datos. Cuando los clones fueron analizados entre ellos mismos, o entre ellos y la condición control, se utilizó la prueba F del

análisis de varianza (ANOVA, del inglés *analysis of variance*). El análisis *post-hoc* se realizó siempre mediante el método de la mínima diferencia significativa (LSD, del inglés *least significant difference*) de Fisher.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

IV. RESULTADOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

4.1. FENOTIPO DE MEMBRANA DE LAS ASC

Los clones analizados no expresaron en ningún caso las moléculas de linaje hematopoyético CD34 y CD45 (datos no mostrados). Sin embargo, entre el 85 y el 98% de las células, según el clon, mostraron expresión de los antígenos de membrana CD44, CD73, CD90 y CD105 (Figura 23).

Aunque en ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos clones, ni en el porcentaje ni en la intensidad de expresión de los distintos antígenos de membrana analizados por separado, se aprecian no obstante ciertas diferencias que merece la pena mencionar.

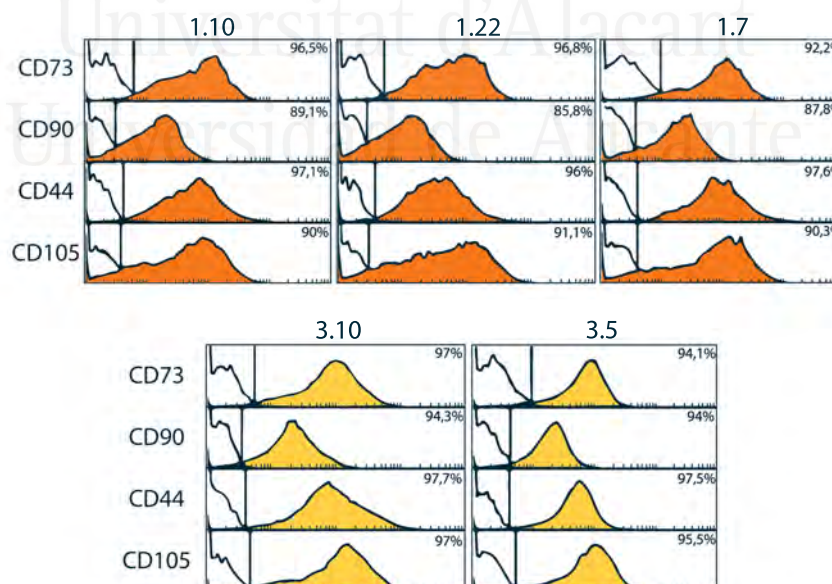


Figura 23. Histogramas de frecuencia y porcentajes de expresión de los distintos antígenos de membrana en los cinco clones de ASC. De arriba a abajo CD73, CD90, CD44 y CD105. En blanco se representa el control negativo, y en color (■ Clones 1.x ■ Clones 3.x), el marcaje positivo. Se muestra un ejemplo representativo.

Así por ejemplo, atendiendo al porcentaje de células que expresaban individualmente los distintos antígenos de membrana en cada clon, sólo encontramos diferencias en el caso concreto de los antígenos CD90 y CD105, donde el mayor porcentaje de expresión celular correspondió a los clones 3.10 y 3.5.

Sin embargo, cuando analizamos el conjunto de los marcadores, con el objetivo de identificar posibles combinaciones de varios de ellos que nos permitieran distinguir diferentes patrones de expresión entre clones, pudimos observar tres fenotipos de expresión diferentes (Tabla 1). En el caso de los clones 3.10 y 3.5, el 90% de las células coexpresaban los cuatro antígenos de membrana mencionados anteriormente, porcentaje que se reducía al 80% en el caso del clon 1.7, y que incluso bajaba hasta el 70% en el caso de los clones 1.10 y 1.22 (Figura 24).

Cuando nos fijamos en la intensidad de expresión de los distintos antígenos de membrana, medida en intensidad mediana de fluorescencia (MFI, del inglés *median fluorescence intensity*), lo que indica indirectamente la cantidad de antígeno por unidad de superficie de membrana, se observa que los clones 1.10 y 1.22 expresaban en general menor cantidad de antígenos que el resto de clones, correspondiendo los valores más bajos de intensidad de los cuatro marcadores, al clon 1.22. (Figura 25).

CD90 fue el marcador menos abundante, independientemente del clon analizado. En el caso del marcador CD105, el clon 3.5 fue el que mayor intensidad de expresión mostraba, mientras que el clon 1.7 presentaba mayor intensidad de expresión para CD73 y CD44 que el resto de clones. Estos resultados permiten hablar de nuevo de tres fenotipos de membrana

Tabla 1. Valores de p obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher) de las distintas comparaciones interclonales para las medias de porcentajes de células con coexpresión de los marcadores CD44, CD73, CD90 y CD105 (n=3). El gradiente de naranja a amarillo es proporcional al p-valor.

	1.10	1.22	1.7	3.10	3.5
1.10					
1.22	0,8229				
1.7	0,2127	0,2965			
3.10	0,0060	0,0088	0,0575		
3.5	0,0048	0,0070	0,0458	0,8953	

potenciales, en parte similares a los descritos anteriormente. Por un lado estarían los clones 1.10 y 1.22, que en conjunto presentarían la menor cantidad de antígenos. Por otro lado estarían los clones 3.10 y 3.5, con mayores cantidades de alguno de los cuatro antígenos analizados y, finalmente el clon 1.7, que en términos generales podríamos definir como un fenotipo intermedio entre los otros dos.

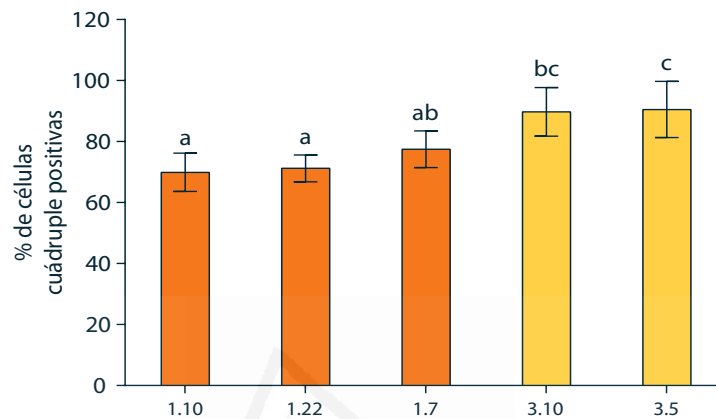


Figura 24. Porcentaje de células con coexpresión de los marcadores CD44, CD73, CD90 y CD105 en los distintos clones de ASC (n=3). Los resultados se expresan como media (SD, del inglés standard deviation). Valores de p obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher). Medias que contengan letras iguales no son significativas entre sí (p<0,05). ■ Clones 1.x ■ Clones 3.x.

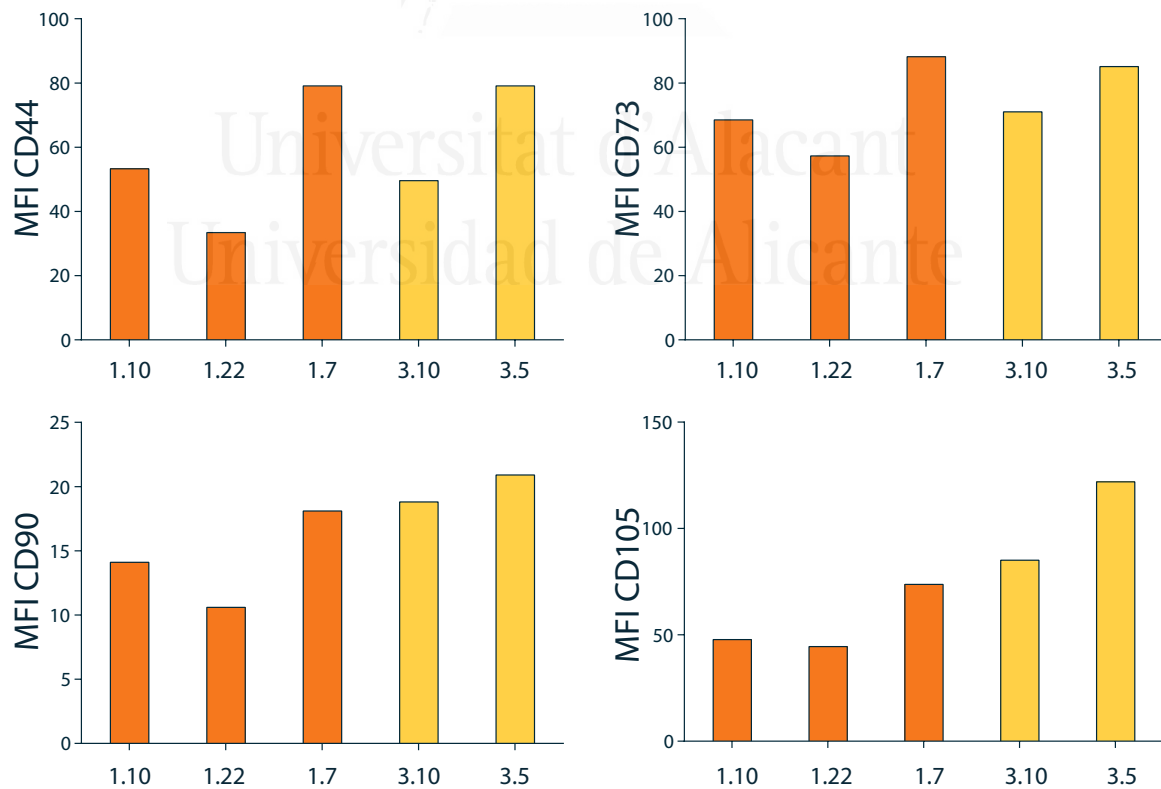


Figura 25. Intensidad mediana de fluorescencia (MFI) de los antígenos analizados en los distintos clones. Se muestra un experimento representativo. ■ Clones 1.x ■ Clones 3.x.

4.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE CITOCINAS Th1/Th2

En experimentos preliminares, observamos que todos los clones de ASC secretaban en mayor o menor medida IL-6 e IL-8 de manera constitutiva, mientras que otras citocinas sólo se detectaban cuando los clones eran sometidos a estímulos como LPS o PMA+IO; de los dos estímulos mencionados, el LPS resultó ser el óptimo. Por otro lado, se observó que la estimulación no afectaba significativamente a la síntesis de IL-6 e IL-8. Del mismo modo, también comprobamos que los niveles de las diferentes citocinas no variaban en función de que el estímulo se añadiese inmediatamente tras la tripsinización, o al cabo de 3-4 días de cultivo, una vez las ASC ya se habían adherido al plástico (datos no mostrados).

Por todo lo anterior, se decidió analizar la cinética de producción de las citocinas del estudio inmediatamente tras la tripsinización de las células, sin estímulo en el caso de la IL-6 e IL-8, y con LPS (0,2 µg/mL) para el resto de citocinas (ver apartado de Material y Métodos).

4.2.1. CINÉTICA DE CITOCINAS IL-6 E IL-8 SIN ESTÍMULO

- **IL-6.** Los cinco clones de ASC produjeron grandes cantidades de IL-6, con unas concentraciones finales que se encontraban entre los 20 y los 35 ng/mL. Salvo en el caso de los clones 1.7 y 3.10, que alcanzaron su mayor nivel de secreción al final del cultivo (96 horas), con una tendencia a seguir creciendo, el resto de clones alcanzaron un pico a las 48-72 horas de cultivo. Los clones 3.10 y 1.22 presentaron una cinética más rápida que el resto, alcanzando casi valores máximos de IL-6 en las primeras 2-4 horas de cultivo. El clon 3.5 es el que produjo la mayor cantidad de IL-6 entre las 24 y las 72 horas, el clon 1.7 el que finalmente alcanzó mayores niveles de IL-6 al final del cultivo, y el clon 1.22 el que alcanzó niveles más bajos (Figura 26A).

- IL-8.** En el caso de la IL-8, pudimos observar que los cinco clones de ASC sintetizaban cantidades moderadas de dicha citocina, aunque con unas concentraciones finales nada despreciables, comprendidas entre 2,5 y 3,5 ng/mL. Se pueden distinguir claramente dos grupos de clones, en función del comportamiento de la secreción de esta citocina. En primer lugar, los clones 1.10 y 3.5, que presentaron una cinética más lenta que el resto. Por otro lado, los clones 1.22, 1.7 y 3.10, con una cinética mucho más rápida, y que alcanzaron el valor de 1-1,5 ng/mL en apenas 2-4 horas de cultivo, frente a los anteriores clones que necesitaron 48-72h para alcanzar dicha concentración. Con la excepción del clon 1.22, el resto de clones presentaron una clara tendencia lineal a seguir aumentando su concentración pasadas 96 horas de cultivo. De nuevo, fue el clon 1.7 el que alcanzó mayores niveles de citocina al final del cultivo, y el clon 1.22 el que produjo los niveles más bajos (Figura 26B).

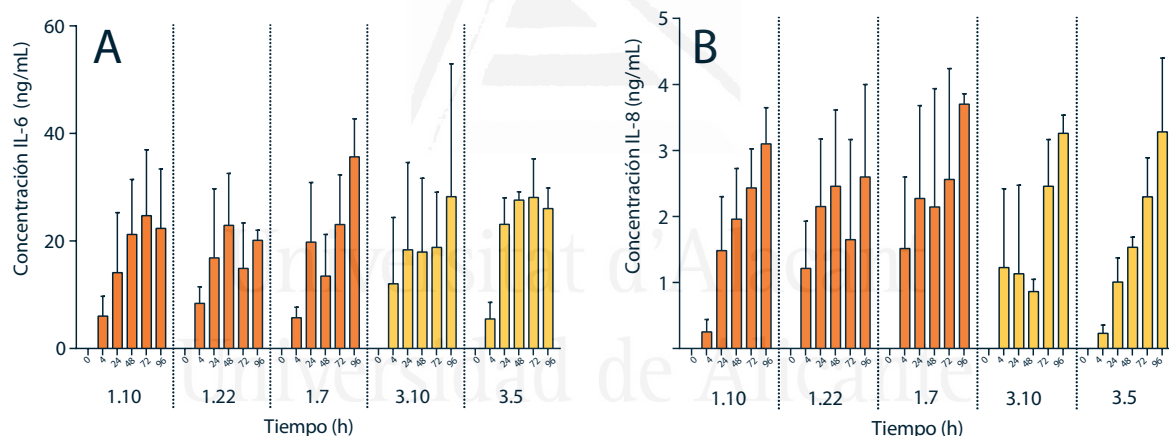


Figura 26. A: Cinética de producción de IL-6. B: Cinética de producción de IL-8. Resultados expresados como media (SD) (n=3). ■ Clones 1.x ■ Clones 3.x

4.2.2. CINÉTICA DE CITOCINAS Th1/Th2 TRAS ESTIMULACIÓN

Las citocinas analizadas dentro de este apartado, aunque no mostraron un comportamiento lineal o logarítmico en cuanto a su cinética de secreción, sí mostraron sin embargo concentraciones importantes en determinados puntos de la cinética.

Citocinas Th1

- **IL-1 β** . Los clones 3.10 y 3.5 fueron, con diferencia, los que mayor cantidad de citocina produjeron, con un valor máximo a las 24h de cultivo, en torno a los 400-500 pg/mL. En segundo lugar el clon 1.10, que secretó unas cantidades moderadas (100-120 pg/mL), con un máximo a las 48h. Los clones 1.22 y 1.7 apenas produjeron IL-1 β , con valores máximos entre las 4 y las 6 horas de cultivo (Figuras 27A y 29).
- **TNF- β** . Todos los clones produjeron niveles bajos-moderados (50-100 pg/mL), si bien fue el clon 1.22 el que produjo mayores niveles. Curiosamente, los clones 1.x mostraron un pico máximo de secreción en apenas 12 horas de cultivo, mientras que los clones 3.x alcanzaron su máxima concentración a las 48 horas (Figuras 27B y 29).
- **IL-2**. Todos los clones produjeron cantidades bajas-moderadas de esta citocina (50-200 pg/mL), si bien fue de nuevo el clon 1.22 el que produjo mayores niveles. Al igual que en el caso del TNF- β , los clones 1.x mostraron una cinética más rápida, con un pico máximo en sólo 4-8 horas de cultivo, mientras que el clon 3.5 alcanzó su máximo entre las 12 y 24 horas. Por otro lado, el clon 3.10, aunque al principio del cultivo apenas secretó IL-2, dicha citocina comenzó a incrementar sus niveles a las 12 horas y continuó aumentando hasta las 72, momento en el que alcanzó su máxima concentración (en torno a 100 pg/mL) (Figuras 27C y 29).
- **TNF- α** . Tan sólo los clones 1.22 y 1.10 secretaron TNF- α y, además, a niveles muy bajos, en torno a los 10 pg/ml (Figuras 27D y 29).
- **IFN- γ** . De nuevo, sólo el clon 1.22 fue capaz de producirlo, y además puntualmente (a las 4 horas de cultivo) y a concentraciones muy bajas (en torno a 25 pg/mL) (Figuras 27E y 29).
- **IL-12**. Ninguno de los clones produjo IL-12 a lo largo del cultivo.

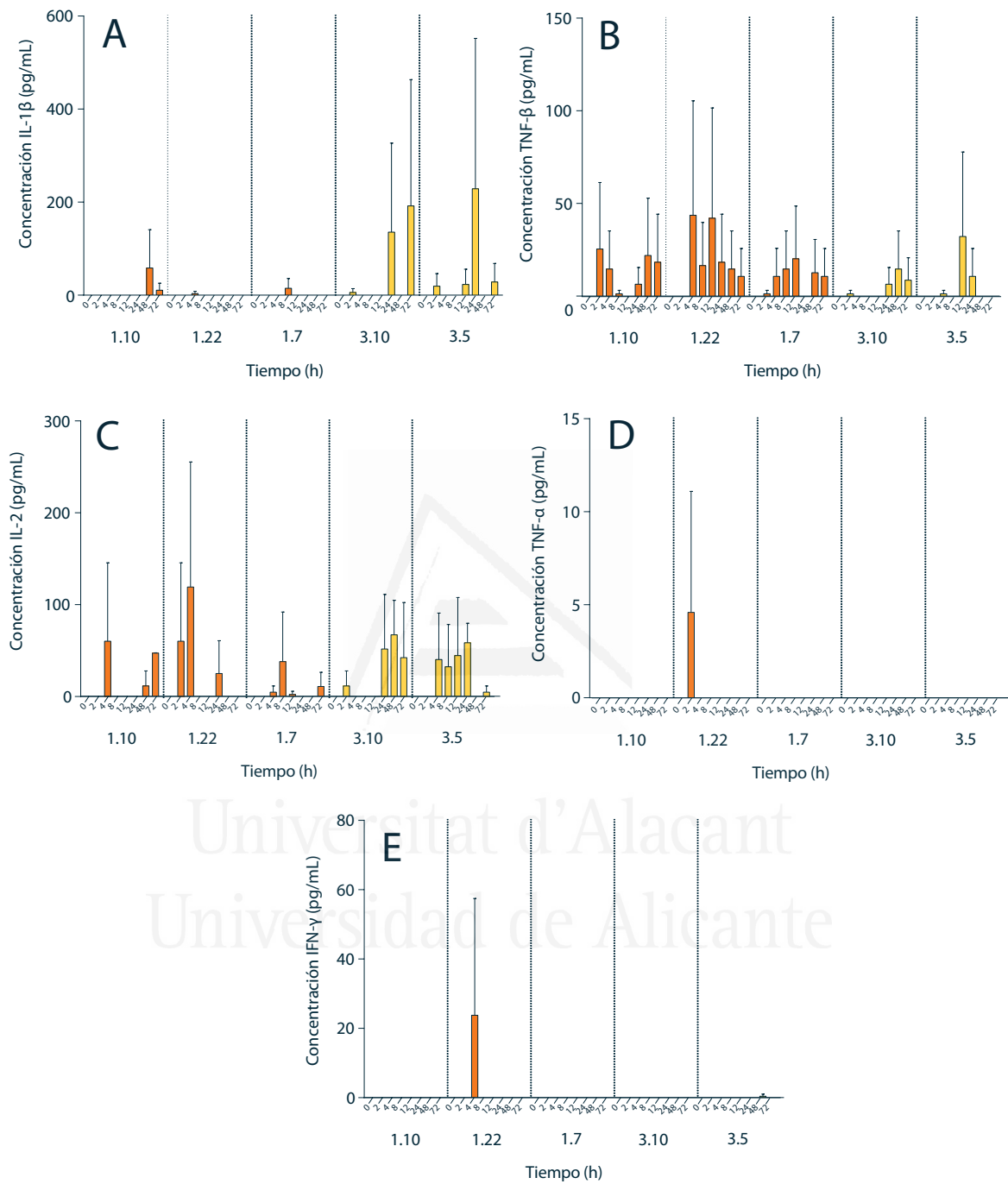


Figura 27. Cinética (0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas) de producción de citocinas Th1 para los cinco clones analizados, tras estimulación con LPS 0,2 μ g/mL. Resultados expresados como media (SD) (n=3). A: IL-1 β . B: TNF- β . C: IL-2 TNF- α . D: . E: IFN- γ . ■ Clones 1.x ■ Clones 3.x

Citocinas Th2

- **IL-4.** Todos los clones produjeron cantidades bajas-moderadas de dicha citocina, si bien fueron los clones 1.x los que en general alcanzaron los mayores niveles y los que de nuevo mostraron una mayor velocidad de secreción, alcanzando un pico en las primeras 4-8 horas de cultivo. Los clones 3.x tardaron sin embargo entre 12 y 24 horas en alcanzar sus máximas concentraciones (Figuras 28A y 29).
- **IL-5.** Al igual que ocurrió con la IL-2 y el TNF- β , fue el clon 1.22 el que produjo los niveles más altos de IL-5. Salvo el clon 3.5, que apenas la secretó, el resto de clones secretaron concentraciones bajas-moderadas de dicha citocina. Los valores máximos fueron observados a las 4-8 horas de cultivo para los clones 1.7 y 1.22, mientras que para el 1.10 y el 3.10 el máximo se obtuvo entre las 24 y 48 horas (Figuras 28B y 29).
- **IL-10.** Ninguno de los clones produjo IL-10 a lo largo del cultivo.

4.3. CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS EN SOBRENADANTES DE COCULTIVOS ASC-PBMC

Citocinas Th1/Th17

- **IL-1 β .** En condiciones de ausencia de estímulo, la adición de los diferentes clones de ASC al medio de cultivo, produjo un aumento en los niveles de esta citocina; este aumento fue estadísticamente significativo¹ para todos los clones, sin detectar diferencias significativas entre clones salvo para la pareja 1.22 y 1.7. La estimulación con PHA produjo en todos los casos un aumento de esta citocina. Aquí sí se aprecian diferencias entre clones. De hecho, los cocultivos con los clones 1.7 y 3.10 aumentaron significativamente la concentración

1. Para la concentración de las citocinas en cocultivos, todos los valores de p correspondientes a las comparaciones entre las distintas condiciones se reflejan en la Tabla 2.

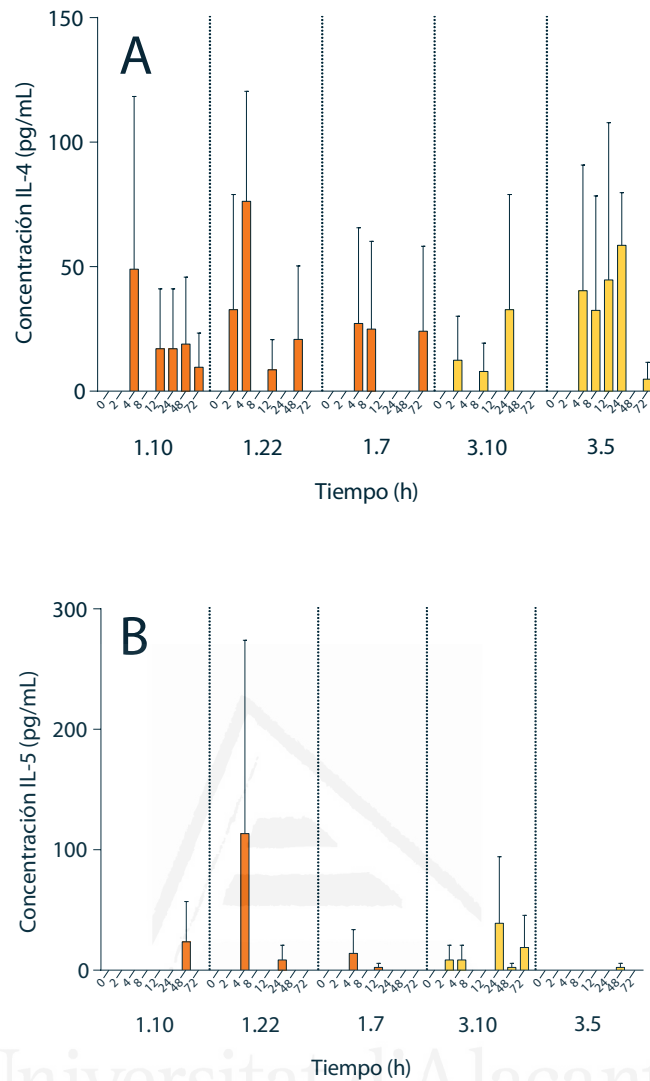


Figura 28. Cinética (0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas) de producción de citocinas Th2 para los cinco clones analizados, tras estimulación con LPS 0,2 µg/mL. Resultados expresados como media (SD) (n=3). A: IL-4. B: IL-5. ■ Clones 1.x ■ Clones 3.x

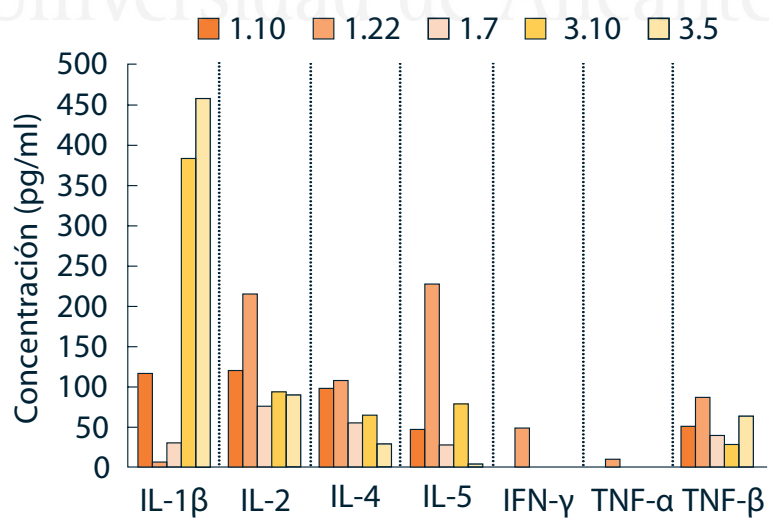


Figura 29. Picos máximos de producción de citocinas por los diferentes clones, tras estimulación con LPS 0,2 µg/mL (n=3).

de esta citocina en el sobrenadante, respecto del resto de clones y de la condición de ausencia de ASC, mientras que el resto no modificaron sustancialmente su concentración respecto a la condición de ausencia de ASCs (Figura 30A).

- **IL-2.** Esta citocina proinflamatoria presentó un comportamiento variable. Su expresión no se produjo, o bien lo hizo a niveles muy bajos (cerca de los 50 pg/mL). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre las distintas condiciones de cultivo ni entre clones, se pudo observar sin embargo que, en presencia de clones en el cultivo, generalmente hubo una menor producción de dicha citocina respecto a la condición de PBMC solas, tanto en ausencia como en presencia de estímulo. Incluso hubo ausencia total de la misma en el caso de los clones 1.10, 1.7 y 3.5 (en ausencia de estímulo) o el 3.5 y el 3.10 (en presencia de estímulo) (Figura 30B).
- **IL-12p70.** Esta citocina proinflamatoria sólo se detectó en presencia del clon 1.7 con estímulo PHA y, además, a una concentración muy baja (unos 40 pg/mL) (Datos no mostrados).
- **IL-17A.** En ausencia de estímulo, no se detectó presencia de esta citocina en ninguna de las condiciones de cultivo. Sin embargo, en presencia de PHA sí se detectaron niveles moderados de IL-17 en los sobrenadantes de las PBMC solas. Esta cantidad se duplicó en presencia de las ASC, salvo en el caso del clon 1.10, que mostró un comportamiento contrario al resto de clones, al observarse una disminución muy significativa de la concentración de dicha citocina respecto a la observada en presencia del resto de clones. (Figura 30C).
- **IL-22.** En ausencia de estímulo, sólo se detectaron niveles medibles de IL-22 en presencia del clon 1.10, en cantidades muy pequeñas (próximas a los 50 pg/mL). Sin embargo, en presencia de PHA sí se detectaron niveles bajos-moderados de esta citocina en los sobre-

nadantes de las PBMC solas (en torno a los 150 pg/mL). Esta cantidad parece disminuir en mayor o menor grado según el clon de ASC presente en el medio de cultivo, e incluso llega a ser indetectable en el caso de los clones 1.10 y 3.5, encontrando únicamente diferencias significativas entre ambos clones y el clon 3.10 (Figura 30D).

- **TNF- α** . Cuando las PBMC fueron estimuladas con mitógeno, en ausencia de ASC, esta citocina aumentó de manera importante en el medio de cultivo. Todos los clones de ASC provocaron un descenso muy marcado de esta citocina, tanto en condiciones de ausencia como de presencia de mitógeno, siendo el clon 1.7 el que mostró menor capacidad para disminuir los niveles de esta citocina y el único que en presencia de estímulo presentó diferencias significativas con el resto de clones (Figura 30E).
- **IFN- γ** . En ausencia de ASC, esta citocina aumentó de manera importante tras añadir PHA al cultivo. Sin embargo, este aumento se vió prácticamente abolido en presencia de los clones 1.10, 1.22 y 3.5, que además mostraron diferencias significativas con el clon 1.7 y 3.10, que parecieron no tener efecto sobre la síntesis y secreción de IFN- γ . Curiosamente, estos dos últimos clones fueron capaces de promover la producción de esta citocina en ausencia de estímulo (Figura 30F).

Citocinas Th2

- **IL-4**. Los niveles de dicha citocina fueron prácticamente indetectables en las diferentes condiciones de cultivo, alcanzando valores máximos de 20 pg/mL. En ausencia de estímulo y sólo en presencia del clon 3.10, se pudo apreciar un ligero incremento en los niveles de dicha citocina *vs.* las PBMC solas, que no alcanzó valores significativos (Figura 31A).

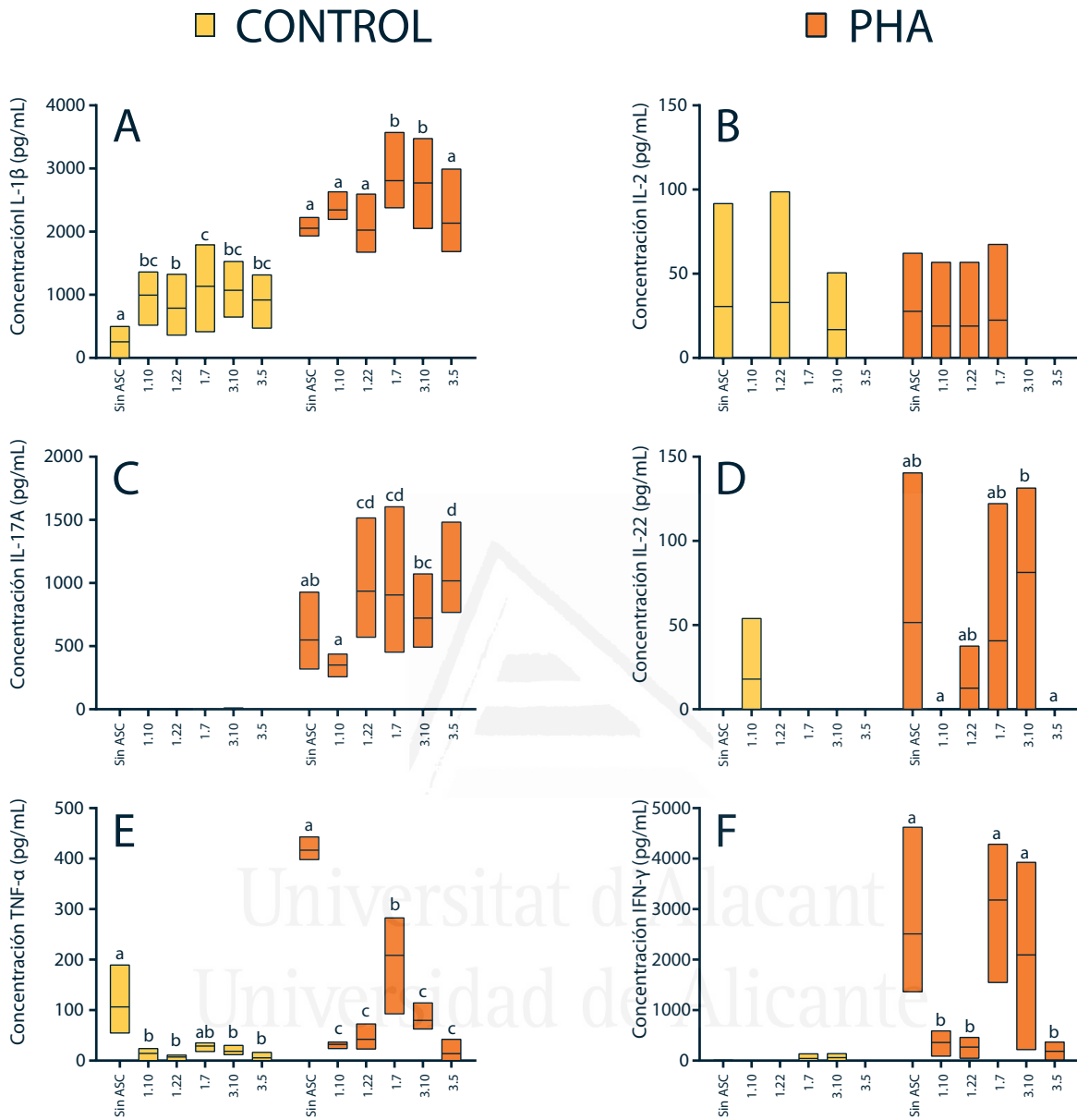


Figura 30. Concentraciones de citocinas Th1/Th17 en sobrenadantes de cocultivos ASC:PBMC, a un ratio 1:10. A: IL-1 β . B: IL-2. C: IL-17A. D: IL-22. E: TNF- α . F: IFN- γ . Resultados expresados en box-plots (media; máximo a mínimo). (n=3) ■ Control (ausencia de estímulo). ■ PHA 10 μ g/mL. Valores de obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher) (véase Tabla 2). Medias que contengan letras iguales no son significativas entre sí (p<0,05).

- **IL-5.** En ausencia de estímulo no se detectó en ningún caso la presencia de esta citocina. Sin embargo, la estimulación de las PBMC con PHA provocó en todos los casos un aumento en los niveles de la misma, de en torno a los 300 pg/mL, que fue signifi-

vamente menor en las condiciones de cultivo que contenían a los diferentes clones de ASC vs. PBMC solas. Sólo se encontraron diferencias significativas entre los clones 1.10 y 3.10 que provocaron respectivamente la mayor y la menor reducción en los niveles de citocina del medio (Figura 31B).

- **IL-9.** Esta citocina sólo se detectó en presencia del mitógeno PHA y no para todas las condiciones de cultivo, alcanzando niveles máximos de alrededor de 500 pg/mL. La presencia de los clones de ASC disminuyó en todos los casos los niveles de citocina, siendo el clon 1.7, seguido del 3.10, los que presentaron menor capacidad para reducir los niveles de la misma; al contrario que los clones 1.10 y 3.5, que fueron capaces de anular por completo su síntesis. Las diferencias entre clones aparecen detalladas en la Tabla 2 (Figura 31C).
- **IL-10.** En ausencia de estímulo, aunque el análisis estadístico no llega a marcar diferencias significativas entre la ausencia y la presencia de los distintos clones de ASC, se observa una clara tendencia a un aumento de esta citocina cuando las PBMC son co-cultivadas con ASC. La estimulación con PHA produjo en todos los casos un aumento de esta citocina, que fue menor en las condiciones de cultivo que contenían ASC, salvo en el caso del clon 1.7, llegando esta diferencia a alcanzar valores muy significativos en el caso de los clones 1.10 y 3.10. (Figura 31D).
- **IL-13.** En ausencia de estímulo, esta citocina solo se detectó en presencia del clon 1.10, y a niveles muy bajos. Al estimular con PHA, dicha citocina aumentó considerablemente en ausencia de ASC y, en menor grado, en presencia de los clones, llegando incluso a no producirse en el caso de los cultivos que contenían los clones 1.10 y 3.5, que mostraron diferencias significativas con el clon 3.10. Sin embargo, estas diferencias fueron significativas para todos los clones vs. las PBMC solas. (Figura 31E).

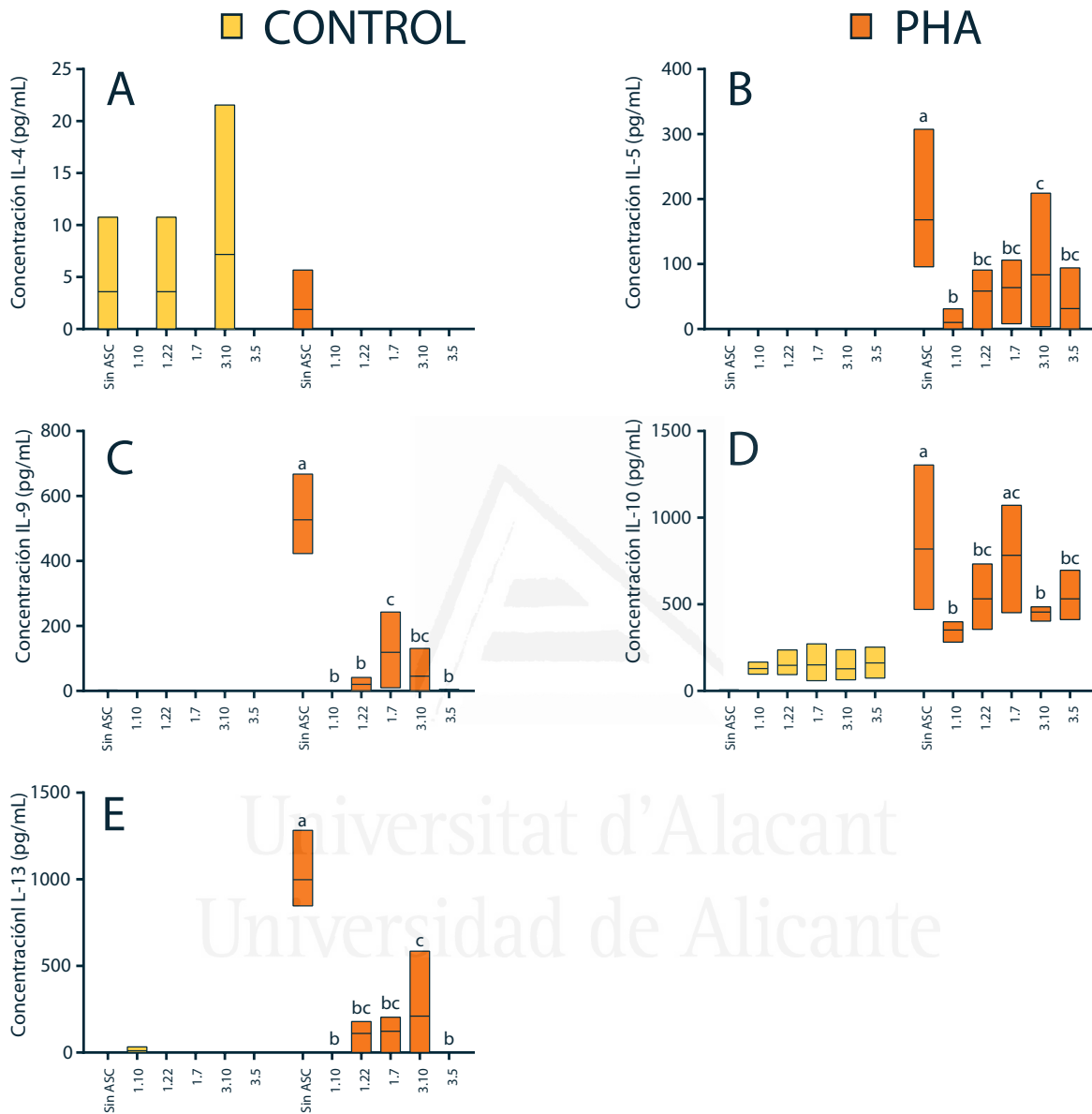


Figura 31. Concentraciones de citocinas Th2 en sobrenadantes de cocultivos ASC:PBMC, a un ratio 1:10 A: IL-4. B: IL-5. C: IL-9. D: IL-10. E: IL-13. Resultados expresados en box-plots (media; máximo a mínimo) (n=3). ■ Control (ausencia de estímulo). ■ PHA 10 µg/mL. Valores de p obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher) (véase Tabla 2). Medias que contengan letras iguales no son significativas entre sí (p<0,05).

Tabla 2. Valores de p obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher), de las distintas comparaciones entre los valores medios de citocinas, tanto para la condición control (parte superior) como para la condición con estímulo PHA (parte inferior) (n=3). Con sombreado naranja, p-valores significativos (p<0,05). *IL-12p70

	IL-1β	IL-2	IL-12*	IL-17A	IL-22	TNF-α	IL-6	IFN-γ	IL-4	IL-5	IL-9	IL-10	IL-13
CONTROL													
Sin ASC vs. Clon 1.10	0,0006	0,3699	>0,9999	>0,9999	0,6081	0,0266	0,0001	0,9947	0,3929	>0,9999	0,9804	0,3083	0,8988
Sin ASC vs. Clon 1.22	0,0055	0,9440	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,0187	<0,0001	0,9947	>0,9999	>0,9999	0,9804	0,2461	>0,9999
Sin ASC vs. Clon 1.7	0,0002	0,3699	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,0535	<0,0001	0,9424	0,3929	>0,9999	0,9804	0,2400	>0,9999
Sin ASC vs. Clon 3.10	0,0003	0,6827	>0,9999	0,9732	>0,9999	0,0321	<0,0001	0,9234	0,3925	>0,9999	0,9804	0,3124	>0,9999
Sin ASC vs. Clon 3.5	0,0013	0,3699	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,0172	<0,0001	0,9947	0,3929	>0,9999	0,9804	0,2093	>0,9999
Clon 1.10 vs. Clon 1.22	0,1991	0,3359	>0,9999	>0,9999	0,6081	0,8425	0,2422	>0,9999	0,3929	>0,9999	>0,9999	0,8771	0,8988
Clon 1.10 vs. Clon 1.7	0,3853	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,6081	0,6906	0,2746	0,9371	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,8639	0,8988
Clon 1.10 vs. Clon 3.10	0,6299	0,6157	>0,9999	0,9732	0,6081	0,9155	0,7095	0,9181	0,1043	>0,9999	>0,9999	0,9926	0,8988
Clon 1.10 vs. Clon 3.5	0,6231	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,6081	0,8041	0,2538	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,7937	0,8988
Clon 1.22 vs. Clon 1.7	0,0456	0,3359	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,5531	0,9321	0,9371	0,3929	>0,9999	>0,9999	0,9866	>0,9999
Clon 1.22 vs. Clon 3.10	0,0907	0,6327	>0,9999	0,9732	>0,9999	0,7609	0,4100	0,9181	0,3925	>0,9999	>0,9999	0,8698	>0,9999
Clon 1.22 vs. Clon 3.5	0,4058	0,3359	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,9605	0,9748	>0,9999	0,3929	>0,9999	>0,9999	0,9146	>0,9999
Clon 1.7 vs. Clon 3.10	0,6899	0,6157	>0,9999	0,9732	>0,9999	0,7696	0,4577	0,9809	0,1043	>0,9999	>0,9999	0,8566	>0,9999
Clon 1.7 vs. Clon 3.5	0,1875	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,5214	0,9573	0,9371	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,9280	>0,9999
Clon 3.10 vs. Clon 3.5	0,3390	0,6157	>0,9999	0,9732	>0,9999	0,7238	0,4273	0,9181	0,1043	>0,9999	>0,9999	0,7866	>0,9999
PHA													
Sin ASC vs. Clon 1.10	0,0849	0,7921	>0,9999	0,1015	0,1602	<0,0001	<0,0001	0,0034	0,6478	0,0002	<0,0001	0,0028	<0,0001
Sin ASC vs. Clon 1.22	0,8468	0,7921	>0,9999	0,0057	0,2773	<0,0001	<0,0001	0,0026	0,6478	0,0025	<0,0001	0,0361	<0,0001
Sin ASC vs. Clon 1.7	0,0006	0,8746	<0,0001	0,0089	0,7566	0,0002	<0,0001	0,2641	0,6478	0,0034	<0,0001	0,7664	<0,0001
Sin ASC vs. Clon 3.10	0,0008	0,4138	>0,9999	0,1462	0,4015	<0,0001	<0,0001	0,4749	0,6478	0,0111	<0,0001	0,0120	<0,0001
Sin ASC vs. Clon 3.5	0,6018	0,4138	>0,9999	0,0017	0,1602	<0,0001	<0,0001	0,0021	0,6478	0,0005	<0,0001	0,0360	<0,0001
Clon 1.10 vs. Clon 1.22	0,0610	>0,9999	>0,9999	0,0003	0,7205	0,7824	0,7907	0,8771	>0,9999	0,1081	0,6224	0,1620	0,2146
Clon 1.10 vs. Clon 1.7	0,0119	0,9155	<0,0001	0,0005	0,2584	0,0006	0,7343	0,0005	>0,9999	0,0781	0,0132	0,0047	0,1708
Clon 1.10 vs. Clon 3.10	0,0183	0,5735	>0,9999	0,0070	0,0377	0,2095	0,7150	0,0118	>0,9999	0,0233	0,2765	0,4077	0,0302
Clon 1.10 vs. Clon 3.5	0,1996	0,5735	>0,9999	0,0001	>0,9999	0,6147	0,5930	0,7645	>0,9999	0,4577	0,9430	0,1628	>0,9999
Clon 1.22 vs. Clon 1.7	0,0004	0,9155	<0,0001	0,7943	0,4257	0,0008	0,9406	0,0004	>0,9999	0,8471	0,0316	0,0607	0,8834
Clon 1.22 vs. Clon 3.10	0,0006	0,5735	>0,9999	0,0828	0,0704	0,3151	0,9200	0,0090	>0,9999	0,3839	0,5348	0,5331	0,2586
Clon 1.22 vs. Clon 3.5	0,4780	0,5735	>0,9999	0,4785	0,7205	0,4405	0,7856	0,8844	>0,9999	0,3445	0,6729	0,9977	0,2146
Clon 1.7 vs. Clon 3.10	0,8066	0,5055	<0,0001	0,1281	0,2597	0,0045	0,9793	0,0830	>0,9999	0,4923	0,0933	0,0202	0,3196
Clon 1.7 vs. Clon 3.5	0,0013	0,5055	<0,0001	0,3390	0,2584	0,0003	0,8431	0,0003	>0,9999	0,2615	0,0150	0,0604	0,1708
Clon 3.10 vs. Clon 3.5	0,0019	>0,9999	>0,9999	0,0238	0,0377	0,0924	0,8634	0,0070	>0,9999	0,0862	0,3065	0,5350	0,0302

4.4. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA

En este apartado se reflejan los resultados derivados de los distintos ensayos de proliferación linfocitaria. El estímulo utilizado fue siempre PHA (10 µg/mL), que tal y como era de esperar promovió la proliferación linfocitaria en todos los ensayos. El rendimiento de la purificación de poblaciones linfocitarias estuvo siempre en torno al 90-95%. Debido a que el grado de proliferación era distinto para cada una de las muestras de PBMC, y de las subpoblaciones purificadas, los datos se homogeneizaron para mostrar los resultados en términos de *tasa de cambio de proliferación*, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de cambio} = \left[\frac{\% \text{ Pr L}^+ (\text{con o sin ASC}) - \% \text{ Pr L} (\text{con o sin ASC})}{\% \text{ Pr L}^+ \text{ sin ASC} - \% \text{ Pr L} \text{ sin ASC}} \right] : 100$$

Pr: proliferación; L⁺: linfocitos + PHA; L: linfocitos

Debido al elevado número de comparaciones resultante de las múltiples condiciones de cultivo, los valores de *p* para las comparaciones entre las condiciones sin presencia de ASC (PBMC/poblaciones purificadas) y los diferentes clones, así como las comparaciones de los diferentes clones entre sí, se detallan en las [Tablas 3 y 4](#).

4.4.1. EFECTO DE LAS ASC SOBRE PBMC

Las PBMC sin estimular no mostraron signos de proliferación, independientemente de la presencia o no de los distintos clones de ASC en el cultivo. La estimulación provocó proliferación celular en todos los casos, siendo la condición de PBMC sin ASC la que mayor proliferación mostraba y para todas las subpoblaciones linfocitarias estudiadas.

La presencia de las ASC en cocultivo, siempre redujo significativamente la proliferación respecto de las PBMC solas. Dicha reducción no fue, sin embargo, idéntica para todos los clones ni para todas las subpoblaciones linfocitarias. Pudimos distinguir dos comportamien-

tos sobre la inhibición de la proliferación, relacionados en principio con las diferencias interindividuales de los donantes de ASC. El conjunto de los clones 1 produjo una inhibición de la proliferación mucho más intensa que el conjunto de los clones 3, tanto para linfocitos totales ($p=0,0044$), como para linfocitos $CD3^+$ ($p=0,00504$), linfocitos $CD4^+$ ($p=0,0254$) y células NK ($p=0,0121$), sin mostrar diferencias en el caso de los linfocitos $CD8^+$ ($p=0,349$) (Figura 32A).

Analizando el comportamiento individual de los distintos clones sobre las distintas poblaciones y subpoblaciones linfocitarias, si consideramos la inhibición sobre el conjunto de los linfocitos, los clones 1.22 y 1.7 fueron, con diferencia, más inhibitorios que los clones 3.10 y 3.5. El clon 1.10 mostró un nivel de inhibición intermedio (Figura 32B).

Analizando el conjunto de la población de linfocitos T ($CD3^+$), los clones 1.22 y 1.7 fueron de nuevo los más inhibitorios, mostrando valores cercanos a la significación con respecto al clon 3.10, el menos inhibitorio de todos (Figura 32C).

En el caso de los linfocitos T $CD8^+$ (Figura 32D) el clon 1.7 fue el más inhibitorio. Para las células NK (Figura 32E) lo fue el clon 1.22 y para los $CD4^+$ el 1.10, aunque de nuevo el clon 1.7 presentó un alto nivel de inhibición de la proliferación de ambas poblaciones.

Analizando el efecto global de los clones de ASC sobre la inhibición de la proliferación de todas las poblaciones celulares, se pueden distinguir tres tendencias. Por un lado, los clones 1.10, 1.22 y 1.7 presentan un comportamiento similar, con una alta inhibición de la proliferación, siendo el 1.7 el más inhibidor de los tres. Por otro lado el clon 3.10 fue, sin duda, el menos inhibidor. Finalmente, el clon 3.5 mostró un comportamiento «intermedio» entre los dos anteriores.

4.4.2. EFECTO DE LAS ASC SOBRE LINFOCITOS $CD3^+$ PURIFICADOS

Los clones de ASC no provocaron proliferación en los linfocitos T $CD3^+$, en ausencia de estímulo, y el análisis interindividual (1.x vs. 3.x) no mostró diferencias entre los grupos de clones. En presencia de estímulo, los clones provocaron una fuerte inhibición de la proliferación, siendo el 1.10 y el 3.5 los más inhibidores. En el análisis interclonal, se observaron

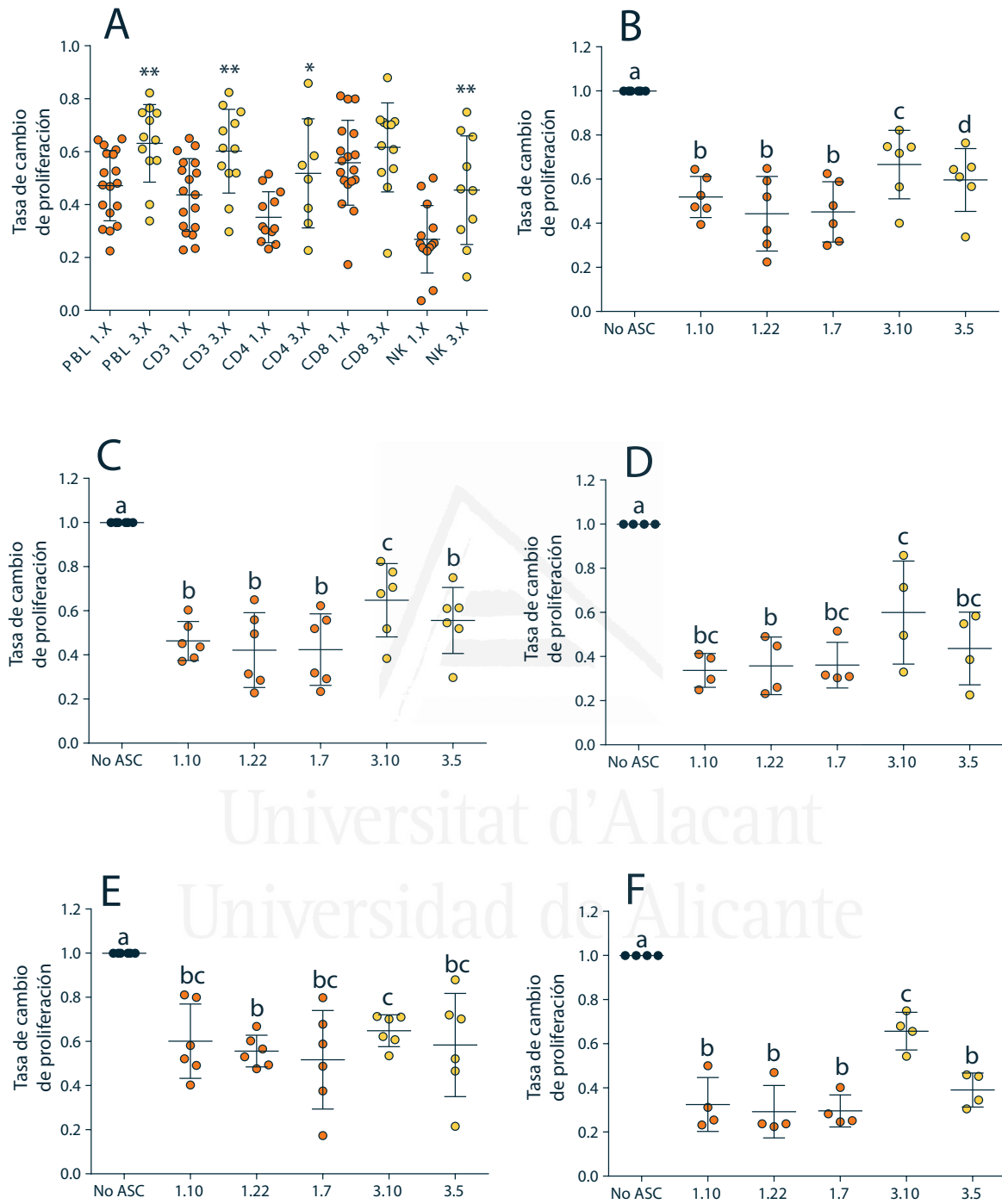


Figura 32. Proliferación de las distintas poblaciones linfocitarias en cocultivos de PBMC estimulados con PHA 10 µg/mL, en presencia o ausencia de los distintos clones de ASC. Ratio ASC:PBMC 1:10. Resultados expresados como media (SD). A: 1.X vs 3.X. B: PBMC totales. C: linfocitos CD3⁺. D: linfocitos CD4⁺. E: linfocitos T CD8⁺. F: células NK. ● No ASC. ● Clones 1.X. ● Clones 3.X. Para A: *=(p<0,05), **=(p<0,01), ***=(p<0,001). Para el resto de gráficas, vlores de p obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher) (véase Tabla 3). Medias que contengan letras iguales no son significativas entre sí (p<0,05).

Tabla 3. Valores de *p* para las comparaciones interclonales de los cocultivos de PBMC con los distintos clones, para las subpoblaciones indicadas, en condiciones de presencia de estímulo PHA 10 µg/mL. Con sombreado naranja, *p*-valores significativos (*p*<0,05).

Comparación	PBMC totales	CD3 ⁺	T CD4 ⁺	T CD8 ⁺	células NK
1.10 vs. 1.22	0,2450	0,5658	0,7999	0,5220	0,1370
1.10 vs. 1.7	0,2688	0,5792	0,6083	0,5772	0,4187
1.10 vs. 3.10	0,0114	0,0196	0,1355	0,3783	0,0273
1.10 vs. 3.5	0,0481	0,0515	0,1818	0,7699	0,3212
1.22 vs. 1.7	0,8424	0,7733	0,9521	0,6761	0,9022
1.22 vs. 3.10	0,0052	0,0054	0,0329	0,0046	0,0165
1.22 vs. 3.5	0,0341	0,0720	0,3824	0,7399	0,1252
1.7 vs. 3.10	0,0059	0,0054	0,1235	0,2479	0,0058
1.7 vs. 3.5	0,0263	0,0735	0,3515	0,6518	0,0909
3.10 vs. 3.5	0,0125	0,0311	0,2368	0,3816	0,0208

ligeras diferencias significativas entre los clones 1.10 y 3.10; y 3.5 y 3.10 (Figura 33A). En el análisis de datos pareados, aunque con una *n* menor (*n*=3), el patrón de inhibición fue idéntico pero la inferencia estadística permitió además identificar al clon 1.22 como significativamente distinto de los clones 1.10 y 3.5 (Figura 33B).

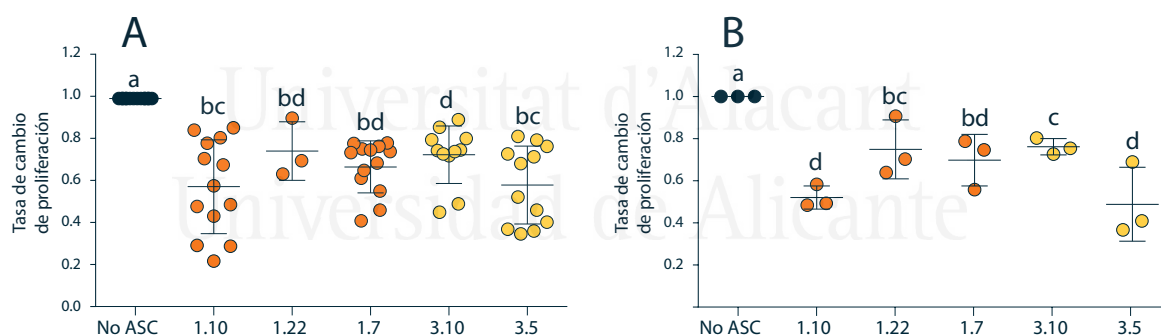


Figura 33. Proliferación linfocitaria en cocultivos de linfocitos CD3⁺ purificados, estimulados con PHA 10 µg/mL, en presencia o ausencia de los distintos clones de ASC. Ratio ASC:PBMC 1:10. Resultados expresados como media (SD). A: Datos globales • No ASC (*n*=14) • Clon 1.10 (*n*=13). • Clon 1.22 (*n*=3). • Clon 3.10 (*n*=11). • Clon 3.5 (*n*=12). B: Datos pareados (*n*=3). Valores de *p* obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher) (véase Tabla 4). Medias que contengan letras iguales no son significativas entre sí (*p*<0,05).

4.4.3. EFECTO DE LAS ASC SOBRE LINFOCITOS CD4⁺ PURIFICADOS

Aunque individualmente no hubieron diferencias significativas entre cada clon por separado y la población purificada de linfocitos CD4⁺, en ausencia de estímulo (Figura 34A), al analizar conjuntamente el efecto de todos los clones sí observamos un aumento significativo ($p < 0,0001$) de la proliferación linfocitaria (datos no mostrados), justo al contrario de lo que pudimos observar en el caso de los linfocitos CD3⁺ purificados y de las PBMC. En presencia de estímulo, los cocultivos sí que mostraron una disminución significativa de la proliferación, similar a la descrita para los linfocitos CD3⁺ y PBMC, siendo el clon 1.7 el menos inhibitorio y el 1.10 el más inhibitorio. Por otro lado, tampoco se detectaron diferencias entre grupos de clones a nivel interindividual. Finalmente, el análisis interclonal mostró diferencias significativas del clon 1.7 con los clones 1.10 y 1.22, Al igual que en el caso anterior, también se encontraron diferencias entre los clones 1.10 y 3.10 (Figura 34B).

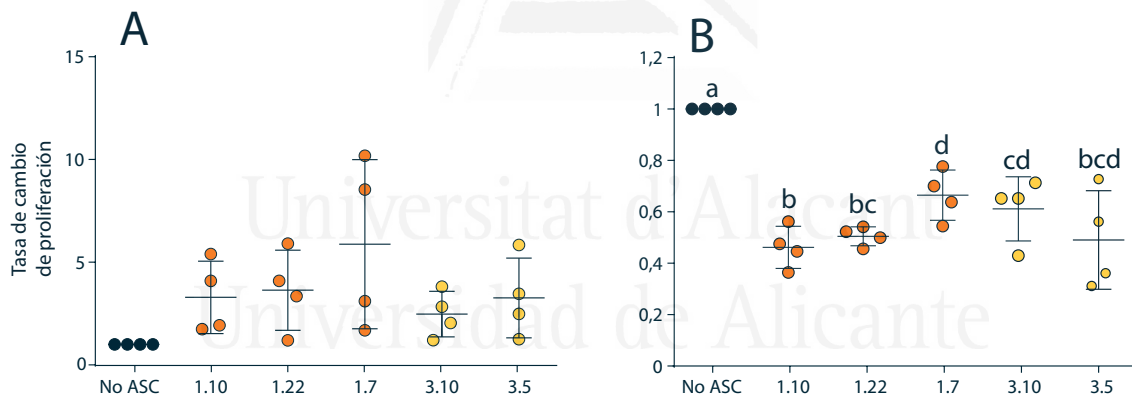


Figura 34. Proliferación linfocitaria en cocultivos de linfocitos CD4⁺ purificados, en presencia o ausencia de los distintos clones de ASC. Ratio ASC:PBMC 1:10. Resultados expresados como media (SD). A: Control sin estímulo. B: PHA 10 µg/mL • No ASC • Clones 1.x. • Clones 3.x. Valores de p obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher) (véase Tabla 4) (n=4). Medias que contengan letras iguales no son significativas entre sí ($p < 0,05$).

4.4.4. EFECTO DE LAS ASC SOBRE LINFOCITOS T CD8⁺ PURIFICADOS

Al igual que en el caso de los linfocitos CD4⁺ purificados, la presencia de ASC en el cocultivo con linfocitos CD8⁺ purificados sin estimular, también provocó un aumento significativo en la proliferación de éstos ($p < 0,0001$). La comparación individual mostró diferen-

cias con los clones 1.10 ($p=0,0026$), 1.22 ($p=0,0459$), 1.7 ($p=0,0181$), 3.10 ($p=0,0045$) y 3.5 ($p=0,0042$) (Figura 35A). Sin embargo no se obtuvieron diferencias interindividuales (1.x vs. 3.x). En el análisis interclonal tampoco se llegaron a obtener diferencias significativas, pero sí valores cercanos a la significación estadística para las parejas de clones 1.10 vs. 1.7, 1.10 vs. 3.10, 1.7 vs. 3.5 y 3.10 vs. 3.5. Al contrario de lo analizado en las anteriores poblaciones y subpoblaciones de PBMC, en presencia del estímulo PHA, la proliferación de los linfocitos CD8⁺ purificados aumentó significativamente ($p=0,0001$). Individualmente, las diferencias con los distintos clones mostraron distintos grados de significación para los clones 1.10 ($p=0,0304$), 1.22 ($p=0,0339$), 1.7 ($p=0,0105$), 3.10 ($p=0,0062$) y 3.5 ($p=0,0241$). En cuanto a las diferencias interindividuales (1.x vs. 3.x), no se detectaron diferencias entre ambos grupos de clones. Por último, en el análisis interclonal encontramos de nuevo diferencias significativas entre clones, destacando el clon 3.10 que mostró un mayor nivel de proliferación estadísticamente significativo que el resto de clones. El clon 1.7 también mostró diferencias con los clones 1.10 y 3.5, provocando un nivel de proliferación intermedio (Figura 35B).

Si observamos la Figura 36, podemos comprobar que el estímulo PHA provocó un aumento en el tamaño de parte de los linfocitos CD8⁺ purificados, que podría estar relacionado con una respuesta parcial al estímulo, que no resultara suficiente para traducirse en una proliferación efectiva. Sin embargo, en presencia de las ASC sí que observamos un incremento claro en la proliferación de dicha población.

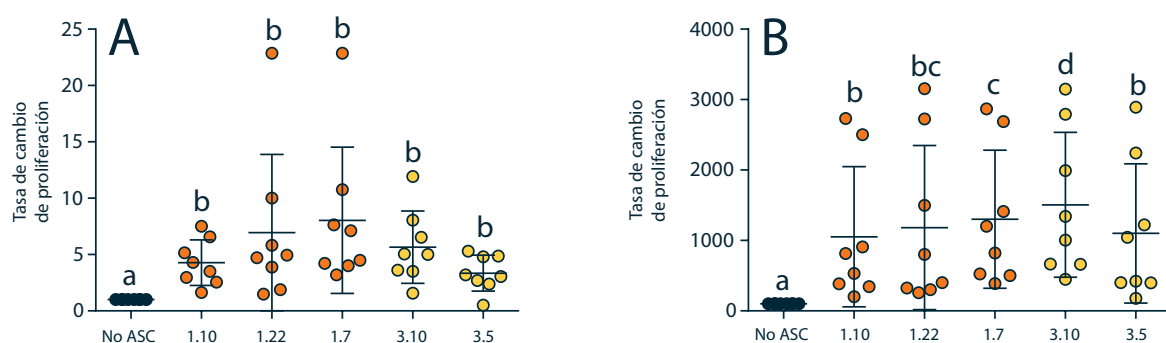


Figura 35. Proliferación linfocitaria en cocultivos de linfocitos CD8⁺ purificados, en presencia o ausencia de los distintos clones de ASC. Ratio ASC:PBMC 1:10. Resultados expresados como media (SD). A: Control sin estímulo. B: PHA 10 µg/mL ● No ASC ● Clones 1.x. ● Clones 3.x. Valores de p obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher) (véase Tabla 4) (n=8). Medias que contengan letras iguales no son significativas entre sí ($p<0,05$).

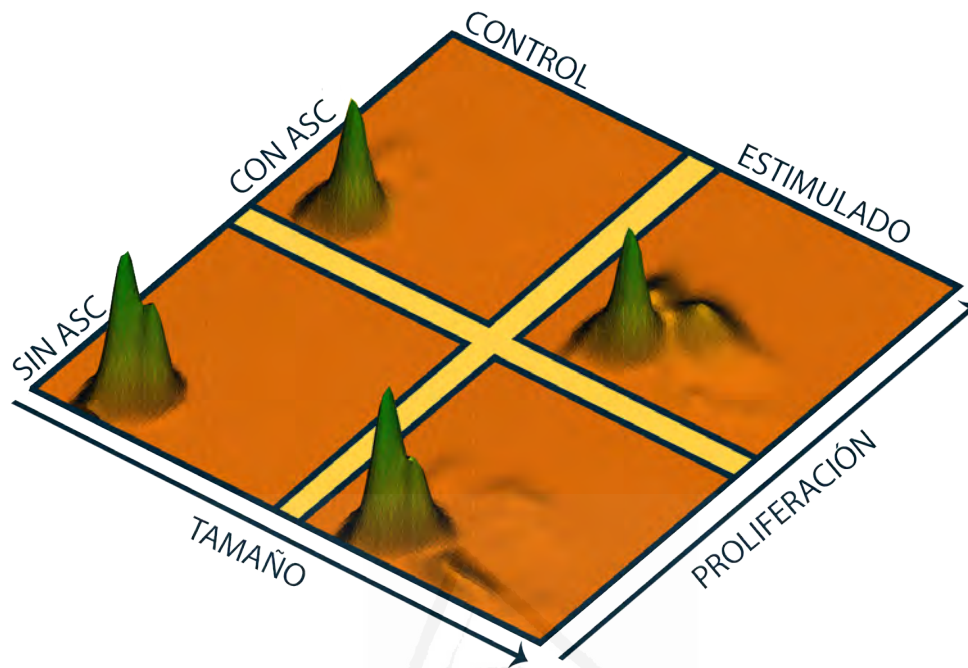


Figura 36. Histogramas 3D del análisis de los cocultivos de ASC y linfocitos CD8⁺, mostrando la proliferación frente al tamaño celular. La altura del histograma es proporcional al número de células. En la parte superior, sin estímulo y con ASC; parte izquierda, sin estímulo y sin ASC; parte derecha, con estímulo y con ASC; parte inferior con estímulo y con ASC. Se muestra un ejemplo representativo.

4.4.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO CD11b EN COCULTIVOS DE ASC Y LINFOCITOS CD8 PURIFICADOS

El fenotipo resultante del análisis fue un perfil CD11b⁻ mayoritario (Figura 37). Este resultado fue consistente en todos los cocultivos realizados ($p=0,0538$) (datos no mostrados). Analizando las diferencias individuales respecto al control sin ASC, en cuanto a la tasa de cambio de expresión de CD11b, se observó un aumento en el porcentaje de la población CD8⁺CD11b⁻ (Figura 38). Aunque sin llegar a alcanzar diferencias significativas, probablemente debido al tamaño de la muestra analizada, los valores de p sí que mostraron, al menos, unos valores cercanos a la significación para la comparación entre la ausencia y la presencia de ASC (Sin ASC vs 1.10 ($p=0,1054$); sin ASC vs 3.5 ($p=0,1371$) y 1.10 vs 3.5 ($p=0,3867$)).

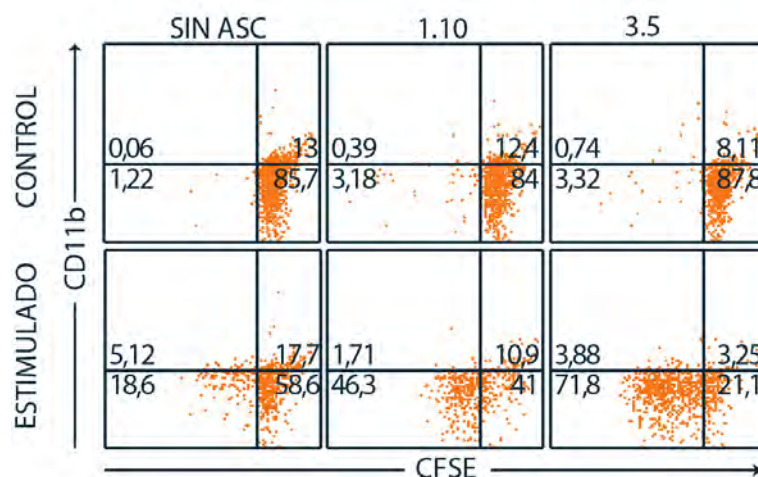


Figura 37. Diagrama de puntos de las distintas condiciones de cultivo para el análisis de la expresión del antígeno de superficie CD11b en linfocitos CD8⁺ purificados. Ratio ASC:PBMC 1:10. En abcisas, CFSE. En ordenadas, expresión de CD11b. Fila superior, control. Fila inferior, estimulado con PHA 10 µg/mL. Primera columna, sin ASC. Segunda columna, Clon 1.10. Tercera columna, clon 3.5. Se muestran porcentajes de células de un experimento representativo.

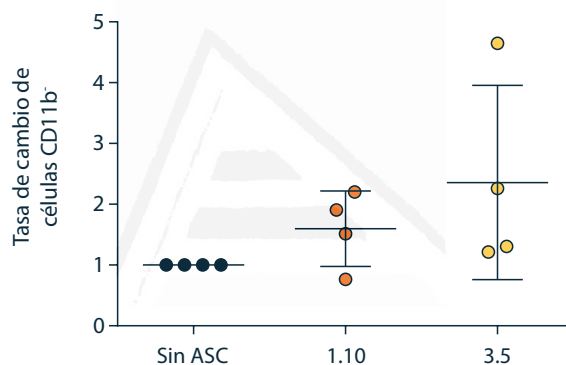


Figura 38. Tasa de cambio en la expresión del antígeno de superficie CD11b en linfocitos CD8⁺ purificados, en presencia o ausencia de dos clones de ASC. Ratio ASC:PBMC 1:10. Resultados expresados como edia (SD). ● No ASC ● Clon 1.10. ● Clon 3.5. Valores de p obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher) (n=4).

Universidad de Alicante

Tabla 4. Valores de p para las comparaciones interclonales de los cocultivos de clones con las distintas poblaciones linfocitarias purificadas, en presencia o ausencia de estímulo PHA. Con sombreado naranja, p-valores significativos (p<0,05).

Comparación	T CD3 ⁺ PHA totales	T CD3 ⁺ PHA pareados	T CD4 ⁺ control	T CD4 ⁺ PHA	T CD8 ⁺ control	T CD8 ⁺ PHA
1.10 vs. 1.22	0,0856	0,0231	0,2126	0,2721	0,2133	0,2488
1.10 vs. 1.7	0,1189	0,0668	0,4664	0,031	0,079	0,0027
1.10 vs. 3.10	0,0177	0,0179	0,1852	0,0159	0,0773	0,0039
1.10 vs. 3.5	0,8972	0,7253	0,0757	0,7223	0,2501	0,5255
1.22 vs. 1.7	0,4391	0,5684	0,1492	0,0189	0,2017	0,2113
1.22 vs. 3.10	0,8542	0,8912	0,1712	0,1082	0,4844	0,0046
1.22 vs. 3.5	0,1034	0,0119	0,1259	0,8773	0,1505	0,3644
1.7 vs. 3.10	0,3589	0,4816	0,9298	0,3324	0,1931	0,0096
1.7 vs. 3.5	0,1607	0,0351	0,1202	0,1767	0,0523	0,0094
3.10 vs. 3.5	0,0269	0,0092	0,1653	0,2118	0,0704	0,0008

4.4.6. EFECTO DE LOS ASC-DMEM⁺ SOBRE PBMC

En cuanto al efecto de los medios condicionados (ASC-DMEM⁺) sobre la proliferación de PBMC, en condiciones de ausencia de estímulo no hubo diferencias significativas entre los distintos ASC-DMEM⁺ y el medio control (DMEM). Tampoco se detectaron diferencias en el análisis interindividual. Sin embargo, el análisis interclonal sí mostró diferencias entre el clon 3.5 y los clones 1.22 ($p=0,0193$) y 1.7 ($p=0,0181$) (datos no mostrados).

En presencia de estímulo, todos los medios condicionados disminuyeron ligeramente la proliferación linfocitaria respecto de la condición sin ASC-DMEM⁺, mostrando diferencias significativas para los clones 1.10 ($p=0,0198$) y 1.22 ($p<0,0001$) (Figura 39). El análisis interclonal también mostró diferencias entre clones (Tabla 5), destacando el clon 1.22, que mostró una gran reducción de la proliferación respecto a los otros clones (Figura 39).

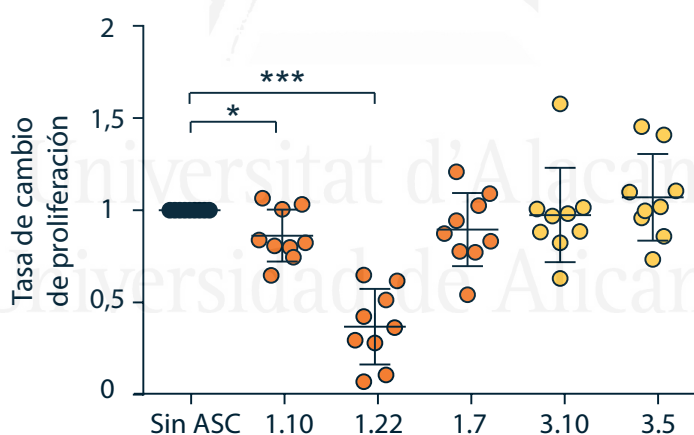


Figura 39. Proliferación linfocitaria en cultivos de PBMC estimulados con PHA 10 µg/mL, en presencia o ausencia de ASC-DMEM⁺ de los distintos clones. Resultados expresados como media (SD). ● DMEM ● ASC-DMEM⁺ de los clones 1.X. ● ASC-DMEM⁺ de los clones 3.X. Valores de p obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher) ($n=9$). *=($p<0,05$), ***=($p<0,001$).

Tabla 5. Valores estadísticamente significativos, resultantes del análisis ANOVA para las comparaciones interclonales de los cocultivos de ASC-DMEM⁺ y PBMC.

Comparación	Valor de p	Comparación	Valor de p	Comparación	Valor de p
1.10 vs. 1.22	0,0002	1.22 vs. 1.7	0,0003	1.22 vs. 3.5	0,0007
1.10 vs. 3.5	0,0105	1.22 vs. 3.10	0,0010	1.7 vs. 3.5	0,0420

4.5. ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DE LOS VALORES DE FoxP3 Y CD EN PBMC COCULTIVADAS CON LOS CLONES DE ASC

Las ASC cocultivadas con PBMC, provocaron en todos los casos un aumento de la expresión del factor de transcripción característico de las células TREG (FoxP3) en linfocitos CD4⁺, y del receptor para la IL-2 (CD25) (Figura 40A), en linfocitos CD4⁺CD25⁺ (Figura 40B). En cuanto a las diferencias individuales con el control sin ASC, todos los clones aumentaron significativamente la expresión de FoxP3 [1.10 ($p=0,0247$), 1.22 ($p=0,0052$), 1.7 ($p=0,0095$), 3.10 ($p=0,0216$) y 3.5 ($p=0,0131$)] (Figura 40A). Para el marcador CD25, el análisis estadístico mostró diferencias significativas con todos los clones [1.22 ($p=0,0057$), 1.7 ($p=0,0031$), 3.10 ($p=0,0063$) y 3.5 ($p=0,0182$)], salvo con el clon 1.10, aunque el valor de p de este último fue de 0,0536 (Figura 40B).

Por otro lado, no se encontraron diferencias a nivel interindividual ni para FoxP3 ni para CD25. Finalmente, en la comparación interclonal se observaron numerosas diferencias, tanto para FoxP3 como para CD25, destacando en ambos casos los clones 1.22 y 1.7, con unas tasas de cambio superiores al resto. Los clones 1.10 y 3.5 fueron con diferencia los que menos efecto tuvieron sobre la expresión de los marcadores, mientras que en presencia del clon 3.10 se observó unos valores intermedios entre los dos grupos anteriores (Figura 40 y Tabla 6).

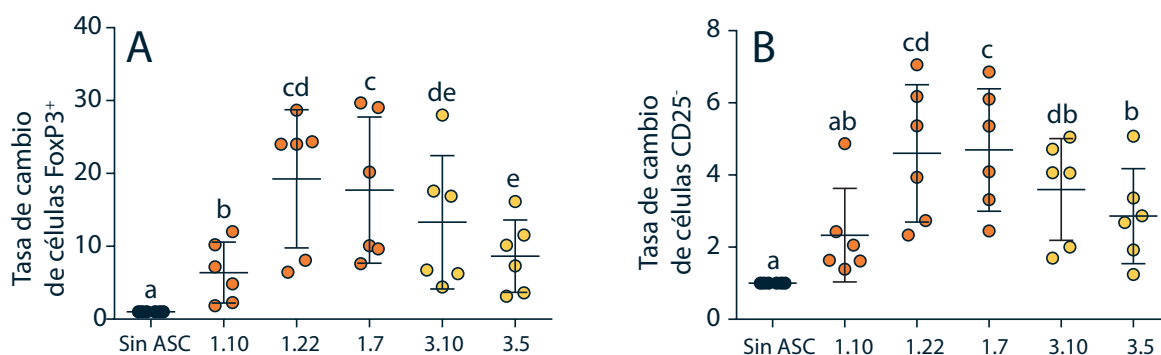


Figura 40. Tasa de cambio en la expresión de los marcadores FoxP3 y CD25 en cocultivos de PBMC con ASC. A: FoxP3. B: CD25. ● Sin ASC ● Clones 1.x ● Clones 3.x. Valores de p obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher) ($n=6$). Medias que contengan letras iguales no son significativas entre sí ($p<0,05$).

Tabla 6. Valores resultantes del análisis ANOVA para las comparaciones en cuanto a la expresión de los marcadores FoxP3 y CD25 de cocultivos de PBMC y ASC. En negrita se muestran los valores significativos.

FoxP3		CD25		FoxP3		CD25	
Comparación	Valor de <i>p</i>	Valor de <i>p</i>	Comparación	Valor de <i>p</i>	Valor de <i>p</i>	Valor de <i>p</i>	Valor de <i>p</i>
1.10 vs. 1.22	0,0059	0,0096	1.22 vs. 3.10	0,1234	0,0562		
1.10 vs. 1.7	0,0135	0,0266	1.22 vs. 3.5	0,0093	0,0128		
1.10 vs. 3.10	0,0387	0,0704	1.7 vs. 3.10	0,0386	0,0167		
1.10 vs. 3.5	0,0055	0,0538	1.7 vs. 3.5	0,0310	0,0309		
1.22 vs. 1.7	0,6130	0,8382	3.10 vs. 3.5	0,1318	0,1064		

4.6. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL ASC-DMEM⁺ SOBRE LA EXPRESIÓN DE FoxP3 Y CD25 EN PBMC

En cuanto al efecto de los secretomas procedentes de los distintos clones de ASC sobre la expresión de los mismos marcadores analizados anteriormente, todos los medios condicionados provocaron un aumento en la expresión tanto de FoxP3 como de CD25, si bien sólo se encontraron diferencias significativas cuando era el medio condicionado del clon 1.7 el que estaba presente en el cultivo y, además, sólo para FoxP3 (Figura 41). Sin embargo, los valores de *p* para el resto de comparaciones respecto a DMEM puro, fueron bastante bajos (entre 0,0635 y 0,1444 para FoxP3, y entre 0,0722 y 0,3127 para CD25), indicando una fuerte tendencia por parte de los medios condicionados a aumentar los valores de expresión de las dos moléculas analizadas. No se encontraron tampoco diferencias interindividuales ni interclonales.

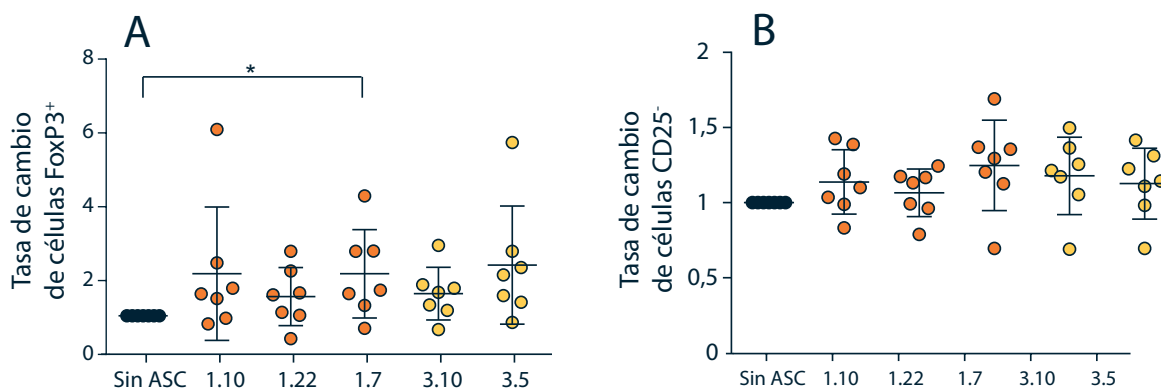


Figura 41. Tasa de cambio en la expresión de los marcadores FoxP3 y CD25 en cultivos de PBMC con ASC-DMEM⁺. A: FoxP3. B: CD25. ● Sin ASC ● ASC-DMEM⁺ de lo clones 1.X ● ASC-DMEM⁺ de lo clones 3.X. Valores de *p* obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher) (n=7). *=(*p*<0,05).

4.7. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS ASC SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS PBMC

El análisis de la viabilidad de las PBMC mostró diferencias significativas entre el tratamiento con luz UV y el control negativo, para todas las condiciones de cultivo. En ausencia de luz UV, los clones no ejercieron ninguna influencia sobre la viabilidad de las PBMC (Figura 42A).

Sin embargo, en las células pretratadas con luz UV, observamos que la presencia del clon 1.10 disminuyó significativamente la mortalidad de las PBMC ($p=0,0020$), al contrario de lo que ocurrió con el clon 3.5, que la aumentó levemente ($p=0,0225$). El conjunto de estos dos comportamientos contrarios, se tradujo en una gran diferencia significativa entre ambos clones, en cuanto a su efecto sobre la viabilidad de las PBMC ($p=0,0006$) (Fig. 42B).

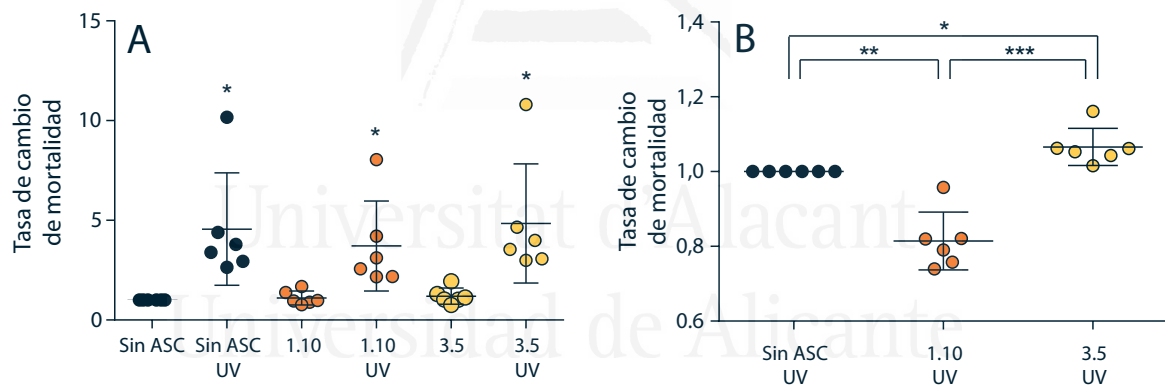


Figura 42. Tasa de cambio en la mortalidad de PBMC pretratadas con ASC, y estimuladas con luz UV. A: efecto de la luz UV en cada una de las condiciones B: mortalidad con luz UV. • Sin ASC • Clon 1.10 • Clon 3.5. Valores de p obtenidos mediante ANOVA (test LSD de Fisher) ($n=6$). *=($p<0,05$), **=($p<0,01$) ***=($p<0,001$).

V. DISCUSIÓN



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Las células troncales son una de las grandes esperanzas de la medicina regenerativa. Su propiedad de diferenciación hace que sean, teóricamente, capaces de formar cualquier tipo celular. Las células troncales embrionarias son, sin duda alguna, las que mayor potencial poseen. Sin embargo, los límites éticos y/o morales tienen un gran protagonismo en este campo de la medicina, dependiendo enormemente su uso de la legislación vigente presente en cada país y/o región. Es por ello que la búsqueda de alternativas al uso de células troncales que provoquen una menor controversia, ha sido objeto de enormes esfuerzos por parte de la comunidad científica. Uno de los mayores hitos en esta búsqueda ha sido la generación de iPSC a partir de células somáticas adultas (Takahashi & Yamanaka 2006; Takahashi *et al.* 2007). Sin embargo, el uso de estas células troncales implica un cierto riesgo de tumorigenicidad (Ben-David & Benvenisty 2011), que aunque no ausente en el uso de las MSC (Cawthorn *et al.* 2012), es menor en estas últimas. A falta de un conocimiento más profundo sobre el funcionamiento de las iPSC, su tumorigenicidad es un hecho que hay que tener en cuenta y que es en parte responsable de que, a día de hoy, existan tan sólo 21 ensayos clínicos en humanos con iPSC. Sin embargo, los ensayos clínicos con MSC son mucho más numerosos tal y como se puede comprobar en la página web *clinicaltrials.gov*.

El descubrimiento de las MSC en médula ósea por parte de Friedenstein, fue secundado por un elevado número de estudios que lograron aislar estas células, a partir de una gran variedad de tejidos. En este sentido, una de las fuentes con mayores ventajas respecto al resto, es el tejido adiposo, tanto por la cantidad relativa de MSC por gramo de tejido, como por su facilidad de obtención. En cuanto a su diferenciación, en un principio se definieron por su capacidad para diferenciarse en linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos. A día de

hoy, y aunque sin alcanzar la potencialidad de las iPSC, las MSC constituyen una herramienta fundamental en medicina regenerativa, gracias principalmente a su capacidad de transdiferenciación, proceso que les permite diferenciarse en células de otros linajes embrionarios, tales como las neuronas (Ng *et al.* 2014).

Como se ha descrito en la INTRODUCCIÓN de este trabajo, a parte de las múltiples aplicaciones que las MSC puedan tener en la medicina regenerativa, una de las propiedades más importantes de estas células es que son capaces de interactuar íntimamente con distintas poblaciones celulares y moléculas del sistema inmunitario. Gracias a esta propiedad, las MSC también constituyen una herramienta potencialmente útil en el tratamiento de enfermedades de base inmunológica, como pueden ser las enfermedades autoinmunes y/o autoinflamatorias, entre otras. En este sentido, las MSC, además de su capacidad potencial para modular la patogenia de la enfermedad, y con ello de modificar el pronóstico de la misma, podrían servir también para reducir la cantidad de fármacos inmunosupresores que son administrados de forma convencional y, por tanto, el número de efectos secundarios derivados de los mismos. De hecho, varios estudios han demostrado que las MSC son capaces de suprimir la respuesta de linfocitos T y células NK, y también, de modificar la diferenciación, maduración y función de linfocitos B y células dendríticas (Arribas *et al.*, 2012), sin ser inherentemente inmunogénicas. Este último punto es muy importante, ya que demuestra que estas células se pueden aislar de diferentes donantes y, a continuación, ser expandidas *ex vivo* para su posterior administración a cualquier individuo en forma de trasplante alogénico (Zhang *et al.*, 2015), al amparo de diferentes protocolos de terapia celular. Por otro lado, son numerosos los investigadores que a través de distintos modelos animales y ensayos clínicos en humanos, ya han demostrado la capacidad que las MSC tienen, una vez perfundidas, para migrar e insertarse específicamente en distintos tejidos y órganos (Rustad & Gurtner, 2012).

Aunque los mecanismos mediante los cuales ejercen la inmunomodulación aún no están del todo caracterizados, lo que sí queda demostrado en la literatura científica es que esta población es altamente heterogénea (Docheva *et al.* 2008), con distinta capacidad para

interaccionar con el sistema inmunitario y con perfiles de secreción de citocinas distintos, según el donante del cual procede el cultivo primario.

Algunos autores han demostrado que cuando las MSC se cultivan como colonias derivadas de una sola célula, cada una de ellas muestra un grado variable de plasticidad, en términos de diferenciación tisular. Esto indica que ciertas colonias son solamente capaces de diferenciarse hacia un linaje único, mientras que otras tienen un mayor potencial de diferenciación (Guilak *et al.* 2006). En este sentido, los clones analizados en este trabajo presentan cierta heterogeneidad en su potencial de diferenciación hacia los linajes osteogénicos y adipogénicos. A este respecto, los clones 1.22 y 1.7 son capaces de diferenciarse en ambos linajes, el clon 3.5 muestra sólo diferenciación hacia el linaje osteogénico y los clones 1.10 y 3.10 no son capaces de diferenciarse (Paredes *et al.* 2011; Arribas, 2014).

El principal objetivo de este trabajo fue analizar si esta plasticidad, observada en términos de diferenciación tisular, también está presente en las propiedades inmunomoduladoras de las MSC. De ser así, podríamos en su caso seleccionar el clon o los clones a priori más adecuados en el tratamiento de diferentes patologías, en vez de utilizar poblaciones heterogéneas, que poseen un mayor grado de variabilidad.

Para conseguir este objetivo, hemos analizado *ex vivo* las diferencias existentes entre los clones objeto de estudio, obtenidos de tejido adiposo de dos donantes sanos diferentes, y hemos caracterizado para cada clon su fenotipo de membrana específico, su perfil de secreción de citocinas, así como la modificación del ambiente de las mismas en cocultivo. Además, analizamos sus distintas capacidades para inhibir la proliferación de diferentes subpoblaciones de linfocitos. Del mismo modo, también hemos estudiado el efecto que los distintos clones de ASC ejercen sobre diversas poblaciones linfocitarias reguladoras y sobre la viabilidad de linfocitos preincubados con dichos clones. Algunos de estos efectos también se han analizado utilizando exclusivamente los medios condicionados por los clones, es decir, sin la presencia de ASC en el cultivo, con el objetivo de determinar el papel que el secretoma pudiera estar jugando directamente sobre el grado de plasticidad anteriormente mencionado.

Probablemente, y en relación con lo previamente expuesto, los resultados contradictorios que pueden observarse en la literatura cuando se utilizan MSC, sean principalmente debidos a la heterogeneidad de las poblaciones utilizadas en cada caso concreto. Dicha heterogeneidad puede a su vez estar relacionada con los diferentes protocolos de aislamiento y condiciones de cultivo utilizados, y puede ir cambiando con el número de pases, en función de la mayor o menor presencia de determinados clones con ventajas proliferativas, que irían desplazando al resto. El nicho celular también tiene en este caso un gran protagonismo, ya que es éste el que determina de una forma directa el grado de diferenciación de cada una de las células troncales que lo habitan y, por tanto, su potencialidad, pudiendo ser distinta para cada célula o clon de células. Además, algunos trabajos han demostrado que la fuente de obtención de las MSC también compromete su diferenciación hacia uno o varios linajes (Gebler *et al.* 2012; Boquest *et al.* 2006).

En lo referente a la primera parte de nuestro trabajo, es decir, al análisis de los antígenos de membrana expresados por los diferentes clones de ASC, establecidos por la ISCT como indispensables para la correcta identificación de las MSC en general, es de destacar que tienen funciones de activación y de supresión. Así por ejemplo, CD44 es una molécula de adhesión implicada en una amplia gama de funciones celulares, incluyendo la activación linfocitaria, la recirculación y la migración (Khaldoyanidi, 2008). CD73 cataliza la conversión de mononucleótidos, principalmente AMP, a nucleósidos. Su expresión en las células TREG parece estar involucrada en sus mecanismos reguladores (Whiteside *et al.* 2011). CD90 está relacionado con la activación de la señal mediada por TCR, sustituyendo en parte la función activadora de CD28 (Loertscher & Lavery 2002). Finalmente, CD105 (endoglina) forma parte del receptor para el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF, del inglés *transforming growth factor*) y también está implicado en la organización del citoesqueleto, que a su vez afecta a la morfología y a los procesos de migración (Sanz-Rodriguez *et al.* 2004).

En relación a los antígenos de superficie expresados por los clones de nuestro estudio, el análisis interclonal mostró diferencias en la expresión de varios de ellos. Los clones 1.10 y 1.22 expresaron cantidades más bajas de antígenos que los otros tres clones, siendo

el clon 1.22 el que expresaba las cantidades más bajas para todos ellos. Los clones 3.10 y 3.5 expresaron CD105 con una intensidad mayor que el resto de clones y el clon 1.7 expresó las mayores cantidades de CD73 y CD44. El equilibrio resultante entre los antígenos de membrana que participan principalmente en funciones de activación, tales como CD44 o CD90, y marcadores que están más involucrados en funciones supresoras, tales como CD73 o CD105, puede determinar, junto con mecanismos adicionales, las propiedades inmunomoduladoras finales de los clones. Por otro lado, en el análisis interindividual observamos que los clones 3.x tuvieron en términos generales un comportamiento más homogéneo que los 1.x, en lo referente al porcentaje de coexpresión de dos o más de estos marcadores.

En nuestra opinión, tanto la homogeneidad en la expresión de antígenos de membrana de la población celular, como su equilibrio final entre antígenos activadores o inhibidores, debieran ser dos factores a tener en cuenta a la hora de utilizar protocolos de terapia celular, ya que además de constituir un indicador del grado de pureza de la población utilizada, también podrían resultar decisivos en la reproducibilidad y solidez de los resultados, sobre todo al compararlos con los obtenidos al utilizar poblaciones más heterogéneas. Aunque hay evidencias de que las MSC son capaces de cambiar su patrón de expresión de marcadores de superficie dependiendo del tiempo de cultivo (Arribas *et al.* 2012), es importante destacar que la mayor parte de los clones usados en este trabajo fueron cultivados la misma cantidad de tiempo y pases, entrando en procesos de senescencia tras 14-15 pases, sin afectar durante ese tiempo a su grado de homogeneidad.

Varios estudios llevados a cabo con poblaciones heterogéneas de MSC, demuestran la capacidad de estas células para expresar y/o secretar una amplia variedad de citocinas que están involucradas, en gran medida, en sus propiedades inmunomoduladoras (Hoogduijn *et al.* 2010). Se han descrito dos tipos de MSC fisiológicamente distintos, en función de su perfil de secreción de citocinas *ex vivo*: MSC1, que secreta principalmente citocinas proinflamatorias, y MSC2, que secreta principalmente citocinas inmunosupresoras (Waterman *et al.* 2010). Dicha polarización viene determinada *ex vivo* tras la activación mediante los receptores TLR-4 o TLR-3, respectivamente, y puede ser otro de los factores directamente implicados en el alto

grado de heterogeneidad que caracteriza a estas células. De nuevo, el nicho celular podría estar ejerciendo aquí un papel fundamental, ya que además de influir en el grado de diferenciación de las células troncales, tal y como hemos mencionado anteriormente, también podría resultar decisivo en el grado de polarización final de estas MSC, las cuales podrían estar ya polarizadas *in vivo* en uno u otro fenotipo, previamente a la extracción. Por lo tanto, cuando se trabaja con poblaciones heterogéneas de MSC, un análisis previo del equilibrio MSC1/MS2 podría también constituir una herramienta indirecta para medir el grado de homogeneidad del cultivo de MSC que vaya a ser utilizado en terapia celular. En este sentido, si en vez de utilizar poblaciones heterogéneas utilizamos clones de MSC perfectamente caracterizados, en cuanto a su perfil de secreción de citocinas se refiere, estaríamos optimizando la tan ansiada uniformidad previamente mencionada.

En relación con lo expuesto anteriormente, y tras analizar el perfil de citocinas de nuestros clones, también hemos descubierto algunas diferencias interesantes. De hecho, todos los clones eran capaces de liberar de forma espontánea altos niveles de IL-6 y niveles bajos o moderados de IL-8, destacando de nuevo los clones 1.7 y 3.x, que fueron los que produjeron las mayores cantidades de estas citocinas. En general, estos resultados fueron coincidentes con el patrón de expresión de genes de citocinas y el correspondiente perfil de metilación de DNA de los clones de estudio (Sempere *et al.* 2014). En cuanto a la cinética de producción, los clones 1.7, 1.22 y 3.10 presentaron una cinética más rápida que los clones 1.10 y 3.5. Es conocido que la IL-8 favorece la quimiotaxis de neutrófilos, teniendo una función claramente proinflamatoria (Harada *et al.*, 1996). También sabemos que la IL-6 es una citocina pleiotrópica, con efectos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios, aunque el primer efecto es normalmente el que predomina (Oka *et al.* 2007; Gabay, 2006), y que variaciones en sus niveles se han relacionado directamente con la fisiopatología de diversas enfermedades autoinmunes, en particular la artritis reumatoide (Colmegna *et al.*, 2012).

Los niveles de citocinas secretados por los distintos clones tras estimulación con LPS, variaron ligeramente dependiendo de la citocina. Brevemente, los clones 3.x fueron los que produjeron las mayores cantidades de citocinas proinflamatorias, tales como IL-1 β y al mis-

mo tiempo expresaron la menor cantidad de citocinas antiinflamatorias Th2, tales como IL-4 e IL-5. Por el contrario, los clones 1.10 y 1.22, a pesar de ser capaces de producir niveles muy bajos de varias citocinas proinflamatorias tales como TNF- α , TNF- β o IFN- γ , son también los clones que produjeron las cantidades más altas de IL-4 y IL-5, siendo más abundantes en el secretoma del clon 1.22. En total, se puede concluir que en términos generales los clones 3.x muestran un perfil más proinflamatorio, mientras que los clones 1.10 y 1.22 tienen un perfil más supresor. En cuanto al comportamiento del clon 1.7, a pesar de pertenecer al grupo 1.x parece, sin embargo, ser más similar a los clones 3.x, en lo referente a los niveles máximos de citocinas se refiere (Figura 29).

El ambiente que comparten y promueven las ASC en presencia de las PBMC es muy distinto al observado cuando los clones están aislados, tanto en presencia como en ausencia de estímulo. Atendiendo al perfil de citocinas de los cocultivos, no se puede determinar un ambiente claramente proinflamatorio (Th1) ni antiinflamatorio (Th2) de ningún clon, ya que los resultados mostraron tanto aumentos como disminuciones en ambos grupos de citocinas.

En ausencia de estímulo, pudimos observar que la presencia de los diferentes clones se tradujo en todos los casos en un incremento significativo en el sobrenadante de los niveles de IL-1 β y de IL-10, así como en una disminución significativa de los de TNF- α . Sin embargo, al observar con detalle la tasa de cambio de dichos niveles, pudimos comprobar que mientras que los niveles de IL-1 β aumentaban entre 3 y 5 veces respecto de los encontrados en los cultivos que sólo contenían PBMC, los de IL-10 lo hacían entre 65 y 75 veces, según el clon. Estas diferencias apoyan el carácter predominantemente inmunosupresor de las MSC, ya descrito sobradamente en la literatura. Si atendemos ahora a las diferencias interclonales relacionadas con el efecto sobre las anteriores citocinas, observamos que el clon 1.7 es el que se relaciona con un mayor incremento de IL-1 β y con una menor disminución de TNF- α en el sobrenadante, comportamiento exactamente opuesto al observado con el clon 1.22, que de nuevo y dadas estas características, parece tener un perfil predominantemente inmunosupresor. Estas diferencias sólo fueron significativas entre estos dos clones y para la citocina IL-1 β . Los demás clones se comportaron de un modo más homogéneo en lo referente a estas

dos citocinas. En relación con el resto de citocinas analizadas, también observamos algunas diferencias interclonales que merecen la pena ser destacadas. Por ejemplo, en cuanto a la IL-2, ésta no se detectó en presencia de los clones 1.10, 1.7 y 3.5, hecho que se repitió en el caso de la IL-4. Por otro lado, sólo en presencia del clon 1.10 se detectaron niveles bajos o moderados de IL-22 e IL-13, mientras que el IFN- γ sólo se detectó a niveles bajos en presencia de los clones 1.7 y 3.10.

La presencia de estímulo en el medio provocó, generalmente, un incremento en los niveles de las diferentes citocinas analizadas. Los diferentes clones modificaron casi siempre los niveles de dichas citocinas, aunque de un modo mucho más heterogéneo al observado en ausencia de estímulo. Así, por ejemplo, encontramos que en el caso de la IL-17A, todos los clones promovieron un aumento de dicha citocina en el medio, con la excepción del clon 1.10, que mostró una clara tendencia a comportarse de un modo totalmente opuesto al resto de los clones. En el caso del TNF- α , el comportamiento de los clones es similar al observado en ausencia de estímulo, aunque más intenso, siendo de nuevo el clon 1.7 el que menos capacidad mostró para disminuir su producción por parte de las PBMC. Si observamos atentamente en su conjunto los niveles de citocinas predominantemente proinflamatorias, como IL-1 β , IL-22 e IFN- γ , podemos observar dos patrones de comportamiento diferentes según los clones. Por un lado, la presencia de los clones 1.7 y 3.10 se tradujo en los niveles más altos de estas citocinas proinflamatorias en el medio; por el contrario, la presencia de los otros tres clones lo hizo en menores niveles de las mismas. Por otro lado, si prestamos atención a los cambios significativos en algunas de las citocinas antiinflamatorias analizadas, podemos observar que también existieron patrones diferentes de comportamiento que se repitieron de forma casi exacta. Los clones 1.10 y 3.5 fueron los que más redujeron los niveles de dichas citocinas en el medio, aunque también de las citocinas proinflamatorias, tal y como hemos mencionado anteriormente; junto con el clon 1.22, parecen ser en términos generales un ambiente más pobre en citocinas en el medio.

Como resumen de los resultados obtenidos en el análisis general de las citocinas del estudio, y en la línea de lo observado en relación con el análisis del fenotipo de membrana,

podemos afirmar que clones aislados de distintos individuos se pueden comportar de una forma similar, a la vez que clones aislados del mismo individuo pueden tener comportamientos diferentes. Teóricamente, podríamos encontrar en cada individuo, una amplia gama de clones con perfiles ligeramente distintos, que pueden estar polarizados en un gradiente de comportamientos que irían desde un fenotipo más proinflamatorio a uno más inmunosupresor.

Varios autores han descrito la capacidad de poblaciones heterogéneas de MSC para inhibir la proliferación y la activación de diferentes subconjuntos de poblaciones celulares del sistema inmunitario, sin ser inherentemente inmunogénicas (Shi *et al.* 2011). Este hecho es uno de los principales argumentos que sostiene el uso terapéutico de dichas células en individuos alogénicamente diferentes, lo que supone una amplia ventaja si lo comparamos con otros protocolos de terapia celular, que habitualmente implican el uso de células autólogas. Los resultados derivados de estos estudios, aunque sirven como punto de partida para comprender las interacciones entre las MSC alogénicas y las células del sistema inmunitario, y proporcionan información sobre los mecanismos que pueden estar involucrados en la inducción *in vivo* de la tolerancia mediada por las MSC son, sin embargo, dispares (Gao *et al.*, 2016). A nuestro juicio, una vez más defendemos que la variabilidad de los resultados obtenidos al manejar estas células radica, precisamente, en la heterogeneidad anteriormente mencionada (Gebler *et al.* 2012). Es por ello que en este estudio analizamos la capacidad inmunomoduladora de las MSC, pero desde la perspectiva que los diferentes clones de ASC tienen para inhibir la proliferación de varias poblaciones y subpoblaciones linfocitarias.

En la línea de lo anteriormente expuesto, hay que destacar, en primer lugar, que en este estudio no se detectó proliferación celular cuando los distintos clones de ASC se cocultivaron con PBMC totales o con linfocitos T totales (CD3⁺) purificados sin estimular. Sin embargo, sí se detectó una ligera proliferación cuando las poblaciones cocultivadas con las ASC fueron los linfocitos T colaboradores o los linfocitos T citotóxicos, purificados. Este hecho, en nuestra opinión, más que por la inmunogenicidad de las propias ASC, que de ser así también debiera haber ejercido el mismo efecto sobre los linfocitos T totales, estaría probablemente

condicionado por los distintos ambientes de citocinas presentes en los cocultivos, que variarían en función de las poblaciones leucocitarias presentes en el medio.

En presencia de estímulo, y de manera similar a lo que hemos descrito para el fenotipo de membrana y el perfil de citocinas, existen diferencias significativas entre los clones 1.x y 3.x. Cuando las ASC son cocultivadas con PBMC totales, en términos generales podemos afirmar que los clones 1.x son, en conjunto, más supresores que los clones 3.x, para los diferentes subgrupos de linfocitos analizados. Sin embargo, un análisis individual muestra que el clon 1.22 fue el más supresor para la población total de PBMC, así como para los linfocitos T CD3⁺; el clon 1.7, lo fue para los linfocitos T CD8⁺ y las células NK; y el clon 1.10 para las células CD4⁺. El clon 3.10 fue el menos supresor en todos los casos, seguido del clon 3.5. Estos resultados son consistentes con los datos del marcaje de membrana, anteriormente expuestos. De hecho, el clon 1.22, que era el más supresor, es el que expresó la menor cantidad de antígenos de superficie, secretando bajas cantidades de algunas de las más potentes citocinas proinflamatorias y altas cantidades de citocinas antiinflamatorias, como IL-4 o IL-5. Lo contrario ocurre para los clones 3.x, que en general expresaron más antígenos de superficie, produjeron mayores niveles de citocinas proinflamatorias y menores niveles de antiinflamatorias, al mismo tiempo que fueron los menos supresores.

Cuando los cocultivos se realizaron con subpoblaciones purificadas, también se detectaron diferencias sobre el nivel de inhibición de la proliferación según la subpoblación presente en el medio de cultivo, aunque no fueron exactamente iguales a las observadas al trabajar con PBMC. Así, cuando los distintos clones se cocultivaron tanto con linfocitos T CD3⁺ como con linfocitos T CD4⁺ purificados, los clones 1.10 y 3.5 fueron doblemente supresores respecto del resto de clones, mientras que los clones 1.7 y 3.10 fueron los que mostraron menor capacidad de inhibición.

En el caso de los linfocitos T CD8⁺ purificados, y al contrario de lo anteriormente observado con las otras poblaciones leucocitarias analizadas, los cocultivos mostraron un aumento de la proliferación respecto de la condición sin ASC. Este comportamiento sorprende enormemente, ya que es contrario a lo descrito hasta ahora en la literatura (Nicola *et al.*, 2002), aun-

que es de destacar que no existen apenas estudios que hayan determinado, mediante ensayos de proliferación, el efecto de las MSC sobre esta población linfocitaria purificada en particular. Por otro lado, hay que señalar que, a pesar de la estimulación con PHA, dicha subpoblación mostró un nivel de proliferación muy bajo en ausencia de ASC. No obstante, los efectos sobre el tamaño celular estarían indicando que sí se habría producido una cierta activación, aunque ésta no resultase suficiente para que se tradujese en proliferación. Ello podría estar determinado por la ausencia de factores provenientes de otras poblaciones leucocitarias, presentes sin embargo en el resto de cocultivos analizados. Al añadir ASC al cultivo, los clones podrían estar aportando estos factores deficitarios, proporcionando así las señales necesarias para complementar la activación celular y la consiguiente proliferación. Al mismo tiempo, al tratarse de linfocitos T citotóxicos purificados, las poblaciones reguladoras de linfocitos T CD4⁺ tampoco podrían ejercer su efecto modulador habitual sobre la proliferación de los linfocitos T citotóxicos. Este hecho concuerda con datos publicados por otros autores, que afirman que la inhibición de la proliferación celular provocada en presencia de MSC, vendría principalmente determinada por su efecto estimulante sobre los linfocitos T CD4⁺, y más específicamente sobre los linfocitos TREG (Luz-Crawford *et al.*, 2013; Frazier *et al.*, 2014). Este último análisis también ha sido objeto de estudio en esta tesis, tal y como comentaremos más adelante. Si nos ceñimos a las diferencias interclonales observadas previamente para los cocultivos con linfocitos T CD4⁺, podemos destacar que los patrones se repiten de nuevo. De hecho, los clones 1.7 y 3.10 vuelven a comportarse de un modo similar entre sí, pero en este caso destacan por ser los que se relacionaron con un mayor grado de proliferación de linfocitos T CD8⁺. Lo contrario ocurría para los clones 1.10, 1.22 y 3.5.

Con el objetivo de obtener más información sobre la población T CD8⁺ que proliferaba en presencia de las ASC, decidimos medir el grado de expresión del antígeno de membrana CD11b en dicha población. El resultado fue que en presencia de los clones, la población que proliferaba era fundamentalmente CD11b⁻. Los linfocitos CD8⁺CD11b⁻ están ampliamente caracterizados en la literatura como una población de carácter predominantemente inmunosupresor (Fiorentini *et al.*, 2014). Este resultado es importante porque, aunque las ASC parecen

estar aumentando la proliferación de linfocitos T CD8⁺, ésta estaría afectando principalmente a una subpoblación de carácter supresor, lo que de nuevo apoyaría que las ASC llevan a cabo una parte de sus efectos inmunomoduladores, a través de un efecto indirecto sobre poblaciones reguladoras del sistema inmunitario, tal y como hemos mencionado previamente en el caso de las TREG.

Existe cierta discrepancia entre distintos estudios, sobre la necesidad de contacto celular para que las MSC puedan ejercer correctamente la inmunomodulación (Kang *et al.*, 2008). En el último de los ensayos de proliferación descritos en este estudio, utilizamos los secretomas de los distintos clones, para analizar su efecto sobre la proliferación de las PBMC. En todos los casos obtuvimos una menor inhibición de la proliferación respecto a la obtenida en los cocultivos, lo que apoyaría la importancia del contacto celular para una inmunomodulación completa. Sin embargo, el secretoma del clon 1.22 sí fue capaz de inhibir significativamente la proliferación de las PBMC. El resto de clones, aunque también disminuyeron en cierto grado la proliferación, lo hicieron de una forma menos intensa y sin alcanzar valores estadísticamente significativos. Aunque el secretoma del clon 1.22 destaca por ser el que alcanzó concentraciones más altas de IL-4 e IL-5, esto por sí solo no explicaría en principio porqué es el único clon que provocó inhibición, dado que dichas citocinas antiinflamatorias, aunque en cantidades menores, también se detectaron en el resto de secretomas (Figura 29). Dicho de otra forma, deben ser otros factores los que determinen el grado final de inhibición, como sería el caso de la propia interacción celular, o el ambiente final resultante de la interacción entre citocinas pro y antiinflamatorias, entre otros. Estos resultados, además de corroborar los hallazgos de otros autores en relación con la importancia que el contacto celular tiene para conseguir una inmunomodulación máxima (Najar *et al.*, 2016), pondrían de nuevo de manifiesto que la heterogeneidad de las muestras utilizadas puede estar sesgando los resultados que en la literatura se reflejan, jugando un rol principal en la variabilidad de los resultados obtenidos en los diferentes estudios. Desde nuestro punto de vista, este sesgo podría reducirse con el uso de poblaciones homogéneas, como puede ser el caso de los clones utilizados en este estudio, tal y como venimos planteando desde el principio de esta discusión.

El conjunto de los resultados que hemos obtenido sobre la inhibición de la proliferación celular, y en la línea de lo anteriormente descrito para el fenotipo de membrana y la producción de citocinas, confirmaría de nuevo la existencia de diferencias entre clones a la hora de ejercer la inmunomodulación. Siendo conscientes de este hecho, al establecer protocolos de terapia celular sería importante disponer de una caracterización previa, lo más fina posible, del efecto que la población o poblaciones de MSC que se vayan a utilizar, puedan tener sobre las distintas poblaciones leucocitarias, en un intento de asegurar al máximo la homogeneidad necesaria para obtener los resultados clínicos perseguidos. En cuanto al efecto observado sobre la proliferación de linfocitos T CD8⁺, el hecho de que en este trabajo hayamos obtenido resultados contrarios a los referidos en la literatura, justificaría aún más, en nuestra opinión, la necesidad de dicha caracterización previa.

Las células TREG son una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ con una elevada actividad supresora. Cuando maduran en el timo, se denominan nTREG, y expresan constitutivamente el antígeno de membrana CD25 y el factor de transcripción FoxP3. También pueden madurar en la periferia gracias a factores solubles como el TGF- β o la IL-2. En este caso se denominan iTREG y la expresión de dichos marcadores es inducida. En el presente estudio analizamos el efecto de las ASC y de su secretoma, sobre la expresión del receptor para la IL-2 (CD25) y del factor de transcripción FoxP3.

En presencia de los distintos clones de ASC, ambas proteínas aumentaron paralelamente su expresión, de nuevo con diferencias entre clones. Todos los clones aumentaron la cantidad de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, en distintos grados, siendo el clon 1.22 el que mayor tasa de cambio provocaba en cocultivos con PBMC. Este hallazgo es coherente con los resultados mencionados previamente en este estudio, ya que tanto dicho clon como su secretoma, fueron los que mayor capacidad mostraron para inhibir la proliferación linfocitaria; al mismo tiempo, este clon se relacionó siempre con mayores niveles de IL-2. En relación con este último aspecto, es sobradamente conocida la necesidad que las TREG tienen de IL-2 para proliferar (Chinen *et al.* 2016). Dicha citocina no se detectó en el sobrenadante de los cocultivos de los clones 1.10, 1.7 y 3.5. Su ausencia permite explicar los niveles más bajos de iTREG obtenidos

al utilizar los clones 1.10 y 3.5, pero no en el caso del clon 1.7, en el que se detectaron niveles similares de formación de iTREG a los obtenidos con los clones 1.22. Este hecho podría estar determinado por la interacción a través de moléculas coestimuladoras como el CD28, o por otros factores solubles como el TGF- β , también importantes en la formación de iTREG, aunque no analizados en el presente trabajo.

Otro hecho destacable es que la tasa de cambio de FoxP3 inducida por los clones, reproduce exactamente el mismo patrón que el obtenido para el análisis de la citocina IL-10. Ésta es la principal citocina secretada por los linfocitos TREG, por lo que estos resultados parecen ir de nuevo en la línea de los estudios que reflejan que la inhibición promovida por las MSC, estaría principalmente mediada a través de un efecto indirecto sobre las células TREG.

El secretoma produjo el mismo efecto que las ASC, aunque de nuevo con una intensidad menor y sin obtener diferencias significativas. Este último punto sería consistente con los datos obtenidos sobre la inhibición de la proliferación linfocitaria, previamente mencionados, en relación con la importancia del contacto célula-célula, aunque también podría deberse al agotamiento de los factores solubles presentes en el secretoma. En este caso, el único clon que mostró un efecto estadísticamente significativo sobre la tasa de cambio de TREG, fue el clon 1.7. Este último resultado estaría de nuevo reflejando la variabilidad entre clones, ya observada con el resto de parámetros previamente analizados. De nuevo, estamos ante un resultado que podría justificar la previa caracterización de las poblaciones a usar en terapia celular, dependiendo de la patología a tratar, y de la duración del efecto perseguido.

Numerosos estudios han determinado la capacidad de las MSC y de su secretoma, de aumentar la viabilidad de poblaciones celulares *ex vivo*, rescatando a las células apoptóticas, tanto de poblaciones del sistema inmunitario (Tabera *et al.*, 2008) como de otros tipos celulares (Bonafede *et al.*, 2015). Sin embargo, también son capaces de inducir la apoptosis en células tumorales *ex vivo*. (Ahn *et al.*, 2015). Estas características, en principio favorables para la terapia celular, deberían ser analizadas previamente a un tratamiento, ya que la heterogeneidad demostrada en la literatura de las ASC puede hacer que se obtengan resultados clínicamente contrarios a los esperados. En este sentido, la población de ASC que se aplique

como terapia, además de estar ejerciendo el esperado efecto inmunomodulador, podría estar favoreciendo en un segundo plano la viabilidad o la apoptosis de otras poblaciones celulares implicadas en la patología a tratar.

En nuestro estudio se analizó el efecto potencial que los clones 1.10 y 3.5, podrían estar ejerciendo sobre la viabilidad de las PBMC. Los resultados obtenidos mostraron que el clon 1.10 era capaz de disminuir significativamente la mortalidad celular, mientras que el clon 3.5 provocó justo el efecto contrario. Dado que el estímulo UV es un conocido activador de la apoptosis, y que en ausencia del mismo se detectó una mortalidad celular entre 4 y 5 veces inferior, es lógico pensar que el efecto ejercido por nuestros clones sobre la viabilidad de las PBMC, estaría modificando en uno u otro sentido las rutas apoptóticas.

La mayor parte de los resultados descritos anteriormente en el presente estudio, habían puesto de manifiesto diferencias entre clones en cuanto a su intensidad de acción, si bien la inmunomodulación resultante solía presentar la misma tendencia para todos los clones. Sin embargo, estos últimos resultados obtenidos en el apartado de la viabilidad, muestran que la heterogeneidad de las MSC utilizadas habitualmente en los protocolos de terapia celular, podría estar siendo la causante no sólo de respuestas con intensidades diferentes, sino también de respuestas contrarias, tal y como ya hemos descrito previamente en este apartado en relación con alguna de las citocinas estudiadas.

En resumen, el conjunto de los resultados obtenidos en este estudio, pone de manifiesto la importancia de la caracterización previa de las MSC a la hora de diseñar protocolos de terapia celular. Creemos que dicha caracterización debiera abordarse desde multitud de frentes, considerando no sólo su capacidad de diferenciación hacia distintos tejidos, sino también su capacidad inmunomoduladora final, resultado de la combinación de los múltiples efectos ejercidos por dichas células sobre el sistema inmunitario. Dicha caracterización sería mucho más sencilla si en los protocolos de terapia celular se utilizara un clon o una combinación de clones, en lugar de las poblaciones heterogéneas habituales. Ello permitiría predecir con mayores garantías de éxito los efectos esperados, y facilitaría la reproducibilidad de los mismos, evitando en gran medida los problemas habituales derivados de la heteroge-

neidad celular aplicada a distintos individuos. El disponer de un banco de clones bien caracterizados y con efectos diferentes sobre distintas poblaciones y/o moléculas del sistema inmunitario, permitiría ampliar el abanico terapéutico y facilitaría su uso en una gran variedad de enfermedades que requieran distintos efectos sobre la inmunomodulación, aumentando así las posibilidades de éxito de la terapia celular. De hecho, desde nuestro punto de vista, muchas de las terapias que actualmente se están llevando a cabo, y que no están obteniendo los resultados esperados, podrían conllevar resultados distintos si su uso se abordara desde la perspectiva de los clones o de sus secretomas, en función de querer obtener un efecto más prolongado o más puntual, acorde a lo observado en nuestros resultados *ex vivo* y también en concordancia con lo descrito por otros autores (Sun *et al.*, 2012)

Como conclusión final, la heterogeneidad de las MSC, lejos de tener que ser vista como un hándicap para la terapia celular, podría ser utilizada en nuestro favor en pro de una terapia mucho más optimizada, mediante el uso de clones. De hecho, podríamos aprovechar las características particulares de cada clon para diseñar *ex vivo* la terapia personalizada más adecuada en cada caso, en función no sólo de la patología a tratar y de su grado de actividad, sino también del individuo que la va a recibir. De acuerdo con nuestros resultados, estas características podrían ser, entre otras, una mayor o menor capacidad para activar o inhibir una determinada población o poblaciones leucocitarias, para promover un determinado balance de citocinas anti o pro inflamatorias o un balance concreto Th17/TREG, o para modificar la viabilidad de las poblaciones celulares diana.

VI. CONCLUSIONES



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

6.1. CONCLUSIONES

1.- Según el grado de coexpresión de los diferentes antígenos de membrana analizados, observamos tres patrones diferentes. Por un lado estarían los clones 3.x, que presentaron un comportamiento más homogéneo que el resto de clones y mayor cantidad de antígenos. Por otro lado, los clones 1.10 y 1.22, que en conjunto presentaron la menor cantidad de antígenos. Finalmente el clon 1.7, que podríamos definir como un fenotipo intermedio entre los otros dos.

2.- Los clones 1.7 y 3.x, produjeron espontáneamente mayores cantidades de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 y los clones 1.7, 1.22 y 3.10 presentaron una cinética de producción más rápida. Tras la estimulación, los clones 3.x mostraron un perfil más proinflamatorio, mientras que los clones 1.10 y 1.22 presentaron un perfil más supresor. El clon 1.7 mostró de nuevo un comportamiento más parecido al de los clones 3.x, especialmente en lo relacionado a los niveles máximos de citocinas.

3.- En los cocultivos observamos dos patrones de comportamiento distintos. Generalmente, la presencia de los clones 1.7 y 3.10 se acompañó de niveles altos de citocinas en el medio, al contrario de lo que ocurrió con los clones 1.10, 1.22 y 3.5. El clon 1.7 fue el que se relacionó con niveles más altos de las principales citocinas proinflamatorias y el clon 1.10 el que presentó una mayor capacidad inmunosupresora.

4.- Los clones del estudio mostraron capacidades diferentes a la hora de inhibir la proliferación. En el cocultivo con PBMC totales, los clones 1.x fueron en conjunto más supresores que los clones 3.x, siendo el 3.10 el menos inhibidor y el 1.22 el más inhibidor. En el caso de los cocultivos con linfocitos T CD3⁺ y CD4⁺ purificados, los clones 1.7 y 3.10 fueron los que mostraron menor capacidad de inhibición, al contrario que los clones 1.10 y 3.5, que fueron doblemente supresores.

5.- En el caso de los linfocitos T CD8⁺ purificados y al contrario de lo anteriormente observado con las otras poblaciones leucocitarias analizadas, los cocultivos con ASC mostraron un aumento de la proliferación respecto de la condición sin ASC. Los clones 1.7 y 3.10 fueron los que produjeron mayores aumentos, y los clones 1.10, 1.22 y 3.5 los que menos. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que demuestra este hecho, sentando *a priori* las bases para investigaciones futuras más detalladas sobre esta población.

6.- Aunque las ASC parecen estar aumentando la proliferación de linfocitos T CD8⁺, ésta estaría afectando principalmente a una subpoblación de reconocido carácter supresor, como la CD8⁺CD11b⁻. Estos resultados sugieren que las ASC llevarían a cabo una parte de sus efectos inmunomoduladores, a través de un efecto indirecto sobre poblaciones reguladoras del sistema inmunitario, tal y como se describe en la Literatura para las Treg. En esta misma línea, nuestros clones también aumentaron la presencia de células Treg en los cocultivos con PBMC, de nuevo con intensidades diferentes, siendo el clon 1.22 el que mostró mayor incremento.

7.- Los secretomas de los distintos clones produjeron generalmente los mismos efectos que los observados en los cocultivos, tanto en la inhibición de la proliferación como en la variación del porcentaje de Treg, aunque siempre con una menor intensidad, lo que corrobora la importancia del contacto celular en la inmunomodulación llevada a cabo por estas células.

8.- Los clones de estudio mostraron en este caso efectos contrarios sobre la viabilidad de las pBMC. De hecho, el clon 3.5 aumentó la mortalidad de pBMC preincubadas con estímulos apoptóticos (UV), mientras que el clon 1.10 la disminuyó.

9.- *Como conclusión final, la heterogeneidad de las MSC, lejos de tener que ser vista como un hándicap para la terapia celular, podría ser utilizada en nuestro favor en pro de una terapia mucho más optimizada. De hecho, y acorde a nuestros resultados, podríamos aprovechar las características particulares de cada clon descritas en el presente trabajo (utilizando clones aislados o aquellas combinaciones de clones más adecuadas en cada caso concreto), para activar o inhibir una determinada población o poblaciones leucocitarias, promover un balance final de citocinas anti o pro inflamatorias o un balance concreto Th17/Treg, o modificar la viabilidad de una población celular. Ello permitiría diseñar ex vivo la terapia personalizada más adecuada en cada caso, en función no sólo de la patología a tratar y de su grado de actividad, sino también del individuo que la va a recibir, lo que supondría un gran avance en el campo de la terapia celular.*

BIBLIOGRAFÍA



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

- A ▷ AFANASYEV B V, ELSTNER EE, & ZANDER AR. "A. J. Friedenstein, Founder of the Mesenchymal Stem Cell Concept." *Cellular Therapy and Transplantation*. 2009;1(3):35–38.
- AGGARWAL S, & PITTENGER MF. "Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Allogeneic Immune Cell Responses." *Blood*. 2005;105(4):1815–1822.
- AHN J, COH Y, LEE H, SHIN I, KANG S, & YOUN H. "Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit Melanoma Growth In Vitro and In Vivo." *Anticancer research*. 2015;168(1):159–168.
- ARRIBAS I, JONES J, & MART S. "Adipose Cell-Derived Stem Cells : Neurogenic and Immunomodulatory Potentials." 2012;3:19–30.
- ARRIBAS MI, "Plasticidad diferencial de distintos clones de células madre mesenquimales aisladas de lipoaspirados humanos." Tesis Doctoral, UMH, 2014
- ARRICK MS. "Stem Cell Lymphoma of the Newborn." *Archives of pathology*. 1946;42:104–10.
- B ▷ BAPTISTA LS, DA SILVA KR, DA PEDROSA CSG, CLAUDIO-DA-SILVA C, CARNEIRO JRI, ANICETO M, DE MELLO-COELHO V, TAKIYA CM, ROSSI MID, & BOROJEVIC R. "Adipose Tissue of Control and Ex-Obese Patients Exhibit Differences in Blood Vessel Content and Resident Mesenchymal Stem Cell Population." *Obesity surgery*. 2009;19(9):1304–12.
- BECKER A J, MCCULLOCH E A, & TILL JE. "Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells." *Nature*. 1963;197(4866):452–454.
- BEN-DAVID U, & BENVENISTY N. "The Tumorigenicity of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells." *Nature reviews. Cancer*. 2011;11(4):268–77.
- BONAFEDE R, SCAMBI I, PERONI D, POTRICH V, BOSCHI F, BENATI D, BONETTI B, & MARIOTTI R. "Exosome Derived from Murine Adipose-Derived Stromal Cells: Neuroprotective Effect on in Vitromodel of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Experimental cell research*. 2015;340(1):150–158.
- BONGSO A & EH LEE. "Cancer Stem Cells: From Bench to Bedside." *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2007;13(SUPPL. 1):47–52. 6
- BONGSO A, & RICHARDS M. "History and Perspective of Stem Cell Research." *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2004;18(6):827–842.
- BOQUEST AC, NOER A, & COLLAS P. "Epigenetic Programming of Mesenchymal Stem Cells from Human Adipose Tissue." *Stem cell reviews*. 2006;2(4):319–29.
- BOXIO R, BOSSENMEYER-POURIÉ C, STEINCKWICH N, DOURNON C, & NÜSSE O. "Mouse Bone Marrow Contains Large Numbers of Functionally Competent Neutrophils." *Journal of leukocyte biology*. 2004;75(4):604–11.
- BRANDAU S, JAKOB M, BRUDEREK K, BOOTZ F, GIEBEL B, RADTKE S, MAUEL K, J??GER M, FLOH?? SB, & LANG S. "Mesenchymal Stem Cells Augment the Anti-Bacterial Activity of Neutrophil Granulocytes." *PLoS ONE*. 2014;9(9):.
- BUSSER H, NAJAR M, RAICEVIC G, PIETERS K, VELEZ POMBO R, PHILIPPART P, MEULEMAN N, BRON D, & LAGNEAUX L. "Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stromal Cells Subpopulations: Comparison of Bone Marrow and Adipose Tissue." *Stem cells and development*. 2015;24(18):2142–2157.
- C ▷ CAN A. "A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells." *Turkish Journal of Hematology*. 2008;25(2):57–59.
- CAPLAN AI. "All MSCs Are Pericytes?" *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):229–230.
- CAPLAN AI. "Mesenchymal Stem Cells." *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 1991;9(5):641–50.

- C** ▷ CASSATELLA MA, MOSNA F, MICHELETTI A, LISI V, TAMASSIA N, CONT C, CALZETTI F, PELLETIER M, PIZZOLO G, & KRAMPERA M. "Toll-like Receptor-3-Activated Human Mesenchymal Stromal Cells Significantly Prolong the Survival and Function of Neutrophils." *Stem Cells*. 2011;29(6):1001–1011.
- CAWTHORN WP, SCHELLER EL, & MACDOUGALD OA. "Adipose Tissue Stem Cells: The Great WAT Hope." *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2012;23(6):270–277.
- CHEN P, LIU K-J, HSU P-J, WEI C-F, BAI C-H, HO L-J, SYTWU H-K, & YEN BL. "Induction of Immunomodulatory Monocytes by Human Mesenchymal Stem Cell-Derived Hepatocyte Growth Factor through ERK1/2." *Journal of leukocyte biology*. 2014;96(2):295–303.
- COLMEGNA I, OHATA BR, & MENARD HA. "Current Understanding of Rheumatoid Arthritis Therapy." *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2012;91(4):607–20.
- CORCIONE A, BENVENUTO F, FERRETTI E, GIUNTI D, CAPPIELLO V, CAZZANTI F, RISSO M, GUALANDI F, MANCARDI GL, PISTOIA V, & UCCELLI A. "Human Mesenchymal Stem Cells Modulate B-Cell Functions." *Blood*. 2006;107(1):367–372.
- CRISAN M, YAP S, CASTEILLA L, CHEN CW, CORSELLI M, PARK TS, ANDRIOLO G, SUN B, ZHENG B, ZHANG L, NOROTTE C, TENG PN, TRAAS J, SCHUGAR R, DEASY BM, BADYLAK S, BUHRING HJ, ... P??AULT B. "A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs." *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301–313.
- CROITORU-LAMOURY J, LAMOURY FMJ, CARISTO M, SUZUKI K, WALKER D, TAKIKAWA O, TAYLOR R, & BREW BJ. "Interferon-?? Regulates the Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via Activation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO)." *PLoS ONE*. 2011;6(2):.
- D** ▷ DE BECKER A, & RIET I VAN. "Homing and Migration of Mesenchymal Stromal Cells: How to Improve the Efficacy of Cell Therapy?" *World journal of stem cells*. 2016;8(3):73–87.
- DEZAWA M, KANNO H, & HOSHINO M. "Specific Induction of Neuronal Cells from Bone Marrow Stromal Cells and Application for Autologous Transplantation." *Journal of Clinical ...* 2004;113(12):1701–1710.
- DOCHEVA D, HAASTERS F, & SCHIEKER M. "Mesenchymal Stem Cells and Their Cell Surface Receptors." *Current Rheumatology Reviews*. 2008;4(3):155–160.
- DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP D, & HORWITZ E. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytherapy*. 2006;8(4):315–7.
- DONNENBERG AD, MEYER EM, RUBIN JP, & DONNENBERG VS. "The Cell-Surface Proteome of Cultured Adipose Stromal Cells." *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2015;665–674.
- E** ▷ ERICES A, CONGET P, & MINGUELL JJ. "Mesenchymal Progenitor Cells in Human Umbilical Cord Blood." *British journal of haematology*. 2000;109(1):235–42.
- FIALKOW P. "Clonal Origin of Human Tumors." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1976;458(3):283–321.
- F** ▷ FIORENTINI S, LICENZIATI S, ALESSANDRI G, CASTELLI F, CALIGARIS S, BONAFEDE M, GRASSI M, GARRAFA E, BALSARI A, TURANO A, & CARUSO A. "CD11b Expression Identifies CD8+CD28+ T Lymphocytes with Phenotype and Function of Both Naive/memory and Effector Cells." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2001;166(2):900–7.
- FRANÇOIS M, ROMIEU-MOUREZ R, LI M, & GALIPEAU J. "Human MSC Suppression Correlates With Cytokine Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Bystander M2 Macrophage Differentiation." *Molecular Therapy*. 2012;20(1):187–195.
-

- F** ▷ FRAZIER TP, MCLACHLAN JB, GIMBLE JM, TUCKER H A., & ROWAN BG. "Human Adipose-Derived Stromal/ Stem Cells Induce Functional CD4 + CD25 + FoxP3 + CD127 – Regulatory T Cells Under Low Oxygen Culture Conditions." *Stem Cells and Development*. 2014;23(9):968–977.
- FRIEDENSTEIN A J, PIATETZKY-SHAPIRO II, & PETRAKOVA K V. "Osteogenesis in Transplants of Bone Marrow Cells." *Journal of embryology and experimental morphology*. 1966;16(3):381–390.
- FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHJAN RK, & LALYKINA KS. "The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells." *Cell Proliferation*. 1970;3(4):393–403.
- FRIEDENSTEIN AJ, PETRAKOVA K V, KUROLESOVA AI, & FROLOVA GP. "Heterotopic of Bone Marrow. Analysis of Precursor Cells for Osteogenic and Hematopoietic Tissues." *Transplantation*. 1968;6(2):230–247.
- FUKUCHI Y, NAKAJIMA H, SUGIYAMA D, HIROSE I, KITAMURA T, & TSUJI K. "Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential." *Stem Cells*. 2004;22(5):649–658.
- G** ▷ GABAY C. "Interleukin-6 and Chronic Inflammation." *Arthritis research & therapy*. 2006;8 Suppl 2(Suppl 2):S3.
- GAGE FH, & TEMPLE S. "Neural Stem Cells: Generating and Regenerating the Brain." *Neuron*. 2013;80(3):588–601.
- GAO F, CHIU SM, MOTAN DAL, ZHANG Z, CHEN L, JI H-L, TSE H-F, FU Q-L, & LIAN Q. "Mesenchymal Stem Cells and Immunomodulation: Current Status and Future Prospects." *Cell death & disease*. 2016;7(1):e2062.
- GAO J, DENNIS JE, MUZIC RF, LUNDBERG M, & CAPLAN AI. "The Dynamic in Vivo Distribution of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells after Infusion." *Cells, tissues, organs*. 2001;169(1):12–20.
- GBLER A, ZABEL O, & SELIGER B. "The Immunomodulatory Capacity of Mesenchymal Stem Cells." *Trends in Molecular Medicine*. 2012;18(2):128–134.
- GHANNAM S, PÈNE J, TORCY-MOQUET G, JORGENSEN C, & YSSEL H. "Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation and Function and Induce a T Regulatory Cell Phenotype." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2010;185(1):302–312.
- GRAF T, & ENVER T. "Forcing Cells to Change Lineages." *Nature*. 2009;462(7273):587–594.
- GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, ROBEY PG, & SHI S. "Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) in Vitro and in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(25):13625–30.
- GUILAK F, LOTT KE, AWAD HA, CAO Q, HICOK KC, FERMOR B, & GIMBLE JM. "Clonal Analysis of the Differentiation Potential of Human Adipose-Derived Adult Stem Cells." *Journal of cellular physiology*. 2006;206(1):229–37.
- H** ▷ HAECKEL E. "Anthropogenie." 1877.
- HAECKEL E. "Natürliche Schöpfungs-Geschichte." 1868.
- HANIFFA MA, WANG X, HOLTICK U, RAE M, ISAACS JD, DICKINSON AM, HILKENS CMU, & COLLIN MP. "Adult Human Fibroblasts Are Potent Immunoregulatory Cells and Functionally Equivalent to Mesenchymal Stem Cells." *The Journal of Immunology*. 2007;179(3):1595–1604.
- HARADA A. "Interleukin 8 as a Novel Target for Intervention Therapy in Acute Inflammatory Diseases." *Molecular Medicine Today*. 1996;2(11):482–489.
- HAUSMAN GJ, & CAMPION DR. "Histology of the Stroma in Developing Rat Subcutaneous Adipose Tissue." *Journal of animal science*. 1982;55(6):1336–42.
- HERMANN A, LIEBAU S, GASTL R, FICKERT S, HABISCH HJ, FIEDLER J, SCHWARZ J, BRENNER R, & STORCH A. "Comparative Analysis of Neuroectodermal Differentiation Capacity of Human Bone Marrow Stromal Cells Using Various Conversion Protocols." *Journal of Neuroscience Research*. 2006;83(8):1502–1514.

- H** ▷ HIDA N, NISHIYAMA N, MIYOSHI S, KIRA S, SEGAWA K, UYAMA T, MORI T, MIYADO K, IKEGAMI Y, CUI C, KIYONO T, KYO S, SHIMIZU T, OKANO T, SAKAMOTO M, OGAWA S, & UMEZAWA A. "Novel Cardiac Precursor-like Cells from Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Cells." *Stem cells* (Dayton, Ohio). 2008;26(7):1695–704.
- HOCKING AM, & GIBRAN NS. "Mesenchymal Stem Cells: Paracrine Signaling and Differentiation during Cutaneous Wound Repair." *Experimental cell research*. 2010;316(14):2213–9.
- HOOGDUIJN MJ, POPP F, VERBEEK R, MASOODI M, NICOLAOU A, BAAN C, & DAHLKE MH. "The Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells and Their Use for Immunotherapy." *International Immunopharmacology*. 2010;10(12):1496–1500.
- HSU SC, WANG LT, YAO CL, LAI HY, CHAN KY, LIU BS, CHONG P, LEE OKS, & CHEN HW. "Mesenchymal Stem Cells Promote Neutrophil Activation by Inducing IL-17 Production in CD4+ CD45RO+ T Cells." *Immunobiology*. 2013;218(1):90–95.
- IN 'T ANKER PS, SCHERJON SA, KLEIJBURG-VAN DER KEUR C, NOORT WA, CLAAS FH, WILLEMZE R, FIBBE WE, & KANHAI HH. "Amniotic Fluid as a Novel Source of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Transplantation." *Blood*. 2003;102(4):1548–1549.
- I** ▷ IVANOVA-TODOROVA E, BOCHEV I, DIMITROV R, BELEMEZOVA K, MOURDJEVA M, KYURKCHIEV S, KINOV P, ALTANKOVA I, & KYURKCHIEV D. "Conditioned Medium from Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induces CD4+FOXP3+ Cells and Increases IL-10 Secretion." *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012;2012:295167.
- JANICKI P, BOEUF S, STECK E, EGERMANN M, KASTEN P, & RICHTER W. "Prediction of in Vivo Bone Forming Potency of Bone Marrowderived Human Mesenchymal Stem Cells." *European Cells and Materials*. 2011;21(0):488–507.
- J** ▷ JIANG X, ZHANG Y, & LIU B. "Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Differentiation and Function of Monocyte-Derived Dendritic Cells." *Blood*. 2005;105(10):4120–4126.
- JONES DL, & WAGERS AJ. "No Place like Home: Anatomy and Function of the Stem Cell Niche." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(1):11–21.
- JONES RJ, & MATSUI W. "Cancer Stem Cells: From Bench to Bedside." *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2007;13(SUPPL. 1):47–52.
- KANG JW, KANG K-S, KOO HC, PARK JR, CHOI EW, & PARK YH. "Soluble Factors-Mediated Immunomodulatory Effects of Canine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells." *Stem cells and development*. 2008;17(4):681–693.
- K** ▷ KARP JM, & LENG TEO GS. "Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details." *Cell stem cell*. 2009;4(3):206–16.
- KHALDOYANIDI S. "Directing Stem Cell Homing." *Cell Stem Cell*. 2008;2(3):198–200.
- KNOBLICH JA. "Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division." *Cell*. 2008;132(4):583–597.
- KOLIOS G, & MOODLEY Y. "Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine." *Respiration*. 2013;85(1):3–10.
- KRAMPERA M, COSMI L, ANGELI R, PASINI A, LIOTTA F, ANDREINI A, SANTARLASCIO V, MAZZINGHI B, PIZZOLO G, VINANTE F, ROMAGNANI P, MAGGI E, ROMAGNANI S, & ANNUNZIATO F. "Role for Interferon-Gamma in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells." *Stem Cells*. 2006;24(2):386–398.
-

- K** ▷ KRAMPERA M, SARTORIS S, LIOTTA F, PASINI A, ANGELI R, COSMI L, ANDREINI A, MOSNA F, BONETTI B, REBELLATO E, TESTI MG, FROSALI F, PIZZOLO G, TRIDENTE G, MAGGI E, ROMAGNANI S, & ANNUNZIATO F. “Immune Regulation by Mesenchymal Stem Cells Derived from Adult Spleen and Thymus.” *Stem cells and development*. 2007;16(5):797–810.
- L** ▷ LAI T-S, WANG Z-H, & CAI S-X. “Mesenchymal Stem Cell Attenuates Neutrophil-Predominant Inflammation and Acute Lung Injury in an in Vivo Rat Model of Ventilator-Induced Lung Injury.” *Chinese medical journal*. 2015;128(3):361–7.
- LANDGRAF K, BRUNAUER R, LEPPERDINGER G, & GRUBECK-LOEBENSTEIN B. “The Suppressive Effect of Mesenchymal Stromal Cells on T Cell Proliferation Is Conserved in Old Age.” *Transplant Immunology*. 2011;25(2–3):167–172.
- LE BLANC K, & MOUGIAKAKOS D. “Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and the Innate Immune System.” *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(5):383–396.
- LIN H. “The Stem-Cell Niche Theory: Lessons from Flies.” *Nature reviews. Genetics*. 2002;3(12):931–40.
- LIU G, BLACK KL, & YU JS. “Stem Cells and Cancer.” *Nature*. 2009;414(c):275–286.
- LOERTSCHER R, & LAVERY P. “The Role of Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI)-Anchored Cell Surface Proteins in T-Cell Activation.” *Transplant Immunology*. 2002;9(2):93–96.
- LUZ-CRAWFORD P, KURTE M, BRAVO-ALEGRÍA J, CONTRERAS R, NOVA-LAMPERTI E, TEJEDOR G, NOËL D, JORGENSEN C, FIGUEROA F, DJOUAD F, & CARRIÓN F. “Mesenchymal Stem Cells Generate a CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cell Population during the Differentiation Process of Th1 and Th17 Cells.” *Stem cell research & therapy*. 2013;4(3):65.
- LUZ-CRAWFORD P, KURTE M, BRAVO-ALEGRÍA J, CONTRERAS R, NOVA-LAMPERTI E, TEJEDOR G, NOËL D, JORGENSEN C, FIGUEROA F, DJOUAD F, & CARRIÓN F. “Mesenchymal Stem Cells Generate a CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cell Population during the Differentiation Process of Th1 and Th17 Cells.” *Stem cell research & therapy*. 2013;4(3):65.
- M** ▷ MEISEL R, ZIBERT A, LARYEA M, GÖBEL U, DÄUBENER W, & DILLOO D. “Human Bone Marrow Stromal Cells Inhibit Allogeneic T-Cell Responses by Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Mediated Tryptophan Degradation.” *Blood*. 2004;103(12):4619–4621.
- MELIEF SM, GEUTSKENS SB, FIBBE WE, & ROELOFS H. “Multipotent Stromal Cells Skew Monocytes towards an Anti-Inflammatory Interleukin-10-Producing Phenotype by Production of Interleukin-6.” *Haematologica*. 2013;98(6):888–895.
- MELIEF SM, SCHRAMA E, BRUGMAN MH, TIEMESSEN MM, HOOGDUIJN MJ, FIBBE WE, & ROELOFS H. “Multipotent Stromal Cells Induce Human Regulatory T Cells through a Novel Pathway Involving Skewing of Monocytes toward Anti-Inflammatory Macrophages.” *Stem Cells*. 2013;31(9):1980–1991.
- MÉNDEZ-FERRER S, MICHURINA T V, FERRARO F, MAZLOOM AR, MACARTHUR BD, LIRA SA, SCADDEN DT, MAAYAN A, ENIKOLOPOV GN, & FRENETTE PS. “Mesenchymal and Haematopoietic Stem Cells Form a Unique Bone Marrow Niche.” *Nature*. 2010;466(7308):829–34.
- MIKKOLA HKA. “The Journey of Developing Hematopoietic Stem Cells.” *Development*. 2006;133(19):3733–3744.
- MOLL G, HULT A, BAHR L VON, ALM JJ, HELDRING N, HAMAD OA, STENBECK-FUNKE L, LARSSON S, TERAMURA Y, ROELOFS H, NILSSON B, FIBBE WE, OLSSON ML, LE BLANC K, SINGER N, CAPLAN A, ANKRUM J, ... RIEBEN R. “Do ABO Blood Group Antigens Hamper the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stromal Cells?” *PLoS ONE*. 2014;9(1):e85040.

- M** ▷ MOLL G, JITSCHIN R, BAHR LENA VON, RASMUSSEN-DUPREZ I, SUNDBERG B, LÖNNIES L, ELGUE G, NILSSON-EKDAHL K, MOUGIAKAKOS D, LAMBRIS JD, RINGDÉN O, BLANC K, & NILSSON B. "Mesenchymal Stromal Cells Engage Complement and Complement Receptor Bearing Innate Effector Cells to Modulate Immune Responses." *PLoS ONE*. 2011;6(7):.
- MOORE KA, LEMISCHKA IR, INTESTINAL T, & CELL S. "Stem Cells and Their Niches." *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133:S243–S246.
- MOSNA F, & SENSEBE L. "Human Bone Marrow and Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells : A User ' S Guide." 2010;19(10):1–53.
- MURAGLIA A, CANCEDDA R, & QUARTO R. "Clonal Mesenchymal Progenitors from Human Bone Marrow Differentiate in Vitro according to a Hierarchical Model." *Journal of cell science*. 2000;1161–6.
- N** ▷ NAJAR M, RAICEVIC G, FAYYAD-KAZAN H, BRON D, TOUNGOUZ M, & LAGNEAUX L. "Mesenchymal Stromal Cells and Immunomodulation: A Gathering of Regulatory Immune Cells." *Cytotherapy*. 2016;18(2):160–71.
- NAJIMI M, KHUU DN, LYSY PA, JAZOULI N, ABARCA J, SEMPOUX C, & SOKAL EM. "Adult-Derived Human Liver Mesenchymal-like Cells as a Potential Progenitor Reservoir of Hepatocytes?" *Cell Transplantation*. 2007;16(7):717–728.
- NG TK, FORTINO VR, PELAEZ D, & CHEUNG HS. "Progress of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Neural and Retinal Diseases." *World journal of stem cells*. 2014;6(2):111–9.
- NICOLA M DI, CARLO-STELLA C, MAGNI M, MILANESI M, LONGONI PD, MATTEUCCI P, GRISANTI S, & GIANNI AM. "Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T-Lymphocyte Proliferation Induced by Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli." *Blood*. 2002;99(10):3838–3843.
- NICOLA M DI, CARLO-STELLA C, MAGNI M, MILANESI M, LONGONI PD, MATTEUCCI P, GRISANTI S, & GIANNI AM. "Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T-Lymphocyte Proliferation Induced by Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli." *Blood*. 2002;99(10):3838–3843.
- NICOLA M DI, CARLO-STELLA C, MAGNI M, MILANESI M, LONGONI PD, MATTEUCCI P, GRISANTI S, & GIANNI AM. "Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T-Lymphocyte Proliferation Induced by Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli." *Blood*. 2002;99(10):3838–3843.
- NIH. "The Human Embryonic Stem Cell and." *Cell*. 1998;11–22.
- O** ▷ OKA Y, IBUKI T, MATSUMURA K, NAMBA M, YAMAZAKI Y, POOLE S, TANAKA Y, & KOBAYASHI S. "Interleukin-6 Is a Candidate Molecule That Transmits Inflammatory Information to the CNS." *Neuroscience*. 2007;145(2):530–538.
- OLIVA-OLIVERA W, LEIVA GEA A, LHAMYANI S, COÍN-ARAGÜEZ L, ALCAIDE TORRES J, BERNAL-LÓPEZ MR, GARCÍA-LUNA PP, MORALES CONDE S, FERNÁNDEZ-VELEDO S, EL BEKAY R, & TINAHONES FJ. "Differences in the Osteogenic Differentiation Capacity of Omental Adipose-Derived Stem Cells in Obese Patients With and Without Metabolic Syndrome." *Endocrinology*. 2015;156(12):4492–501.
- OÑATE B, VILAHUR G, CAMINO-LÓPEZ S, DÍEZ-CABALLERO A, BALLESTA-LÓPEZ C, YBARRA J, MOSCATIELLO F, HERRERO J, BADIMON L, ZUK P, ZHU M, ASHJIAN P, UGARTE D DE, HUANG J, MIZUNO H, ALFONSO Z, FRASER J, ... BADIMON L. "Stem Cells Isolated from Adipose Tissue of Obese Patients Show Changes in Their Transcriptomic Profile That Indicate Loss in Stemcellness and Increased Commitment to an Adipocyte-like Phenotype." *BMC Genomics*. 2013;14(1):625.
- OWEN M. "Marrow Stromal Stem Cells." *J. Cell Sci. Suppl*. 1988;10(12):63–76.
- P** ▷ PACHÓN-PEÑA G, SERENA C, EJARQUE M, PETRIZ J, DURAN X, OLIVA-OLIVERA W, SIMÓ R, TINAHONES FJ, FERNÁNDEZ-VELEDO S, & VENDRELL J. "Obesity Determines the Immunophenotypic Profile and Functional Characteristics of Human Mesenchymal Stem Cells From Adipose Tissue." *Stem cells translational medicine*. 2016;5(4):464–75.
-

- P** ▷ PAPPENHEIM A. "Atlas Der Menschlichen Blutzellen." 1905.
- PAREDES B, SANTANA A, ARRIBAS MI, VICENTE-SALAR N, DE AZA PN, ROCHE E, SUCH J, & REIG JA. "Phenotypic Differences during the Osteogenic Differentiation of Single Cell-Derived Clones Isolated from Human Lipospirates." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2011;5(8):589–599.
- PATKI S, KADAM S, CHANDRA V, & BHONDE R. "Human Breast Milk Is a Rich Source of Multipotent Mesenchymal Stem Cells." *Human cell*. 2010;23(2):35–40.
- PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, & MARSHAK DR. "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Science (New York, N.Y.)*. 1999;284(5411):143–7.
- R** ▷ RAFFAGHELLO L, BIANCHI G, BERTOLOTTO M, MONTECUCCO F, BUSCA A, DALLEGRI F, OTTONELLO L, & PISTOIA V. "Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche." *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2008;26(1):151–62.
- RAMALHO-SANTOS M, & WILLENBRING H. "On the Origin of the Term 'Stem Cell.'" *Cell Stem Cell*. 2007;1(1):35–38.
- REYA T, MORRISON SJ, CLARKE MF, & WEISSMAN IL. "Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells." *Nature*. 2001;414(6859):105–11.
- RIBEIRO A, LARANJEIRA P, MENDES S, VELADA I, LEITE C, ANDRADE P, SANTOS F, HENRIQUES A, GRÃOS M, CARDOSO CMP, MARTINHO A, PAIS M, DA SILVA CL, CABRAL J, TRINDADE H, & PAIVA A. "Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Matrix, Adipose Tissue and Bone Marrow Exhibit Different Capability to Suppress Peripheral Blood B, Natural Killer and T Cells." *Stem cell research & therapy*. 2013;4(5):125–141.
- RIES C, & EGEE V. "Human Mesenchymal Stem Cell Transdifferentiation to Neural Cells: Role of Tumor Necrosis Factor Alpha." *Stem Cells and Cancer Stem Cells*. 2012;8:71–78.
- ROMBOUTS WJC, & PLOEMACHER RE. "Primary Murine MSC Show Highly Efficient Homing to the Bone Marrow but Lose Homing Ability Following Culture." *Leukemia*. 2003;17(1):160–170.
- ROMPOLAS P, MESA KR, & GRECO V. "Spatial Organization within a Niche as a Determinant of Stem-Cell Fate." *Nature*. 2013;502(7472):513–8.
- RUSTAD KC, & GURTNER GC. "Mesenchymal Stem Cells Home to Sites of Injury and Inflammation." *Advances in wound care*. 2012;1(4):147–152.
- S** ▷ SABIN BYFR, DOAN C A, & FORKNER CE. "THE PRODUCTION OF OSTEOGENIC SARCOMATA AND THE EFFECTS ON LYMPH NODES AND BONE MAR- ROW OF INTRAVENOUS INJECTIONS OF RA- DIUM CHLORIDE AND MESOTHORIUM IN RABBITS (From the Laboratories of The Rockefeller Institute for Medical Research) Early in the Use ." *The Journal of experimental medicine*. 1932;56(28):267–89.
- SABIN FR, MILLER FR, SMITHBURN KC, THOMAS RM, & HUMMEL LE. "Changes in the Bone Marrow and Blood Cells of Developing Rabbits." *The Journal of experimental medicine*. 1936;64(1):97–120.
- SANZ-RODRIGUEZ F, GUERRERO-ESTEO M, BOTELLA L-M, BANVILLE D, VARY CPH, & BERNABÉU C. "Endoglin Regulates Cytoskeletal Organization through Binding to ZRP-1, a Member of the Lim Family of Proteins." *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(31):32858–68.
- SCHOFIELD R. "The Relationship between the Spleen Colony-Forming Cell and the Haemopoietic Stem Cell." *Blood cells*. 1978;4(1–2):7–25.
- SCHRAUFSTATTER IU, DISCIPIO RG, ZHAO M, & KHALDOYANIDI SK. "C3a and C5a Are Chemotactic Factors for Human Mesenchymal Stem Cells, Which Cause Prolonged ERK1/2 Phosphorylation." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2009;182:3827–3836.

- S** ▷ SEMPERE JM, MARTINEZ-PEINADO P, ARRIBAS MI, REIG JA, DE LA SEN ML, ZUBCOFF JJ, FRAGA MF, FERNÁNDEZ AF, SANTANA A, & ROCHE E. "Single Cell-Derived Clones from Human Adipose Stem Cells Present Different Immunomodulatory Properties." *Clinical and Experimental Immunology*. 2014;176(2):255–265.
- SHI M, LIU ZW, & WANG FS. "Immunomodulatory Properties and Therapeutic Application of Mesenchymal Stem Cells." *Clinical and Experimental Immunology*. 2011;164(1):1–8.
- SMITH A. "A Glossary for Stem-Cell Biology." *Nature*. 2006;441(7097):1060–1060.
- SOTIROPOULOU P A, PEREZ S A, GRITZAPIS AD, BAXEVANIS CN, & PAPAMICHAIL M. "Interactions between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells." *Stem cells*. 2006;24(1):74–85.
- SPAGGIARI GM, CAPOBIANCO A, ABDELRAZIK H, BECCHETTI F, MINGARI MC, & MORETTA L. "Mesenchymal Stem Cells Inhibit Natural Killer Cell Proliferation, Cytotoxicity, and Cytokine Production: Role of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase and Prostaglandin E2." *Blood*. 2008;111(3):1327–1333.
- SPAGGIARI GM, CAPOBIANCO A, BECCHETTI S, MINGARI MC, & MORETTA L. "Mesenchymal Stem Cell – Natural Killer Cell Interactions: Evidence That Activated NK Cells Are Capable of Killing MSCs, Whereas MSCs Can Inhibit IL-2 – Induced NK-Cell Proliferation." *Blood*. 2006;107(4):1484–1490.
- SPRADLING A, DRUMMOND-BARBOSA D, & KAI T. "Stem Cells Find Their Niche." *Nature*. 2001;414(November):98–104.
- STEINMAN R, & COHN Z. "Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution." *The Journal of Experimental Medicine*. 1973;137(5):1142–1162.
- SUN J, ZHOU H, DENG Y, ZHANG Y, GU P, GE S, & FAN X. "Conditioned Medium from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transiently Retards Osteoblast Differentiation by Downregulating Runx2." *Cells Tissues Organs*. 2012;196(6):510–522.
- T** ▷ TABERA S, PÉREZ-SIMÓN JA, DÍEZ-CAMPELO M, SÁNCHEZ-ABARCA LI, BLANCO B, LÓPEZ A, BENITO A, OCIO E, SÁNCHEZ-GUIJO FM, CAÑIZO C, & SAN MIGUEL JF. "The Effect of Mesenchymal Stem Cells on the Viability, Proliferation and Differentiation of B-Lymphocytes." *Haematologica*. 2008;93(9):1301–1309.
- TAKAHASHI K, & YAMANAKA S. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell*. 2006;126(4):663–676.
- TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K, & YAMANAKA S. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors." *Cell*. 2007;131(5):861–872.
- TENG L, & LABOSKY PA. "Neural Crest Stem Cells." *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2006;589:206–212.
- TEO GSL, ANKRUM JA, MARTINELLI R, BOETTO SE, SIMMS K, SCIUTO TE, DVORAK AM, KARP JM, & CARMAN C V. "Mesenchymal Stem Cells Transmigrate between and Directly through Tumor Necrosis Factor- α -Activated Endothelial Cells via Both Leukocyte-like and Novel Mechanisms." *Stem Cells*. 2012;30(11):2472–2486.
- THOMAS H, JÄGER M, MAUEL K, BRANDAU S, LASK S, & FLOHÉ SB. "Interaction with Mesenchymal Stem Cells Provokes Natural Killer Cells for Enhanced IL-12 / IL-18-Induced Interferon-Gamma Secretion." 2014;2014(Dc):
- TILL JE, & MCCULLOCH E A. "A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells." *Radiation research*. 1961;14(2):213–222.
- TREMAIN N, KORKKO J, IBBERTSON D, KOPEN GC, DIGIROLAMO C, & PHINNEY DG. "MicroSAGE Analysis of 2,353 Expressed Genes in a Single Cell-Derived Colony of Undifferentiated Human Mesenchymal Stem Cells Reveals mRNAs of Multiple Cell Lineages." *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2001;19(5):408–18.
- TU Z, LI Q, BU H, & LIN F. "Mesenchymal Stem Cells Inhibit Complement Activation by Secreting Factor H." *Stem Cells and Development*. 2010;19(11):1803–1809.
-

- W ▷ WANG D, AKIYAMA K, ZHANG H, YAMAZA T, LI X, FENG X, WANG H, HUA B, LIU B, XU H, CHEN W, SHI S, & SUN L. "Double Allogenic Mesenchymal Stem Cells Transplantations Could Not Enhance Therapeutic Effect Compared with Single Transplantation in Systemic Lupus Erythematosus." *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012:273291.
- WATERMAN RS, TOMCHUCK SL, HENKLE SL, & BETANCOURT AM. "A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype." *PLoS ONE*. 2010;5(4):e10088.
- W ▷ WEI ZHANG, WEI GE, CHANGHONG LI, SHENGGUO YOU, LIANMING LIAO, QIN HAN, WEIMIN DENG AND RCHZ. "Effects of Mesenchymal Stem Cells on Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells." 2013;271(November):263–271.
- WEISS ML, & TROYER DL. "Stem Cells in the Umbilical Cord." *Stem Cell Rev*. 2006;2(2):155–162.
- WHITESIDETL, MANDAPATHILM, & SCHULERP. "The Role of the Adenosinergic Pathway in Immunosuppression Mediated by Human Regulatory T Cells (Treg)." *Current medicinal chemistry*. 2011;18(34):5217–23.
- WOODBURY D, SCHWARZ EJ, PROCKOP DJ, & BLACK IB. "Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neurons." *Journal of Neuroscience Research*. 2000;61(4):364–370.
- X ▷ XU L, & LI G. "Circulating Mesenchymal Stem Cells and Their Clinical Implications." *Journal of Orthopaedic Translation*. 2014;2(1):1–7.
- Y ▷ YAN XL, FU CJ, CHEN L, QIN JH, ZENG Q, YUAN HF, NAN X, CHEN HX, ZHOU JN, LIN YL, ZHANG XM, YU CZ, YUE W, & PEI XT. "Mesenchymal Stem Cells from Primary Breast Cancer Tissue Promote Cancer Proliferation and Enhance Mammosphere Formation Partially via EGF/EGFR/Akt Pathway." *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012;132(1):153–164.
- Z ▷ ZARNETT R, & SALTER RB. "Periosteal Neochondrogenesis for Biologically Resurfacing Joints: Its Cellular Origin." *Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie*. 1989;32(3):171–4.
- ZHANG J, HUANG X, WANG H, LIU X, ZHANG T, WANG Y, & HU D. "The Challenges and Promises of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Use as a Cell-Based Therapy." *Stem cell research & therapy*. 2015;6:234.
- ZHAO Y, & ZHANG H. "Update on the Mechanisms of Homing of Adipose Tissue-derived Stem Cells." *Cytotherapy*. 2016;18(7):816–827.
- ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ, BENHAIM P, LORENZ HP, & HEDRICK MH. "Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies." *Tissue engineering*. 2001;7(2):211–228.

