

Propiedades inmunomoduladoras de células madre derivadas de membrana amniótica murina.

A. I. García-Guillén^{1,2}, A. Soriano-Filiu^{1,2}, P. A. Romecín^{1,2}, E. M. García-Navarro²,
J. García-Estañ^{1,2}, D. García-Bernal², N. M. Atucha^{1,2}.

1. Dept. Fisiología, Fac Medicina, UMU.

2. Trasplante Hematopoyético/Terapia Celular, IMIB-Arrixaca,

Introducción: Las células madre mesenquimales o estromales (MSCs) son consideradas una fuente de células madre adultas con un amplio potencial debido a la posibilidad de ser cultivadas *in vitro*, su capacidad de autorenovación y su propiedad de diferenciación multipotencial a diferentes líneas celulares de la capa mesodérmica (osteocitos, adipocitos y condrocitos). Estas características junto con sus **propiedades inmunomoduladoras**, hacen de las MSCs una fuente atractiva con múltiples aplicaciones en medicina regenerativa (Chamberlain, Fox, Ashton y Middleton, 2007; Gao *et al*, 2016).

Las MSCs presentan una baja expresión de los antígenos HLA I y una expresión negativa para los antígenos HLA II, responsables del rechazo de injertos y trasplantes, siendo también negativas para la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40L (Chamberlain *et al* 2007; Le Blanc, Tammik, Rosendahl, Zetterberg y Ringden, 2003; Tse, Pendleton, Beyer, Egalka, y Guinan, 2003;). Las MSCs son consideradas células con una baja inmunogenicidad y son capaces de producir una gran variedad de citoquinas, quimioquinas y proteasas que pueden jugar un importante papel en su función migratoria e inmunomoduladora (Kima *et al*, 2005).

Numerosos estudios han demostrado que las MSCs afectan a la función de varias poblaciones celulares del sistema inmune, y están siendo actualmente utilizadas para el tratamiento de enfermedades degenerativas, metabólicas e inflamatorias como la enfermedad de Parkinson, cirrosis, Enfermedad Injerto contra Huésped (EICH), fallo de injerto, artritis reumatoide y enfermedad de Crohn, entre otras (LeBlanc *et al*, 2004; Zappia *et al*, 2005).

En 2002, se demostró que MSCs humanas podían inhibir la proliferación de células T en un cultivo mixto de linfocitos estimulados alogénicamente (MLC) (Di Nicola *et al*, 2002). Además, Bartholomew *et al* demostraron que estas células infundidas *in vivo* pueden prolongar el injerto de piel en primates no humanos. También se ha demostrado que la proliferación de células NK tras estimulación con IL2 e IL15 es inhibida por MSCs (Krampera *et al*, 2006), alterando tanto el fenotipo como la secreción de citoquinas por parte de las NKs. Sin embargo, el mecanismo molecular por el que las MSCs inhiben la proliferación de las células T es poco conocido. Diferentes experimentos *in vivo* e *in vitro* sugieren que las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs son el resultado de un efecto combinado entre factores solubles secretados y el contacto célula-célula (Uccelli, Moretta y Pistoia, 2006). La interacción de las MSCs en cultivos mixtos con células dendríticas y células T, ha mostrado una disminución en la producción de TNF α y un incremento de la de IL10. Esto da lugar a una disminución en la secreción de IFN γ por parte de las células Th1, incremento de IL4 por las Th2, y un aumento de células T reguladoras (Aggarwal y Pittenger, 2005). Esta acción podría ser mediada por factores

solubles como la PGE₂, producida gracias al contacto celular con las MSCs (Aggarwal *et al*, 2005; Jiang *et al*, 2005). Además, diversos ensayos realizados por Yang *et al* en 2009, mostraron que esplenocitos estimulados con aloantígenos en presencia de sobrenadantes de cultivo de MSCs producen un aumento significativo de IL10, siendo esta citoquina, junto con la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) factores anti-inflamatorios implicados en la disminución de la proliferación de células T.

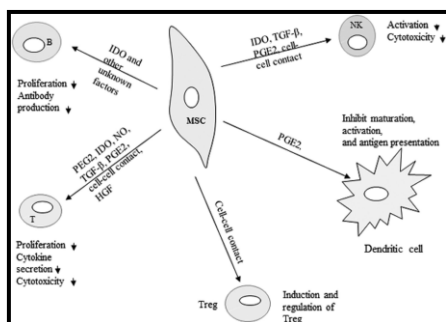


Fig. 1 Efectos de las MSCs sobre las células del sistema inmune, entre los cuales se incluyen la inhibición de la proliferación de células T y B, inducción de las células T reguladoras, inhibición de la función de lisis de las NKs y la inhibición de la activación y maduración de las células dendríticas. Estos efectos están mediados tanto por contactos célula-célula como por la producción de factores solubles (Gao *et al*, 2016).

LA MEMBRANA AMNIÓTICA COMO FUENTE DE CÉLULAS MSCs

Las fuentes de células MSCs más utilizadas hoy en día son la médula ósea, la gelatina de Wharton y el tejido adiposo (Ayatollahi, Talaei-Khozani y Razmkhah, 2015), pero hay estudios que demuestran que las células obtenidas de la membrana amniótica humana también son un claro ejemplo de células susceptibles para el tratamiento de diversas enfermedades.

En la membrana amniótica humana (hMA), un tejido extraembrionario que se desecha tras el parto, se ha demostrado la existencia de MSCs con propiedades inmunomoduladoras y baja inmunogenicidad y tumorigenicidad *in vivo*. (Insausti, Blanquer, Majado, Insausti y Moraleda, 2011; Kosuga *et al*, 2001)

La membrana amniótica humana ha sido previamente utilizada para el tratamiento de quemaduras, trasplantes de piel y de córnea, usándose como un apósito, gracias a su habilidad para inducir la cicatrización y sus propiedades anti-inflamatorias (Dua y Azuara-Blanco, 1999). Tan *et al* en 2015 demostraron que la administración de células epiteliales de MAh aumenta la diferenciación de células T reguladoras en un modelo murino de daño pulmonar, coincidiendo con la reducción del daño tisular. También se ha encontrado que las MSCs de la hMA son capaces de inhibir la proliferación de células T (Magatti *et al*, 2008), e incluso bloquear la diferenciación y maduración de monocitos hacia células dendríticas, reduciendo la expresión de los marcadores CD1a, HLA-DR, CD80 y CD83. (Magatti *et al*, 2009).

Teniendo en cuenta que el ratón es un modelo animal clave en investigación, junto con la necesidad de realizar ensayos preclínicos en animales para el futuro de la terapia celular en humanos, nuestro objetivo fue la puesta a punto del aislamiento y cultivo de las MSCs de la membrana amniótica murina (MAm), estudiando como objetivo específico, su capacidad inmunomoduladora.

Material y métodos: Las MAMs se aislaron de los fetos de ratones hembra C57Bl/6 gestantes. La obtención del cultivo celular se llevó a cabo mediante la digestión enzimática del tejido. Las MSCs se cultivaron hasta pase 4. Posteriormente, para el estudio de la capacidad inmunomoduladora de las MSCs de membrana amniótica (AMSCs) cultivadas *in vitro*, se empleó la técnica de cultivos mixtos de linfocitos (MLC) en un contexto alogénico, utilizando como células estimuladoras esplenocitos de ratón Balb/c irradiados y como respondedoras esplenocitos de ratón C57Bl/6 cultivados en presencia de diferentes ratios de AMSCs (1:100, 1:25, 1:10, 1:5, 1:1; siendo la relación AMSC: esplenocito de ratón C57Bl/6). El estudio de proliferación celular se llevó a cabo mediante la incorporación de BdrU y medición de la absorbancia a 450 nm.

Además se estudió, mediante la técnica de ELISA, las variaciones en la concentración de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IFN γ y la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en los sobrenadantes de los diferentes cultivos mixtos. Los datos fueron analizados mediante el test estadístico T de Student.

Resultados: Los resultados obtenidos de los ensayos de MLC mostraron que las AMSCs inducen una inhibición dosis-dependiente de la proliferación de los esplenocitos C57Bl/6 con una diferencia estadísticamente significativa desde un ratio 1:25, siendo aún más notable la inhibición de la proliferación en los ratios 1:10, 1:5 y 1:1. (Fig. 2)

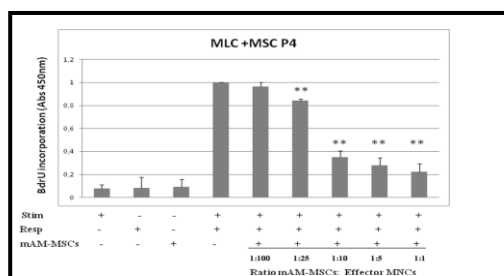


Fig.2 MLC: Disminución de la proliferación de esplenocitos C57Bl/6 respondedores en presencia de ratios crecientes de AMSCs. La inhibición de la proliferación disminuyó de forma significativa, ** $p < 0,01$. Datos representados: medias +/- desviación estándar obtenidos de dos experimentos diferentes.

Mediante la técnica de ELISA, pudimos detectar cambios en la concentración de las citoquinas estudiadas en los sobrenadantes de los cultivos. En el caso de la citoquina anti-inflamatoria IL10, se observó que la concentración aumentó de forma dosis-dependiente en el cultivo con la presencia de las AMSCs, encontrándose ya diferencias significativas al mayor ratio empleado (1:100) (Fig. 3).

En cuanto a las citoquinas pro-inflamatorias TNF α e IFN γ se observó una disminución dosis-dependiente de su concentración, siendo estadísticamente significativa con respecto al co-cultivo sin AMSCs desde un ratio 1:100 (Fig. 4 y Fig. 5).

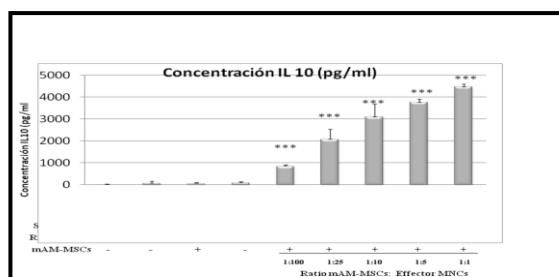


Fig.3 Detección mediante ELISA de la citoquina antiinflamatoria IL10 en sobrenadante del MLC: Aumento de la concentración dosis-dependiente, El aumento de la concentración fue estadísticamente significativo desde un ratio 1:100. *** $p < 0,001$ Datos representados: medias +/- desviación estándar.

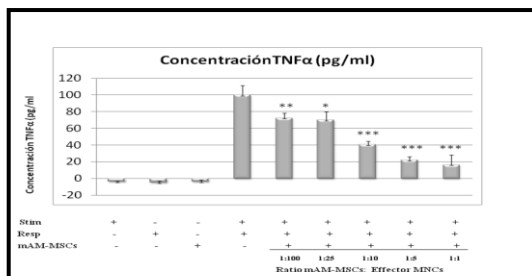


Fig.4 Detección mediante ELISA de la citoquina pro-inflamatoria TNFα en los sobrenadantes del MLC: Disminución de la concentración estadísticamente significativa a partir del ratio 1:100. *p<0,05. **p<0,01, ***p <0,001. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

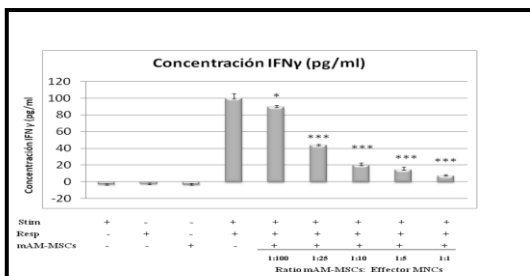


Fig.5 Detección mediante ELISA de la citoquina pro-inflamatoria IFNγ en sobrenadante del MLC: Disminución de la concentración estadísticamente significativa a partir del ratio 1:100. *p<0,05. ***p <0,001. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Conclusión: Las células mesenquimales

obtenidas a partir de MAM y que pueden ser expandidas *in vitro* presentan una importante **capacidad inmunomoduladora**, al igual que las MSCs provenientes de otras fuentes empleadas más habitualmente en la práctica clínica. Esta capacidad junto con sus otras características, hacen de la MA y de sus células una potencial fuente para realizar diferentes estudios preclínicos en ratón, lo que permitirá avanzar en el desarrollo de la terapia celular a partir de un tejido fácil de obtener y sin problemas éticos.

Referencias bibliográficas:

1. Aggarwal, S. and Pittenger, M. F., (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 105: 1815–1822
2. Ayatollahi, M., Talaei-Khozani and T., Razmkhah, M. (2016) Growth suppression effect of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and Wharton's jelly of umbilical cord on PBMCs. *Iran J Basic Med Sci*; 19:145-153.
3. Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S.,..., Ronald Hoffman (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol*. 30: 42–48. Amelia Deans, Annemarie Moseley,
4. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. and Middleton, J. (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*; 25: 2739-2749.
5. Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S. and Gianni, A.M., (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 99: 3838–3843.
6. Dua, H.S. and Azuara-Blanco, A (1999). Amniotic membrane transplantation. *British Journal of Ophthalmology*. 83. 748-752
7. Gao, F., Chiu, S.M., Motan, D., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H.,..., Lian, Q. (2016) Mesenchymal stem cells and immunomodulation : current status and future prospects. *Cell Death and Disease*;7:1–11

8. Insausti, C., Blanquer, M., Majado, M.J., Insausti, A., Moraleda, J.M., (2011) Utilidad terapéutica potencial de las células madre de membrana amniótica, *Rev Hematol Mex.* 12(4): 276-286.
9. Jiang, X. X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S. X., Wu, Y., Yu, X. D. and Mao, N. (2005) Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 105: 4120–4126.
10. Kima, D. H., Yoo, K. H., Choi, K. S., Choi, J., Choi, S. Y., Yang, S. E., ..., Koob, H. H. (2005). Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine.* 31: 119–126.
11. Kosuga, M., Sasaki, K., Tanabe, A., Li, X., Okawa, H., Ogino, I., ..., Okuyama, T. (2001) Engraftment of Genetically Engineered Amniotic Epithelial Cells Corrects Lysosomal Storage in Multiple Areas of the Brain in Mucopolysaccharidosis Type VII Mice, *Mol. Therapy.* 3(2): 139-148
12. Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., ... Annunziato, F. (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 24: 386–398
13. Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E. and Ringden, O., (2003) HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* 31: 890–896.
14. Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M. and Ringden, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 363: 1439–1441
15. Magatti, M., De Munari, S., Vertua, E., Nassauto, C., Albertini, A., Wengler, G.S. and Parolini, O. (2008) Human Amnion Mesenchyme Harbors Cells with Allogeneic T-Cell Suppression and Stimulation Capabilities. *Stem Cells*;26:182-192
16. Magatti, M., De Munari, S., Vertua, E., Nassauto, C., Albertini, A., Wengler, G.S. and Parolini, O., (2009). Amniotic Mesenchymal Tissue Cells Inhibit Dendritic Cell Differentiation of Peripheral Blood and Amnion Resident Monocytes. *Cell Transplantation.*;18:899–914.
17. Pereira, P.N.G., Dobreva, M.P., Graham, L., Huylebroeck, D., Lawson, K.A. and Zwijsen, A.N. (2011) Amnion formation in the mouse embryo: the single amniochorionic fold model. *BMC Dev Biol. BioMed Central Ltd*;11(1):48.
18. Tan, J.L., Chan, S.T., Lo, C.Y., Deane, J.A., MacDonald, C.A., Bernard, C.C.A., ..., Lim, R. (2015) Amnion cell-mediated immune modulation following bleomycin challenge: controlling the regulatory T cell response. *Stem Cell research and therapy.* 6:8
19. Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C. and Guinan, E.C. (2003) Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: Implications in transplantation. *Transplantation.* 75: 389–397.
20. Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V. (2006) Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *European Journal of Immunology*;36:2566–73.
21. Yang, S., Park, M., Yoon, I., Kim, S., Hong, S., Shin, J., ..., Park, C. (2009) Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med*;41(5):315–24.
22. Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., ..., Uccelli, A. (2005), Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T cell anergy. *Blood.* 106: 1755–1761.