



Gimeno, María Laura

Muse-AT : nueva población de células madre de tejido adiposo con potencial terapéutico para la diabetes autoinmune



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Gimeno, M. L. (2018). *Muse-AT: nueva población de células madre de tejido adiposo con potencial terapéutico para la diabetes autoinmune. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2021>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Muse-AT: nueva población de células madre de tejido adiposo con potencial terapéutico para la diabetes autoinmune

TESIS DOCTORAL

María Laura Gimeno

laligimeno@gmail.com

Resumen

La existencia de una población de células madre pluripotente disponible en cualquier etapa de la vida, abre las puertas a una futura y cercana aplicación en la medicina regenerativa. Optimizamos el método de obtención de células Muse-AT, resultando un procedimiento sencillo, poco invasivo y de muy bajo costo. Además demostramos que pueden obtenerse fácilmente y de forma abundante, a partir de tejido adiposo subcutáneo lipoaspirado, sometiénolas a situaciones de estrés severo mientras que otras metodologías se basan en la utilización de la separación celular específica (cell-sorting) o métodos de manipulación genética. También, confirmamos la pluripotencialidad de las células Muse-AT demostrando la capacidad de diferenciación hacia las tres capas germinales primitivas.

Por otro parte, se comprobó que las células Muse-AT no desarrollan teratomas in vivo y conservan un cariotipo normal estable en cultivo. Por estos motivos, poseen una gran ventaja comparativa con otras células pluripotentes (ESC y iPS) para un posible empleo terapéutico.

Demostramos que las células Muse-AT poseen una potente actividad inmunomoduladora como consecuencia de la reducción de la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ y TNF- α , y el aumento de la citoquina antiinflamatoria IL-10, sobre macrófagos estimulados con LPS y linfocitos T CD4+estimulados de manera antígeno específica. Descubrimos que las células Muse-AT expresan espontáneamente TGF- β 1, y confirmamos que la modulación se encuentra mediada principalmente por la acción de esta citoquina de manera dependiente de la vía de señalización TGF- β RII/pSMAD2, aunque no excluimos la acción de otras moléculas como por ejemplo, IL-37 cuya expresión en las células Muse-AT es importante.

Los resultados preliminares in vivo, obtenidos hasta el momento, mediante la administración de células Muse-AT en modelos de diabetes autoinmune, indicarían que

las células Muse-AT atenúan el desarrollo de la autoinmunidad y alientan la profundización en la investigación de estas en modelos de diabetes autoinmune.

Concluimos que las células Muse-AT poseen una alta capacidad inmunomoduladora mediada por la liberación de factores solubles, principalmente TGF- β 1, sobre las células del sistema inmune. Por lo tanto, las células Muse-AT podrían representar una novedosa herramienta reparadora e inmunomoduladora para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.



Muse-AT: nueva población de células madre de tejido adiposo con potencial terapéutico para la diabetes autoinmune

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad Nacional de Quilmes en el Área de Ciencias y
Tecnología

Lic. María Laura Gimeno

Director de Tesis: Dr. Marcelo Javier Perone

Consejero de Estudio: Carlos Facundo Temprana

Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires
(IBioBA), CONICET, Instituto Partner de la Sociedad Max
Planck

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2018

Gracias ...

- ... Marcelo por la confianza, el apoyo y la fuerza para no dejarme
bajar los brazos nunca ...*
- ... Gregorio por traer el interrogante de estas pequeñas células y la
positividad de cada logro/descubrimiento que fuimos transitando...*
- ...a los cirujanos plásticos que me proveyeron de las muestras de
liposucción...*
- ... a los Mushis por estar siempre listos para escuchar, discutir,
bebernos unas birras olvidar fracasos y empujar para seguir adelante...*
- ... a cada uno del labo que han sido parte de mi aprendizaje durante
estos últimos cinco años ...*
- ...a mis compañeras de grupo por las salvadas de metida de pata y por
el aguante cotidiano ...*
- ... a mi compañero de ruta en esta vida que siempre confió y me motivó
para seguir mis sueños...*
- ... y a mis padres y hermano, porque siempre confiaron en mí e hicieron
todo para que yo hoy sea quien SOY.*

INDICE

ABREVIATURAS	9
INTRODUCCION	11
Diabetes mellitus	12
<i>Clasificación de la diabetes mellitus</i>	13
<i>Complicaciones clínicas de la diabetes mellitus</i>	14
Diabetes mellitus tipo 1	15
<i>Patogénesis de la diabetes mellitus tipo 1</i>	16
<i>Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 1</i>	21
<i>Algunos modelos experimentales relevantes para el estudio de la diabetes mellitus tipo 1</i>	23
Células Madre	27
<i>Clasificación de células madre</i>	27
<i>Capacidades inmunoreguladoras de las células madre</i>	29
¿A qué se denomina Células Muse?	30
HIPOTESIS	35
OBJETIVOS	37
Objetivo general	38
<i>Objetivos específicos</i>	38
MATERIALES Y METODOS	39
RESULTADOS	63
CAPITULO I: Obtención y caracterización de células Muse-AT	64
Condiciones severas de estrés activan una nueva población de células derivadas de tejido adiposo humano	64
Las células Muse-AT expresan marcadores de pluripotencialidad	68
Las células Muse-AT poseen la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales primitivas.....	70
Las células Muse-AT no forman teratoma y muestran estabilidad de su cariotipo.....	71
Las células Muse-AT expresan espontáneamente altos niveles de TGF- β 1	73

Conclusión capítulo I	76
CAPITULO II: Capacidad de las células Muse-AT de modular la actividad de células inmunes	77
Primeras evidencias de los efectos inmunomoduladores de las células Muse-AT sobre macrófagos	77
Las células Muse-AT poseen capacidad de modular la respuesta antígeno específica de linfocitos T diabetogénicos.....	81
El efecto de las células Muse-AT en la secreción de citoquinas esta mediado principalmente por la vía de señalización intracelular TGF- β /pSMAD2 en esplenocitos NOD BDC2.5.....	85
Conclusión capítulo II	88
Capítulo III : Evaluación del potencial terapéutico de las células Muse-AT en modelos experimentales de diabetes autoinmune	89
Efecto de la administración de células Muse-AT en un modelo de diabetes autoinmune espontánea.....	89
Administración de células Muse-AT en un modelo de deficiencia de insulina inducido por estreptozotocina	91
Potencial actividad pro-angiogénica de células Muse-AT para el mejoramiento del trasplante de islotes pancreáticos murinos	94
Conclusión Capítulo III:	96
DISCUSION	97
CONCLUSION	109
BIBLIOGRAFIA	111

PUBLICACIONES RELACIONADAS A ESTA TESIS

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se publicaron los siguientes Artículos Científicos relacionados con las células Muse-AT:

- **Gimeno ML**, Fuertes F, Barcala Tabarozzi AE, Attorressi AI, Cucchiani R, Corrales L, Oliveira TC, Sogayar MC, Labriola L, Dewey RA, Perone MJ. Pluripotent Nontumorigenic Adipose Tissue-Derived Muse Cells have Immunomodulatory Capacity Mediated by Transforming Growth Factor- β 1. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Jan;6(1):161-173.
- Fisch SC, **Gimeno ML**, Phan JD, Simerman AA, Dumesic DA, Perone MJ, Chazenbalk GD. Pluripotent nontumorigenic multilineage differentiating stress enduring cells (Muse cells): a seven-year retrospective. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Oct 18;8(1):227.
- Simerman AA, Perone MJ, **Gimeno ML**, Dumesic DA, Chazenbalk GD. A mystery unraveled: nontumorigenic pluripotent stem cells in human adult tissues. *Expert Opin Biol Ther.* 2014 Jul;14(7):917-29.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

T1DM: Diabetes mellitus tipo 1
MSC: células madre mesenquimales
ASC: células madre derivadas de tejido adiposo
ESC: células madre embrionarias
iPS: células madre pluripotentes inducidas
STZ: estreptozotocina
scid: Inmunodeficiencia combinada severa
SFB: Suero fetal bovino
TNF: Factor de necrosis tumoral
SVA: Estreptavidina
PFA: Paraformaldehído
PBS: *Buffer* fosfato salino
p: p-valor
NOD: Obeso no diabético
LPS: Lipopolisacarido
l: litro/s
IFN: Interferon
IL: Interleuquina
i.p.: Intraperitoneal
g: gramo/s
V/V: Volumen/Volumen
P/V: Peso/Volumen
ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*
CD: clusters de diferenciación
CFSE: ester succinimidil diacetato de carboxifluoresceína
Muse: multilineage differentiating stress enduring
CM: medio condicionado
SPL: esplenocitos

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica caracterizada por elevados niveles de glucosa en sangre como resultado de defectos en la capacidad de un organismo de producir o responder a la insulina. En ausencia de tratamiento, esta enfermedad puede conducir a la muerte. Para la organización mundial de la salud, la diabetes es una de las cuatro enfermedades no comunicables (enfermedades no contagiosas o infecciosas) prioritarias, junto a las enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedad crónica respiratoria.

Según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (WHO), 1 de cada 11 personas en el mundo desarrollan Diabetes, con un total de 425 millones en el mundo. En Argentina, se ha estimado una prevalencia superior al 10 % en 2017, indicando que se encuentra dentro del grupo de países en donde la diabetes representa un problema de relevancia clínica y socio-económica (Figura 1).

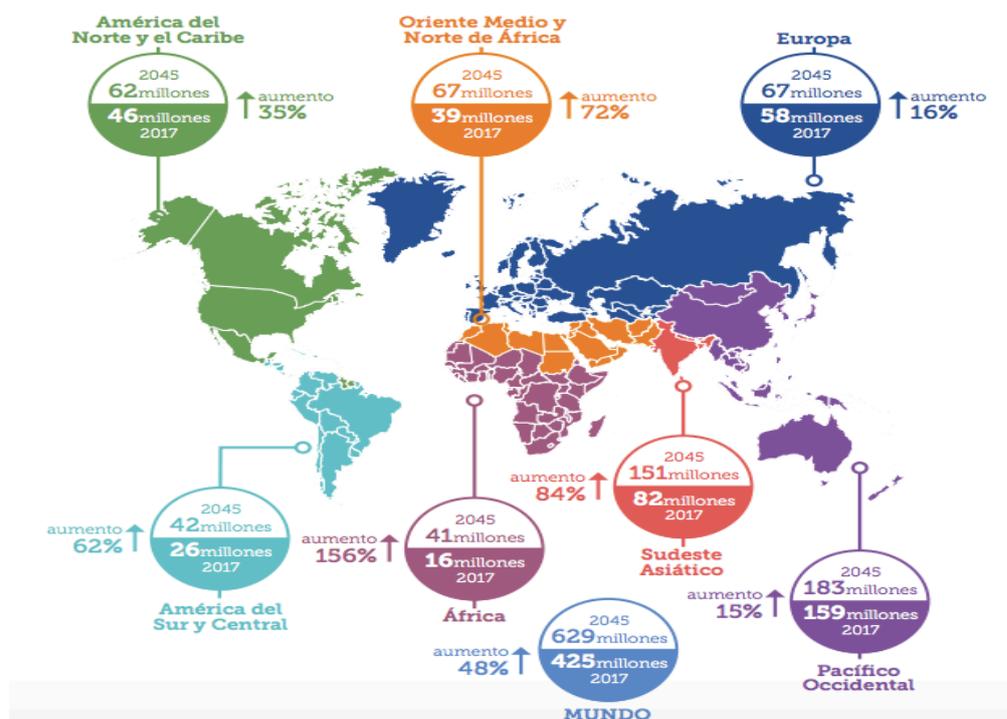


Figura 1: Número de personas con Diabetes en todo el mundo y por región en 2017 y 2045 (20-79 años). Fuente: International Diabetes Federation (<https://www.idf.org>).

Clasificación de la diabetes mellitus

La Asociación Americana de Diabetes (ADA), clasifica a la Diabetes en varias categorías en función de las características que presentan al momento del diagnóstico y a la etiología de la enfermedad [1]. La diabetes mellitus tipo 1 (T1DM, del inglés "*type 1 diabetes mellitus*"), la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM, del inglés "*type 2 diabetes mellitus*") y la diabetes mellitus gestacional (GMD, del inglés "*gestational diabetes mellitus*"). También, existen casos de diabetes poco comunes con etiologías variables, como defectos genéticos en las células β del páncreas o en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exócrino, endocrinopatías inducidas por drogas o químicos, infecciones, formas no convencionales de diabetes mediada por inmunidad y otros síndromes genéticos.

La T1DM, también conocida como diabetes insulino-dependiente, comprende el 5-10% de los casos totales de diabetes mellitus y se caracteriza por una pérdida sustancial, muchas veces total, de la insulina circulante en sangre, debido a la destrucción de las células β del páncreas. En la gran mayoría de los casos, la T1DM se debe a una destrucción de las células β mediada por una respuesta autoinmune, a este tipo de diabetes se lo denomina diabetes tipo 1A. Solo una minoría de pacientes con T1DM no tiene una etiología conocida y no muestra evidencias de autoinmunidad. En estos pacientes, la enfermedad se clasifica como diabetes tipo 1B.

La T2DM, diabetes no dependiente de la insulina o diabetes del adulto, es la forma más común de diabetes mellitus (90-95 % de los casos) y se caracteriza por la resistencia del organismo a la insulina y su incapacidad de producir niveles compensatorios en respuesta a la hiperglucemia [2]. Esta forma de diabetes es multifactorial, existiendo probablemente diversas causas, y su etiología no es completamente comprendida. La obesidad es una característica fuertemente asociada al desarrollo de T2DM y en muchos casos conduce a resistencia a la insulina.

La GDM tiene características similares a la T2DM, se desarrolla durante el período gestacional y afecta aproximadamente al 7% de los embarazos. Las

mujeres que desarrollan esta afección y sus hijos, fruto de embarazos con GDM, tienen mayores probabilidades de desarrollar T2DM en la adultez [3].

También se ha descrito otro tipo de diabetes, la diabetes latente autoinmune del adulto (LADA, del inglés "*latent autoimmune diabetes of adult*"). Los pacientes con LADA comparten algunas características con los que padecen T1DM, como la presencia de anticuerpos contra antígenos derivados de islotes pancreáticos, al tiempo que presentan un cuadro clínico similar a aquellos con T2DM, como la resistencia a la insulina al momento del diagnóstico y el desarrollo de la enfermedad en individuos mayores de 30 años. Mediante estudios genéticos, se ha encontrado una alta frecuencia de pacientes con LADA que poseen genotipos de riesgo asociados a T1DM y otros asociados a T2DM, sugiriendo que LADA podría resultar de una combinación entre los dos tipos principales de diabetes mellitus [4].

Complicaciones clínicas de la diabetes mellitus

Los pacientes con diabetes mellitus presentan complicaciones clínicas asociadas a la desregulación del metabolismo de la glucosa, que son muchas veces el causal de muerte. Dentro de estas, se encuentran complicaciones agudas como el shock hiperglucémico, cetoacidosis y shock hipoglucémico, que pueden resultar en un coma diabético si no son inmediatamente tratadas. Por otro lado, existen complicaciones clínicas crónicas, principalmente vinculadas a alteraciones micro y macrovasculares [5]. Las primeras comprenden la retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética, que pueden llevar a la ceguera, insuficiencia renal y pérdida de sensibilidad al dolor, respectivamente. La remodelación de la microvasculatura es uno de los eventos tempranos en el daño de órganos blanco vulnerables y es un proceso dinámico que aún puede ser revertido. La identificación de la enfermedad microvascular está asociada a un alto riesgo de enfermedad macrovascular [6]. Esta última puede resultar en cardiopatía isquémica, accidente vascular cerebral y arteriopatía periférica. Condiciones como la hipertensión y la dislipidemia coexisten en pacientes diabéticos, y son factores de riesgo importantes para la enfermedad cardiovascular. Si bien un control adecuado de

la glucemia contribuye a una mejora en cuanto a las complicaciones microvasculares, aún no se ha probado en ensayos clínicos que involucren un alto número de pacientes, que esto ocurra con las macrovasculares [7].

Diabetes mellitus tipo 1

En 1940, Von Meyenburg observó que la destrucción selectiva de las células β estaba asociada a una inflamación linfocitaria de los islotes pancreáticos, dando origen al concepto de insulitis y a la hipótesis de que la diabetes insulino-dependiente sería una enfermedad autoinmune [8]. La detección de anticuerpos contra antígenos de las células β en el suero de pacientes con diabetes insulino-dependiente avala también dicha hipótesis [9]. Hoy en día, un gran número de evidencias respalda la idea que la pérdida de la masa celular β pancreática en la T1DM se debe a un ataque autoinmune específico contra estas células, producto de una falla del sistema inmune en la capacidad de mantener la tolerancia hacia autoantígenos presentes en las células β .

Se estima que en la patogénesis de la enfermedad los factores genéticos y no genéticos están involucrados aproximadamente en la misma medida. Los principales factores ambientales asociados con un mayor riesgo de insulitis autoinmune incluyen infecciones por enterovirus [10, 11], algunos factores nutricionales (ej., exposición temprana y alto consumo a proteínas de leche de vaca, duración de la lactancia materna, deficiencia de vitamina D) [12], y factores perinatales y de la primera infancia (ej., edad mayor de la madre, nacimientos prematuros) [13]. Probablemente son los factores ambientales, es decir, los cambios en la exposición a ciertos factores no genéticos, los responsables de un aumento drástico en la incidencia de diabetes tipo 1 en las últimas décadas.

La T1DM se desarrolla principalmente durante la infancia y juventud. La edad de incidencia aumenta hasta los 10-14 años de edad y luego declina hasta estabilizarse alrededor de los 29 años por debajo de la incidencia observada en niños [14]. Diferentes estudios epidemiológicos indican que la

incidencia de T1DM se ha incrementado en las últimas décadas, con una mayor tasa de incremento a edades más tempranas (0-4 años de vida) [14]. En Europa, se pronostica que se duplicarán los casos de T1DM en niños menores a 5 años entre los años 2005 y 2020, y que la prevalencia de la enfermedad en chicos menores a 15 años se incrementará un 70 % en el mismo período [15]. Como se comentó anteriormente para la diabetes mellitus, existe una gran variabilidad geográfica en cuanto a la prevalencia e incidencia de T1DM (Figura 2). Además, algunos estudios han revelado diferencias en la prevalencia e incidencia de T1DM entre distintas etnias [14].

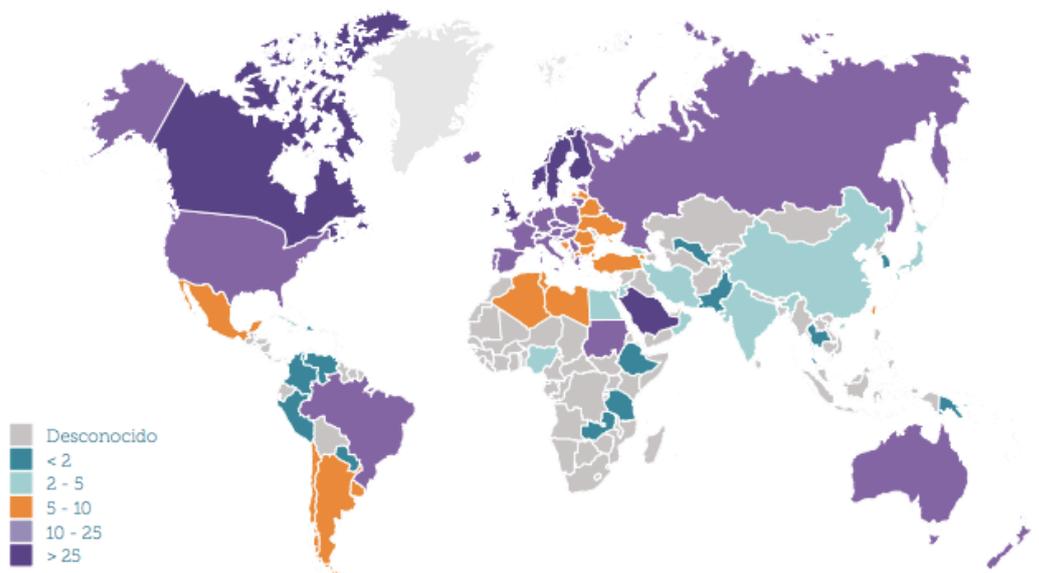


Figura 2. Distribución geográfica de la incidencia de T1DM en el mundo. Estimación de nuevos casos de diabetes tipo 1 (< 15 años) por 100.000 niños por año, datos de 2015. Fuente: International Diabetes Federation (<https://www.idf.org>).

Patogénesis de la diabetes mellitus tipo 1

Al momento del diagnóstico, los pacientes con T1DM presentan aproximadamente un 80 % o más de los islotes pancreáticos con infiltración leucocitaria y sin reservas de insulina. El infiltrado se compone principalmente de linfocitos T CD8⁺, macrófagos, linfocitos T CD4⁺ y linfocitos B, en proporciones variables en función del porcentaje de células β funcionales dentro del islote. Al inicio de la infiltración, los linfocitos T CD8⁺ son los mayoritarios, junto a los macrófagos. Su número se incrementa a medida que

se van destruyendo las células β y disminuye rápidamente cuando el islote ya no contiene más células productoras de insulina. Los linfocitos T $CD4^+$ y B siguen un patrón similar, aunque en menor número en comparación con los linfocitos T $CD8^+$. El número de macrófagos permanece relativamente constante independientemente del porcentaje de células β funcionales remanentes [16].

Si bien se desconoce la causa que desencadena la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, existe un gran número de evidencias indicando alteraciones tanto en la rama innata como adaptativa de la respuesta inmune en pacientes con T1DM. Asimismo, estudios en modelos experimentales han contribuido sustancialmente acerca de la participación de cada tipo celular del sistema inmune en la patogénesis de la enfermedad [17]. Actualmente, se piensa que tanto el desarrollo como la progresión de la enfermedad es el resultado de la acción conjunta entre componentes del sistema inmune innato y adaptativo en la destrucción específica de las células β .

La participación de los linfocitos T en la patogénesis de la T1DM resulta indiscutible. Estos se encuentran infiltrando los islotes pancreáticos en los ratones NOD, modelo de la enfermedad, como en los pacientes con T1DM [18]. Se han detectado linfocitos T autorreactivos circulantes en pacientes pre-diabéticos y con T1DM recientemente diagnosticada [19]. Una evidencia de que en la enfermedad está involucrado el sistema inmune es que ha sido transferida adoptivamente mediante trasplantes de médula ósea entre hermanos. Experimentalmente la transferencia de linfocitos T diabetogénicos activados provenientes de ratones NOD diabéticos a ratones de la misma cepa jóvenes, dispara la enfermedad abruptamente [20, 21]. Asimismo, tratamientos inmunosupresores con blanco en la depleción de los linfocitos T han resultado exitosos en la prevención y cura de la diabetes en ratones NOD. Algunas de éstas intervenciones, como el empleo de la ciclosporina y el anticuerpo anti-CD3, han sido ensayadas también en pacientes recientemente diagnosticados con distintos grados de éxito [22-25].

Los linfocitos T $CD8^+$ contribuyen fuertemente a la destrucción de las células β , probablemente a través de la liberación de granzimas, perforinas e IFN- γ .

Como se mencionó, los linfocitos T CD8⁺ son la población mayoritaria en los infiltrados de los islotes pancreáticos de pacientes con T1DM [16] y se ha mostrado que estos tienen acción citotóxica directa sobre las células β [26]. Además, en pacientes con T1DM recientemente diagnosticada, se han detectado linfocitos T CD8⁺ autorreactivos tanto en circulación [23] como en los islotes infiltrados [28].

Por su parte, los linfocitos T CD4⁺ también resultan imprescindibles en el desarrollo y la progresión de la enfermedad. Los linfocitos T CD4⁺ pueden adquirir diferentes perfiles de respuesta caracterizados por el tipo de citoquina que liberan y el factor de transcripción que gobierna su diferenciación. Los linfocitos Th1 se caracterizan por la producción de IFN- γ y la expresión del factor de transcripción T-bet. Estos son importantes para la activación de macrófagos y la eliminación de patógenos intracelulares. Los linfocitos Th2 se caracterizan por la producción de IL-4, IL-5, IL-13 y la expresión del factor de transcripción GATA-3. Las evidencias en modelos experimentales y en humanos indican que la diabetes autoinmune estaría dominada por una respuesta principalmente de tipo Th1 [29]. El perfil Th2 podría resultar protector en la patología, sin embargo no existen evidencias concluyentes acerca de si éste perfil es una causa o una consecuencia de los tratamientos que inducen la prevención de la diabetes experimental [30]. Los linfocitos T regulatorios (Treg), caracterizados por la producción de TGF- β , IL-10 y la expresión del factor de transcripción FoxP3, median la supresión de la activación de otros linfocitos, de macrófagos, la inducción de células dendríticas tolerogénicas y son importantes para la mantención de la tolerancia periférica y la regulación negativa de la respuesta inmune. Respecto a la participación de los linfocitos Treg, en la diabetes autoinmune, las evidencias son contradictorias y no resultan concluyentes. Se postula que el desarrollo de T1DM estaría asociado a una disminución en la frecuencia de linfocitos Treg o una alteración en su función reguladora. En modelos experimentales, se ha demostrado que la falta de Treg induce autoinmunidad generalizada [31]. Sin embargo, los reportes en humanos indican frecuencias normales [32, 33] o reducidas [34, 35] de Treg en pacientes con T1DM en comparación con personas sanas.

Los linfocitos Th17, caracterizados por la producción de IL-17 y la expresión del factor de transcripción ROR γ t, median el reclutamiento y activación de neutrófilos y son importantes para la eliminación de hongos y bacterias extracelulares. Las evidencias sobre la participación de los linfocitos Th17 en modelos experimentales son controversiales indicando que no serían imprescindibles para el desarrollo de la patología pero podrían contribuir a la progresión de la misma. También, existen reportes indicando que los Th17 no cumplen ninguna función en la diabetes autoinmune experimental [17, 36]. En pacientes recientemente diagnosticados con T1DM se han detectado linfocitos Th17 autorreactivos contra antígenos β [37] y una expansión de la población Th17 en los ganglios linfáticos del páncreas [38].

La relevancia de los linfocitos B en la T1DM se ilustra por la baja frecuencia de diabetes autoinmune observada en ratones NOD carentes de linfocitos B [39]. A su vez, la depleción de linfocitos B en ratones NOD reduce la incidencia de la enfermedad [40]. Resulta destacable que la depleción de linfocitos B en humanos mediante la infusión de anti-CD20 en pacientes recientemente diagnosticados preservó la función de las células β por 1 año [41, 42]. Después del año, la reducción en los niveles de péptido C coincidió con el recobro en el número de linfocitos B circulantes. Sin embargo, existe el reporte de un caso de un paciente con agamaglobulinemia que desarrolló T1DM, lo cual sugiere que los linfocitos B no serían fundamentales para el desarrollo de la enfermedad [43]. Se piensa que los linfocitos B contribuirían al desarrollo y progresión de la enfermedad, probablemente actuando como células presentadoras de antígeno y expandiendo el número de antígenos contra los que se activarían los linfocitos T (mecanismo conocido como “*determinant spreading*”). La presencia de anticuerpos contra antígenos pancreáticos en pacientes diabéticos y pre-diabéticos sugiere también una participación importante de los linfocitos B, sin embargo se desconoce la acción de estos anticuerpos en la patogénesis de la T1DM.

Las células de la rama innata del sistema inmune como los macrófagos, células dendríticas y NK (del inglés *natural killer*) podrían tener acciones patogénicas o protectoras en la T1DM. El número de células NK que infiltran a los islotes pancreáticos se incrementa con el avance de la enfermedad en

modelos experimentales [44]. Ligandos presentes en las células β promueven la activación de estas células y la muerte de las primeras por citotoxicidad directa [45]. Por lo que se propone que las células NK podrían contribuir a la destrucción de las células β . Sin embargo, solo en algunas muestras de páncreas de pacientes cadavéricos con T1DM se ha detectado un muy bajo número de células NK infiltrando los islotes pancreáticos, por lo que éstas células no son consideradas un componente principal de dicha infiltración [16]. Por otro lado las células NK contribuyen con las células dendríticas en la modulación de la respuesta inmune adaptativa y se piensa que alteraciones en su función podrían contribuir al desarrollo de la autoinmunidad. Sin embargo, aún se desconoce las implicancias de éste tipo celular en la patogénesis de la enfermedad.

Los macrófagos son el segundo tipo celular más numeroso que se encuentra en los infiltrados de los islotes pancreáticos de pacientes con T1DM [16]. Estos son capaces de ejercer toxicidad directa contra las células β en ausencia de linfocitos T y B, e inducir diabetes en modelos experimentales [46]. La depleción de monocitos previa a la transfusión de linfocitos T diabetogénicos previene el desarrollo de la diabetes autoinmune en animales, indicando que los monocitos no solo contribuirían a la destrucción de las células β , sino que resultarían fundamentales para la patogénesis de la enfermedad [47]. Los monocitos de los pacientes con T1DM, producen mayor cantidad de citoquinas inflamatorias como IL-6, TNF- α e IL-1 β en respuesta a estímulos como el LPS [48, 49]. Además, se ha encontrado que los macrófagos y las células dendríticas que infiltran los islotes pancreáticos de pacientes con T1DM son las fuentes principales de TNF- α e IL-1 β [50].

Las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígenos en la inducción de respuestas inmunes adaptativas contra antígenos extraños y en la mantención de la tolerancia frente a autoantígenos. Se cree que la desregulación del balance inmunogénico/tolerogénico de estas células presentadoras podría tener un papel importante en el desarrollo de la T1DM. La depleción de células dendríticas en un modelo murino promueve la autoinmunidad espontánea, poniendo de manifiesto su función en el mantenimiento de la tolerancia inmunogénica [51].

Si bien aún se desconoce cual o cuales son los disparadores de la autoinmunidad en la T1DM, parecería ser el resultado de la acción concertada de las distintas poblaciones leucocitarias. La alteración en cualquiera de ellas podría inclinar el balance entre la homeostasis y la patogénesis. Una vez desencadenada la respuesta autoinmune, los mecanismos de eliminación específica de las células β implican al menos la acción de los linfocitos T CD8⁺ y las citoquinas producidas por los macrófagos y linfocitos T CD4⁺.

Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 1

Desde su descubrimiento en 1922, la insulina revolucionó el tratamiento de la T1DM, convirtiéndose en el único paliativo que permite la supervivencia de los pacientes. Hoy en día, la terapia de reemplazo hormonal continúa siendo el único tratamiento posible para la T1DM. En los últimos años ha habido un gran avance en los tipos de insulina disponibles en el mercado, en términos de su tiempo de acción, origen y costos, y en los métodos de aplicación. Actualmente, existen análogos de insulina, generados por sustituciones de aminoácidos o modificaciones de los mismos, que se distinguen por el tiempo que tardan en comenzar su efecto biológico, el tiempo en el que tienen su máximo efecto y su duración total. La administración de los distintos tipos de insulina en diferentes momentos del día ayuda a mejorar el control de la glucemia. Por otro lado, existen bombas de insulina que permiten dispensar la hormona las 24 horas del día por medio de un catéter. El uso de las bombas resulta en una mejora sustancial de los niveles de HbA1c y reduce los episodios de hiper e hipoglucemia. Además, evita las lesiones por inyecciones repetidas en la misma zona, facilita la realización de ejercicio físico sin necesidad de ingerir grandes cantidades de carbohidratos y permite mayor flexibilidad con respecto al tipo y al horario de comida. Sin embargo, la dosificación no está aún automatizada y debe ser regulada por el paciente en base a un estricto control de glucemia. Incluso en los regímenes de tratamiento intensivo, no es posible emular la regulación fina realizada por las células β del páncreas.

Resulta obvio que el tratamiento con insulina, aunque permita la sobrevida de los pacientes con T1DM no es una cura de la enfermedad. La expectativa de vida de los pacientes con T1DM se ha incrementado en las últimas décadas con las mejoras en los esquemas de seguimiento y tratamiento de la enfermedad [52]. Sin embargo, esta continúa siendo significativamente menor a la de las personas sanas, probablemente debido al abandono o falta de adherencia a los tratamientos recomendados, ya que existe una correlación positiva entre el grado de adherencia al tratamiento y la expectativa de vida de los pacientes con T1DM [53]. Las complicaciones clínicas asociadas a la T1DM, así como el la necesidad de un control estricto de su glucemia, mantener una dieta saludable y realizar ejercicio frecuente, impactan en la calidad de vida de los pacientes. Por estos motivos, un gran número de laboratorios se encuentran estudiando diversas estrategias terapéuticas tendientes a repoblar la masa celular β y/o suprimir la respuesta autoinmune o re-educar la respuesta inmune en los pacientes con T1DM. Recordando que el 80 % o más de las células β del páncreas han sido destruidas al momento del diagnóstico de la diabetes, resulta fundamental el desarrollo de métodos de diagnóstico fiables y de bajo costo para la detección temprana del proceso de destrucción autoinmune, que permita el tratamiento preventivo de la enfermedad.

El trasplante de islotes de Langerhans desde donantes cadavéricos es un tratamiento promisorio para la T1DM, ya que ofrecería la posibilidad de restaurar la euglucemia de manera confiable de una forma que la administración exógena de insulina hasta ahora no ha podido lograr y además posee mucho menos riesgos que el trasplante de páncreas completo. Los pacientes que son considerados para este tipo de tratamiento son aquellos adultos que muestran una completa deficiencia de péptido-C, episodios recurrentes de hipoglucemia y una reducida habilidad de detectar estos episodios. El protocolo de Edmonton [54] es un procedimiento exitoso de trasplante de islotes que se obtienen a partir de donantes múltiples (2-4 donantes). El éxito se debió, en parte, a la gran cantidad de trasplantados, a la repetición del proceso de trasplante de islotes en un mismo paciente y a la implementación de un cocktail de inmunosupresores no esteroideos. Un

ensayo clínico multicéntrico de fase III finalizado en 2015 del Consorcio NIH (Clinical Islet Transplantation Consortium) confirmó que el trasplante de islotes es un tratamiento seguro y eficaz para pacientes con T1DM con desconocimiento de la hipoglucemia o eventos hipoglucémicos graves [55]

Los obstáculos restantes se relacionan con la disponibilidad de procedimientos, el costo y, lo más importante, una cantidad suficiente de donantes.

El trasplante de islotes desde un solo donante podría resolver este problema además de reducir la posibilidad de fracaso por reducir la exposición a distintos HLA no compatibles. Se han realizado trasplantes de islotes con un único donante con dificultades en algunos centros como el de la Universidad de Alberta y con éxito en otros centros: Universidad de Minnesota [56] y Universidad de San Francisco [57]. Los días iniciales posteriores a la infusión de los islotes son los más críticos, debido a que la mayor proporción (~60%) de muerte de islotes se produce en esta etapa. Para evitar esta pérdida, se están investigando distintas estrategias de mejoramiento de obtención de islotes; por ejemplo, se cultivan los islotes durante 24-72 horas, lo que resulta al final del proceso en una cosecha de islotes más sanos, reduciendo el número de células muertas/apoptóticas y sus subproductos derivados y en paralelo, se comienza con la terapia de inmunosupresión en el paciente, antes de ser trasplantado [58]. Además, la capacidad de mantener islotes en cultivo durante tiempos relativamente cortos, permite el traslado de islotes desde centros especializados para su obtención hacia otros donde se realizaría el trasplante [59]. La optimización y el desarrollo de mejores técnicas de trasplante desde un único donante permitirán que un mayor número de pacientes, en particular aquellos que no responden a la terapia de reemplazo con insulina, reciban este tratamiento [60].

Algunos modelos experimentales relevantes para el estudio de la diabetes mellitus tipo 1

Los modelos experimentales para el estudio de la diabetes mellitus tipo 1 pueden clasificarse en aquellos de desarrollo espontáneo e inducido. Entre los primeros, se encuentran las cepas endocriadas de ratones NOD y ratas BB

(“*Bio Breeding*”) [61]. Estos animales desarrollan insulinitis y pérdida de células β mediada por el ataque autoinmune, de manera muy similar a lo que ocurre en la T1DM en humanos. Dadas las similitudes en la susceptibilidad genética y el progreso de la enfermedad de la diabetes autoinmune, los ratones NOD y las ratas BB son considerados como los mejores modelos experimentales para el estudio del desarrollo de la T1DM [61]. Por otro lado, la diabetes puede provocarse mediante la destrucción específica de las células β inducida por drogas. Estos se conocen como modelos de inducción química de diabetes, siendo la estreptozotocina (STZ) la droga más utilizada. El modelo de inducción de diabetes por STZ está muy difundido para el estudio de trasplantes de islotes [62]. La principal limitante de este tipo de modelos es la ausencia del componente autoinmune en el desarrollo de la enfermedad. Otro de los modelos que fueron utilizados, principalmente en los comienzos de la investigación científica sobre diabetes, es el de animales pancreatectomizados. Al igual que en los modelos de inducción química, la diabetes se alcanza en ausencia del componente autoinmune [62].

Cada uno de los modelos experimentales de diabetes mellitus ha permitido investigar distintos aspectos de la enfermedad y desafiar las estrategias terapéuticas en diferentes escenarios. A continuación se describen los modelos seleccionados y utilizados en esta tesis.

- Modelo de inducción de muerte de células β por administración de estreptozotocina en ratones

La administración de estreptozotocina (STZ) crea un estado de insulino-dependencia en ratas y ratones, al impedir la secreción de insulina debido a la muerte selectiva de las células β . La STZ es un análogo de la nitrosourea, unido a una hexosa, que es internalizado selectivamente por las células β a través del receptor GLUT2. Una vez internalizada esta droga, produce daño al ADN (es un compuesto alquilante) y finalmente la muerte de las células productoras de insulina [63-64]. Administrada en 1 ó 2 dosis altas (150 mg/Kg) produce necrosis. De hecho, es posible detectar necrosis de células β tan solo a 2-4 h luego de su administración, mientras que la infiltración leucocitaria es evidente 3-4 días después de su administración [65].

Si bien, la administración de múltiples dosis bajas (35-60 mg/Kg) de STZ se la emplea como un modelo de diabetes autoinmune por ocasionar infiltrado de células mononucleares en islotes, esta característica no prueba sino sugiere que este compuesto podría iniciar una respuesta inmune dirigida a las células β .

- Ratones NOD/ShiLtJ (NOD)

El ratón NOD (del inglés, “*Non-Obese Diabetic*”) desarrolla una patología autoinmune progresiva similar a la que tiene lugar en el humano. El ratón NOD fue descubierto en Japón al final de la década del 70 por aparición espontánea [66]. Se caracteriza por desarrollar insulinitis autoinmune, hipoinsulinemia, glucosuria e hiperglucemia. Las hembras NOD desarrollan la enfermedad a edades más tempranas y con mayor incidencia que los machos. En condiciones libres de patógenos específicos, el 80-100% de las hembras desarrolla hiperglucemia a las 30 semanas de vida versus un 40-60% de los machos entre las 30 y 40 semanas de vida, según especificaciones de The Jackson Laboratory (<https://www.jax.org>). La generación y progresión de la diabetes en los ratones NOD se puede atribuir a una combinación de factores en el contexto de un complejo control poligénico. El mayor componente de la susceptibilidad de estos ratones es el haplotipo del MHC H-2g7 (K^d , A_g^7 , E^{null} , D^b). Las condiciones de higiene durante la cría o mantenimiento, el estado de salud, y la dieta, pueden afectar el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Los ratones NOD también exhiben múltiples fenotipos inmunológicos aberrantes incluyendo funciones inmunorregulatorias defectuosas de células presentadoras de antígeno, defectos en la regulación del repertorio de linfocitos T y función defectuosa de células NK. Los ratones NOD pueden desarrollar otras enfermedades autoinmunes espontáneamente como enfermedad de Sjögren [67], sialadenitis [68] y prostatitis [69].

- Ratones NOD/ShiLtSz-Prkdcscid (NODscid)

Los ratones homocigotas para la mutación espontánea de la inmunodeficiencia combinada severa (Prkdcscid, comúnmente llamada *scid*) se caracterizan por la ausencia de linfocitos T y B funcionales, linfopenia,

hipogammaglobulemia y un microambiente hematopoyético normal. Los ratones *scid* tienen defectos en la reparación del DNA y en la recombinación somática no homóloga de genes que codifican para los receptores específicos de antígeno en los linfocitos. La mayoría no tienen niveles detectables de IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgA. El timo, nódulos linfáticos y folículos del bazo están prácticamente desprovistos de linfocitos. Los ratones *scid* en el *background* genético del ratón NOD (NOD*scid*) no desarrollan insulinitis o diabetes durante su vida. Sin embargo, pueden ser utilizados como modelo experimental de diabetes autoinmune mediante la transferencia adoptiva de células de bazo (denominadas en su conjunto esplenocitos) de ratones NOD diabéticos. Los ratones NOD*scid* transferidos adoptivamente con esplenocitos provenientes de ratones NOD diabéticos desarrollan la enfermedad entre los 20-30 días y con una incidencia del 100 %. Esta estrategia permite evaluar la acción de un sistema inmune completamente activado contra autoantígenos β en un huésped con un páncreas endócrino inicialmente funcional y además, permite la sincronización de la aparición de hiperglucemia cuando los esplenocitos son administrados a un grupo de ratones.

- Ratones NOD.Cg-Tg(TcraBDC2.5,TcrbBDC2.5)1Doi/DoiJ (NOD BDC2.5)

Los ratones NOD BDC2.5 son animales transgénicos cuyos linfocitos T CD4⁺ maduros expresan los genes de las cadenas α y β del TCR (receptor del linfocito T) de un clon de linfocitos T derivado del ratón NOD altamente diabetogénico, denominado BDC2.5. Estos animales presentan una incidencia de diabetes menor a la de la cepa NOD (12% de incidencia a la edad de 30 semanas) [70]. Inicialmente, se desconocía el péptido reconocido por este clon de linfocitos T, por lo tanto la estimulación con este clon se realizaba utilizando un péptido mimotopo. En 2010, se reportó que la secuencia peptídica reconocida por los linfocitos T BDC2.5 corresponde a un péptido derivado de la cromogranina A [71]; una proteína de la familia de las graninas, presente en los gránulos secretorios de las células β y otras células secretorias.

Este modelo resulta de utilidad para el estudio de la activación y manipulación experimental de linfocitos T diabetogénicos en ensayos *in vitro* y de transferencia adoptiva de diabetes autoinmune en ratones NOD*scid*.

Células Madre

Las células madre tienen la capacidad de autodividirse (fenómeno reconocido como, self-renewal). Cada nueva célula tiene el potencial de seguir siendo una célula madre o convertirse en otro tipo de célula con una función más especializada, no solo morfológicamente sino también en forma funcional; a este proceso se denomina diferenciación celular.

Clasificación de células madre

Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación en: células madre **totipotenciales**, siendo capaces de producir tejidos embrionarios y extraembrionarios, generando células de cualquier tejido del cuerpo. Esta capacidad solo la presentan el cigoto o las células embrionarias primarias. Las células madre **pluripotenciales** tienen la capacidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias. Se considera que las células madre embrionarias (ESC, embryonic stem cell), las cuales se obtienen de la masa celular interna del blastocisto (embrión en el día 5, antes de la implantación) poseen ésta capacidad. Por último, las células madre **multipotenciales** son capaces de diferenciarse a distintos estirpes celulares procedentes del mismo tejido o de otro, pero no de todos los tejidos del organismo. Algunas tienen la capacidad de reactivar su programa genético como respuesta a determinadas señales de estimulación y dar lugar a ciertos linajes celulares posibles [72-77] (Figura 3).

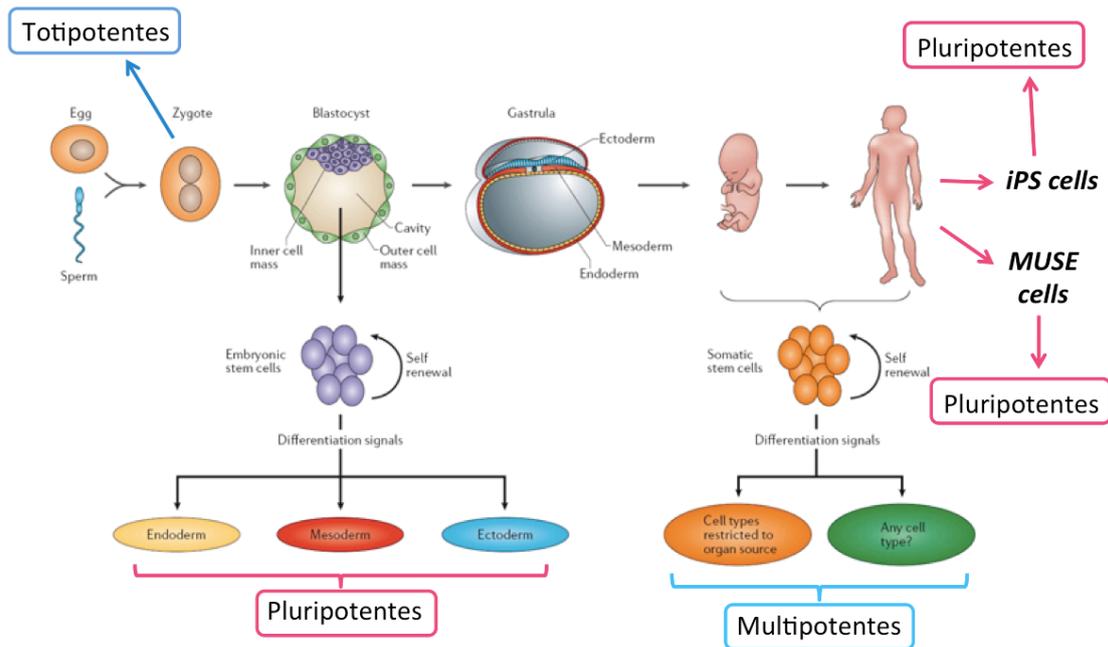


Figura 3: Esquema representativo de la procedencia y potencialidad de los distintos tipos de células madre. Modificado de O'Connor, T.P., *et.al.*2006. Nature Reviews Genetics 7, 261-276 [78].

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso tres criterios para definir las células madre mesenquimales (células multipotentes)[79]:

1. adherencia en cultivo.
2. expresión de los antígenos CD73, CD90 (Thy1) y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B.
3. capacidad de diferenciación *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo.

Las células madre mesenquimales (MSC) se las puede obtener de casi todos los tejidos adultos y son de fácil acceso, como por ejemplo médula ósea (BM-MSC), tejido adiposo (ASC) y cordón umbilical, entre otros.

En 2006, surgieron de la mano del investigador Yamanaka, unas células con perfil de expresión génica y potencial de desarrollo similar a las células madre embrionarias, las cuales fueron generadas a partir de células somáticas de ratón (fibroblastos) con la inserción de cuatro factores de transcripción característicos de células pluripotenciales (OCT4, SOX2, KLF4 y

MYC). Éstas células se las denominó células inducidas pluripotentes (iPSCs – *induced pluripotent stem cells*) [80].

Un año más tarde, otros grupos reportaron la generación de iPSCs a partir de fibroblastos humanos [81-82]. Mediante la utilización de ésta nueva estrategia para obtener células pluripotentes, las células iPS serían más útiles que a las ESC para ser aplicadas en autotrasplantes, eludiendo el rechazo inmunológico y además resolviendo los problemas éticos. Sin embargo, aún no se han resuelto las cuestiones relacionadas con la carcinogenicidad de las células iPS y la formación de teratomas *in vivo* como resultado de la proliferación celular desenfrenada y generación de mutaciones, lo que les impide su aplicación clínica [83].

Las MSCs no son tumorigénicas y son aceptadas como pertenecientes a una población de células multipotentes heterogéneas. Sin embargo, se ha encontrado que las MSCs pueden presentar diferenciación triploblástica con baja frecuencia [84]. A raíz de esto, han surgido varias teorías de porque las MSC exhiben un bajo grado de diferenciación hacia otros linajes germinales.

Como se menciona anteriormente, las MSC constituyen una población heterogénea de células que incluye células endoteliales y fibroblastos [84], por lo que podría hipotetizarse que existen varios tipos de células madre dentro de la población heterogénea de MSC que tienen diferentes capacidades de diferenciación. Mientras tanto, otros investigadores especulan que existe una sola población de células con la capacidad de diferenciarse en las tres líneas germinales primitivas [85].

Capacidades inmunoreguladoras de las células madre

Existe evidencia que las MSC poseen la capacidad de controlar ciertas funciones efectoras inmunológicas, regulando la rama innata como así también la adaptativa del sistema inmune [86-88]. Estas células han sido descritas como capaces de inhibir la proliferación de células T, su secreción de citoquinas y regular el equilibrio Th1/Th2 en enfermedades de respuestas dominantes de tipo Th1 y en enfermedades de modelos animales [88-89]. También, las MSC inducen células T (Treg) [86], inhiben la activación y

proliferación de las células dendríticas [90], así como la proliferación de células Natural Killer (NK) [91], siendo ambos tipos celulares las principales responsables de la respuesta inmune innata. De forma similar, las células madre pluripotentes como las células ES o iPS demostraron un alto potencial inmunomodulador mediante la inhibición de la proliferación de linfocitos T efectores, incluidas las células T CD4⁺, T CD8⁺ y las células NK [92].

Los mecanismos por los cuales las MSC promueven funciones reguladoras en las células inmunes no se conocen en detalle. Sin embargo, la liberación de factores solubles y el contacto íntimo entre las células madre y las células inmunes, podrían ser los mecanismos responsables de la capacidad inmunomoduladora de las células madre [93]. Se han reportado factores liberados por las células madre como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1), indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenasa (IDO), prostaglandina E2 (PGE2), hemo oxigenasa-1 (HO-1), interleuquina-10 (IL-10) y óxido nítrico (NO) [87]. Varios de estos agentes moduladores son inducidos y secretados después de la interacción entre las células efectoras del sistema inmune y las células madre.

¿A qué se denomina Células Muse?

En el 2010, Kuroda y col., describieron y caracterizaron un tipo particular de células progenitoras mesenquimales obtenidas a partir de tejido adulto, las cuales fueron denominadas células Muse (del inglés, multilineage differentiating stress enduring). Al cultivar las MSC en α -medio esencial mínimo (α -MEM) o medio esencial mínimo Dulbecco's (DMEM) con 10% de suero fetal bovino (SFB), formaban espontáneamente grupos celulares similares a los cuerpos embrioides que se forman en cultivos de células madre embrionarias (ESC) en suspensión [85]. Interesantemente, identificaron que ésta población celular, expresaba marcadores pluripotenciales como: Nanog, Oct3/4, Sox2, PAR4 y SSEA-3, y poseían la capacidad de diferenciarse a las 3 capas germinales, sugiriendo que las MSC contienen una subpoblación de células de tipo pluripotente [85]. En general, las células madre son tolerantes al estrés y, aunque normalmente están inactivas, se activan mediante estímulos de

diversas naturaleza [86]. Luego de su activación, entran en el ciclo celular, se diferencian en células que comprenden el tejido en el que residen y contribuyen a la regeneración y reparación del tejido. Kuroda *et.al.*, incubaron MSCs durante más de 16 h en una solución de tripsina que no contenía nutrientes, sino solo enzimas proteolíticas y postularon que, “si existirían células del tipo pluripotente entre las MSC, esas células pueden definirse como "células madre" en el verdadero sentido y, por lo tanto, deberían ser muy tolerantes al estrés en comparación con otras MSC”. [85]. Por lo tanto, postularon que las células Muse son una subpoblación pluripotente entre las MSC. Las indentificaron por su doble expresión del antígeno específico del estadio embrionario-3 (SSEA-3), un marcador de superficie conocido para las ESC humanas conjuntamente con cualquiera de los marcadores mesenquimales CD105, CD29 y CD90 [87]. Por lo tanto, las células Muse pueden ser aisladas de tejidos mesenquimal y células mesenquimales cultivadas, mediante separación celular (cell-sorting) por la doble expresión en la membrana plasmática de SSEA-3 y uno de los marcadores mesenquimales. Comúnmente, se las encuentra representando entre 1-3% de la población total de células mesenquimales.

La capacidad de diferenciación a los tres linajes germinales, es una característica sumamente importante a la hora de definirse como células pluripotentes, y como hemos mencionado anteriormente, las células Muse poseen esta capacidad. La diferenciación triploblástica espontánea de las células ESC, se observa ocasionalmente en placas de cultivo recubiertas con gelatina. De forma similar, se ha demostrado que los clusters de Muse se expanden de la misma forma, y dentro de las células expandidas, se indentificaron células derivadas de las tres capas germinales mediante marcadores representativos: para linaje ectodérmico, se indentificó con neurofilamento, para mesodérmico, con actina de músculo liso y α -fetoproteína para el linaje endodérmico [95]. Además, no solo se diferencian espontáneamente, sino que también se diferencian en hepatocitos y células de linaje neural, así como en adipocitos y melanocitos, cuando se suministra un cóctel adecuado de factores [96, 98]. Por lo tanto, las células Muse contrastan fuertemente a las células mesenquimales en términos de mayor potencial de

diferenciación hacia los tres linajes germinales primitivos. Las células mesenquimales pueden diferenciarse en osteocitos, células de cartílago y adipocitos en presencia de varios factores de estimulación, pero se ha visto, que su tasa de diferenciación es menor que la de las células Muse [98]. Resulta sumamente importante el hecho que las células Muse pueden cruzar los límites de linaje entre el mesodermo original y el ectodermo o endodermo. Por ejemplo, en la diferenciación hacia melanocitos, donde es necesario cruzar la barrera de linaje entre mesodermo a ectodermo, la adición de diez factores de estimulación es suficiente para diferenciar a las células Muse en melanocitos funcionales, mientras que las células mesenquimales, logran diferenciación con respuestas parciales [99].

También, se ha demostrado que las células Muse no son tumorigénicas: mediante la comparación de la expresión génica entre tres tipos de células, ESC/células pluripotentes inducidas (iPSCs) y células Muse humanas y mesenquimales. Se observó que el patrón de los genes de pluripotencialidad que se expresa era muy similar entre Muse y ESC/iPSCs, pero los niveles de expresión en las células Muse era menor en comparación con ESC/iPSCs [88]. El patrón de expresión génica de factores relacionados con el ciclo celular (denominados, factores tumorígenos), difiere entre ESC/iPSCs y células Muse, siendo mucho menor en las células Muse [88]. También se ha demostrado que la actividad de la telomerasa, un indicador de la actividad tumorigénica, es muy baja en las células Muse en comparación con iPSCs [89]. Al realizar trasplantes en testículos de ratones inmunodeficientes, a partir de células Muse derivadas de médula ósea y tejido adiposo humano, se observó que no generan ningún tumor/teratomas, durante 6 meses [85]. Por lo tanto, se considera que las células Muse tienen un riesgo bajo de tumorigénesis.

La estabilidad de la supervivencia y proliferación celular *in vitro* normalmente depende del entorno (por ejemplo, si se trata de un cultivo en suspensión o en adherencia). Por ejemplo, las células hematopoyéticas sobreviven en cultivos en suspensión, mientras que la mayoría de los demás tipos de células, incluidas las de origen mesenquimal, dependen de un cultivo en adherencia. Pero en el caso de las células Muse, éstas son las únicas que

sobreviven y proliferan en ambos tipos de cultivo. Las células que no son Muse (mesenquimales), por otro lado, no son capaces de sobrevivir en cultivos en suspensión. Cuando las células Muse individuales se transfieren a un cultivo en suspensión, comienzan a proliferar y forman aglomerados celulares similares a los cuerpos embrioides formados por ESC cuando se las cultiva en suspensión [85]. Mas allá de ésta característica morfológica similar a las células ESC, Kuroda *et.al.* identificaron que cuando las células Muse se encuentran aglomeradas expresan niveles más altos de Oct3/4, Sox2 y Nanog, de hasta 50-100 veces, que las células Muse cultivadas en placas adherentes. Este hallazgo sugiere que un entorno de suspensión incrementa la pluripotencialidad de las células Muse; pero su actividad proliferativa es limitada [85].

Una de las características que se destaca de las células Muse es la capacidad de percibir señales de daño liberadas por tejidos lesionados/dañados. Si bien otros tipos de células madre (ESC/iPSCs/somáticas, etc.) también poseen ésta característica, se ha demostrado que las células Muse son mas efectivas. Cuando se administran células Muse por vía intravenosa, éstas viajan al tejido dañado y se diferencian espontáneamente en células compatibles con el tejido receptor e incluso pueden diferenciarse a más de un tipo celular, de ser necesario, entre células mesodérmicas a endodérmicas o ectodérmicas.

Por lo tanto, las células Muse pueden funcionar como células reparadoras para una amplia gama de tejidos y órganos. Por ejemplo, se ha demostrado que al inyectar células Muse por vía intravenosa, en un modelo de hepatitis fulminante y en un modelo de daño muscular en ratones inmunodeficientes severos (SCID), éstas habían logrado diferenciarse de forma espontánea en hepatocitos y células del músculo esquelético contribuyendo a la eventual reparación del tejido [85]. Recientemente, el grupo de investigación del Prof. Yoshimura (Univ. de Tokyo) ha demostrado que las células Muse inyectadas localmente contribuyen directamente a la reparación de los tejidos. Se sabe que las úlceras de piel en pacientes con diabetes mellitus son muy difíciles de tratar. Por lo tanto, luego de generar un daño tisular experimental, similar a úlceras cutáneas en ratones NODScid, inyectaron de forma subcutánea y localizada, células Muse humanas derivadas de tejido adiposo. El

resultado fue exitoso, obteniendo una reparación tisular más rápida comparada a las lesiones en los animales controles [100]. Las células Muse inyectadas se incorporaron tanto en la dermis como en la epidermis del área dañada, diferenciándose a fibroblastos dérmicos, vasos sanguíneos y queratinocitos funcionales [100]. Por otro lado, también ha sido demostrado que en un modelo experimental de accidente cerebrovascular en ratas, las células Muse humanas inyectadas en la región alrededor de la isquemia cerebral, se diferenciaban espontáneamente en células neuronales (positivas para NeuN ~65%). Observándose que las células reconstituían el tracto piramidal y el circuito somatosensorial [101].

Otro grupo independiente dirigido por el Dr. Chazenbalk, logró aislar mediante una metodología diferente al empleado por el grupo japonés pionero antes mencionado, una cantidad abundante de células Muse de tejido adiposo (Muse-AT), sometiendo al tejido a severas condiciones de estrés. Observaron que al igual que las Muse descritas por Kuroda *et.al.*, al ser cultivadas en suspensión formaban aglomerados, expresaban los marcadores típicos de pluripotencia (Oct3/4, Sox2, Nanog, TRA 1-60 y TRA 1-81) y también eran capaces de diferenciarse a las 3 capas germinales, mesodermo, ectodermo y endodermo. El método de identificación/aislamiento de células Muse del grupo japonés, se basa principalmente en la expresión dual de SSEA-3 y marcadores característicos de células mesenquimales como CD105, corroborado de ésta misma forma por el grupo de Chazenbalk [102]. Confirmaron que las células Muse-AT no formaban teratoma en un modelo de ratón inmunodeficiente. Varios grupos definen la formación de teratoma *in vivo* como un requisito esencial para que una célula sea pluripotente [103]. La existencia de células madre pluripotentes sin actividad teratogénica propone una alternativa segura para la posible utilización en medicina regenerativa, ya que hasta la actualidad las únicas células puripotentes disponibles (ESC / iPSc) poseen la desventaja de formar teratoma/teratocarcinoma.

HIPOTESIS

HIPOTESIS

Las células Muse-AT son capaces de modular/atenuar respuestas inmunes. La administración de células Muse-AT atenúa/controla el deterioro de la célula β en la diabetes autoinmune de modelos murinos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis consiste en obtener y caracterizar células madre denominadas Muse (del inglés, multilineage differentiating stress enduring) derivadas de tejido adiposo adulto humano (AT), e investigar si estas poseen el potencial de modular el sistema inmune con el propósito de ser empleadas terapéuticamente en modelos experimentales de diabetes autoinmune.

Objetivos específicos

1. Obtener, amplificar y caracterizar células Muse derivadas de tejido adiposo humano (Muse-AT).
2. Investigar si las células Muse-AT son capaces de modular respuestas inmunes *in vitro*.
3. Investigar si la administración de células Muse-AT son capaces de modular/atenuar la diabetes autoinmune en modelos experimentales murinos. También, determinar si estas células son capaces de mejorar el resultado final del trasplante de una cantidad subóptima de islotes pancreáticos.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. Cultivos celulares

Para el cultivo de células, se utilizaron siempre materiales descartables estériles. Todos los cultivos celulares fueron realizados en condiciones de esterilidad, trabajando bajo campanas de flujo laminar vertical e incubados en estufas a 37°C y atmósfera controlada de 5% CO₂.

1.1. Medios de cultivo

- Cultivos primarios de células derivadas de tejido adiposo: se utilizó el medio de cultivo DMEM baja glucosa (5,5mM) (Gibco BRL-LifeTechnologies-Invitrogen, New York, EUA) suplementado con NaHCO₃ (2 g/l) y HEPES (2.3 g/l), suero fetal bovino (20% V/V) (Natocor, Córdoba, Argentina), penicilina-estreptomicina (100 U/ml).
- Cultivos primarios de células de bazo: se utilizó el medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco BRL-LifeTechnologies-Invitrogen, New York, EUA) 2g/L D-Glucosa, suplementado con NaHCO₃ (2 g/L), HEPES (4.7 g/L), suero fetal bovino (10% v/v) (Natocor, Córdoba, Argentina), penicilina-estreptomicina (100 U/ml).
- Cultivo línea celular RAW 264.7 y cultivo primario de macrófagos de ratón, se utilizó el medio de cultivo DMEM alta glucosa (25mM) (Gibco BRL-LifeTechnologies-Invitrogen, New York, EUA) suplementado con NaHCO₃ (2 g/l) y HEPES (2.3 g/l), suero fetal bovino (10% v/v) (Natocor, Córdoba, Argentina), penicilina-estreptomicina (100 U/ml).

Para la crio-preservación de células en N₂ líquido, se utilizó un medio denominado medio de congelación (5 volúmenes de medio de mantenimiento, 4 partes de SFB y 1 parte de DMSO).

1.2. Obtención de células Muse derivadas de tejido adiposo

Para esta preparación se utilizaron muestras de liposucción provenientes de cirugías estéticas mayoritariamente de la zona abdominal y flancos, y en menor cantidad de la cara interna del muslo. Las muestras

provinieron indistintamente de hombres o mujeres en un rango de edad de 20-65 años, provistas por el servicio de Cirugía del Hospital Austral (Derqui, Pcia. de Buenos Aires) luego del Consentimiento Informado rubricado por el paciente y médico interviniente. El trabajo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Austral. Se tomó como criterio de exclusión, los pacientes con cualquier tipo de enfermedades y medicación concomitante que pudiera generar algún sesgo en la interpretación de los resultados (por ej. curso de enfermedad infecciosa, inflamatoria crónica, etc.).

Las muestras se obtuvieron en condiciones de asepsia y se trasladaron a temperatura ambiente, siendo procesadas dentro de las 24 horas posteriores al aislamiento.

A partir de 100-200 ml de material de liposucción de tejido adiposo, se realizaron 2 lavados con buffer fosfato salino (PBS), centrifugando a 400xg durante 5 min entre cada lavado. Se incubó con colagenasa IA (Sigma-Aldrich) al 0,1% V/V en medio DMEM sin suero a 37°C por 30 min en agitación (110rpm). Una vez cumplido el tiempo de digestión, se incubó a 4°C en condiciones de hipoxia y agitación por 16 horas más. Luego, se centrifugó 10 min a 400xg y se descartó el sobrenadante. El pellet de células obtenido, se incubó con 5 ml de solución de lisis de eritrocitos en baño de agua-hielo durante 5 min y se lavó con 30 ml de PBS. Las células Muse-AT se sembraron en una concentración de $3,5 \times 10^6$ células por placa de 60 mm sin tratamiento de adhesión, en el medio de cultivo (DMEM baja glucosa [5,5mM] suplementado con 20%SFB y 1% penicilina-estreptomicina) durante 12-15 días. Se cambió el medio cada 72h.

1.2.1. Obtención de medio condicionado (CM) de células Muse-AT

Se cultivaron las células Muse-AT en la densidad antes mencionada con 6 ml de medio de mantenimiento. Al día 6 de cultivo se reemplazó el medio por uno fresco y se dejaron en cultivo durante 72h. Una vez cumplido ese tiempo, se recolectó el medio, se centrifugó a 400xg por 5 min a 4°C, se descartaron las células (pellet) y se volvió a centrifugar el sobrenadante a 500xg por 10 min a 4°C para eliminar restos celulares. El sobrenadante (CM) se alicuotó y conservó a -80°C, hasta su empleo.

1.3. Obtención de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo

A partir de 50 ml de tejido adiposo lipoaspirado, se realizaron 2 lavados con PBS, centrifugando a 400xg por 5 min entre cada lavado. Luego se incubó con colagenasa IA al 0,1% V/V en medio DMEM sin suero a 37°C por 30 min en agitación (110rpm). Luego, se procedió a centrifugar 10 min a 400xg. Se descartó el sobrenadante, se lavó 2 veces con PBS y se sembraron las células ($0,5-1 \times 10^6$) en frascos de 25cm² en medio de mantenimiento. A las 24h se realizó cambio de medio. Para el mantenimiento, las células fueron lavadas con PBS y despegadas del plástico adherente en presencia de tripsina durante 5-10 min a 37°C. Las células se utilizaron hasta el pasaje 5 como máximo.

1.4. Obtención de células del bazo de ratón

Las células del bazo de ratón (que denominamos esplenocitos) fueron obtenidas mediante la disgregación mecánica del órgano en condiciones de esterilidad. Para esto, los bazos de los ratones previamente sacrificados fueron disecados en condiciones de asepsia y colocados en PBS frío, y estéril. Una parte de las células fueron liberadas haciendo fluir medio de cultivo dentro del bazo por medio de una aguja 30G y jeringa de 10 ml. Cuando el órgano quedó translúcido, éste fue disgregado mecánicamente con la ayuda de pinzas de cirugía y la suspensión resultante se la pasó a través de una malla de 70 µm de tamaño de poro. Luego, las células fueron centrifugadas a 400xg durante 5 min, incubadas con 4-5 ml de solución de lisis de eritrocitos en baño de agua-hielo durante 3 min y lavadas con 20 ml de PBS. Finalmente, las células de bazo libres de eritrocitos fueron centrifugadas a 400xg durante 5 min y suspendidas en medio de mantenimiento sembradas en una densidad de $3,5 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$ por pocillo (placa de 96-pocillos con fondo en U).

1.4.1. Estimulación específica de antígeno de esplenocitos provenientes de ratones NOD BDC2.5

Las células de bazo fueron obtenidas y sembradas como se indicó anteriormente. La estimulación se realizó con el péptido (Ac-MVLPLWVRME-

NH2) mimotopo del antígeno derivado de la cromogranina A incubado a una concentración 5 nM, a 37 °C, 5 % CO₂. Como controles, se dejaron células de cada grupo sin estimular o alternatively, se las trató con un péptido no relacionado (ovoalbúmina (OVA); control negativo de estimulación).

1.5. Obtención de macrófagos peritoneales de ratón

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se inyectaron (i.p.) con 10ml de PBS frío. Luego de 5 minutos, se aspiró lentamente el líquido peritoneal en condiciones asépticas. El líquido peritoneal fue centrifugado a 300xg durante 5 min y el pellet celular obtenido fue suspendido en el medio de cultivo. Las células obtenidas (~90% de macrófagos) fueron sembradas en placas de 96-pocillos con fondo plano (2×10^4 células / well).

1.6. Cultivo de la línea celular RAW264.7

La línea celular de macrófagos murinos, RAW264.7, fue cultivada en medio de cultivo (DMEM alta glucosa [25nM] suplementado con 10% SFB y 1% penicilina-estreptomicina). Se mantuvieron en crecimiento con pasajes cada 72-96h diluyéndolas en 1:5. Para el mantenimiento y plaqueo de experimentos, las células fueron lavadas con PBS y despegadas del plástico adherente en presencia de tripsina durante 5-10 min a 37°C.

1.7. Cultivo de la línea celular P19

La línea celular de carcinoma embrionario de ratón fue cultivada en medio α -MEM suplementado con 5% SFB. Se mantuvieron en crecimiento con pasajes cada 48-72h de una dilución 1:10. Para el mantenimiento, las células fueron lavadas con PBS y despegadas del plástico adherente en presencia de tripsina durante 5-10 min a 37°C.

2. Ensayos de caracterización de células Muse-AT

2.1. Diferenciación espontánea de células Muse-AT hacia los tres linajes de células germinales

La diferenciación espontánea de células Muse-AT hacia los linajes mesodérmicos, endodérmicos y ectodérmicos se analizó mediante el cultivo de las células Muse-AT en placas plásticas adherentes por 7 días con el medio de mantención. Cumplidos éstos días, se extrajo el ARNm utilizando la solución de Tri Reagent, siguiendo con las especificaciones de la empresa. Mediante PCR, se identificaron genes característicos de cada linaje germinal. Microtúbulos asociados a la proteína 2 (MAP-2) como marcador de células mesodérmicas, α -fetoproteína para el origen de células endodérmicas y NK2 homeobox 5 (Nkx2.5) para identificar células de tipo neural, origen de células ectodérmicas.

2.2. Diferenciación inducida de células Muse-AT hacia los tres linajes germinales primitivos

Las células Muse-AT se sembraron en placas plásticas adherentes para ser inducidas hacia los tres linajes celulares germinales. Para la inducción de miocitos, las células Muse-AT se incubaron en medio DMEM 20%SFB suplementado con 5% de N-hidroxisuccinimida (NHS), 50mM de hidrocortisona. El medio de diferenciación de hepatocitos consistió en DMEM 20%SFB suplementado con 10 mg/ml de insulina, 5 mg/ml de transferrina, 7 ng/ml de Na_2SeO_3 , 10nM de dexametasona y 100 ng/ml de factor de crecimiento de hepatocitos-4 (HGF). Para la inducción de miocitos y hepatocitos, las células Muse-AT se cultivaron en sus respectivos medios de diferenciación durante 7 días, y se identificó mediante la técnica de microscopia de inmunofluorescencia, la expresión de actina de músculo liso (SMA) y α -fetoproteína, respectivamente. Para la formación de neuronas, se utilizó el medio Neurobasal sin suero (Thermo Fisher) suplementado con B-27, 2mM glutamina, 30 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y 30 ng/ml de factor de crecimiento endothelial (ambos de Peprotech, Rocky Hill, NJ) y se cultivó durante 7 días. Luego, se reemplazó el medio por DMEM

suplementado con 2% de SFB, 25 ng/ml de bFGF y 25 ng/ml de factor de crecimiento derivado del cerebro (Peprotech) por 7 días más. Se identificó mediante la técnica de microscopia de inmunofluorescencia la expresión de MAP-2.

2.3. Ensayo de teratogénesis

Para el ensayo de teratogénesis, se utilizaron células Muse-AT cultivadas entre los días 7-10 *in vitro*, y ratones NODscid (8 semanas de edad). Las células Muse-AT fueron disgregadas con tripsina y lavadas con PBS, obteniendo células individuales. Se suspendieron en 50µl de PBS a una concentración de 1×10^6 .

Se sometió los ratones a una pequeña cirugía que consistió en una incisión en la zona inguinal (1cm), exponiendo el testículo e inyectándolo con células (50µl) o su vehículo (en testículo contralateral, control) transversalmente hacia el centro del testículo con una aguja 30G. Luego se suturó la zona abdominal y se controlaron los animales hasta su recuperación post anestesia. Se inyectaron en los testículo derecho con células Muse-AT y en los izquierdos sus respectivos controles, en un total de 16 ratones NODscid. Como control positivo de formación de teratocarcinomas, se utilizaron células de carcinoma embrionario de ratón (la línea celular P19, 1×10^6) las que fueron inoculadas en los testículos derechos de ratones NODscid (n=3). Los ratones fueron sacrificados a los 20; 60; 90 y 120 días post inyección de las células. Se disecaron los testículos, fijándolos en paraformaldehído al 4% V/V (n=4 para cada tiempo indicado). Luego se analizaron mediante histoquímica mediante tinción con H&E.

2.4. Determinación del cariotipo

Se utilizaron células Muse-AT cultivadas en suspensión durante 10-13 días, se tiñeron con quinacrina-Hoechst y luego se incubaron en KCl 0,075M (solución hipotónica) que provoca un aumento en el volumen del citoplasma. Se lavaron y se fijaron cuidadosamente con la solución de Carnoy, evitando la aglutinación celular. Las preparaciones cromosómicas se realizaron sobre

portaobjetos dejando caer de a una gota a la vez, a cierta distancia para que al tocar la superficie del portaobjeto, se logre el lisado celular y queden expuestos los cromosomas teñidos. Luego se microfotografiaron y se analizaron (n = 3).

2.5. Inmunofluorescencia – Microscopía Confocal

Las células Muse-AT se recogieron al tiempo indicado en cada experimento, que dependió de la marcación a analizar. Fueron cosechadas, lavadas con PBS y adheridas a portaobjetos de vidrio ($1,5 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$) centrifugándolas a 220 xg por 5 min a 4°C (en un Cito-Spin). Se fijaron mediante la adición de metanol frío por 10 min y luego se lavaron con PBS frío. Cuando fue necesario, las células se permeabilizaron con 0,01% V/V de Tritón X-100 en PBS por 15 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en la concentración adecuada por 16 horas en cámara húmeda a 4°C. Luego se lavaron con PBS frío y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a Alexa Fluor 647 o Alexa Fluor 488 de ratón y conejo (Thermo Fisher) respectivamente, y Alexa Fluor 647 de rata (Abcam), utilizados a una dilución de 1/200. Se lavó nuevamente con PBS y se realizó la tinción con DAPI (1:2000). Por último, se montaron con Mowiol (Sigma-Aldrich). En todos los casos se realizaron los controles de autofluorescencia (sin anticuerpo) y de especificidad del anticuerpo secundario (sin anticuerpo primario). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal invertido LSM710 Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemania). La adquisición de datos se realizó utilizando el programa ZEN Black 2011 (Microscopía Carl Zeiss) y la cuantificación con el programa Fiji (NIH).

- Lista de anticuerpos primarios:
 - Anti-h SSEA-3 (BioLegend, cat# 330302)
 - Panel marcador de células embrionarias anti-h: Oct-4, Nanog, Sox-2, Tra1-60 y SSEA-4 (Abcam, cat#ab109884)
 - Anti-h TGF- β 1 (Santa Cruz Biotechnology, cat#sc-130348)
 - Anti-h SMA (Thermo Fisher, cat#MA5-11547)

- Anti-h MAP-2 (Bio-Rad Laboratories, cat#AHP997)
- Anti-h α -fetoproteína (Dako, cat#A0008)
- Anti-h-IL-37 (Atlas, cat#HPA054371)
- Anti- h-TGFbRII (Santa Cruz, cat#sc-17791)

2.6. Microscopía Electrónica de transmisión

Células Muse-AT individuales y aglomeradas en clústeres, fueron fijadas con glutaraldehído al 2,5% V/V en PBS. Posteriormente se las trató con tetróxido de osmio al 1% P/V frío a temperatura ambiente. Luego se las sometió a deshidratación con un gradiente de alcoholes en forma creciente. Se pasaron por óxido de propileno y se embebieron en resina Durcupan (Sigma-Aldrich). La tinción se realizó en cortes ultrafinos con uranilo al 2% P/V y en solución de Reynolds. Los cortes se observaron con un microscopio electrónico Zeiss 109T con cámara digital (Gatan ES 1000 W; Gatan, Pleasanton, CA).

3. Ensayos funcionales

3.1. Co-cultivo de células Muse-AT y la línea celular RAW264.7

Se obtuvieron las células Muse-AT como se describió anteriormente (n=3) a día 9 de cultivo en suspensión. Las células RAW264.7 se sembraron en placa de 96 pocillos (2×10^4 por pocillo) y una vez adheridas, fueron estimuladas con LPS (200ng/ml) por 20 min o no (control), luego se lavaron con PBS y se colocaron diferentes concentraciones de células Muse-AT (relación 10:1, 1:1 y 1:10 RAW:Muse-AT). Se cultivaron durante 16 horas y se recolectó el sobrenadante, para determinar mediante ELISAs, la concentraciones de TNF- α e IL10.

3.2. Co-cultivo de células Muse-AT y la línea celular RAW264.7 en Cámara de Boyden

Con el objetivo de determinar si la secreción de TNF- α estaba regulada por agentes solubles liberados por las células Muse-AT o era necesario el contacto entre células, utilizamos el sistema de la Cámara de Boyden (conocida comúnmente como sistema de transwell) (Figura 4) que consiste en separar las poblaciones celulares con una membrana de tamaño de poro de 3 μ m que impide la migración celular a través de ella. Sembramos en la base de la placa de 24 pocillos las células RAW264.7, fueron estimuladas con LPS o no (control) y las células Muse-AT fueron colocadas sobre la membrana en las mismas densidades que en el punto anterior (1:10, 1:1 y 10:10 RAW:Muse-AT). Se cultivaron por 16 horas y se recolectaron los sobrenadantes para determinar, mediante ELISAs, las concentraciones de TNF- α e IL10.

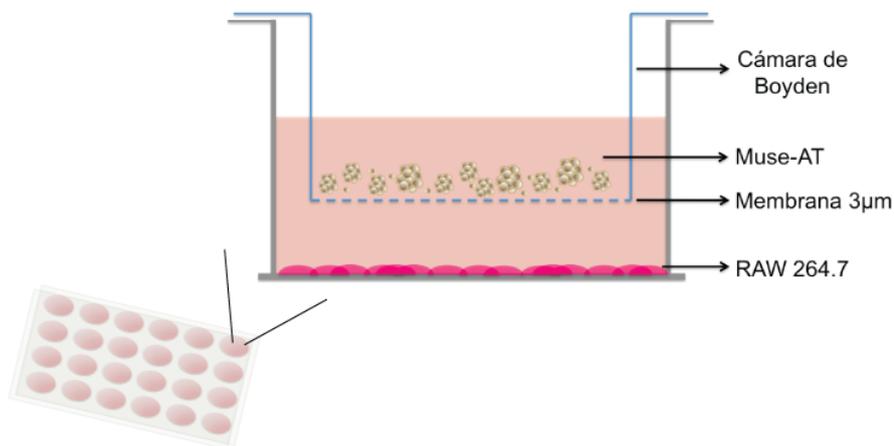


Figura 4 – Cámara de Boyden - sistema de Transwell. Las células RAW264.7 se sembraron en la parte inferior, y sobre la membrana de 3 μ m de tamaño de poro se colocaron las células Muse-AT. El tamaño de poro permite sólo la difusión de factores solubles y no la migración celular hacia la celda inferior. Los sobrenadantes fueron evaluados mediante ELISAs específicos.

3.3. Cultivo de la línea celular RAW264.7 con medio condicionado de células Muse-AT

Las células RAW264.7 se sembraron en placas de 96 pocillos (2×10^4 /pocillo), se estimularon con LPS (200ng/ml) por 20 min o no (control). Luego, se lavaron los pocillos con PBS y se colocaron los medios condicionados (CM) provenientes de células Muse-AT (n=5, pacientes) a diferentes diluciones (1/5, 1/50, 1/500 y 1/5000). Para determinar si el efecto del CM sobre la secreción de citoquinas por parte de las células RAW264.7 podría deberse a la presencia de TGF- β 1 en el, se adicionó al cultivo una molécula inhibidora de la cascada de señalización de TGF- β , denominada SB-431542 (SB) en la concentración de 10 μ M. Luego de 16 horas de cultivo, se colectaron los sobrenadantes para determinar, mediante ELISAs, la liberación de TNF- α e IL10.

3.4. Co-cultivo de células Muse-AT y cultivo primario de macrófagos murinos

Los macrófagos de ratones C57/BL6, fueron obtenidos como se describió anteriormente y fueron utilizados inmediatamente luego de su obtención. El cultivo se realizó en placas de 96 pocillos, con una concentración de 2×10^4 células/pocillo. Una vez adheridos a la superficie del pocillo, se estimularon con LPS (200ng/ml) por 20 min o no (control). Se lavaron los pocillos con PBS y se colocaron los medios condicionados (CM) (n=5 pacientes) en la dilución 1/5. Se adicionó SB (10 μ M) en los pocillos correspondientes. Luego de 16 horas de cultivo, se colectaron los sobrenadantes para determinar, mediante ELISAs específicos, la concentración de TNF- α e IL10.

3.5. Cultivo primario de esplenocitos de ratones NOD BDC2.5 con medio condicionado (CM) de células Muse-AT

Los esplenocitos (spl) fueron obtenidos como se describió en el punto 1.4 y estimulados como se describió en el punto 1.4.1. Bajo estas condiciones se realizaron cultivos con CMs de Muse-AT obtenidos como se describió anteriormente. Se definieron los siguientes tratamientos: spl (control), spl + CM, spl+Mi, spl+Mi+CM (diferentes concentraciones- 1/5, 1/50, 1/500 y 1/5000),

spl+Mi+ $1/5$ CM_{ASCs} (ASCs, células madre de tejido adiposo-mesenquimales), spl+Mi+CM $1/5$ +SB (concentraciones variables 1,25-10ng/ml), spl+Mi+CM $1/5$ +TGF- β exógeno (concentraciones variables 0,1-5ng/ml), spl+Mi+CM $1/5$ + α -TGF- β (anticuerpo monoclonal anti-TGF- β 1 [25ng/ml]).

En todos los casos se cultivó por 72 horas y se colectaron los sobrenadantes para determinar, mediante ELISAs, la concentración de IFN- γ , TNF- α e IL10. También, se cosecharon los esplenocitos para extraer el RNAm utilizando la solución de Tri Reagent, siguiendo con las especificaciones de la empresa.

Para detectar las proteínas pSMAD2, SMAD2, T-bet y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), se estimularon los esplenocitos por 24 horas, luego se pre-trataron con y sin SB (10ng/ml) por una hora y se adicionó el CM $1/5$ de las Muse-AT por 30 y 60 min. Se colectaron en PBS frío, se lavaron y se lisaron con Laemmli buffer 2X para posteriormente realizar Western Blot.

3.5.1. *Ensayo de proliferación de linfocitos T CD4⁺*

Se suspendieron los esplenocitos en 1 ml de PBS + 5 % V/V de SFB a una concentración de 10^7 células/ml e incubamos con ester succinimidil diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) 5 μ M a temperatura ambiente durante 5 min. Luego se realizaron 3 lavados sucesivos con 10 ml de PBS+ 5 % V/V de SFB y uno con medio de cultivo. Se sembraron 3.5×10^5 células/pocillo en 200 μ l de medio de cultivo en placas de 96 pocillos de fondo U. Los esplenocitos fueron estimulados con el péptido Mi e incubadas por 3 días a 37 °C, 5 % CO₂. Se realizó también la incubación con spl+Mi+CM $1/5$ y como control de no proliferación, se dejó un grupo de spl sin estimular con el Mi.

Al finalizar el tratamiento correspondiente, las células fueron cosechadas, marcadas con el anticuerpo anti-CD4-biotinilado + SVA-APC según se describe más abajo en la sección de marcación de citometría de flujo, y fueron analizadas mediante citometría de flujo. El porcentaje de células T CD4⁺ con marca de CFSE de baja intensidad fue considerado como una medida de proliferación de linfocitos T CD4⁺.

4. Animales

4.1. Cría y mantenimiento de los animales empleados

Las cepas de ratones NOD/ShiLtJ (**NOD**), NOD/ShiLtSz-Prkdcid (**NODscid**), NOD.Cg.Tg(TcraBDC2.5,TcrbBDC2.5)1Doi/DoiJ (**NOD BDC2.5**) y C57BL/6j (**C57**), fueron originalmente adquiridas en The Jackson Laboratory (<https://www.jax.org>) y criadas en el Bioterio del Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires – Instituto Partner de la Sociedad Max Planck (IBioBA-MPSP). Todos los animales utilizados fueron dispuestos en cajas (5 ratones/caja, como máximo) en sistemas de racks ventilados con filtración de aire constante, manipulados bajo campana de flujo laminar y criados en condiciones libres de patógenos con ciclos de luz (12 h luz blanca y 12 h oscuridad) y temperatura (22-23 °C) controladas. Los ratones fueron provistos de alimento balanceado (extrusado rata/ratón, Asociación de Cooperativas Argentinas) y agua acidificada (con HCl) administrados “ad libitum”.

La cepa de ratones transgénicos heterocigotas NOD BDC2.5 fue mantenida mediante el cruzamiento de ratones machos NOD BDC2.5 con hembras NOD, siguiendo las recomendaciones de The Jackson Laboratory. Al momento del destete, las crías fueron analizadas para determinar la presencia del transgen mediante PCR, como se indicará a continuación.

Los ensayos experimentales con animales fueron aprobados por la Comisión Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCEyN-UBA.

4.2. Genotipificación de ratones NOD BDC2.5

El ADN genómico de los ratones fue extraído a partir de una porción de tejido de la oreja de 1 mm de diámetro tomada con sacabocado. Para esto, el tejido fue incubado en 50 µl de solución alcalina de lisis (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA, pH 12) a 65 °C durante 30 min y luego a 95 °C durante 15 min. Luego, se agregaron 50 µl de solución de neutralización (40 mM Tris-HCl, pH 5), se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min, se transfirieron 50 µl del sobrenadante conteniendo el ADN sobre un tubo nuevo que se conservó a -20 °C hasta su posterior uso. Las secuencias de los cebadores utilizados fueron:

BDC2.5-F 5'-CATGTTTCCCTGCACATCAG-3' y BDC2.5-R 5'-CCAGATCCAAAGATGAGTTGC-3'. Las reacciones de PCR fueron realizadas en la siguiente mezcla de reacción: 2 µl de extracto de ADN genómico, 1.2 µl de solución buffer 10X (Invitrogen, cat # 11615010), 0.48 µl de MgCl₂ 50mM (Invitrogen), 0.25 µl de dNTP's 10 mM cada uno (Invitrogen), 0.6 µl de cada uno de los cebadores 20 µM cada uno, 0.12 µl de enzima ADN polimerasa Taq Pol (Invitrogen, cat # 11615010) y 6.27 µl de H₂O. 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 20 segundos a 72 °C; 5 min a 72 °C. El producto de reacción fue resuelto mediante electroforesis a 80 V en gel de agarosa 2 % en solución TBE (Tris-HCl 25 mM, Borato 100 mM, EDTA10 mM, pH 8.0) conteniendo bromuro de etidio. Los ratones en los que se observó un producto de amplificación de 100pb fueron considerados transgénicos (figura 5).

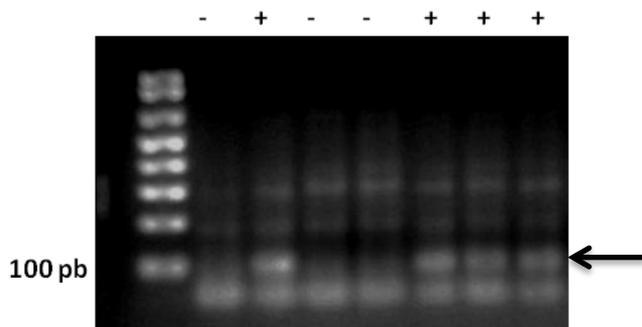


Figura 5. Genotipificación de ratones NOD BDC2.5. Se muestra una fotografía de un gel de agarosa como ejemplo de los resultados obtenidos rutinariamente en la genotipificación de las crías de ratones NOD BDC2.5. En la primer calle de la izquierda se observa el marcador de peso molecular (1 Kb plus, Invitrogen), luego los controles negativo y positivo, dos muestras que resultaron negativas y tres muestras que resultaron positivas para el transgen.

4.3. Inducción de muerte de células β por administración de estreptozotocina en ratones NODscid

Se utilizaron ratones NODscid machos de 8-10 semanas de vida, antes de recibir cada dosis de estreptozotocina (STZ) se los ayunó (6 horas). La STZ (50mg/kg) fue preparada al momento de uso en Buffer Citrato frío, los ratones fueron inyectados (intraperitonealmente, i.p.) durante 4 días consecutivos.

Posteriormente, se midieron las glucemias mediante la utilización de un glucómetro (Optium Xceed, Abbott).

4.4. Determinación de la glucemia

Para determinar la glucemia se les practicó a los ratones una mínima incisión en la punta de la cola y se tomó una gota de 5 a 10 μ l de sangre venosa. La glucemia se determinó mediante el uso de un glucómetro (Optium Xceed, Abbott). Se consideró diabéticos a los ratones que tuvieron durante tres días consecutivos valores de glucemia ≥ 300 mg/dl.

5. Ensayos *in vivo*

5.1. Trasplante de células Muse-AT en ratones NOD

Se utilizaron ratones NOD con valores de glucemias ≥ 300 mg/dl. Al momento de detectar éstos valores de glucemias, se inyectaron 1×10^6 células Muse-AT (día 5-12 de cultivo *in vitro*) de forma intraperitoneal (n=5), y como control (n=3) se inyectó el vehículo (PBS). Semanalmente se dosó la glucemia (método descrito en el punto 4.4) y el peso. Cuando los animales mostraban signos de debilitamiento o caquexia fueron sacrificados por razones humanitarias.

5.2. Trasplante de células Muse-AT en ratones NODscid diabetizados con estreptozotocina

Se diabetizaron ratones NODscid machos de 8-10 semanas de vida, como se ha descrito en el punto 4.3. Una vez alcanzados los valores de hiperglucemia, se inyectaron $1 \times 10^6/100\mu$ l células Muse-AT (día 5-12 de cultivo *in vitro*) de forma intravenosa por la cola (n=10), y como control (n=6) se inyectó el vehículo (PBS). Semanalmente se dosó las glucemias (método descrito en el punto 4.4) y el peso. Cuando los animales mostraban signos de debilitamiento o caquexia fueron sacrificados por razones humanitarias.

5.3. Trasplante de una masa marginal de islotes pancreáticos y de células Muse-AT

5.3.1. *Aislamiento de islotes pancreáticos*

Utilizamos ratones NODscid de entre 8-10 semanas de vida, de ambos sexos. Se sacrificaron por dislocación cervical, se roció el abdomen de animal con etanol 70% y con tijera recta se realizó una laparotomía mediana xifopubiana. Retirando parte de las vísceras fuera de la cavidad abdominal para dar lugar a la distensión del páncreas. Se localizó el duodeno y el colédoco intrapancreático que se extiende desde la base del páncreas hasta el duodeno, se clampeó con un hemostato la entrada de este ducto al duodeno. Se expuso el conducto biliar común y se ubicó la intersección de “Y” (sitio de desembocadura de los conductos hepáticos derecho e izquierdo para formar el conducto hepático común). Se inyectaron 2,5 ml de Colagenasa V 2mg/mL diluida en Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)(Sigma-Aldrich) con aguja 30G en el conducto justo en la intersección “Y” lentamente. Si la inyección resultase correcta se aprecia a simple vista la distensión del páncreas. Terminada la inyección se retiró la jeringa y el hemostato. Se evitó tocar el páncreas con las pinzas y con ayuda de la tijera curva, se despegó el intestino delgado del órgano comenzando a la altura de donde estaba el hemostato y moviéndose hacia la derecha del ratón hasta despegar todo el intestino y páncreas del estómago. Por último, usando el bazo como sostén, se levantó al páncreas y cortando las adherencias restantes al retroperitoneo se terminó de despegar el órgano. Se colocó el páncreas en un tubo de 50ml (3 páncreas máximo por tubo), y se llevó a 37°C por 15 min. Una vez cumplido el tiempo de digestión, se frenó la reacción con 30 ml de HBSS frío suplementado con 0,2% P/V BSA y se centrifugó 2 min a 100xg. Se descartó el sobrenadante y diluyó en 15 ml de HBSS 0,2% P/V BSA frío, luego se tamizó por una malla metálica (tamaño de poro 200µm), y se volvió a centrifugar 2 min a 100xg. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente, y se adicionó 5 ml del gradiente de purificación Ficoll Histopaque1077 (Sigma-Aldrich), se homogenizó con vortex y se agregó suavemente 5 ml de medio RPMI libre de suero. Se centrifugó 20 min a temperatura ambiente, a 900xg sin freno. Los islotes se localizaron en la interface entre el Ficoll y el medio de cultivo, se pipetearon y se colocaron en

un tubo con 20ml de HBSS 0,2% P/V BSA para lavar el Ficoll, se centrifugó 2 min a 150xg repitiendo el lavado 2 veces más. El pellet de islotes se suspendió en medio RPMI suplementado con 10% V/V SFB y se colocó en placa de cultivo de 100mm donde bajo lupa, se colectó islote por islote (conocido en inglés como, hand picking), contando la cantidad de islotes equivalentes necesarios para su posterior uso. Para estandarizar la masa de islotes a trasplantar, se consideró un equivalente de islote (IE), aquel islote entre 100-125µm de diámetro.

5.3.2. *Trasplante de islotes pancreáticos*

Se diabetizaron ratones NOD^{scid} machos de 8-10 semanas de vida, como se describió en el punto 4.3. Una vez alcanzados los valores de hiperglucemia, se aislaron islotes pancreáticos como se describió anteriormente. Se cultivaron por 16 horas y luego se trasplantaron en la cápsula renal izquierda (Figura 6). Se trasplantó una masa marginal de islotes, entendiéndose como tal el número de islotes necesarios para que los niveles de glucemia se encuentren entre los 300-400mg/dl.

5.3.3. *Co-trasplante de islotes pancreáticos con células Muse-AT*

Por otro lado, se co-cultivaron 180 IE con 200 clusters de células Muse-AT (día 4-6 de cultivo *in vitro*) por 16 horas y se co-trasplantaron en la cápsula renal izquierda. Se realizaron controles con islotes y Muse-AT por separados y controles quirúrgicos (vehículo).

Semanalmente se tomaron los valores de glucemia (método descrito en el punto 4.4) y el peso. Cuando los animales mostraban signos de debilitamiento o caquexia fueron sacrificados por razones humanitarias

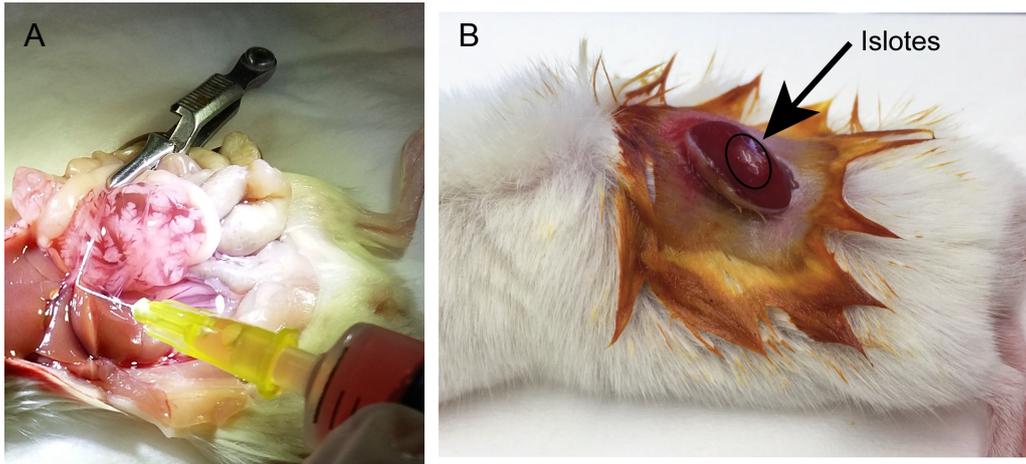


Figura 6. Fotografías representativas (A) procedimiento de distensión pancreática para la obtención de islotes pancreáticos, (B) de un trasplante de islotes en la cápsula renal de ratón. La flecha indica el alojamiento de los islotes entre el riñón y la capsula conjuntiva que lo recubre.

6. Métodos Bioquímicos

6.1. Determinación de la concentración de citoquinas mediante ELISAs

Los medios condicionados obtenidos de los experimentos en ensayos funcionales fueron colectados y conservados en alícuotas de 200-350 μ l a -80 °C hasta su posterior uso (no más de 2-3 meses). Las alícuotas fueron descongeladas, utilizadas y el remanente descartado. La concentración de citoquinas en dichos medios condicionados se determinó mediante ELISAs específicos, utilizando los respectivos 'sets' (BD para IFN- γ y TNF- α ; Biolegend para IL-10) siguiendo las especificaciones de la empresa.

6.2. Tinción de la superficie celular para citometría de flujo

Para las marcaciones de moléculas presentes en la superficie celular, las células fueron cosechadas en tubos para citometría en baño de agua-hielo, centrifugadas a 250xg durante 5 min a 4 °C, lavadas con 1 ml de solución de tinción (PBS+ 1% V/V SFB), suspendidas a una concentración de 2-5x10⁶ células/ml de solución de bloqueo (PBS+ 10% V/V SFB) e incubadas durante 10 min en baño de agua-hielo. Luego, las suspensiones celulares fueron distribuidas en 100 μ l/tubo (2-5x10⁵ células/tubo) e incubadas durante 30 min con las diluciones adecuadas de los anticuerpos conjugados anti-SSEA3-Alexa

Fluor 647 (BD Biosciences), anti-CD105-APC, anti-CD90-FITC, anti-CD73-PE, anti-CD29-PE, anti-CD34-PE, anti-CD73-PE, anti-CD45-FITC, anti-HLA-ABC-PE, anti-HLA-DR-PE o alternativamente anti-CD44-PE (todos de BioLegend). En el caso del anticuerpo anti-CD4 conjugado a biotina se realizó la incubación por 30 min y luego las células fueron lavadas con 1 ml de solución de tinción, centrifugadas a 250xg durante 5 min a 4 °C, suspendidas en 100 µl de solución de tinción e incubadas durante 30 min con la dilución adecuada de estreptavidina conjugada al fluorocromo APC (SVA-APC). Finalmente, para todos los casos, las células fueron lavadas con 1 ml de solución de tinción, centrifugadas a 250xg durante 5 min a 4 °C, fijadas con 300 µl de PBS 4 % P/V PFA y conservadas a 4 °C hasta el posterior análisis. Las muestras fueron conservadas (cubiertas de la luz y a 4°C) hasta una semana como máximo y fueron sometidas a citometría de flujo (FACS Cantoll BD y analizadas con el programa DIVA6).

Para la marcación intracelular de las citoquinas intracelulares IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10, las células fueron cultivadas con Brefeldina A (10ng/ml) por 5 horas, luego fijadas mediante incubación durante 15 min en baño de agua-hielo con 300 µl de solución Fix/Perm (eBiosciences, cat # 00552300), lavadas con 1 ml de solución de tinción, centrifugadas a 250xg durante 5 min a 4 °C, lavadas con 700 µl de solución Perm/Wash (eBiosciences, cat # 00552300), centrifugadas a 250xg durante 5 min a 4 °C, permeabilizadas mediante incubación durante 10 min en baño de agua hielo con 100 µl de solución Perm/Wash e incubadas con la dilución adecuada de cada anticuerpo durante 30 min en baño de agua-hielo. Finalmente, las células fueron lavadas con 700 µl de solución Perm/Wash y analizadas en citómetro de flujo, en el mismo día.

7. Métodos de Biología Molecular

7.1. Análisis de la expresión de proteínas mediante Western Blot

Las células de bazo fueron cosechadas en frío, lavadas con PBS frío, centrifugadas a 400xg durante 5 min a 4 °C, lisadas con 50-100 µl de Laemmli buffer 2X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% P/V SDS, 10% glicerol y 5% V/V β -mercaptoetanol) y conservadas a -20 °C hasta su posterior uso. Luego de descongelar las muestras, nos aseguramos de reducir al mínimo restos

celulares mediante 2 pulsos de 60 segundos de ultrasonido a intensidad alta (Bioruptor Next Gen, Dagenode). Las muestras fueron calentadas a 96 °C durante 5 min y sometidas a electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida 10-15% (dependiendo del tamaño de la proteína a revelar) con solución de corrida tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, pH 8.3; glicina 192 mM; SDS 0.1% P/V) a 100 V. Las proteínas resueltas en el gel fueron transferidas sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,2 a 0.45 µm de tamaño de poro (dependiendo la proteína a detectar), mediante electrotransferencia a 100 V por 1 h en solución de transferencia (Tris 25 mM, pH 8.3; glicina 192 mM; SDS 0.05% P/V; metanol 20%V/V). La calidad de la transferencia y la equivalencia entre las masas sembradas en cada calle fue controlada mediante la tinción transitoria con Rojo Ponceau. Las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo (leche en polvo descremada 5% P/V o en el caso de proteínas fosforiladas en BSA 5% P/V; Tween 20 0.05% V/V; Tris 25 mM, pH 8.3; glicina 192 mM; SDS 0.1% P/V) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Luego del bloqueo, las membranas fueron incubadas durante 18-20hs a 4 °C en agitación con la dilución adecuada de alguno de los siguientes anticuerpos primarios en solución de bloqueo: anti-T-bet de ratón (Santa Cruz Laboratories, cat #sc-21749), anti-GAPDH de ratón (Abcam, cat # ab8245-100), anti-SMAD2 de ratón (Cell Signaling Technologies, cat#12584), anti-pSMAD2 de ratón (Cell Signaling Technologies, cat#3108). Luego de 3 lavados sucesivos de 10 min con solución de lavado (Tween 20 0.05 % V/V; Tris 25 mM, pH 8.3; glicina 192 mM; SDS 0.1% P/V), las membranas fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente en agitación con la dilución adecuada del correspondiente anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, en solución de bloqueo: anti-IgG de ratón-HRP (BioRad, cat # 170-6516) o anti-IgG de conejo-HRP (BioRad, cat#170-6515). Finalmente, luego de 3 lavados sucesivos de 10 min con solución de lavado y un cuarto lavado con solución libre de Tween 20, las bandas fueron reveladas mediante la utilización de un kit de detección de quimioluminiscencia (SuperSignal West Dura, Thermo Fisher) y fotografiado en equipos para quimioluminiscencia (G:BOX Chemi XT4) y su cuantificación se realizó por el software ImageJ.

7.2. Extracción de mRNA y PCR

7.2.1. Purificación de RNA

Para aislar RNA se utilizó el reactivo Tri Reagent (MRC) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras se lisaron en el reactivo, que combina fenol y tiocianato de guanidina, inhibiendo la actividad RNAsa. Luego, se agregó cloroformo que permite la separación del homogenato en fases acuosa y orgánica. El RNA se mantiene en la fase acuosa y se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol 70% V/V y se resuspendió en agua MilliQ y se conservaron a -80°C . Para cuantificar el RNA de las muestras, se descongelaron a 55°C durante 15min y se agitaron vigorosamente con vórtex, colocándolas en hielo y se cuantificaron utilizando un Nanodrop (Thermo Scientific). Para controlar la integridad del RNA extraído, se corrieron geles de agarosa 1% P/V.

7.2.2. Transcripción reversa

Para la obtención de DNA copia (cDNA) a partir de RNA, se utilizó la enzima transcriptasa reversa (M-MLV RT, Promega). Se desnaturalizó el RNA incubándolo 5 min a 65°C y pasándolo inmediatamente a hielo para evitar la formación de estructuras secundarias. Luego, se realizó la transcripción reversa (RT) incubando 1 μg de RNA, 500 μM de dNTPs (mezcla equimolar de dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 20 U de RNAsin (Promega), 5 μM de oligo-dT, 300 U de la enzima retrotranscriptasa M-MLV RT y buffer apropiado en un volumen final de 20 μl a 37°C durante 1 h. Se inactivó la enzima incubando 5 min a 95°C .

7.2.3. PCR de punto final

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en 25 μl de volumen final. Se utilizaron 1-2 μl de la reacción de RT que contiene el cDNA que actúa como molde de la reacción de PCR. A cada tubo de reacción se le agregaron: 2,5 μl de buffer de PCR sin MgCl_2 , 1-2 μl de MgCl_2 25 mM, 1 μl de la dilución 10 μM de la mezcla de *primers forward* y *reverse*, 0,5 μl de dNTPs 10 mM (mezcla

equimolar de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, Invitrogen); 0,3 µl de enzima Taq DNA polimerasa (5 U/µl, PBL); H₂O_{dd}. 25 µl volumen final.

Los programas utilizados fueron ajustados según los *primers* utilizados y el amplicón: 5 min a 95°C, 30-40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55-68°C y elongación 68/72°C (1 min/kpb de producto). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio.

7.2.4. PCR en tiempo real o cuantitativa

Todas las reacciones de PCR en tiempo real (*real-time PCR*, qPCR) fueron realizadas en 25µl de volumen final de forma similar a las PCR de tiempo final. Como molde se utilizaron 5µl de una dilución 1:20-50 de la reacción de RT. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo mediante el agregado de Sybr Green 1:30000 (Roche) a la mezcla de reacción, que se realizó en el ciclador CFX96 touch real-time (BioRad).

El programa que se utilizó en todos los casos fue el siguiente: 5min a 95°C, 40 ciclos de 15s a 95°C, 15s a 60-68°C y 15s a 72°C, efectuándose la lectura de la fluorescencia al finalizar cada ciclo. Se realizó una curva de disociación térmica (curva de *melting*) para evaluar la especificidad de la reacción. Además, para determinar que sólo existiera un producto de la reacción, alícuotas de los productos de qPCR fueron analizadas en geles de agarosa 1.5-2% P/V teñidos con bromuro de etidio, corroborándose también la identidad del producto en función del tamaño esperado. Para cada uno de los productos analizados, se realizó una curva de temperatura de hibridación y de concentración de magnesio para determinar las condiciones óptimas de reacción. En cada experimento se realizó una curva de calibración con diluciones al medio seriadas a partir de una mezcla de los cDNA de las reacciones de RT, para evaluar la eficiencia de la reacción de PCR y estimar la cantidad inicial relativa de molde en cada muestra. Las cantidades relativas iniciales del producto de interés fueron normalizadas en cada caso a los valores obtenidos para el cDNA de *Hprt* por el método de Ct.

- Primers utilizados

Se utilizaron los pares de *primers* detallados en la Tabla 1. Se diseñaron utilizando los programas Beacon Designer y Primer3, las bases de datos

PrimerBank (Harvard University) o MousePrimerDepot (NIH) o secuencias previamente reportadas en bibliografía.

Nombre del Gen	Secuencias	
human a-fetoprotein	forward	5'-CCACTTGTTGCCAACTCAGTGA-3'
	reverse	5'-TGCAGGAGGGACATATGTTTCA-3'
human MAP-2	forward	5'-ACTACCAGTTTCACACCCCCTTT-3'
	reverse	5'-AAGGGTGCAGGAGACACAGATAC-3'
human nkx2.5	forward	5'- CCCACGCCCTTCTCAGTCAA-3'
	reverse	5'-GTAGGCCTCTGGCTTGAAGG-3'
HPRT	forward	5'-CTCCGTTATGGCGACCCGCAG-3'
	reverse	5'-GGCTACAATGTGATGGCCTCCCA-3'
hGAPDH	forward	5'-TACTAGCGGTTTTACGGGCG-3'
	reverse	5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3'
mouse GATA-3	forward	5'-CTACCGGGTTCGGATGTAAGTC-3'
	reverse	5'-GTTACACACTCCCTGCCTTCT-3'
mouse IL-10	forward	5'-CTGGACAACATACTGCTAACCG-3'
	reverse	5'-ATTTCCGATAAGGCTTGAAC-3'

Tabla 1 | Listado de las secuencias de los *primers* empleados para el estudio transcripcional de diferentes genes de interés. En todos los casos se muestra el nombre del gen y las secuencias de cada *primer* en sentido 5' a 3'.

Los pares de *primers* fueron analizados utilizando el Primer-BLAST para evaluar su especificidad. En el caso de los *primers* utilizados para qPCR, se eligieron secuencias que hibridaran en exones distintos (Genome Browser, UCSD) y amplificaran productos entre 75-300 pb.

8. Análisis de los datos estadísticos

Los datos se presentan como la media \pm desvío estándar de la media (SEM por sus siglas en inglés) de al menos tres experimentos independientes, a menos que se indique de otro modo. El programa GraphPad Prism fue usado para el análisis estadístico de los datos. Pruebas *t* de Student fueron utilizadas para comparar dos grupos experimentales. Para comparaciones múltiples, se efectuó un análisis de la varianza (ANOVA) de uno o dos factores. Se

realizaron pruebas *post hoc* de Tukey o Bonferroni para determinar los grupos que presentaban diferencias significativas entre sí. En todos los casos se consideró un valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

RESULTADOS

CAPITULO I: Obtención y caracterización de células Muse-AT

Condiciones severas de estrés activan una nueva población de células derivadas de tejido adiposo humano

Las células madre se encuentran en estado quiescente en el tejido residente; cuando reciben señales particulares del microambiente generadas por algún tipo de estrés o daño tisular, éstas pueden activarse y liberarse de su nicho [95]. A partir de esta premisa, se crearon las condiciones de estrés celular para obtener células Muse-AT a partir del material de descarte proveniente de lipoaspiración de tejido adiposo humano. Este material de liposucción provino, en la mayoría de los casos, de cirugías estéticas de la zona abdominal y flancos, aunque en algunas pocas ocasiones el material proveniente de la liposucción de muslos también fue procesado. Los resultados obtenidos y presentados aquí, no fueron discriminados según la zona de liposucción del tejido. Más del 90% de las liposucciones fueron obtenidas de mujeres sanas, en un rango de edad entre los 20-65 años. Las muestras fueron provistas por el servicio de Cirugía del Hospital Austral (Derqui, Pcia. de Buenos Aires) luego del Consentimiento Informado rubricado por el paciente y médico interviniente. El trabajo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Austral. Se tomó como criterio de exclusión, los pacientes con cualquier tipo de enfermedades y medicación concomitante que pudiera generar algún sesgo en la interpretación de los resultados (por ej., curso de enfermedad infecciosa, inflamatoria crónica, etc.)

Las células Muse-AT se obtuvieron siguiendo un protocolo previamente descrito [92], con algunas modificaciones. Este procedimiento, que requiere aproximadamente 20h, nos permitió optimizar el protocolo hasta alcanzar un rendimiento promedio de 2×10^7 células ($\pm 0.25 \times 10^7$; n = 10) por cada 100 g de material de lipoaspiración, evitando la necesidad de separar células por la

técnicas habituales (como por ej., separación por citometría de flujo) procedimientos genéticos y largos períodos de cultivo (Figura 7- esquema del método de obtención). El material lipoaspirado fue sometido a una incubación prolongada con colagenasa, en un medio de cultivo (DMEM) sin suero, baja temperatura (4-5°C) y condiciones de hipoxia, resultando en una población homogénea de células observables en el microscopio de luz visible y con una morfología que se asemeja a las ya descritas en células Muse provenientes de piel o médula ósea humanas [92]. Las células Muse-AT mostraron tamaño homogéneo (~10-15 μm de diámetro) y se mantuvieron en suspensión como células individuales indiferenciadas, al cultivarse en placas de cultivo de plástico de baja adherencia. Luego de 24h en cultivo, las células Muse-AT comenzaron a formar espontáneamente aglomerados de células (*Ver video en el disco adjunto*; representativo de la formación de clusters observable para todas las muestras procesadas). Estos clusters de células resultaron muy similares a los cuerpos embrioides derivados de células ES y células Muse derivadas de células de médula ósea y fibroblastos de piel [79, 90]. Algunos reportes previos, sugieren que el tamaño de los aglomerados celulares limita el número de divisiones celulares de las células Muse [79, 92]. Luego de 72h en cultivo, las células Muse-AT formaron aglomerados muy densos que disminuyen drásticamente la división celular por contacto, hecho evidente cuando estos aglomerados alcanzaron un diámetro promedio aproximado de 50-200 μm (Figura 8A).

Después de 5 días de cultivo en plástico no adherente, las células Muse-AT mostraron una organización ultraestructural similar a la de las células ES, con grandes núcleos eucromáticos y un citoplasma reducido observados por microscopía electrónica de transmisión. Además, las células Muse-AT exhibieron pocas extensiones de la superficie celular (Figura 8B).

Para evaluar si las células Muse-AT poseen capacidad de auto-renovación, propiedad característica de las células madre, se comenzó un cultivo de células individuales en suspensión. A las 72h, observamos la formación de aglomerados (primer ciclo). Procedimos a disgregar los aglomerados mecánicamente, obteniendo células individuales, se transfirieron a una nueva placa de cultivo no adherente y se las cultivó por otras 72h. Estas

células formaron nuevos aglomerados, los cuales denominamos pertenecer al segundo ciclo y así, sucesivamente fuimos repitiendo el procedimiento (Figura 8C). Las células formadoras de los aglomerados sobreviven a este procedimiento por un máximo de cuatro a cinco ciclos sucesivos, momento en el que se vuelven resistentes a la disociación mecánica resultante en células individuales (datos no mostrados). La realización de los procedimientos descritos mostraron que sólo las células Muse-AT sobrevivieron al estrés celular provocado en su proceso de aislamiento, y todas las demás células presentes en el tejido adiposo (ej.: células estromales derivadas de tejido adiposo (ASC), pre-adipocitos, células endoteliales, macrófagos y fibroblastos) no resistieron a las condiciones de estrés y murieron. Además, las células Muse-AT mostraron características morfológicas, ultraestructurales y de auto-renovación características de las descritas para las células ES, pero a diferencia de estas últimas, con un ciclo de proliferación limitada *in vitro*.

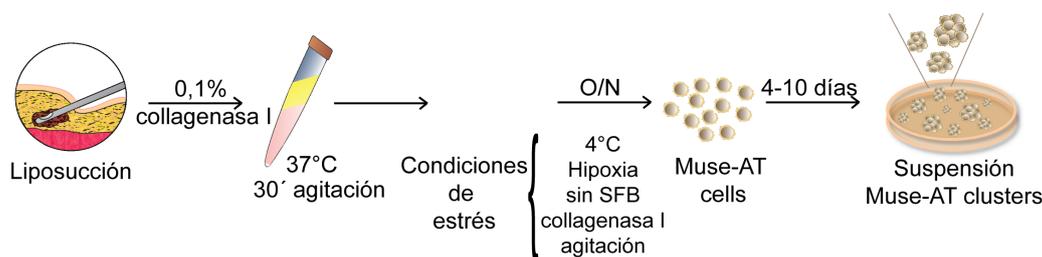


FIGURA 7: Esquema representativo del protocolo de obtención de células Muse-AT. Las células Muse-AT se obtuvieron luego de la digestión con colagenasa I y bajo condiciones de estrés severas. La formación de aglomerados de células Muse-AT se generaron entre los días 4-10 al ser sembradas en placas de cultivo no adherentes. Abreviaturas: SFB, suero bovino fetal; O/N, durante la noche.

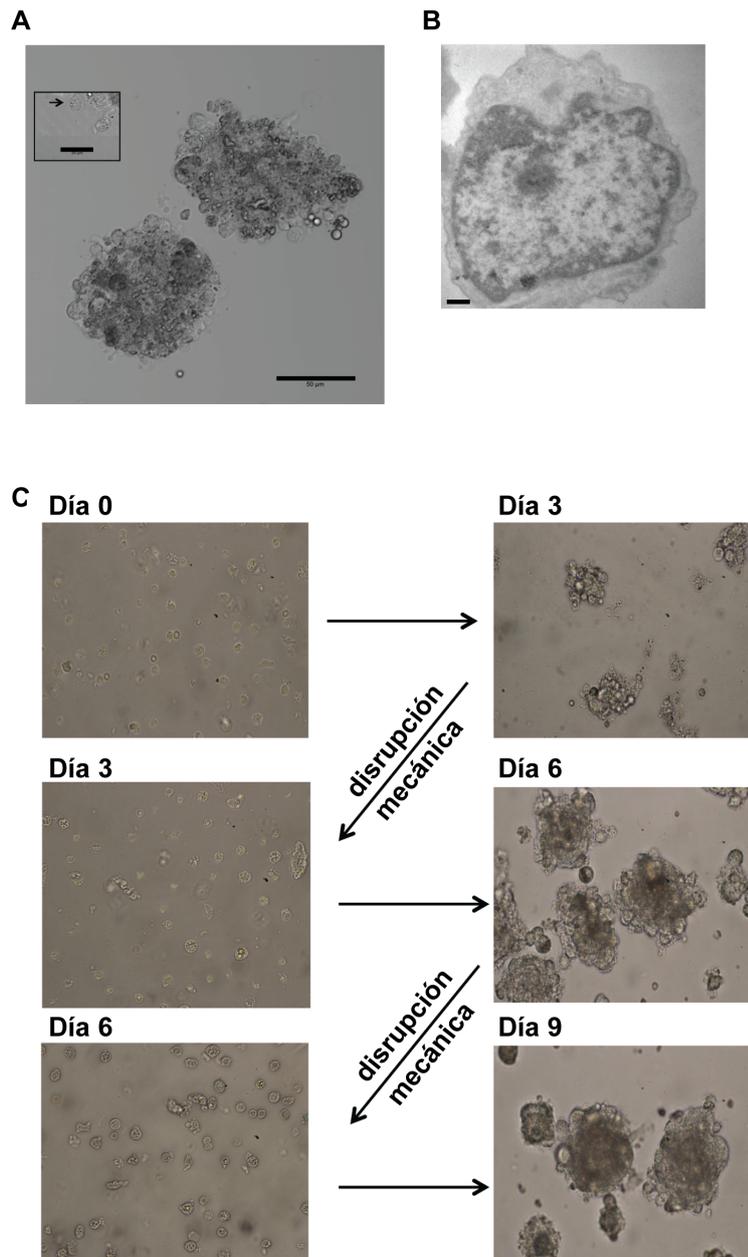


FIGURA 8: Cultivo de células Muse-AT derivadas de liposucción. (A): Las células Muse-AT formaron aglomerados de 50-200 µm de diámetro durante el cultivo en suspensión. Barra de escala = 50 µm. En el recuadro (izquierda/arriba), la flecha indica una única célula Muse-AT en el borde de un aglomerado. Barra de escala = 20 µm. (B): Microscopía electrónica de transmisión de una célula Muse-AT representativa después de 5 días de cultivo que muestra una gran estructura nuclear y un pequeño citoplasma. Barra de escala = 500nm. (C): Al obtener las células Muse-AT se sembraron en placas no adherentes (día 0) y luego de 3 días de cultivo se formaron agregados (día 3, ciclo 1). Se disgregaron mecánicamente y volvieron a formar agregados, alcanzando 50-200 µm de diámetro durante el segundo y tercer ciclo de crecimiento. Se muestran aglomerados de una preparación de Muse-AT representativa de al menos 15 preparaciones.

Las células Muse-AT expresan marcadores de pluripotencialidad

Las células Muse derivadas de células de médula ósea y fibroblastos dérmicos expresan marcadores de pluripotencialidad [79, 90]. Por lo tanto, nos propusimos determinar si las células Muse-AT también los expresan. Para ello, realizamos microscopía de inmunofluorescencia de las células Muse-AT cultivadas en suspensión durante 10 días. Observamos que las Muse-AT agrupadas en clusters (aglomerados) expresan los marcadores de pluripotencia ensayados (Figura 9A – imágenes de células aglomeradas a día 10 de cultivo). Se encontró la expresión de Oct4 mayormente localizada en el núcleo, mientras que TRA1-60 Y SSEA-4 se detectó principalmente en la membrana celular. En el caso de Sox2 y Nanog, la marcación fue citoplasmática. Además, encontramos que los marcadores de pluripotencia se expresan tempranamente, inmediatamente después del aislamiento (día 0) aunque en niveles de expresión más bajos en comparación con los hallados a los 5 y 10 días de cultivo (Figura 9B).

Merece especial atención la expresión del marcador de superficie SSEA-3 cuya expresión diferencial en células Muse, derivadas de piel y médula ósea, ha sido utilizado para su aislamiento a partir de células mesenquimales [89]. Observamos la expresión de SSEA-3 en la membrana celular de las Muse-AT cultivadas en aglomerados durante 7 a 10 días. Mediante el uso de citometría de flujo encontramos que el cultivo en cluster de células Muse-AT expresan un 57,7% \pm 11,8% (n=3, experimentos independientes) de SSEA-3 en su superficie. Este hallazgo fue también confirmado mediante microscopía de inmunofluorescencia (Figura 10 A-B). Al mismo tiempo determinamos SSEA-3 en ASC y comparamos la expresión de este marcador entre estas células y las Muse-AT. Solo una pequeña fracción de las distintas preparaciones de ASC (n=5), aproximadamente un 10% expresan SSEA-3 en su superficie (Figura 10A).

Para lograr una mejor caracterización inmuno fenotípica determinamos mediante citometría de flujo que las células Muse-AT que son SSEA-3⁺

también expresan los siguientes marcadores de superficie: CD105 (74%±10.8%), CD29 (68.4%±4.0%), CD73 (84.5%±6.0%), HLA-ABC (48.7%±2.6 %), CD44 (26%±9.0%) y CD90 (45.5%±2.4%) y baja expresión de CD45, CD34 y HLA-DR (n = 3, experimentos independientes) (Figura 10C). Por lo tanto, las células Muse-AT crecidas en cultivo en clusters presentan en superficie niveles elevados SSEA-3, y tienen un patrón de expresión de clusters de diferenciación similar al de las ASC [95].

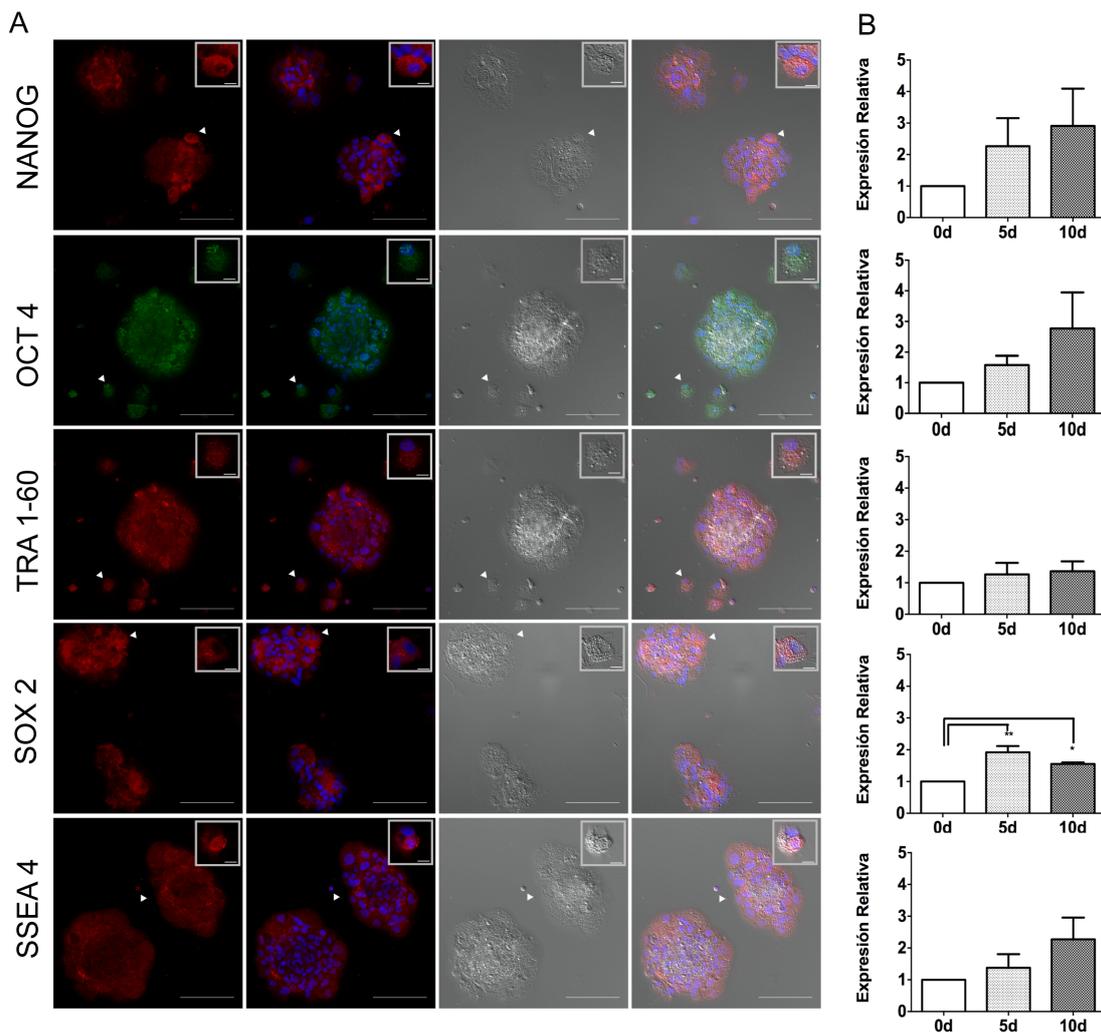


FIGURA 9: Expresión de marcadores de células madre pluripotentes en aglomerados de células Muse-AT. (A): Inmunotinción representativa de marcadores de pluripotencia, Nanog, OCT4, TRA1-60, Sox-2 y SSEA-4 de células Muse-AT aglomeradas. Barra de escala = 100 µm. Las puntas de flecha blancas indican células individuales que se muestran aumentadas en la parte superior derecha de cada imagen. Barra de escala = 5 µm. (B): cuantificación de inmunofluorescencia de marcadores pluripotentes. Las barras de error indican el error estándar. (*), p<0,05; (**), p<0,005; n = 3 muestras analizadas. Abreviaturas: d, día.

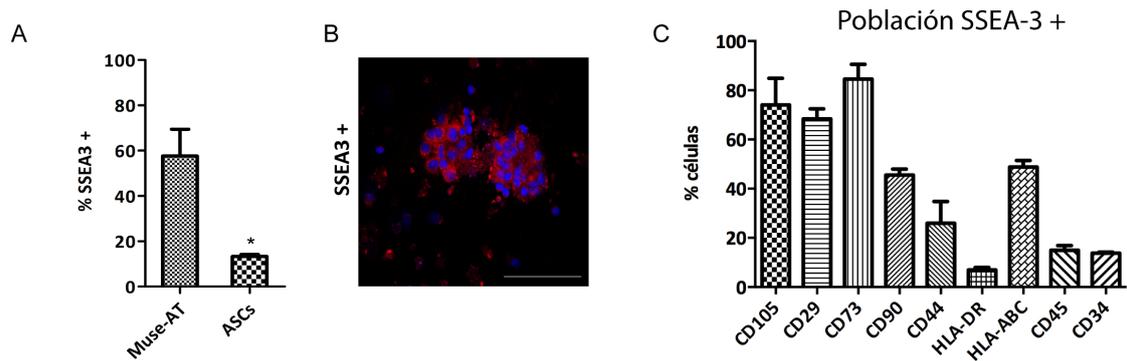


FIGURA 10: Expresión del marcador característico de células Muse (A): Por citometría de flujo, observamos una mayor expresión de SSEA-3 en las células Muse-AT en comparación con ASC. (B): Por la tinción de inmunofluorescencia se confirmó la expresión de SSEA-3 en aglomerados de células Muse-AT. Barra de escala = 100 μ m. (C): La citometría de varios marcadores de superficie reveló el inmuno-fenotipo de las células Muse-AT. La barra de error indica el error estándar. (*), $p < 0,05$; $n = 3$ muestras analizadas. Abreviaturas: ASCs, células estromales derivadas de tejido adiposo; d, día; SSEA, antígeno embrionario en estadio específico.

Las células Muse-AT poseen la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales primitivas

Otra característica distintiva de las células pluripotentes es su capacidad de diferenciación hacia los distintos linajes germinales. Por lo tanto, realizamos experimentos con el objetivo de investigar la capacidad de las células Muse-AT de diferenciarse en tejidos de las tres líneas germinales principales. Para ello, las células Muse-AT se sembraron en placas de plástico adherentes y se cultivaron en DMEM con 20% de SFB sin la adición de factores diferenciadores; éstas se adhirieron a la superficie observándose al microscopio de luz visible cambios morfológicos característicos, luego de 7 días de cultivo. La diferenciación espontánea de células Muse-AT en los linajes mesodérmico, endodérmico y ectodérmico se evaluó mediante amplificación por RT-PCR de los genes Nkx2.5, α -fetoproteína y MAP-2, respectivamente (Figura 11A). De manera similar, después de cultivar células Muse-AT estimuladas con los factores de diferenciación apropiados para cada tejido, las células resultantes luego 7 a 14 días de estímulos fueron sometidas al análisis

de marcadores específicos de las tres capas germinales: α -fetoproteína (endodermo), SMA (mesodermo) y MAP-2 (ectodermo) como se reveló mediante la observación por microscopía de inmunofluorescencia (Figura 11B).

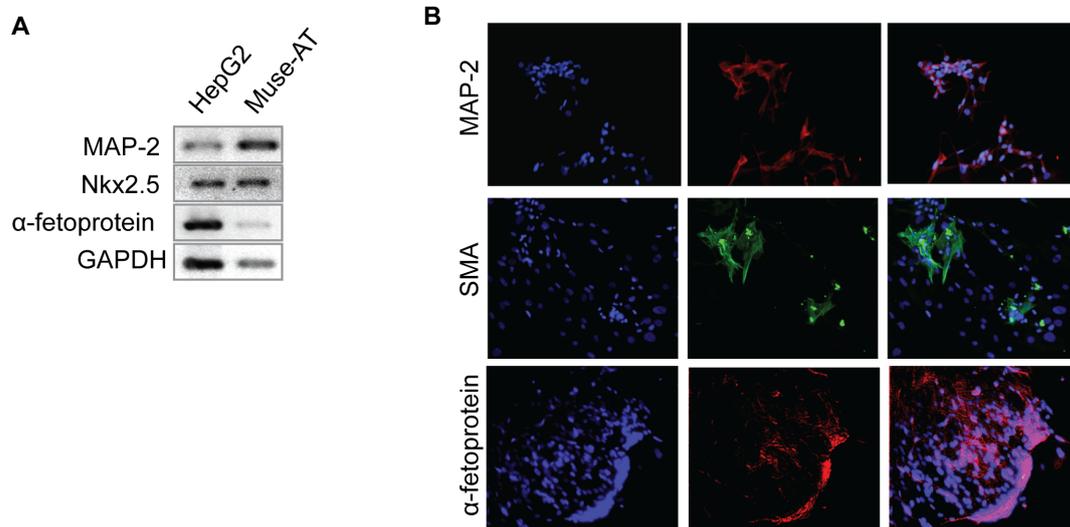


FIGURA 11: Las células Muse-AT se diferencian hacia los tres linajes germinales primitivos. (A): las células Muse-AT cultivadas en placas de plástico adherentes tienen la capacidad de diferenciarse espontáneamente en los linajes: mesodérmico, endodérmico y ectodérmico, se determinó la expresión de los ARNm de Nkx2.5, α -fetoproteína y MAP-2 respectivamente, determinados mediante RealTime-PCR. (B): en presencia de medios de cultivo conteniendo factores de diferenciación específicos, la tinción de inmunofluorescencia reveló positividad para los marcadores de hepatocito (α -fetoproteína, rojo), miocito (SMA, verde) y neurona (MAP-2, rojo). Los núcleos se tiñeron con 49,6-diamidino-2 fenilindol (azul). Aumento original x200. Las imágenes son representaciones de resultados obtenidos de 4 muestras de células Muse-AT independientes. Abreviaturas: RealTime-PCR, reacción cualitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; MAP-2, proteína 2 asociada a microtúbulos; Nkx2.5, NK2 homeobox 5; SMA, actina de músculo liso.

Las células Muse-AT no forman teratoma y muestran estabilidad de su cariotipo

Cualquier tipo celular estudiado con intenciones de empleo en terapia celular no debería demostrar formación de tumores y/o teratomas luego de su trasplante. Para realizar el ensayo de teratogénesis, inyectamos células Muse-AT en ratones inmunodeficientes (NODscid) y evaluamos su posible actividad

teratogénica. El trasplante (1×10^6 células) de la línea celular embrionaria de ratón P19 fue utilizada como control positivo inyectándose en los testículos de ratones NODscid. A los 21 días aproximadamente, los teratocarcinomas fueron detectados a simple vista; momento en que los ratones fueron sacrificados por razones éticas. Contrariamente, las células Muse-AT inyectadas (1×10^6) en el testículo derecho de ratones NODscid no desarrollaron teratoma durante los 6 meses de seguimiento (Figura 12A). Inyectamos en los testículos contralaterales (izquierdo) de estos mismos ratones el volumen correspondiente del vehículo de las células Muse-AT (50 μ l de PBS), como control. Los ratones fueron sacrificados a distintos tiempos post-inyección (30; 60; 120 y 180 días post-inyección) y se disecaron ambos testículos para su análisis histológico. En la figura 12B se muestra la estructura tisular normal representativa de varias preparaciones histológicas mediante la observación microscópica del tejido testicular teñido con H&E.

Para el análisis del cariotipo de las células Muse-AT empleamos preparaciones provenientes de liposucciones provenientes de tres donantes diferentes. Luego de su cultivo durante 9 días en placas de plástico no adherente, se realizó el estudio del cariotipo observándose que conservaban el número normal de cromosomas y sin cambios aparentes en la morfología microscópica. En la figura 12C, se muestra un cariotipo representativo.

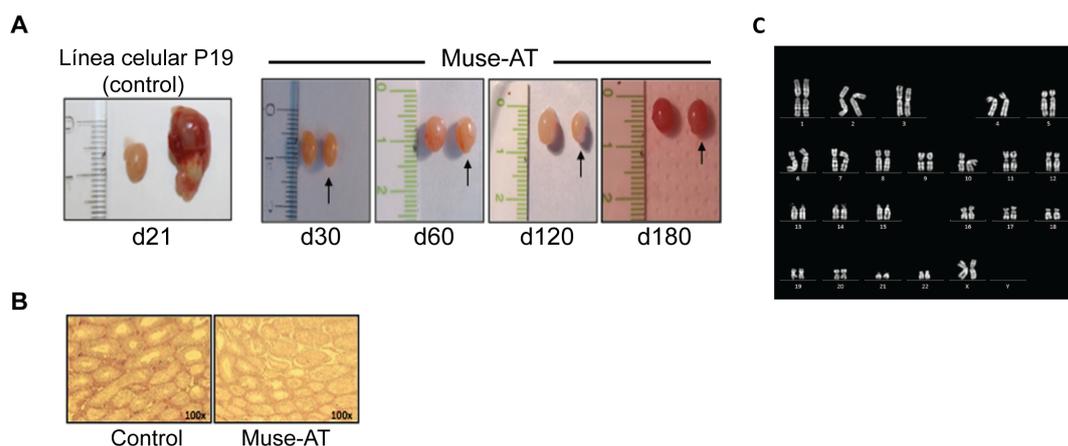


FIGURA 12: Ensayo de teratogénesis negativo y estabilidad de células Muse-AT. (A): se inyectaron células Muse-AT (10^6) i.t. en ratones NODscid. Los ratones trasplantados se controlaron semanalmente observando posible aparición de tumores. P19, una línea celular de carcinoma embrionario se inyectó (10^6) como control. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores por su tamaño, se observaron a simple

vista. Los ratones NOD $scid$ inyectados con células Muse-AT no desarrollaron teratoma durante el período observado (hasta 6 meses). (B): la tinción con H&E de los testículos mostró una estructura tisular normal en los ratones NOD $scid$ inyectados con células Muse-AT. (C): cariotipo normal representativo de células Muse-AT luego de 9 días de cultivo en suspensión. Abreviaturas: d, día; i.t., intratesticular.

Las células Muse-AT expresan espontáneamente altos niveles de TGF- β 1

TGF- β 1 es una citoquina multifuncional a la cual se le han atribuido las funciones de promover o suprimir células tumorales, y también algunas propiedades de atenuar una respuesta inmune. Diversos estudios han reportado que la capacidad inmunoreguladora de algunos tipos de células madre podría estar mediada por TGF- β 1. Por lo tanto, para determinar si las Muse-AT expresan TGF- β 1 empleamos un anticuerpo específico dirigido a esta citoquina humana en preparaciones de clusters de células Muse-AT con evaluaciones durante el curso del cultivo en suspensión. Mediante microscopía de inmunofluorescencia confocal encontramos que la expresión espontánea de TGF- β 1 incrementó en función del tiempo en los clusters de células Muse-AT (Figura 13A).

Determinamos también la expresión de TGF- β 1 en ASC, la cual ya ha sido reportada por otros investigadores [81]. Sorprendentemente, las células Muse-AT expresan espontáneamente mayores niveles de TGF- β 1 en comparación con las ASC; estas últimas mantenidas en cultivo entre pasajes 3-4. Interesantemente, encontramos que la expresión espontánea de TGF- β 1 aumentó en función del tiempo del cultivo de los clusters de las células Muse-AT. La cuantificación de su expresión se determinó para distintas preparaciones de células Muse-AT (n=5), como se observa en la Figura 13B, mostrando un incremento constante hasta los 10 días en cultivo. La expresión espontánea de TGF- β 1 disminuyó progresivamente durante periodos mayores a 15 días en cultivo (datos no mostrados). De acuerdo con esta observación, los niveles de ARNm de TGF- β 1 mostraron un pico de expresión al día 5

(cuatro veces de aumento aproximadamente, en comparación al día 0) seguido de una disminución significativa al día 10 de cultivo (Figura 13C).

Además de los efectos pleiotrópicos antes descritos, TGF- β 1 también juega un rol crítico en el mantenimiento del estado pluripotente de las células ES al inducir la expresión de factores de transcripción como Nanog, Oct4, Sox2 y SSEA-4. Dependiendo del ambiente, puede generar cambios en la expresión de éstos factores, induciendo a estadios tempranos de diferenciación [106]. Notablemente, observamos por inmunofluorescencia que las células Muse-AT expresan en forma elevada el factor de pluripotencialidad SSEA-4 al mismo tiempo que TGF- β 1 (día 10 de cultivo) indicando que TGF- β 1 podría ser uno de los responsables del mantenimiento de pluripotencialidad de las células Muse-AT (Figura 13D). Además, las células Muse-AT expresan en su membrana el receptor TGF- β IR por lo que es posible especular que TGF- β 1 posee un rol autócrino/parácrino manteniendo el estado de pluripotencialidad de las Muse-AT durante un periodo de tiempo determinado (Figura 13E).

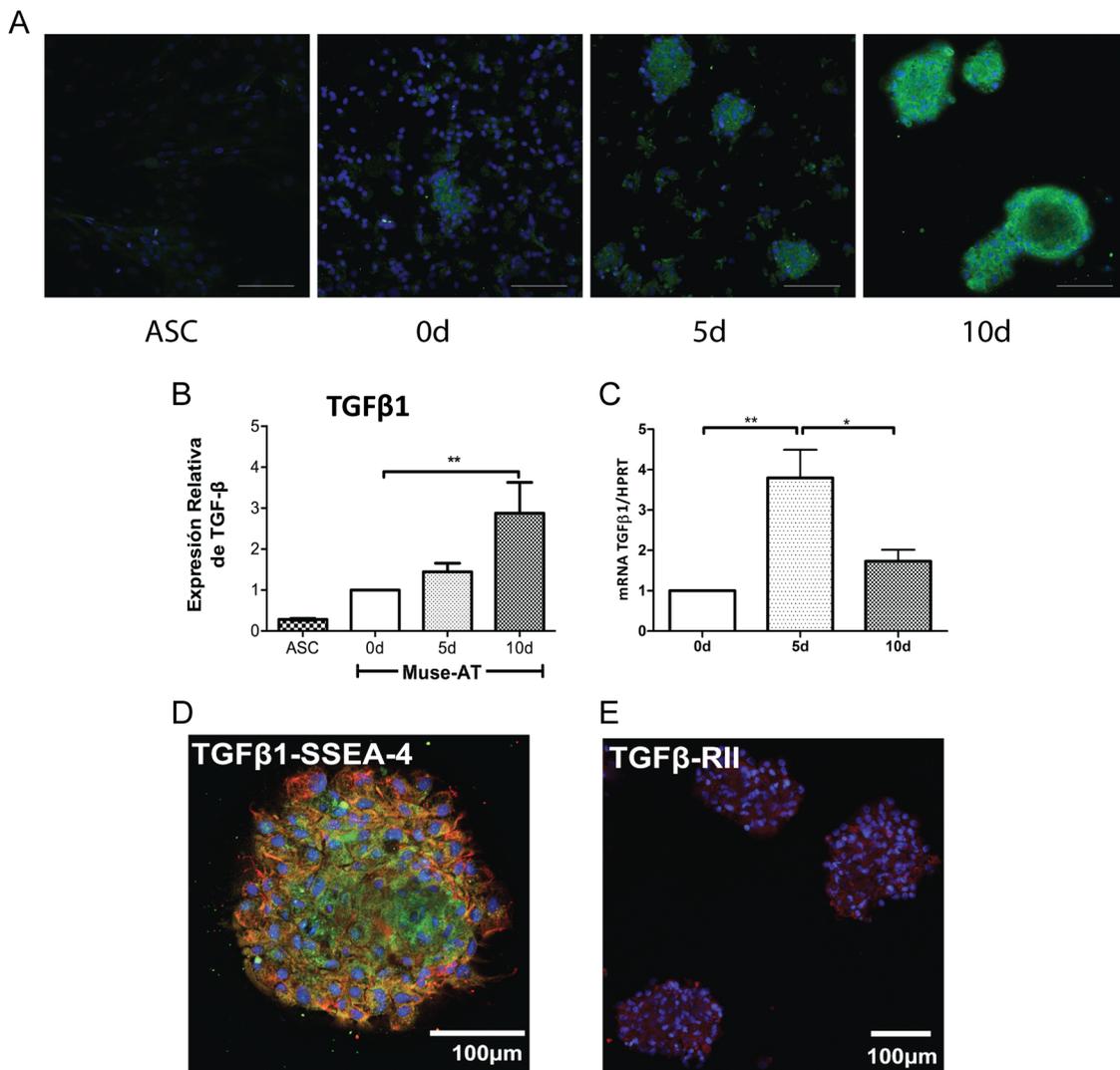


FIGURA 13: Expresión espontánea de TGF-β1 en clusters de células Muse-AT. (A): tinción de inmunofluorescencia de TGF-β1 a diferentes tiempos de cultivo. (B): la cuantificación de la inmunofluorescencia mostró una expresión máxima de TGF-β1 a los 10 días de cultivo. (C): los niveles de expresión de ARNm de TGF-β1 de los aglomerados de células Muse-AT a los 0; 5 y 10 días de cultivo se determinaron mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Los valores de Ct se normalizaron para la expresión del gen HPRT, y los datos se expresan en relación con los valores obtenidos al día 0. (D) doble marcación por inmunofluorescencia de TGF-β1 y SSEA-4 (marcador de células pluripotentes) al día 10 de cultivo. (E) tinción de inmunofluorescencia de TGF-β1RII. Las barras de error indican el error estándar. (*), $p < 0,05$; (**), $p < 0,005$; $n = 5$. Abreviaturas: ASC, células estromales derivadas de tejido adiposo; d, día; TGF-β1, factor de crecimiento transformante β1.

Conclusión capítulo I

Con el análisis del conjunto de los resultados presentados en este primer capítulo, concluimos que el método de obtención de las células Muse-AT que optimizamos en nuestro laboratorio, es un procedimiento sencillo a saber, no requiere aislamientos diferenciales por citometría de flujo, es poco invasivo y de muy bajo costo. También, permite obtener un mayor número de células en comparación con otros procedimientos de obtención a partir de médula ósea u otros tejidos, como ha sido reportado por otros autores, hasta el momento [95]. Además confirmamos que las Muse-AT son células pluripotentes, con capacidad de diferenciarse a las tres capas germinales primitivas. A diferencia de células pluripotentes como ESC y iPS, las células Muse-AT poseen una gran ventaja, para un posible empleo terapéutico, por no formar teratomas y conservar un cariotipo normal en cultivo.

CAPITULO II: Capacidad de las células Muse-AT de modular la actividad de células inmunes

Primeras evidencias de los efectos inmunomoduladores de las células Muse-AT sobre macrófagos

Durante el desarrollo de la diabetes tipo 1 los macrófagos infiltran los islotes pancreáticos, contribuyendo así a la destrucción de las células β por distintos componentes celulares del sistema inmune. Los macrófagos activados liberan altas concentraciones de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α , cuyos niveles circulantes frecuentemente se encuentran elevados en algunos estadios en la diabetes tipo 1. Por lo tanto, para investigar la influencia de las células Muse-AT en la respuesta inmune, empleamos la línea celular de macrófagos murino RAW264.7 y posteriormente, cultivos primarios de macrófagos peritoneales murinos. Está ampliamente establecido el protocolo metodológico para lograr la activación de macrófagos *in vitro* mediante la estimulación con LPS [107].

Para esclarecer sobre la capacidad de las células Muse-AT de controlar la respuesta de los macrófagos ante un estímulo inflamatorio, desafiamos a estos con LPS y determinamos como parámetro de respuesta la secreción de TNF- α . Primeramente, realizamos co-cultivos de células RAW 264.7 estimuladas con LPS con cantidades variables de células Muse-AT. Las células RAW264.7 responden al estímulo de 200ng/ml de LPS secretando una significativa cantidad de TNF- α al medio de cultivo luego de 16h. En presencia de células Muse-AT la secreción de TNF- α se encontró disminuida (datos no mostrados). Para determinar si esta modulación en la secreción de TNF- α estaba mediada por agentes solubles liberados por las células Muse-AT o si era necesario el contacto entre células Muse-AT y los macrófagos, incubamos estas dos poblaciones separadas por una membrana de tamaño de poro de 3 μ m, en Cámara de Boyden (conocida también como sistema de transwells).

Las células RAW264.7 sembradas en el fondo de una placa de 24-wells, fueron estimuladas con LPS o no (control), y las células Muse-AT en la parte superior en diferentes densidades durante 16h, como se indica en el esquema de la Figura 4 (en sección Materiales y Métodos). Observamos nuevamente una notable disminución de la secreción de TNF- α en presencia de las células Muse-AT. Al mismo tiempo, determinamos que la relación células RAW264.7:Muse-AT de 10:1 es la óptima para lograr una máxima inhibición de TNF- α secretado por los macrófagos (~ 4 veces respecto al control, $p < 0.0005$) (Figura 14A). Esto nos indica que existiría al menos un factor soluble, secretado por las células Muse-AT, responsable del efecto inhibitorio sobre la secreción de TNF- α por macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS.

Realizamos una serie de experimentos para demostrar si factores solubles secretados por Muse-AT son los responsables de controlar la secreción de TNF- α por los macrófagos. Para ello, las células RAW264.7 fueron tratadas con distintas diluciones de medio condicionado (CM) provenientes de células Muse-AT, y desafiadas o no, con LPS durante 16h. Observamos una disminución de la secreción de TNF- α dependiente de la dilución del medio condicionado de Muse-AT. Al aumentar la dilución, se pierde el efecto de disminución de TNF- α (datos no mostrados). La concentración 1/5 del CM (CM_{1/5}), arrojó resultados significativos en cuanto a la disminución de la secreción de TNF- α por parte de las células RAW264.7 estimuladas con LPS ($p < 0,005$ vs LPS; Figura 14B) y representa el agregado de un 20% del CM al medio fresco de cultivo. También, observamos que la secreción de TNF- α no cambió cuando las células RAW264.7 fueron incubadas con una dilución CM_{1/5} proveniente de las células Muse-AT (Figura 14B).

Con el objetivo de investigar si TGF- β 1 podría ser uno de los factores solubles responsables de los efectos observados, incorporamos en los cultivos de las células RAW264.7 una pequeña molécula inhibidora de la cascada de señalización de TGF- β , denominada SB-431542 (SB). Cuando SB fue adicionada a los cultivos de células RAW264.7 estimuladas con LPS, el CM_{1/5} no disminuyó la secreción de TNF- α (Figura 14B).

Por otra parte, la producción de IL-10 por parte de las células RAW264.7 no fue detectada mediante el ELISA empleado (límite de detección 31,25 pg/ml).

Las células RAW264.7 son una línea celular inmortalizada. Por lo tanto, para confirmar estos resultados con una fuente mas confiable de macrófagos, aislamos macrófagos peritoneales frescos provenientes de ratones C57BL/6j ($M\phi$). Con estos $M\phi$ observamos resultados similares a los obtenidos con la línea celular RAW264.7 empleando el $CM_{1/5}$ de células Muse-AT.

En la Figura 14C se observa que los $M\phi$ estimulados con LPS secretan altas concentraciones de $TNF-\alpha$. Bajo estas condiciones y tratados con $CM_{1/5}$ proveniente de células Muse-AT la secreción de $TNF-\alpha$ disminuye ($p < 0,05$ vs LPS; Figura 14C). La incorporación de SB en el medio restableció los valores de secreción de $TNF-\alpha$, indicando nuevamente que cuando se inhibe la vía de señalización de $TGF-\beta 1$ se pierden los efectos del CM proveniente de células Muse-AT. La estimulación de los $M\phi$ por LPS induce la secreción de IL-10 (Figura 14D). El CM proveniente de células Muse-AT no modifica la secreción de IL-10 por parte de los $M\phi$ en condiciones basales ni ante su tratamiento con LPS.

En todos los casos se determinó la concentración de $TNF-\alpha$ secretado por los macrófagos mediante ELISA analizando los sobrenadantes celulares luego de 16h de incubación.

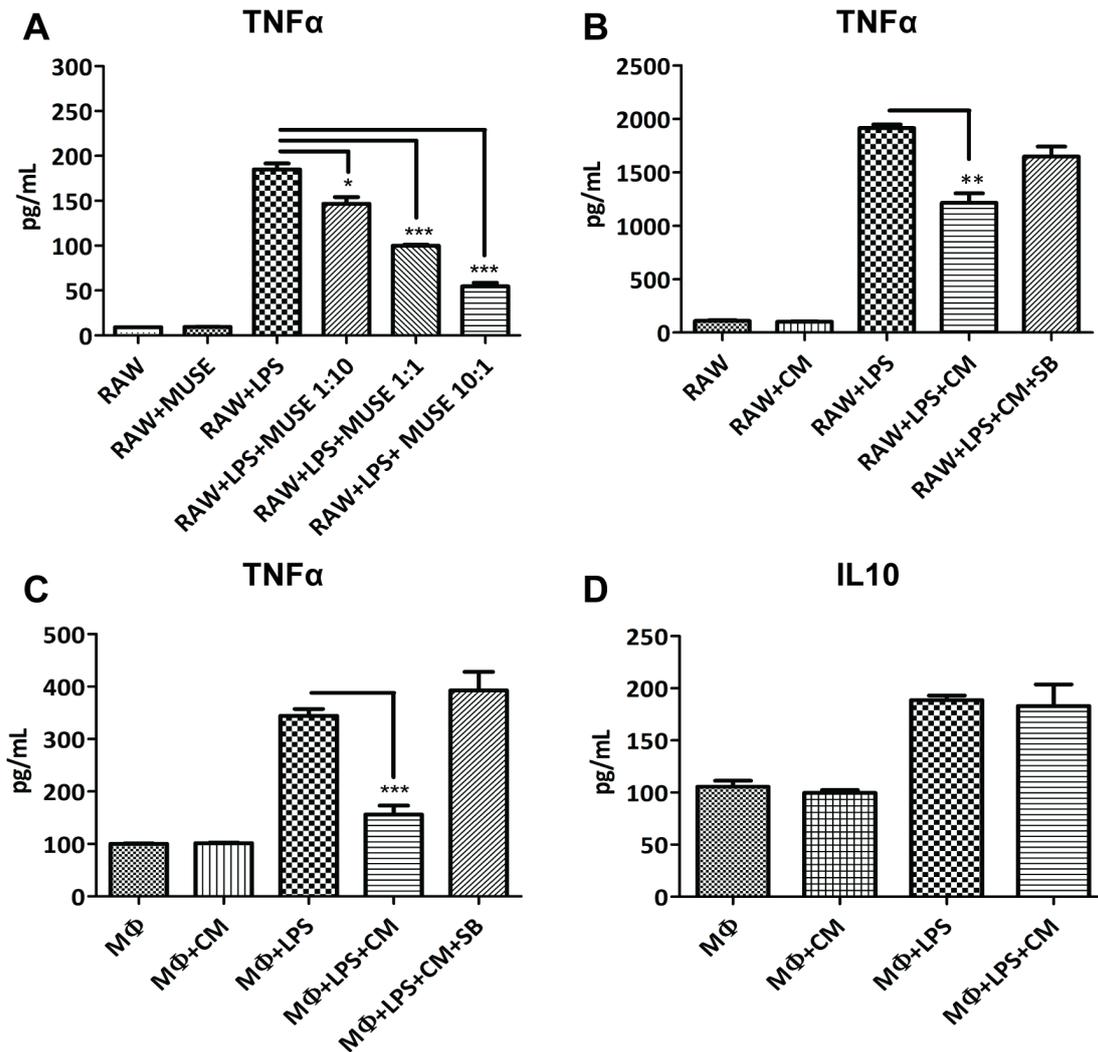


FIGURA 14: Efectos de las células Muse-AT en macrófagos estimulados con LPS. (A): co-cultivo de células Muse-AT con la línea celular de macrófagos RAW264.7. Las células RAW se sembraron en la cámara inferior de una placa Transwell y se estimularon con LPS durante 20 minutos. Se eliminó el LPS lavando las células y luego se cultivaron células Muse-AT sobre una membrana de tamaño de poro de 3 μ m (RAW / Muse-AT en una proporción de 1:10, 1: 1 y 10: 1) luego se evaluó la secreción de TNF- α (B): efectos del CM_{1/5} de células Muse-AT en células RAW estimuladas con LPS con y sin SB 431542 (SB; 10 ng/ml), en la secreción de TNF- α . (C, D): M ϕ peritoneales murinos recientemente aislados, estimulados con LPS. (C) Efecto del CM_{1/5} de las células Muse-AT con y sin SB, sobre la secreción de TNF- α (D) se evaluó la aplicación de CM_{1/5} de células Muse-AT sobre la secreción de IL-10. En todos los casos, se determinaron las concentraciones de citoquinas de los sobrenadantes luego de 16h de cultivo por el método de ELISA. Se indican las concentraciones promedio de al menos 3 experimentos independientes y CM de 5 pacientes distintos. Las barras de error indican el error estándar. (*), p<0,05; (**), p<0,005; (***), p<0,0005. Abreviaturas: CM, medio condicionado; IL, interleuquina; LPS, lipopolisacárido; M ϕ , macrófagos; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α ; MUSE, Muse-AT.

Las células Muse-AT poseen capacidad de modular la respuesta antigénica específica de linfocitos T diabetogénicos

En base a los resultados hasta aquí descritos, decidimos evaluar la acción del CM de células Muse-AT sobre la funcionalidad de linfocitos T. Para esto empleamos células del bazo de ratones NOD BDC2.5, animales transgénicos cuyos linfocitos T CD4⁺ expresan los genes de las cadenas α y β del TCR de un clon de linfocitos T diabetogénico derivado del ratón NOD, que por brevedad lo denominamos BDC2.5. Los linfocitos T BDC2.5 reconocen un péptido de 14 aminoácidos perteneciente a la cromogranina A. Para nuestros ensayos, empleamos un mimotopo del mencionado péptido antigénico (Mi). Los linfocitos T BDC2.5 CD4⁺ presentan un fenotipo Th1 donde se ve aumentada la secreción de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- α frente a la estimulación antigénica-dependiente, sucediendo algo similar en los linfocitos Th1 antigénico específicos durante la patogénesis de la diabetes tipo 1. Por lo tanto, los linfocitos BDC2.5 T CD4⁺ responden *in vitro* con una alta secreción de IFN- γ cuando son estimulados con el Mi (5nM) durante 72h [108-109]. Como control negativo, sometimos a las células T BDC2.5 CD4⁺ a la exposición con ovoalbúmina (OVA) sin obtener respuesta a la secreción de citoquinas, como era esperable, y así confirmar la especificidad de éste bioensayo. Para este bioensayo, aislamos esplenocitos (spl) del bazo de ratones NOD BDC2.5, los estimulamos con el Mi y cultivamos con CM de células Muse-AT por 72h en diferentes diluciones. Primero, observamos que el CM no modifica la secreción de IFN- γ por parte de los esplenocitos (Figura 15A).

Observamos una disminución de la secreción de IFN- γ dependiente de la dilución del CM; así, cuanto más concentrado el CM mayor disminución de la secreción de IFN- γ . La menor dilución empleada 1/5 del CM en el cultivo de spl BDC2.5 estimulados con el mimotopo resultó en una disminución de 4 veces, aproximadamente, en la secreción de IFN- γ (spl+Mi+CM_{1/5} vs. spl+Mi, $p < 0,005$). Empleando la mayor dilución del CM de las Muse-AT (1/5000) y la dilución 1/5 del CM proveniente de ASC, la secreción IFN- γ fue disminuida

levemente comparada con la estimulada por su Mi y no alcanzo significancia estadística (Figura 15A). A partir de estos resultados, decidimos realizar los experimentos subsiguientes en la dilución 1/5 ($CM_{1/5}$). La realización de numerosos experimentos empleando controles que incluyeron el reemplazo de medio fresco con o sin suero, demostraron que los efectos observados en la secreción de IFN- γ no fue causa del agotamiento del medio de cultivo (resultados no mostrados).

Para demostrar si el efecto inhibitor observado en la secreción de IFN- γ atribuido al CM de las células Muse-AT es un efecto de amplio espectro sobre la inhibición de citoquinas inflamatorias también, dosamos la citoquina pro-inflamatoria TNF- α secretada por los esplenocitos BDC2.5 estimulados bajo las mismas condiciones. Los spl BDC2.5 no secretaron TNF- α cuando fueron expuestos al CM de células Muse-AT ni tampoco ante el estímulo de la proteína OVA (Figura 15B). Sin embargo, la presencia del $CM_{1/5}$ reduce aproximadamente a la mitad la secreción de TNF- α inducida por el Mi (Figura 15B).

Es conocido que las células NOD BDC2.5 T CD4⁺ poseen un marcado sesgo hacia Th1, como se ha reportado [110]. Nos avocamos a determinar si el CM de las células Muse-AT podría inducir la secreción de citoquinas anti-inflamatorias por parte de los spl de manera antígeno específica. Para esto dosamos en los sobrenadantes la IL-10, una citoquina anti-inflamatoria clásica. Los spl de NOD BDC2.5 en presencia del Mi secretan IL-10; la presencia en el medio de cultivo de $CM_{1/5}$ o alternativamente, OVA no modifica la liberación de IL-10 por parte de los spl (Figura 15C). Interesantemente, cuando estos spl son estimulados con el Mi en presencia del $CM_{1/5}$ la secreción de IL-10 aumenta en comparación con lo secretado por activación inducida por el Mi ($p < 0,05$; Figura 15C). Paralelamente, se observó el mismo incremento en la expresión de RNAm de IL-10 ($p < 0,005$; Figura 15C, inserto).

Evaluamos mediante citometría de flujo las citoquinas intracelulares IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10. No se observaron cambios en la expresión intracelular de estas citoquinas en linfocitos T CD4⁺ cuando los spl fueron incubados durante distintos tiempos con el Mi o alternativamente, con Mi+ $CM_{1/5}$ (resultados no

mostrados). También, evaluamos si el CM de las Muse-AT modifica la proliferación de linfocitos T CD4⁺ estimulados de manera antígeno específica. Para esto se evaluó la dilución de CFSE mediante citometría de flujo. Observamos que no se modifica la proliferación de linfocitos T CD4⁺ cuando el CM es agregado al medio de cultivo (Figura 15D). Al mismo tiempo se determinó que la expresión de los niveles RNAm de GATA-3, factor de transcripción maestro para la diferenciación de células Th2, no se modificó cuando los spl NOD BDC2.5 fueron expuestos al CM proveniente de las células Muse-AT (datos no mostrados).

TBX21, conocido como factor de transcripción de T-box (T-bet), es el factor de transcripción fundamental responsable de la diferenciación de linfocitos T naive a Th1 y de la expresión de IFN- γ . Por lo tanto nos preguntamos si las células Muse-AT serían capaces de influir en la expresión de T-bet cuando los spl son estimulados de manera antígeno específica.

Mediante el análisis por Western blot determinamos que el CM de las células Muse-AT reduce la expresión de T-bet cuando los spl son estimulados (Figura 15E), indicando que la disminución de los niveles de IFN- γ secretados podrían deberse en parte a la reducción en la expresión de T-bet.

En conjunto esta serie de ensayos sugieren que el CM de las células Muse-AT no induce cambios en la diferenciación de linfocitos T naive hacia el linaje Th2, ni modifica la proliferación de linfocitos T CD4⁺. Confirmando que solo regula la secreción de citoquinas inclinando la balanza hacia un estado menos inflamatorio (disminuye IFN- γ y TNF- α , aumentando leve pero significativamente los niveles de IL-10) sin afectar tampoco la proliferación de linfocitos Th1. Mecánicamente la disminución de la actividad de T-bet podría ser responsable de estas observaciones.

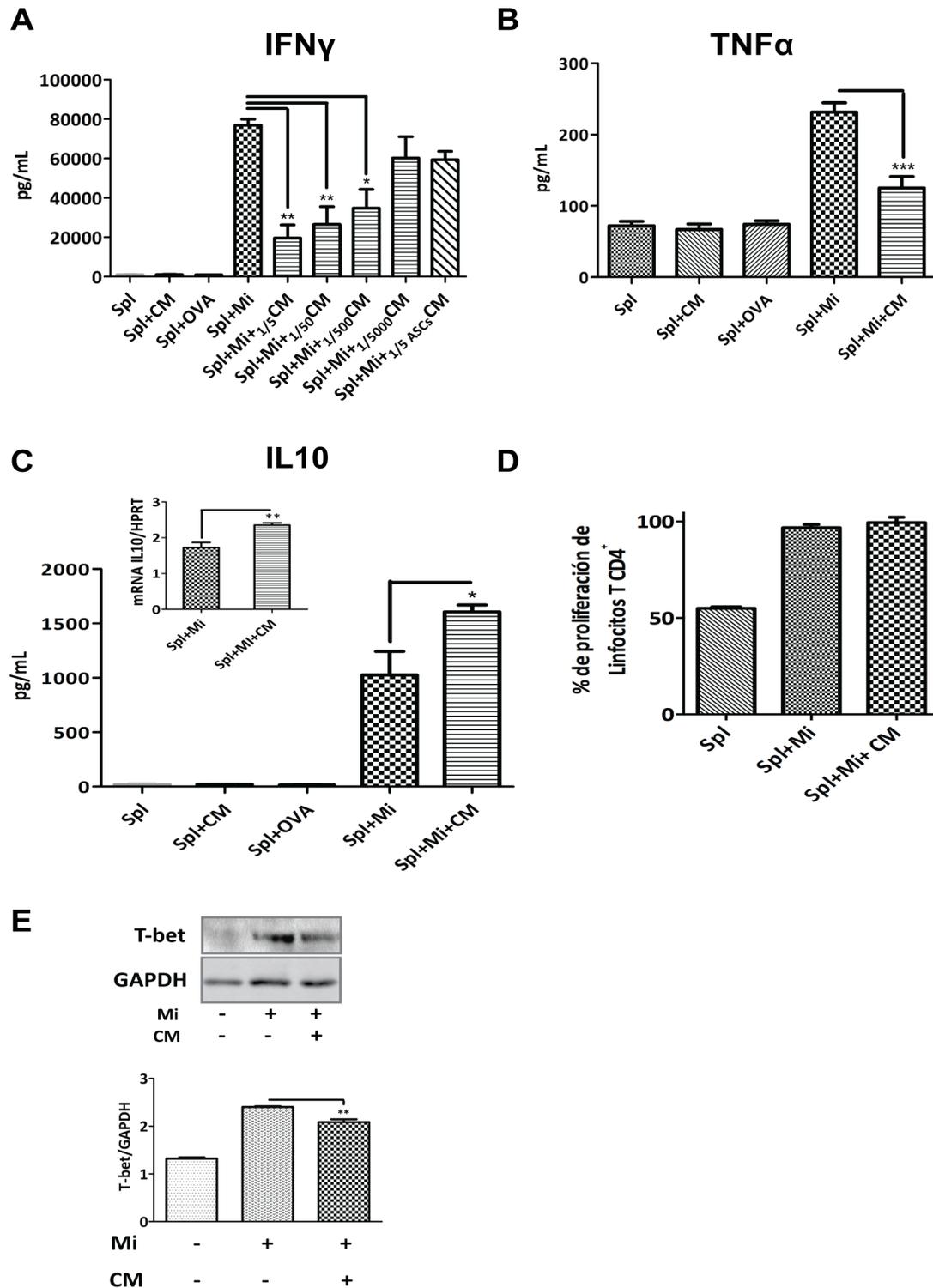


Figura 15: Efectos de las células Muse-AT en esplenocitos de ratones NOD BDC2.5. (A): Respuesta de células T antígeno específicas de cultivos de esplenocitos NOD BDC2.5 a diferentes diluciones de CM de células Muse-AT (1/5 a 1/5000; n = 3) en la secreción de IFN- γ . (B): Las células T desafiadas con el antígeno mostraron una disminución en la secreción de TNF- α al exponerlas al CM_{1/5} de células Muse-AT (n = 3). (C): el CM_{1/5} de células Muse-AT aumentó la secreción de la citoquina anti-

inflamatoria IL-10 en células T estimuladas con antígeno (n = 6). Los niveles de expresión de ARNm de IL-10 se determinaron mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Los valores de Ct se normalizaron para la expresión del gen HPRT, se indica como inserto. (D): el $CM_{1/5}$ de células Muse-AT no perturba la proliferación de células T $CD4^+$ evaluando la dilución de CFSE mediante citometría de flujo (n=3). (E): disminución de la expresión de T-bet en los Spl+Mi sometidos a $CM_{1/5}$ de células Muse-AT evaluada por Western blot (n = 3) Los niveles de citoquinas se cuantificaron por ELISA en sobrenadantes a 72h de cultivo. OVA (antígeno irrelevante) se usó como control. Concentración de Mi = 5 nM. Las barras de error indican el error estándar. (*), $p < 0,05$; (**), $p < 0,005$; (***), $p < 0,0005$. Abreviaturas: Spl, esplenocitos; $ASCs$ CM, medio condicionado del cultivo de células estromales derivadas de tejido adiposo; CM, medio condicionado; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; IL, interleuquina; LPS, lipopolisacárido; Mi, mimotope; NOD, diabético no obeso; OVA, ovoalbúmina; T-bet, factor de transcripción T-box (TBX21); $TNF-\alpha$, factor de necrosis tumoral- α .

El efecto de las células Muse-AT en la secreción de citoquinas esta mediado principalmente por la vía de señalización intracelular TGF- β /pSMAD2 en esplenocitos NOD BDC2.5

Demostramos que los niveles de expresión espontánea de TGF- β 1 son elevados respecto a la expresión observada en células ASC, y su liberación por parte de las células Muse-AT *in vitro* está involucrada en la modulación de la secreción de algunas citoquinas pro- y anti- inflamatorias, a saber IFN- γ , $TNF-\alpha$ e IL-10, respectivamente.

Para conocer con más detalle los mecanismos involucrados en la secreción de IFN- γ se estimularon spl NOD BDC2.5 con concentraciones conocidas de TGF- β 1 exógeno. Notablemente, la secreción de IFN- γ se redujo significativamente de manera dependiente de la concentración de TGF- β 1 adicionado al cultivo, alcanzándose los niveles más bajos de IFN- γ a una concentración de 5ng/ml de TGF- β 1 exógeno (Figura 16A). Por lo tanto, para confirmar si el efecto observado en la disminución de la secreción de IFN- γ por parte del CM de las Muse-AT se debe a su contenido en TGF- β 1, utilizamos un inhibidor de la vía de señalización de TGF- β (SB) como se indicó anteriormente en el estudio de la respuesta de macrófagos.

Observamos que la producción de IL-10 se redujo (aproximadamente, dos veces con 10mM SB y 1,3 veces con 2,5-5mM SB, Figura 16B) y se restableció la secreción de IFN- γ en los spl NOD BDC2.5 estimulados con el Mi en presencia de 10mM SB (Figura 16C). Curiosamente, el agregado del inhibidor SB a los spl estimulados con el Mi, aumentó la secreción de IFN- γ respecto a los estimulados con Mi solamente, lo que sugiere que un bloqueo del receptor de TGF- β (con SB) contribuye a la secreción de IFN- γ por parte de los spl. Esto indicaría que el SB inhibió la actividad de TGF- β 1 liberado por ambas fuentes: una proveniente del CM de las células Muse-AT y la otra, de los propios esplenocitos. También, demostramos el rol del TGF- β 1 como la citoquina responsable de la disminución de la secreción de IFN- γ mediante el empleo de un anticuerpo anti-TGF- β 1 capaz de neutralizar la actividad de esta citoquina. Como se puede observar en la Figura 16D, la presencia de este anticuerpo monoclonal en el medio de cultivo neutraliza la actividad del TGF- β 1 proveniente del CM de las células Muse-AT y restaura los niveles de IFN- γ a los observables solo con la estimulación con Mi.

La citoquina TGF- β 1 se une a receptores específicos de membrana para iniciar la cadena de señalización intracelular del citoplasma hacia núcleo mediante la fosforilación de mediadores, principalmente de la familia de proteínas llamada SMAD, específicamente SMAD2/3. SMAD2 ha sido descrito como un mediador muy importante de la actividad anti-inflamatoria de TGF- β 1 [111]. Por lo tanto, analizamos los niveles de pSMAD2 como mediador intracelular de la acción de TGF- β 1 sobre la estimulación antígeno-específica de esplenocitos NOD BDC2.5. Como era de esperar, la adición de TGF- β 1 exógeno aumentó la expresión de pSMAD2 producido por los esplenocitos alcanzado la expresión máxima entre los 30-60 min luego de ser estimulados (datos no mostrados). Del mismo modo, el CM de células Muse-AT aumentó la fosforilación de SMAD2 en los esplenocitos estimulados con el Mi, mientras que en presencia del inhibidor SB, no se observó aumento de pSMAD2 (Figura 16E-F).

Por lo tanto, éstos datos en conjunto sugieren que la actividad inmunomoduladora ejercida por el medio condicionado de las células Muse-AT

sobre los esplenocitos de ratones NOD BDC2.5 luego de su estimulación antigénica específica, puede ser atribuible a la vía de señalización TGF- β /pSMAD2.

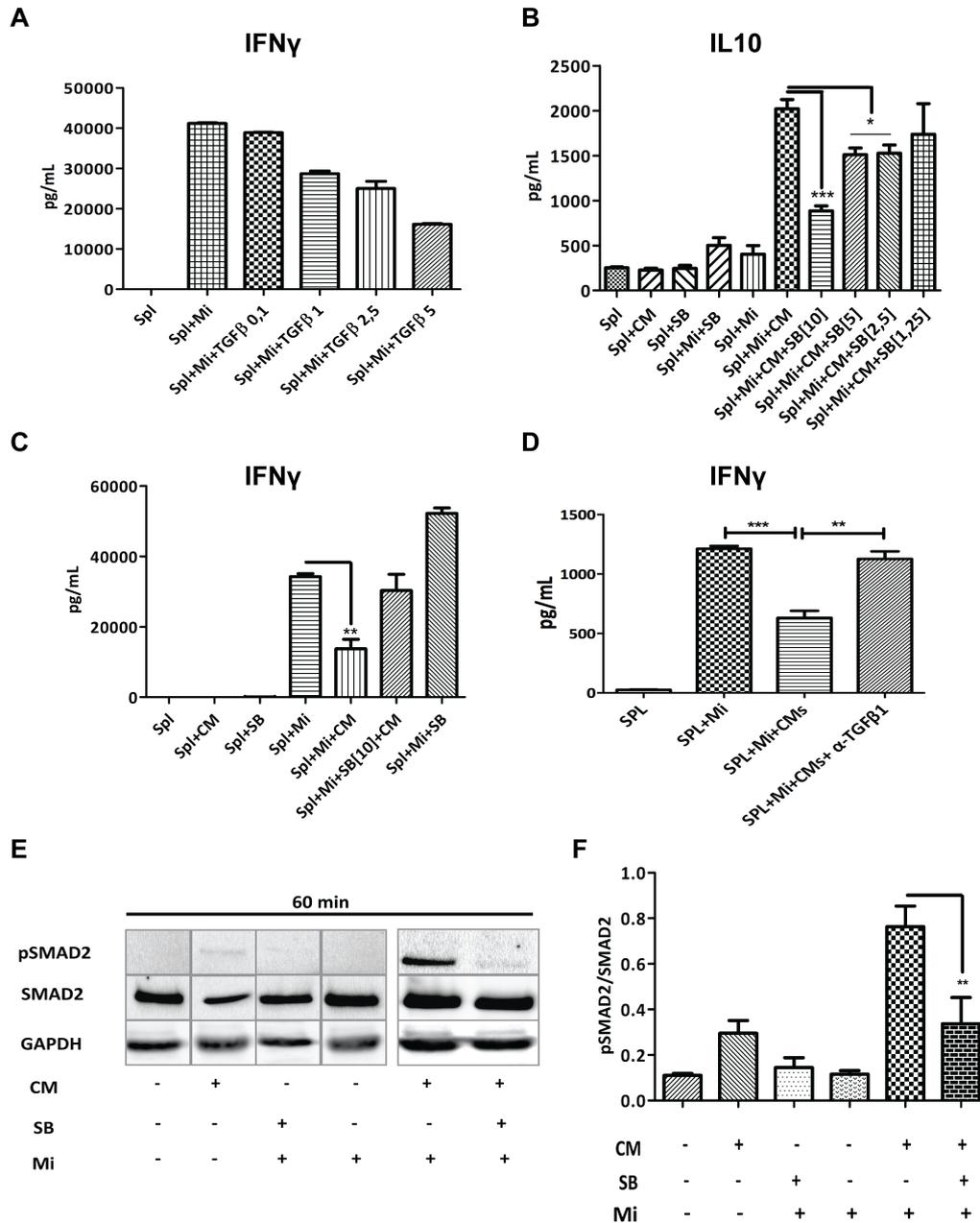


Figura 16: El CM de las Muse-AT contiene TGF- β 1 responsable de la modulación de la secreción de citoquinas ante el estímulo antigénico. (A): La adición de TGF- β 1 exógeno en diferentes concentraciones (0.1-5 ng/ml) al cultivo celular de spl estimulados con el Mi inhibe la secreción de IFN- γ de manera dependiente de su concentración. (B): El efecto del bloqueo de la señalización de TGF- β 1 se evaluó usando SB a diferentes concentraciones (1.25-10 ng/ml) en spl desafiados con el antígeno y se midió la secreción de IL-10. (C): La inhibición de la señalización de TGF- β 1 con 10 ng/ml de SB restauró los niveles de secreción de IFN- γ . (D) Utilizamos un

anticuerpo monoclonal anti-TGF- β 1 capaz de neutralizar la actividad de ésta citoquina, bloqueándose la acción inhibitoria del CM_{1/5} de células Muse-AT sobre la secreción de IFN- γ (n=5) (E): SB disminuyó los niveles de pSMAD2 evaluados por Western blot (WB) en spl estimados con el antígeno. (F): Cuantificación del análisis de WB mostrado en (E). Las citoquinas fueron cuantificadas mediante ELISAs específicos en los sobrenadantes de 72 horas de cultivo. Las barras de error indican el error estándar. (*), p<0,05; (**), p<0,005; (***), p<0,0005; n = 3. Abreviaturas: CM, medios condicionados; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; IFN- γ , interferón- γ ; Mi, mimotopé; p, fosforilado; SB, SB 431542; Spl, esplenocitos; TGF- β 1, transformando el factor de crecimiento- β 1; α , anti.

Conclusión capítulo II

Por medio de los resultados expuestos en este capítulo, concluimos que las células Muse-AT poseen una potente actividad inmunomoduladora como consecuencia de la reducción de la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ y TNF- α , y el aumento de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, sobre macrófagos estimulados con LPS y linfocitos T CD4⁺ estimulados de manera antígeno específica. Esta modulación se encuentra mediada principalmente, aunque no excluimos la acción de otras moléculas, por la acción de TGF- β 1 de manera dependiente de la vía de señalización TGF- β RII/pSMAD2.

Capítulo III – Evaluación del potencial terapéutico de las células Muse-AT en modelos experimentales de diabetes autoinmune

Efecto de la administración de células Muse-AT en un modelo de diabetes autoinmune espontánea

Habiendo establecido que las células Muse-AT poseen capacidad inmunoreguladora *in vitro*: *i*) disminuyendo la secreción de citoquinas inflamatorias en una línea celular de macrófagos estimulados con LPS, *ii*) muy importante, reduciendo la secreción de citoquinas inflamatorias por parte de macrófagos peritoneales aislados de ratones sanos, y *iii*) desviando el perfil característico de tipo Th1 de linfocitos NOD BDC2.5 diabetogénicos hacia uno con menor expresión de IFN- γ , nos preguntamos si las células Muse-AT podrían curar/atenuar el proceso autoinmune del ratón NOD, como modelo de diabetes autoinmune. El ratón NOD desarrolla espontáneamente diabetes como consecuencia de la destrucción selectiva de las células β mediado por su sistema inmune.

Se consideraron diabéticos los ratones hembra de nuestra colonia que desarrollaron espontáneamente hiperglucemia, con dos lecturas de glucemias >250mg/dl durante dos días consecutivos. A estos, se los inyectó con 1×10^6 células Muse-AT y al grupo control con PBS (100 μ l), ambos intraperitonealmente (i.p.).

Como se observa en la Figura 17A, los ratones NOD diabéticos pertenecientes al grupo control con lecturas de glucemia entre 290 y 430 mg/dl al comienzo del experimento, y que recibieron PBS (n=3, grupo control) incrementaron drásticamente sus glucemias alcanzando valores por encima de 500 mg/dl en la primera semana de observación (límite de detección del glucómetro empleado; arbitrariamente se asignó un valor de 600mg/dl para graficarlos). A estos animales se les dosó las glucemias dos veces por semana, y al cabo de la segunda semana se los sacrificó por mostrar un estado de

caquexia muy avanzado, con pérdida de peso importante, por lo que se decidió sacrificarlos por razones humanitarias (como lo establece nuestro protocolo de trabajo).

Interesantemente, del total de los ratones NOD diabéticos (n=5) que recibieron células Muse-AT (i.p.), 4 de ellos mostraron una regulación oscilante de la glucemia en función del tiempo entre las semanas 0 y 7 post-tratamiento. Este hallazgo sugiere una protección parcial por parte de las células Muse-AT del asalto autoinmune dirigido contra las células β (Figura 17B). Observamos que en el grupo control el peso disminuyó notablemente (2 a 5 gramos) en el período de 2 semanas (Figura 17 C) y en los inyectados con células Muse-AT el peso corporal se mantuvo estable hasta la semana 7, aproximadamente (Figura 17D), momento en el que se observa un aumento de las glucemias. Finalmente, todos los ratones tratados con estas células alcanzan un estado hiperglucémico constante (>500mg/dl) y se decidió sacrificarlos cuando mostraron signos de caquexia (>7 semanas).

Podría especularse que un incremento en el número de inyecciones de células Muse-AT, un cambio en la ruta de su administración (i.v.) o alternativamente, el empleo de las células Muse-AT en combinación con otros biológicos (por ej., dosis subóptimas del anticuerpo monoclonal anti-CD3) podrían mejorar la regulación de la glucemia y/o disminuir la velocidad de deterioro de las células β durante la diabetes autoinmune.

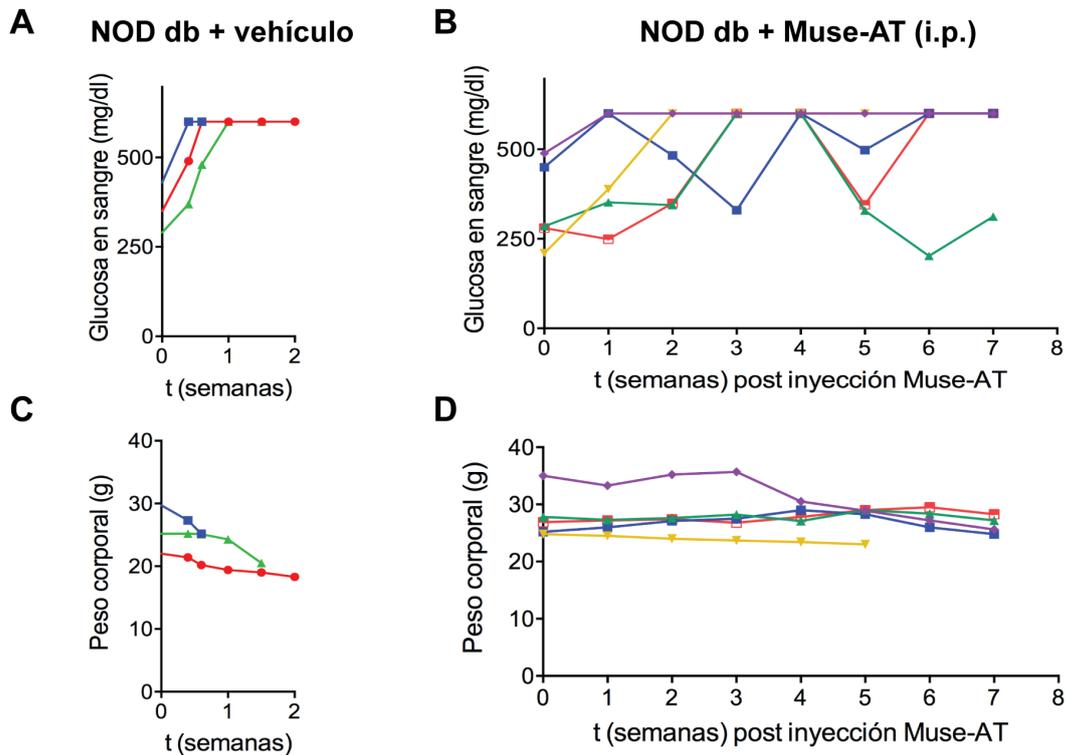


Figura 17: Tratamiento con células Muse-AT de ratones NOD diabéticos. Ratones NOD diabéticos (glucemias ≥ 250 mg/dl) fueron inyectados (1×10^6 , i.p.) con células Muse-AT (cultivadas 5-12 días *in vitro*) luego de la aparición de hiperglucemia. Como control se realizaron inyecciones del vehículo (100 μ l PBS, i.p.). Valores de glucemia en sangre de ratones NODdb, (A): control, (B): tratados con Muse-AT. Peso corporal post-inyección de ratones NOD db (C): control (D): tratados con Muse-AT. Abreviaturas: db, diabético; i.p., intraperitoneal.

Administración de células Muse-AT en un modelo de deficiencia de insulina inducido por estreptozotocina

En el capítulo I caracterizamos fenotípicamente las células Muse-AT humanas, encontrándose que expresan bajos niveles de HLA-DR, aunque valores significativamente altos de HLA-ABC. Por lo tanto, es posible que luego de su inoculación en el ratón NOD, el sistema inmune de éstos las eliminen luego de un cierto tiempo.

El ratón NODscid es parcialmente inmunodeficiente por carecer de la rama adaptativa del sistema inmune completa. Por lo tanto, es posible que las

células Muse-AT tengan una sobrevida más prolongada en estos ratones luego de su transferencia. Utilizamos ratones NOD*scid* que fueron diabetizados con inyecciones múltiples de estreptozotocina (STZ), vía i.p. como se indicó en la sección M&M (sección 4.3). Un grupo de ratones (n=9) recibieron 1×10^6 de células Muse-AT (i.v.) luego de la aparición de hiperglucemia (~7 días posteriores de la primera dosis de STZ). Otro grupo de roedores (n=5) recibieron PBS (control) por la misma vía; ambos grupos fueron tratados luego que la glucemia alcanzara valores >250mg/dl.

Como en el caso del experimento anterior con ratones NOD, los NOD*scid* tratados con células Muse-AT presentaron un mejor estado general positibilitando una mayor sobrevida (11 semanas aprox. vs 6 semanas del control – Figura 18 A-B) luego de la aparición de diabetes.

Al momento de la administración de las células Muse-AT la glucemia se encontraba en ambos grupos entre los 256 a 477 mg/dl, aproximadamente. La glucemia se cuantificó una vez por semana en los dos grupos de ratones. Ambos grupos mostraron glucemias oscilantes en función del tiempo post-tratamiento (Figura 18 A-B). El cálculo del área bajo la curva en función del tiempo (hasta la semana 7 de observación) de la glucemia, nos permitió determinar que el grupo tratado con células Muse-AT conservaba un mejor control de la glucemia (Figura 18C). Se analizó en el tiempo comprendido hasta la semana 7 post-inyección (momento el que los animales fueron sacrificados debido a los signos de caquexia y mal estado en general del grupo control). Contrariamente, los tratados con células Muse-AT sobrevivieron en buenas condiciones generales de salud hasta la semana 11 post-inyección, momento que se decidió dar por concluido el experimento. El peso corporal de los ratones tratados con Muse-AT se mantuvo más estable hasta la semana 6, en la mayoría de los ratones (8 de 9 en total), comparándolo con sus respectivos controles; en este grupo control el peso corporal disminuyó notablemente en función del tiempo (Figura 18 D-E). Estos hallazgos indicarían que las células Muse-AT tienen un efecto favorable en el control de la homeostasis de la glucosa. Probablemente, la acción de las células Muse-AT podría ejecutarse a nivel del microambiente de las células β en este modelo experimental en el que

existe ausencia de la rama adaptativa del sistema inmune (linfocitos T y B). Sin embargo, los posibles mecanismos de acción no fueron investigados, aún.

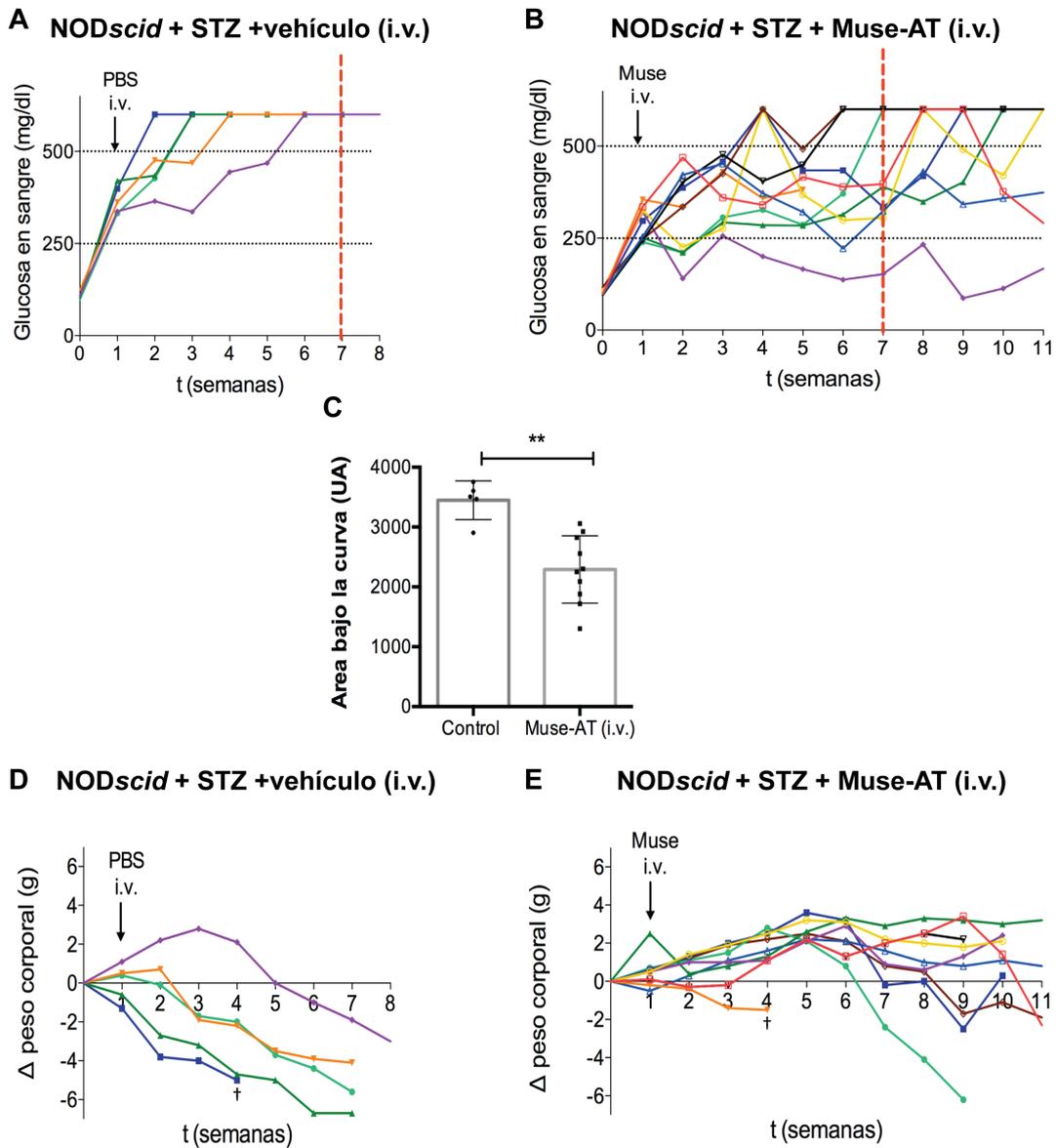


Figura 18: Efecto de la administración de células Muse-AT en un modelo de ausencia de insulina inducido químicamente. Ratones machos NODscid de 8-10 semanas de vida, fueron inyectados i.p. con 4 dosis consecutivas de STZ. Una semana posterior, las células Muse-AT fueron inyectadas $1 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ (día 5-12 de cultivo *in vitro*) de forma i.v. en la cola (n=10), y como control (n=5) se inyectó el vehículo (PBS). Medición de glucemias de ratones (A): grupo control, (B): inyectados con Muse-AT, (C): cuantificación del área bajo la curva de las glucemias del grupo control vs el tratado con células Muse-AT. Cambios en el peso corporal de los ratones diabéticos en función del tiempo. (D):control (PBS, i.v.), (E): inyectados con Muse-AT

(i.v.). Las barras de error indican el error estándar (**), $p < 0,005$. Abreviaturas: STZ, estreptozotocina; i.p., intraperitoneal; i.v., intravenosa; Δ , diferencia; g, gramos; t, tiempo.

Potencial actividad pro-angiogénica de células Muse-AT para el mejoramiento del trasplante de islotes pancreáticos murinos

Como hemos descrito anteriormente las células Muse-AT expresan TGF- β 1, una citoquina multifuncional. Hemos demostrado que la regulación de la función inmunológica por parte de las células Muse-AT se debe, en parte, a la expresión de TGF- β 1. Se ha descrito a esta citoquina como un jugador fundamental durante la angiogénesis en el desarrollo normal embrionario, como así también en diversas patologías.

La actividad angiogénica de TGF- β 1 es altamente dependiente del contexto y coordinada por varios factores reguladores. TGF- β 1 se une al receptor de tipo II (T β RII), que recluta receptores tipo I, denominados receptores de activina quinasa (ALK) para activar la vía de señalización [112]. Por otro lado, recientemente se ha descrito la acción anti-inflamatoria de un miembro de la familia de la IL-1, denominada IL-37. Esta citoquina, presente en humanos y cuyo ortólogo en el ratón no se ha descrito, fue reportada como un potente represor del sistema inmune [113-114], y además se identificó que posee actividad pro-angiogénica [115]. IL-37 induce respuestas pro-angiogénicas, al menos en parte, a través de la vía de señalización TGF- β -ALK1 en células endoteliales. TGF- β 1 interactúa con IL-37 y aumenta la afinidad de unión de IL-37 al complejo receptor ALK1, permitiendo que la IL-37 señalice a través de ALK1 para activar respuestas pro-angiogénicas [116]. A raíz de estas evidencias y sumado a nuestros hallazgos sobre la expresión del receptor TGF β RII en la superficie de las células Muse-AT (Figura 13E- Capítulo I) decidimos investigar si la IL-37 podría también expresarse en las células Muse-AT, arrojando resultados positivos (Figura 19A). También encontramos por microscopía de inmunofluorescencia la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Figura 19B) y de CD31 (marcador de células endoteliales) (Figura 19C).

El hallazgo de diversos componentes importantes para el desarrollo de la regulación de la angiogénesis, que son expresados espontáneamente en las células Muse-AT, nos motivó a postular que células Muse-AT jugarían un papel importante como posibles inductoras de la angiogénesis (o, re-vascularización) al ser co-trasplantadas con islotes pancreáticos.

Como hemos mencionado previamente, la terapia de trasplante de islotes pancreáticos requiere de un número elevado de islotes para lograr valores de normoglucemia debido a que más del 60% no logra sobrevivir luego de ser trasplantados [117-118]. Se cree, que gran parte de esa muerte es debido a la falta de nutrientes a causa, en su mayor parte, de una inapropiada vascularización. De aquí la necesidad de emplear una suficiente cantidad de islotes, solo alcanzada cuando se procesan varios donantes cadavéricos.

A fin de comprobar si las células Muse-AT por sus características mencionadas (inmunoregulación y potencial angiogénico, sin capacidad teratogénica) podrían contribuir haciendo el trasplante de islotes más eficiente, nos planteamos realizar el co-trasplante de islotes con células Muse-AT en ratones diabéticos. Nuestra hipótesis es que el co-trasplante de una masa marginal de islotes (una suficiente que estabilice valores de glucemia comprendidos entre los 300-350mg/dl, aproximadamente; sin llegar a valores fisiológicos normales ni tampoco que superen los 500mg/dl) con células Muse-AT sería capaz de lograr normoglucemia rápidamente en un modelo murino de diabetes experimental. Experimentos de este tipo están actualmente desarrollándose en nuestro laboratorio. De resultar correcta nuestra hipótesis, podría ser de importancia para su traslación clínica por dos motivos: 1) acelerando y mejorando la respuesta de los islotes trasplantados y 2) requiriendo una menor cantidad de equivalentes de islotes para el trasplante, reduciendo así la cantidad de donantes cadavéricos.

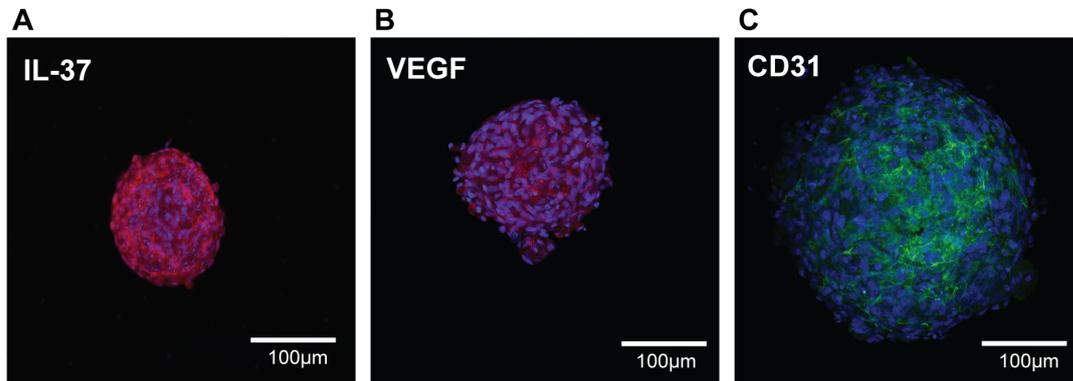


Figura 19: Las células Muse-AT expresan reconocidos factores.

Micrografías de inmunofluorescencia representativas de: IL-37, CD31 y VEGF (A, B y C, respectivamente, de clusters de células Muse-AT (cultivadas *in vitro* durante 6-10 días). Barra de escala = 100 µm; n = 3 muestras analizadas. Abreviaturas: VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular.

Conclusión Capítulo III:

Los resultados obtenidos *in vivo* sugieren que la administración de células Muse-AT favorecen la homeostasis de la glucosa, como así también prolongan el tiempo y la calidad de vida de los ratones en los distintos modelos experimentales ensayados de diabetes autoinmune. Estos hallazgos nos alientan a continuar incrementando el número de animales en los distintos experimentos e investigar más profundamente los mecanismos de acción de los efectos benéficos de las células Muse-AT. Además, experimentos de co-trasplante de islotes murinos y células Muse-AT en modelos de diabetes están en curso en nuestro laboratorio.

DISCUSSION

DISCUSION

Durante las últimas dos décadas, diversos grupos de investigación han contribuido a la acumulación de evidencias acerca del potencial terapéutico de las células madre obtenidas de diversos tejidos. Entre ellas, las MSCs son las más populares debido a que sus métodos de aislamiento son relativamente simples y poseen propiedades de inducir citoquinas y otros factores con un amplio espectro de acción *in vivo* [119, 120]. Si bien las MSCs han sido evaluadas en muchos estudios clínicos, su utilización como una práctica médica confiable aún no ha alcanzado la clínica de manera rutinaria. Una de las principales limitaciones en el uso de MSCs en medicina regenerativa es la baja tasa de supervivencia (1-3%) después del trasplante [121, 122].

Una nueva población de células madre pluripotentes presentes en bajo número entre las células MSCs [85], denominadas células Muse, fueron identificadas originalmente como células tolerantes al estrés y aisladas haciendo uso de su expresión en superficie de SSEA-3. En este trabajo de tesis, hemos documentado la optimización y mejoramiento de los procedimientos existentes de aislamiento de las células Muse-AT en condiciones severas de estrés celular, demostrando que con nuestra metodología obtenemos una población de aproximadamente el 60% que expresa SSEA-3 y posee la capacidad de formar clusters celulares entre los 7-10 días de cultivo *in vitro*. Comparadas con células pluripotentes de otros orígenes, las células Muse-AT podrían representar un fuente más realista de células madre para su empleo en medicina regenerativa. Su potencial uso médico se debe, en parte, a que la obtención es de bajo costo luego de un procedimiento de simple acceso (a partir de una lipoaspiración se obtienen cantidades abundantes de tejido adiposo). A diferencia de otras células pluripotentes, las células Muse-AT son capaces de diferenciarse a todas las capas germinales primitivas sin formar teratomas *in vivo*. Adicionalmente, las células Muse-AT pueden obtenerse directamente de tejido humano adulto evitando los problemas éticos que surgen con el empleo de las células ES y la manipulación/modificación genética de las iPSCs.

Se ha demostrado que mediante el empleo de diversos protocolos de cultivo tridimensional *in vitro* de MSCs creciendo en esferoides/clusters

generan un aumento en sus características de “stemness”, e incrementan su potencial terapéutico en enfermedades donde se desencadenan procesos inflamatorios [123-125], aumentando por ejemplo, sus propiedades de inmunomodulación y expresando niveles elevados de proteínas anti-inflamatorias [123]. Las MSCs cultivadas en esferoides presentan un tamaño más pequeño comparadas a cuando se las cultiva en condiciones adherentes a la superficie. En el caso de las células Muse-AT, presentaron un diámetro pequeño (aprox., 10 μm de diámetro) y mediante microscopía electrónica observamos que poseen una relación núcleo/citoplasma elevado característico de células ES. Se ha descrito que las MSCs no forman clusters fácilmente a menos que se las cultive bajo las condiciones de cultivo tridimensional que requiere de un cultivo en suspensión, conocido como hanging-drop (cultivo en gota suspendida) [124]. En este trabajo, demostramos que las células Muse-AT forman espontáneamente agregados cuando se las cultiva en placas de plástico no adherentes, sin la adición de factores de crecimiento específicos o matrices celulares, y realizan un reducido número de divisiones celulares, limitando su expansión *in vitro*. También, encontramos que las células Muse-AT recién aisladas, expresan marcadores de pluripotencialidad cuyos niveles de expresión se incrementan en función del tiempo en cultivo, sin adicionar factores específicos. Es factible especular que este fenómeno se debe a la formación de clusters/agregados celulares que facilitan el contacto célula-célula con componentes de la matriz extracelular natural. Esto podría ayudar a mantener el estado “stemness” de las células Muse-AT y conservar su alto potencial de diferenciación, tal como se ha demostrado para las MSC luego del cultivo tridimensional [126]. También observamos que las células Muse-AT mantienen la expresión de clusters de diferenciación (CDs) característicos de MSC, que facilitan el contacto célula-célula y célula-matriz extracelular [127]. En el mismo sentido, Kuroda *et al.* reportaron que cuando las células Muse, derivadas de médula ósea o fibroblastos de piel, se aglomeran en cultivo expresan niveles más altos de Oct3/2, Sox2 y Nanog comparado con las Muse cultivadas en placas adherentes [85]. Por otro lado, demostramos que las células Muse-AT no forman teratomas, tal como se describió para las células Muse obtenidas de médula ósea y fibroblastos de piel [98].

La citoquina pleiotrópica TGF- β 1 se ha propuesto como un jugador fundamental para mantener la propiedad definida como “stemness” de las células hematopoyéticas (HSC) a través de la fosforilación de SMAD2, una proteína que señaliza río abajo del receptor de TGF- β [128]. Las células HSC requieren la estimulación de ligandos de activina quinasa 5 (TGF- β RI/ALK5) para mantener un estado quiescente en la médula ósea. Teniendo en cuenta estos conocimientos previos, demostramos que las células Muse-AT expresan espontáneamente TGF- β 1, y que sus niveles de expresión intracelular se incrementaban en función del tiempo en cultivo *in vitro*, coincidiendo con la baja actividad de la proliferación celular. Por el contrario, observamos que los niveles de TGF- β 1 eran, en comparación con las Muse-AT, más bajos en las ASCs cuya tasa de replicación celular se conoce que es alta en cultivo. También, demostramos que las células Muse-AT expresan en su membrana celular el receptor TGF- β RII, por lo que es posible especular que TGF- β 1 posee un rol autócrino/parácrino que mantendría a las células Muse-AT en un estado de “stemness”, baja proliferación y en estado de pluripotencialidad durante un periodo de tiempo determinado [85]. En este sentido, Ylöstalo *et al.* propusieron que la formación de clusters de MSCs induce un tipo de estrés celular que resulta en señales intracelulares que conducen a la regulación positiva de efectores anti-inflamatorios [129]. Es altamente probable que la activación de las células madre ocurra *in vivo* por acción de factores solubles liberados por los tejidos dañados [130]. En concordancia con esta especulación, encontramos que las células Muse-AT expresaron espontáneamente altos niveles de TGF- β 1 cuando se cultivaron en placas de cultivo no adherentes entre los días 5 a 10, y que la agregación celular podría desencadenar el incremento en la expresión de TGF- β 1. El grupo de Dezawa, ha demostrado que las células Muse son más efectivas a la hora de percibir señales de daño liberadas por tejidos dañados/lesionados comparado con otros tipos de células madre (ESC, iPSs, somáticas, etc.) [85]. Por ejemplo, se ha demostrado que al inyectar células Muse por vía intravenosa, en un modelo de hepatitis fulminante y en un modelo de daño muscular en ratones inmunodeficientes (*scid*), éstas lograron diferenciarse de forma espontánea en

hepatocitos y células del músculo esquelético contribuyendo a la eventual reparación del tejido [85].

El uso de las MSC, además de ser atractivo para la reparación de tejidos, es propuesto y altamente estudiado por su capacidad inmunomoduladora y su habilidad para dirigirse y permanecer en el sitio de inflamación y lesión. Las funciones inmunomoduladoras de las MSC se han descrito en términos de su interacción con diversas células del sistema inmune, entre ellas: linfocitos T y B, las células dendríticas y células NK, mediante la expresión y secreción de varios factores solubles y/o mediante la interacción directa de célula-célula por mecanismos dependientes del contacto [131]. Estas características han atraído el interés de los investigadores por utilizar MSCs en modelos animales de varias enfermedades relacionadas con el sistema inmune tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal y dermatitis atópica, y por otro lado para disminuir el rechazo alógeno de órganos [132-136]. Por lo tanto, al comenzar este trabajo, nos preguntamos si las células Muse-AT poseían capacidades de inmunorregulación, debido que hasta ese momento no existían evidencias al respecto. En esta tesis, por primera vez, se demuestra que las células Muse-AT disminuyen significativamente la secreción de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α por parte de la línea celular de macrófagos RAW264.7 y macrófagos peritoneales murinos, estimulados por LPS. Además, encontramos que las células Muse-AT modulan el equilibrio de las citoquinas secretadas por las células T desafiadas con un antígeno-específico hacia una reducción de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ y TNF- α) y un aumento de la producción de IL-10 (anti-inflamatoria). En la misma línea de evidencia, se ha informado anteriormente, que las MSCs cultivadas como esferoides mostraron capacidad anti-inflamatoria y se diferenciaron a macrófagos con un fenotipo anti-inflamatorio (M2) a través de la expresión TSG-6 (del inglés, tumor necrosis factor-inducible gene 6) [123] y prostaglandina E₂ [129, 130].

Hemos encontrado que tan pronto como las células Muse-AT comenzaban a agruparse en el cultivo, aumenta la expresión de TGF- β 1, situación que sugiere que el TGF- β 1 producido por las células Muse-AT podría ser fundamental para la modulación de la secreción de citoquinas por parte de

los macrófagos y las respuestas de las células T antígeno-dependientes. También, se ha demostrado que las MSCs producen diversos mediadores parácrinos y citoquinas, entre la que se encuentra TGF- β 1 [137, 138]. A raíz de esto, confirmamos que las ASCs también producen TGF- β 1, aunque a niveles bajos y consecuentemente, el sobrenadante de estas células posee una acción anti-inflamatoria que resultó mucho menor sobre los linfocitos T estimulados con el antígeno-específico en comparación con las células Muse-AT.

Existe evidencia que las MSCs protegen a las células de cáncer de mama, de la vigilancia del sistema inmune, a través de la secreción de TGF- β 1 induciendo un aumento en número de células T reguladoras [139]. Aunque no excluimos la posibilidad de que las células Muse-AT puedan generar linfocitos T con un fenotipo regulador similar, aquí describimos que estas últimas disminuyeron la expresión de T-bet en linfocitos T desafiados con su antígeno-específico, lo que demuestra que este factor transcripcional estaría involucrado en la disminución de la secreción de IFN- γ . Además, no excluimos la posibilidad de que el medio condicionado (CM) de las células Muse-AT regularan indirectamente la respuesta de las células T al modular las células del linaje mieloide.

Mecanísticamente, encontramos que el CM de las células Muse-AT indujo la fosforilación de SMAD2 de manera dependiente del antígeno en las células T diabetogénicas (NOD BDC2.5), mientras que se observó una disminución en los niveles de la fosforilación cuando utilizamos un inhibidor del receptor de TGF- β 1, lo que sugiere que TGF- β 1 es un actor prominente de este efecto. El papel clave de TGF- β 1 en el control de las respuestas inmunes ya está establecido. Por ejemplo, la generación de ratones knockout para TGF- β 1, condujo a una inflamación sistémica desmedida que provoca la muerte de los ratones [140]. También, se ha demostrado que la inhibición de TGF- β 1 regula positivamente el factor de transcripción T-bet, generando un aumento de las citoquinas liberadas de los linfocitos Th1 en el intestino humano [141]. Del mismo modo, nuestros resultados demostraron, que al exponer células del sistema inmune, esplenocitos NOD BDC2.5 (utilizados en nuestro modelo de trabajo) con el CM de las células Muse-AT, se observa un aumento en la expresión de pSMAD2, mientras que la expresión de T-bet disminuía y por

consiguiente disminuye también la secreción de IFN- γ , de manera antígeno-dependiente. Por lo tanto, hemos demostrado que TGF- β 1 parece jugar un rol crítico asociado a la inmunomodulación ejercida por las células Muse-AT, y al utilizar un inhibidor del receptor de TGF- β tipo I se anulan los efectos inmunoreguladores (Figura 21).

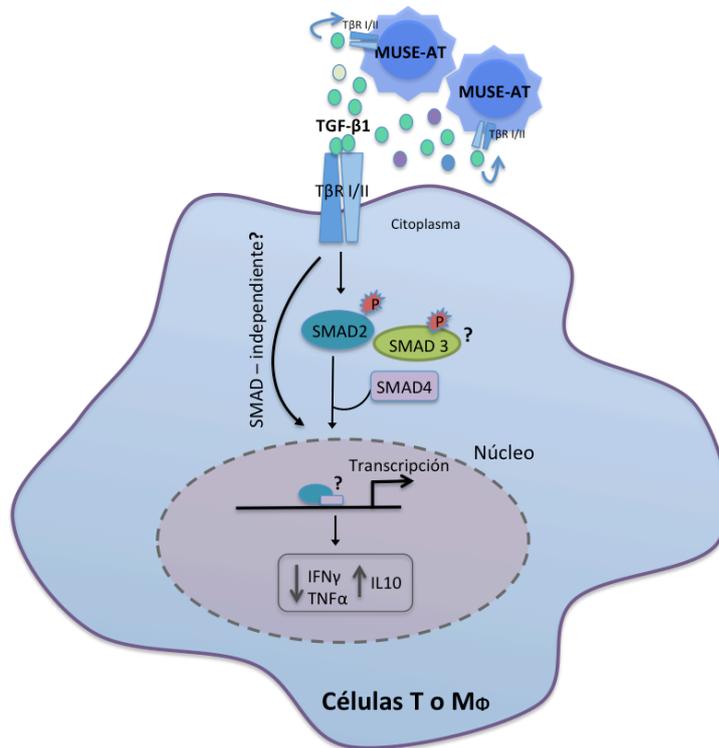


Figura 21: Esquema de posible vía de señalización TGF- β 1/SMAD2 inducido por Muse-AT en células T y macrófagos. El TGF- β 1 liberado por las células Muse-AT se une al receptor T β RI/II de células T o macrófagos, provocando la fosforilación de SMAD2, regulando la secreción de las citoquinas indicadas. Abreviaturas: M ϕ , macrófago; IFN- γ , interferón- γ ; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α ; ↑ indica aumento y ↓ disminución de la síntesis y secreción.

Es muy posible que los efectos inmunomoduladores observados por parte de las células Muse-AT, no solo estén mediados por la citoquina TGF- β 1. Al respecto, identificamos una citoquina perteneciente a la familia de la IL-1 denominada IL-37. Recientemente, se ha descrito que IL-37 posee capacidad anti-inflamatoria. Esta citoquina descrita hasta hoy solo en humanos, también fue reportada como un potente represor del sistema inmune [113-114]. Se ha

demostrado que al utilizar la proteína recombinante de IL-37 en un cultivo de macrófagos humanos estimulados con LPS, la secreción de IL-6 disminuía, observándose una anulación de este efecto cuando se los cultivaba en conjunto con un neutralizador de IL-37 (mAb IL-37), evidenciando un aumento de la secreción de IL-6 [140]. En base a estas evidencias, especulamos que la IL-37 también podría estar asociada a la inmunomodulación ejercida por las células Muse-AT; sin embargo, los experimentos para responder a esta pregunta aún están llevándose a cabo en nuestro laboratorio.

La diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad causada por la destrucción autoinmune específica de las células β del páncreas [17]. La enfermedad se manifiesta cuando el 80 % o más de la masa celular β ha sido destruida [16], reduciendo enormemente las posibilidades de aplicar una terapia que permita restaurar la capacidad del organismo de regular el metabolismo de la glucosa. Actualmente, el único paliativo para esta enfermedad es la terapia de reemplazo hormonal, que consiste en la administración diaria de insulina en base a las demandas metabólicas, lo cual exige un estricto control de la alimentación y de los niveles de glucosa en sangre. Si bien la administración de insulina, permite la sobrevivencia de los pacientes con T1DM, este tratamiento está lejos de ser la cura de la enfermedad. Con el propósito de prevenir o curar la T1DM se han investigado un gran número de estrategias terapéuticas, muchas de las cuales han alcanzado diversas fases en ensayos clínicos con resultados diversos. Debido a la naturaleza autoinmune de la T1DM, diversas estrategias evaluadas hasta el momento se sustentan sobre una intervención inmunológica. En las últimas décadas se ha investigado un gran número de estrategias terapéuticas para la T1DM con foco en la inmunosupresión o inmunomodulación utilizando diferentes tipos de células madre [143-145]. Lograr un control de la respuesta inmune adversa resulta fundamental para prevenir o revertir la destrucción autoinmune de las células β , pero es evidente que podría no ser suficiente para la cura de la enfermedad en aquellos pacientes con T1DM avanzada, exigiendo la necesidad de re-poblar el páncreas con células productoras de insulina. Varios trabajos han demostrado, utilizando diferentes modelos murinos de diabetes, la capacidad de las células MSCs luego de ser inyectadas, de migrar

hacia los islotes pancreáticos [146]. También, el empleo de MSCs retrasó la incidencia de la enfermedad, mejoró niveles de glucemias, redujo la insulinitis pancreática y regeneró el tejido pancreático en un modelo de ratones diabéticos [147]. Sin embargo, solo la administración de MSCs por sí misma no ha resultado apropiada para un tratamiento exitoso de la T1DM. Resulta altamente probable que si las células trasplantadas son alogénicas, el sistema inmune del aceptor las rechaza en un corto plazo, y así se vería muy disminuida su actividad terapéutica. Las células Muse-AT trasplantadas podrían ser menos reconocidas por el sistema inmune, ya que como hemos demostrado, poseen menores niveles de expresión de HLA-DR.

Ha sido demostrado que al modificar genéticamente células MSCs induciendo una sobreexpresión de TGF- β , en un modelo de diabetes provocado por STZ, las MSCs/TGF- β retrasaban la aparición de hiperglucemias por tiempos cortos y por otro lado, se ha observado que los valores de glucemia disminuyeron lentamente a partir de las 3 semanas post-inyección, indicando que el TGF- β liberado por las MSCs modificadas estaría protegiendo la implantación de las células madre, favoreciendo a la regeneración de células β pancreáticas [148]. Otro grupo, confirmó la capacidad de protección de TGF- β , evitando la apoptosis de las MSCs y favoreciendo la regeneración nerviosa de células de Schwann [149]. Por lo tanto, en base a las características que observamos de las células Muse-AT y las diversas evidencias de otros grupos de investigación que avalan capacidades extraordinarias de células madre en distintos modelos, decidimos investigar el potencial terapéutico de las células Muse-AT aprovechando su capacidad regulatoria sobre el sistema inmune *in vivo* en modelos murinos de T1DM. Para ello, comenzamos con un modelo de desarrollo natural y espontáneo de la diabetes autoinmune utilizando ratones NOD. Al evidenciar glucemias >250mg/dl inyectamos i.p. células Muse-AT observando glucemias oscilantes en función del tiempo entre las semanas 0 a 7 post-inyección, sucediendo lo contrario en los controles que aumentaron drásticamente las glucemias a valores >500mg/dl antes de cumplir la semana. Estos resultados preliminares sugieren una protección parcial del ataque dirigido contra las células β por parte de las células Muse-AT. Podríamos especular que un

incremento en el número de inyecciones de células Muse-AT, un cambio en la ruta de su administración (i.v.) o alternativamente, el empleo de las células Muse-AT en combinación con biológicos (por ej., dosis subóptimas del anticuerpo monoclonal anti-CD3) podrían arrojar mejores resultados en cuanto a la velocidad de deterioro o el incremento en la recuperación de las células β , mejorando así la homeostasis de la glucosa durante la diabetes autoinmune.

Existe evidencia que la aplicación de células madre podría ser benéfica para el tratamiento de la diabetes autoinmune. Se ha reportado que al inyectar MSCs por vía i.v. en ratones NOD que aún no presentaban signos de hiperglucemia (semana 4 de vida), estas previnieron el desarrollo de la diabetes autoinmune [150]. Estas evidencias nos condujeron a replantearnos la posibilidad de que más allá de la demostración que las células Muse-AT fenotípicamente expresan niveles bajos de HLA-DR, aunque altos de HLA-ABC, al trasplantar las células Muse-AT a los ratones NOD, el sistema inmune pudiese reconocerlas como extrañas y tal vez por ello no se logró observar efectos en la homeostasis de la glucosa, si los tuviera realmente. Por lo tanto decidimos realizar nuevos experimentos utilizando otro modelo de diabetes empleando ratones NODscid, que carecen de la rama adaptativa del sistema inmune. Para ello, fueron diabetizados mediante STZ, y al presentar valores de hiperglucemia >250mg/dl, inyectamos i.v. células Muse-AT, observando nuevamente glucemias oscilantes y mejor estado de salud general. Determinamos que el grupo tratado con células Muse-AT presentaba un mejor control de la glucemia, arrojando valores significativos mediante el cálculo del área bajo la curva en función del tiempo de las glucemias respecto a los controles. Probablemente, lo que observamos aquí esté asociado a la potencialidad de las células Muse-AT de generar factores de diferenciación hacia células β o su propia diferenciación en células β . Sin embargo, éstos mecanismos no han sido analizados, aún.

Otra alternativa postulada para la terapia de la T1D, es el reemplazo celular β mediante el trasplante de islotes pancreáticos provenientes de donantes cadavéricos. Si bien es una terapia extrema planteada solo para pacientes que presentan episodios de hipoglucemias recurrentes y una reducida habilidad para detectar estos episodios, podría ser una alternativa

terapéutica válida para independizarse de la aplicación diaria de insulina y evitar, las situaciones de riesgo de vida como los episodios de hipoglucemia mencionados. Como fue descrito con más detalle en la sección de Introducción, para lograr la independencia a la insulina exógena, es necesario el trasplante de islotes pancreáticos de múltiples donantes y administración crónica de un cocktail de inmunosupresores. Actualmente, el trasplante de islotes es un procedimiento poco eficaz debido a la poca disponibilidad de donantes y el deterioro que provocan los inmunosupresores. Es por ello, que numerosos grupos de investigación se encuentran en la búsqueda de mejorar este procedimiento. Los días iniciales posteriores al trasplante de islotes son los más críticos debido a que más del 60% de los islotes mueren ya que no logran una correcta implantación; la baja tasa de neovascularización limita de sobremanera la nutrición.

Las MSCs poseen capacidades inmunomoduladoras y efectos reparadores [151,152] ofreciendo nuevas estrategias en el contexto del trasplante de islotes pancreáticos alogénico. Las MSCs (alogénicas, singénicas y xenogénicas) han mostrado ser útiles para mejorar la supervivencia y función de islotes *in vivo* [153-157]. También, se ha evaluado la capacidad de neovascularización de las células MSCs en modelos *in vivo*. Al co-trasplantar islotes con MSCs singénicas, se ha observado una mayor neovascularización en la zona del trasplante [154]. Sin embargo, aún no se han podido superar algunos problemas relacionados con la necesidad de aplicación a gran escala en la clínica, debido a que se necesita una gran cantidad de células para conseguir resultados significativos, y la baja capacidad de supervivencia de las MSCs una vez trasplantadas. En el trabajo aquí expuesto, describimos que las células Muse-AT expresan factores asociados a la neovascularización como el TGF- β 1, y posiblemente también IL-37. La primera ha sido mencionada como un posible agente responsable de la inmunomodulación y además, se conoce que es una citoquina con actividad angiogénica. Se ha descrito que juega un rol fundamental durante la angiogénesis en el desarrollo embrionario y también está involucrada en diversas patologías. Como hemos descrito anteriormente, la función de TGF- β 1 es altamente dependiente del contexto.

También hemos identificado a IL-37, que recientemente se ha reportado que posee actividad pro-angiogénica, al menos en parte a través de la vía de señalización TGF- β -ALK1 en células endoteliales. TGF- β 1 interactúa con IL-37 y aumenta la afinidad de unión de IL-37 al complejo receptor ALK1, permitiendo que la IL-37 señalice a través de ALK1 para activar respuestas pro-angiogénicas [116]. Nosotros hemos demostrado también que los clusters de Muse-AT expresan VEGF y CD31 (marcador de células endoteliales). Ha sido demostrado que el co-trasplante de islotes pancreáticos con células derivadas de médula ósea humana denominadas MAPCs (del inglés, non-endothelial bone marrow derived multipotent adult progenitor cells) mejoró la revascularización del trasplante y su posterior funcionamiento de los islotes trasplantados. Estas células mostraron liberar gran cantidad de agentes pro-angiogénicos como una herramienta fundamental en el trasplante de islotes [158]. Todos estos hallazgos sumado a nuestras evidencias relacionadas a los posibles factores de neovascularización identificados en las células Muse-AT, nos llevaron a plantear una nueva hipótesis: el co-trasplante de células Muse-AT con un número subóptimo de islotes pancreáticos podría mejorar la eficacia del trasplante en modelos murinos de diabetes autoinmune, fundamentalmente por el potencial angiogénico y capacidad inmunoreguladora de las células Muse-AT. Diversos experimentos en curso en nuestro laboratorio apuntan hacia este objetivo.

CONCLUSION

CONCLUSION

Las células Muse-AT son una nueva población de células madre pluripotentes obtenidas a partir de un procedimiento sencillo, poco invasivo, de muy bajo costo y en forma abundante a partir de tejido adiposo del adulto. Estas poseen una alta capacidad de diferenciación hacia tejidos de las tres líneas germinales, sin riesgo de formación de teratomas luego de su trasplante *in vivo*. Se destaca la capacidad inmunoreguladora de las células Muse-AT mediada por diversos factores sintetizados por estas células, principalmente TGF- β 1. Por lo tanto, la administración de células Muse-AT podría representar una metodología segura de terapia regenerativa e inmunomoduladora para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, como por ejemplo la diabetes tipo 1.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014;37 Suppl 1:S81-90.
2. Holman RR. Type 2 diabetes mellitus in 2012: Optimal management of T2DM remains elusive. *Nat Rev Endocrinol* 2013;9(2):67-8.
3. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34(6):e61-993.
4. Cervin C, Lyssenko V, Bakhtadze E, et al. Genetic similarities between latent autoimmune diabetes in adults, type 1 diabetes, and type 2 diabetes. *Diabetes* 2008;57(5):1433-7.
5. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia* 2003; 46:760-5.
6. McVeigh GE, Gibson W, Hamilton PK. Cardiovascular risk in the young type 1 diabetes population with a low 10-year, but high lifetime risk of cardiovascular disease. *Diabetes Obes Metab* 2012.
7. Davidson MH. Cardiovascular risk factors in a patient with diabetes mellitus and coronary artery disease: therapeutic approaches to improve outcomes: perspectives of a preventive cardiologist. *Am J Cardiol* 2012; 110:43B-9B.
8. Greiner DL, Rossini AA, Mordes JP. Translating data from animal models into methods for preventing human autoimmune diabetes mellitus: caveat emptor and primum non nocere. *Clin Immunol* 2001; 100:134-43.
9. Lendrum R, Walker G, Cudworth AG, et al. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus. *Lancet* 1976;2(7998):1273-6.
10. Oikarinen S, Tauriainen S, Hober D, et al. Virus antibody survey in different european populations indicates risk association between coxsackievirus B1 and type 1 diabetes. *Diabetes*. 2014;63(2):655–662.
11. Hober D, Sane F. Enteroviral pathogenesis of type 1 diabetes. *Discovery Medicine* 2010;10(51):151–160
12. Virtanen SM, Knip M. Nutritional risk predictors of β cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2003;78(6):1053–1067.
13. D'Angeli MA, Merzon E, Valbuena LF, et al. Environmental factors associated with childhood-onset type 1 diabetes mellitus: an exploration of the hygiene and overload hypotheses. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine* 2010;164(8):732–738.
14. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, et al. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39(3):481-97.
15. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, et al. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 2009;373(9680):2027-33.

16. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, et al. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 2009;155(2):173-81.
17. Barcala Tabarozzi AE, Castro CN, Dewey RA, et al. Cell-based interventions to halt autoimmunity in type 1 diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol* 2013;171(2):135-46.
18. Roep BO, Kallan AA, De Vries RR. Beta-cell antigen-specific lysis of macrophages by CD4 T-cell clones from newly diagnosed IDDM patient. A putative mechanism of T-cell-mediated autoimmune islet cell destruction. *Diabetes* 1992;41(11):1380-4.
19. Chang JC, Linarelli LG, Laxer JA, et al. Insulin-secretory-granule specific T cell clones in human IDDM. *J Autoimmun* 1995;8(2):221-34.
20. Lampeter EF, Homberg M, Quabeck K, et al. Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. *Lancet* 1993;341(8855):1243-4.
21. Perone MJ, Bertera S, Tawadrous ZS, et al. Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. *J Immunol* 2006;177(8):5278-89.
22. Bougneres PF, Carel JC, Castano L, et al. Factors associated with early remission of type I diabetes in children treated with cyclosporine. *N Engl J Med* 1988;318(11):663-70.
23. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2002;346(22):1692-8.
24. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005;352(25):2598-608.
25. Sherry N, Hagopian W, Ludvigsson J, et al. Teplizumab for treatment of type 1 diabetes (Protege study): 1-year results from a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2011;378(9790):487-97.
26. Skowera A, Ellis RJ, Varela-Calvino R, et al. CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope. *J Clin Invest* 2008;118(10):3390-402.
27. Toma A, Laika T, Haddouk S, et al. Recognition of human proinsulin leader sequence by class I-restricted T-cells in HLA-A*0201 transgenic mice and in human type 1 diabetes. *Diabetes* 2009;58(2):394-402.
28. Coppieters KT, Dotta F, Amirian N, et al. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *J Exp Med* 2012;209(1):51-60.
29. Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995;268(5214):1185-8.
30. Serreze DV, Chapman HD, Post CM, et al. Th1 to Th2 cytokine shifts in nonobese diabetic mice: sometimes an outcome, rather than the cause, of diabetes resistance elicited by immunostimulation. *J Immunol* 2001;166(2):1352-9.

31. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007;8(2):191-7.
32. Putnam AL, Vendrame F, Dotta F, Gottlieb PA. CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 2005;24(1):55-62.
33. Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, et al. No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 2007;56(3):604-12.
34. Kukreja A, Cost G, Marker J, et al. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002;109(1):131-40.
35. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, et al. Defective suppressor function in CD4(+)/CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54(1):92-9.
36. Perone MJ, Bertera S, Shufesky WJ, et al. Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1. *J Immunol* 2009 Mar 1;182(5):2641-53.
37. Arif S, Moore F, Marks K, et al. Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated beta-cell death. *Diabetes* 2011;60(8):2112-9.
38. Ferraro A, Socci C, Stabilini A, et al. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2011;60(11):2903-13.
39. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol* 2010;185(3):1959-67.
40. Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, et al. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice. *J Exp Med* 1996;184(5):2049-53.
41. Hu CY, Rodriguez-Pinto D, Du W, et al. Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest* 2007;117(12):3857-67.
42. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med* 2009;361(22):2143-52.
43. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Bundy B, et al. B-lymphocyte depletion with rituximab and beta-cell function: two-year results. *Diabetes Care* 2014;37(2):453-9.
44. Martin S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, et al. Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. *N Engl J Med* 2001;345(14):1036-40.
45. Brauner H, Elemans M, Lemos S, et al. Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2010;184(5):2272-80.

46. Gur C, Porgador A, Elboim M, et al. The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2010;11(2):121-8.
47. Martin AP, Rankin S, Pitchford S, et al. Increased expression of CCL2 in insulin-producing cells of transgenic mice promotes mobilization of myeloid cells from the bone marrow, marked insulinitis, and diabetes. *Diabetes* 2008;57(11):3025-33.
48. Calderon B, Suri A, Unanue ER. In CD4+ T-cell-induced diabetes, macrophages are the final effector cells that mediate islet beta-cell killing: studies from an acute model. *Am J Pathol* 2006;169(6):2137-47.
49. Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W, et al. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J Immunol* 2009;183(7):4432-9.
50. Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, et al. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(2):578-83.
51. Uno S, Imagawa A, Okita K, et al. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* 2007;50(3):596-601.
52. Secrest AM, Becker DJ, Kelsey SF, et al. All-cause mortality trends in a large population-based cohort with long-standing childhood-onset type 1 diabetes: the Allegheny County type 1 diabetes registry. *Diabetes Care* 2010;33(12):2573-9.
53. Currie CJ, Peyrot M, Morgan CL, et al. The impact of treatment non-compliance on mortality in people with type 1 diabetes. *J Diabetes Complications* 2013;27(3):219-23.
54. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343:230-8.
55. Hering B. J. et al. Phase 3 trial of transplantation of human islets in type 1 diabetes complicated by severe hypoglycemia. *Diabetes Care* 2016;39, 1230–1240.
56. Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, et al. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA* 2005; 293:830-5.
57. Posselt AM, Szot GL, Frassetto LA, et al. Islet transplantation in type 1 diabetic patients using calcineurin inhibitor-free immunosuppressive protocols based on T-cell adhesion or costimulation blockade. *Transplantation* 2010; 90:1595-601.
58. Fraker, C, Montelongo, J, Szust, J, Khan, A & Ricordi, C. The use of multiparametric monitoring during islet cell isolation and culture: a potential tool for in-process corrections of critical physiological factors. *Cell Transplant* 2004; 13, 497–502.

59. Ichii, H. *et al.* Shipment of human islets for transplantation. *Am. J. Transplant* 2007;7, 1010–1020.
60. McCall M, James Shapiro AM. Update on islet transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2:a007823.
61. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 2005;22(4):359-70.
62. Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, *et al.* Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:256707.
63. Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 1998; 47:50-6.
64. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; 51:216-26.
65. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 1976; 193:415-7.
66. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, *et al.* Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 1980;29(1):1-13.
67. Lodde BM, Mineshiba F, Kok MR, *et al.* NOD mouse model for Sjogren's syndrome: lack of longitudinal stability. *Oral Dis* 2006;12(6):566-72.
68. Rosignoli F, Roca V, Meiss R, *et al.* Defective signalling in salivary glands precedes the autoimmune response in the non-obese diabetic mouse model of sialadenitis. *Clin Exp Immunol* 2005;142(3):411-8.
69. Rivero VE, Cailleau C, Depiante-Depaoli M, Riera CM, Carnaud C. Non-obese diabetic (NOD) mice are genetically susceptible to experimental autoimmune prostatitis (EAP). *J Autoimmun* 1998;11(6):603-10.
70. Katz JD, Wang B, Haskins K, Benoist C, Mathis D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 1993;74(6):1089-100.
71. Stadinski BD, DeLong T, Reisdorph N, *et al.* Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2010;11(3):225-31.
72. Rippon, HJ & Bishop, AE. Embryonic stem cells. *Cell Proliferation* 2004; 37, 23–34.
73. Fischbach, GD & Fischbach, RL. Stem cells: science, policy, and ethics. *J. Clin Invest* 2004;114, 1364–1370.
74. Keller, G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 2005; 19, 1129–1155.
75. Hoffman, LM & Carpenter, MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nature Biotechnol* 2005; 23, 699–708.
76. Wagers, AJ & Weissman, IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116, 639–648.
77. Weissman, IL, Anderson, DJ & Gage, F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu. Rev Cell Dev Biol* 2001; 17, 387–403.

- 78.** O'Connor TP, Crystal RG. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat Rev Genet* 2006 Apr;7(4):261-76.
- 79.** Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
- 80.** Takahashi K & Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126, 663–676 .
- 81.** Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131, 861–872.
- 82.** Yu J, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318, 1917–1920.
- 83.** Yui Y. Questions Surrounding iPS cells in Japan. *Int J Stem Cells* 2016;9:1–2.
- 84.** Wakao S, Akashi H, Kushida Y, Dezawa M. Muse cells, newly found nontumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues. *Pathol Int* 2014;64:1–9.
- 85.** Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:8639–43.
- 86.** Selmani Z, Naji A, Zidi I, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem cells* 2008; 26:212-222.
- 87.** Chen K, Wang D, Du WT, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin Immunol* 2010; 135:448-458.
- 88.** Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem cells* 2006; 24:2582-2591.
- 89.** Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439–41.
- 90.** Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW-F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 2007; 83:71-76.
- 91.** Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, et al. 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;107:1484–90
- 92.** Yen BL, Chang CJ, Liu K-J, et al. Brief report human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors possess strong immunosuppressive effects toward natural killer cells as well as T lymphocytes. *Stem Cells* 2009;27:451–6.

- 93.** Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, et al. Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant* 2010;19:667–79.
- 94.** Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay, D, et al. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* 2007;207(2):267–274.
- 95.** Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, et al. Isolation, culture and evaluation of multilineage- differentiating stress-enduring (Muse) cells. *Nat Protoc* 2013;8(7):1391–1415.
- 96.** Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, et al. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(24):9875–9880.
- 97.** Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Dezawa M. Bone marrow mesenchymal cells: How do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? *Arch. Immunol. Ther Exp* 2011;59(5):369–378.
- 98.** Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, et al. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: Potential implications in regenerative medicine. *Stem Cells Dev* 2014;23(7):717–728.
- 99.** Tsuchiyama K, Wakao S, Kuroda Y, et al. Functional melanocytes are readily reprogrammable from multilineage-differentiating stress-enduring (muse) cells, distinct stem cells in human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2013;133(10):2425–2435.
- 100.** Kinoshita K, Kuno S, Ishimine H, et al. Therapeutic potential of adipose-derived SSEA-3-positive muse cells for treating diabetic skin ulcers. *Stem Cells Transl Med* 2015;4(12):1511–1522.
- 101.** Uchida H, Morita T, Niizuma K, et al. Transplantation of unique subpopulation of fibroblasts, muse cells, ameliorates experimental stroke possibly via robust neuronal differentiation. *Stem Cells* 2016;34(1):160–173.
- 102.** Heneidi S, Simerman AA, Keller E, et al. Awakened by cellular stress: isolation and characterization of a novel population of pluripotent stem cells derived from human adipose tissue. *PLoS One* 2013;8, e64752.
- 103.** Zhang WY, de Almeida PE, Wu JC. Teratoma formation: a tool for monitoring pluripotency in stem cell research. *StemBook* 2008.
- 104.** Hong HS, Lee J, Lee E et al. A new role of substance P as an injury-inducible messenger for mobilization of CD29(+) stromal-like cells. *Nat Med* 2009;15:425–435.
- 105.** Chase LG, Yang S, Zachar V et al. Development and characterization of a clinically compliant xeno-free culture medium in good manufacturing practice for human multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells transl med* 2012;1:750–758.
- 106.** Itoh F, Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF- β family signals in the fate determination of pluripotent stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 2014;32:98-106.

- 107.** Lichtman SN, Wang J, Lemasters JJ. LPS receptor CD14 participates in release of TNFalpha in RAW 264.7 and peritoneal cells but not in Kupffer cells. *Am J Physiol* 1998;275 (1 Pt 1):G39–G46.
- 108.** Judkowski V, Pinilla C, Schroder K et al. Identification of MHC class II-restricted peptid ligands, including a glutamic acid decarboxylase 65 sequence, that stimulate diabetogenic T cells from transgenic BDC2.5 nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2001;166:908–917.
- 109.** Castro CN, Barcala Tabarozzi AE, Winnewisser J et al. Curcumin ameliorates autoimmune diabetes. Evidence in accelerated murine models of type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 2014;177:149–160.
- 110.** Stadinski BD, Delong T, Reisdorph N et al. Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2010;11:225–231.
- 111.** Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *EMBO J* 1999;18: 1280–1291.
- 112.** Bobik A. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006;26, 1712.
- 113.** Nold MF, et al. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nature immunology* 2010;11, 1014.
- 114.** Xu WD, Zhao Y & Liu Y. Insights into IL-37, the role in autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews* 2015;14, 1170.
- 115.** Yang T, et al. IL-37 Is a novel proangiogenic factor of developmental and pathological angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2015; 35, 2638.
- 116.** Zhao M, Hu Y, Jin J, et al. Interleukin 37 promotes angiogenesis through TGF-β signaling. *Sci Rep* 2017;21;7(1):6113.
- 117.** Biarnes M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes*. 2002;51:66–72.
- 118.** Davalli AM, Scaglia L, Zangen DH, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC. Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period: dynamic changes in structure and function. *Diabetes*. 1996;45:1161–1167.
- 119.** Caplan AI, Correa D. The MSC: An injury drugstore. *Cell Stem Cell* 2011;9:11–15.
- 120.** Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/ stromal cells (MSCs): Role as guardians of inflammation. *Mol Ther* 2012;20:14–20.
- 121.** Hodgetts SI, Beilharz MW, Scalzo AA et al. Why do cultured transplanted myoblasts die in vivo? DNA quantification shows enhanced survival of donor male myoblasts in host mice depleted of CD4+ and CD8+ cells or Nk1.1+ cells. *Cell Transplant* 2000;9:489–502.
- 122.** Mingliang R, Bo Z, Zhengguo W. Stem cells for cardiac repair: Status, mechanisms, and new strategies. *Stem Cells Int* 2011;2011: 310928.

- 123.** Bartosh TJ, Ylöstalo JH, Mohammadipoor A, et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:13724–13729.
- 124.** Frith JE, Thomson B, Genever PG. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16:735–749.
- 125.** Yeh HY, Liu BH, Hsu SH. The calcium dependent regulation of spheroid formation and cardiomyogenic differentiation for MSCs on chitosan membranes. *Biomaterials* 2012; 33:8943–8954.
- 126.** Stiehler M, Bünger C, Baatrup A et al. Effect of dynamic 3-D culture on proliferation, distribution, and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2009;89:96–107.
- 127.** Miao Z, Jin J, Chen L et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2006;30:681–687.
- 128.** Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, et al. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J* 2006;25:3515–3523.
- 129.** Ylöstalo JH, Bartosh TJ, Coble K et al. Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells* 2012;30:2283–2296.
- 130.** Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009;15: 42–49.
- 131.** Shi Y, Su JAI, Roberts AI, et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 2012;33:136–143.
- 132.** Sun L, Akiyama K, Zhang H, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells* 2009;27:1421–1432.
- 133.** Popp FC, Renner P, Eggenhofer E, et al. Mesenchymal stem cells as immunomodulators after liver transplantation. *Liver Transpl* 2009;15:1192–1198.
- 134.** Zhou B, Yuan J, Zhou Y, et al. Administering human adipose-derived mesenchymal stem cells to prevent and treat experimental arthritis. *Clin Immunol* 2011;141:328–337.
- 135.** Dalal J, Gandy K, Domen J. Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease. *Pediatr Res* 2012;71:445–451.
- 136.** Kim H-S, Yun J-W, Shin T-H, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell derived PGE2 and TGF- β 1 alleviate atopic dermatitis by reducing mast cell degranulation. *Stem Cells* 2015;33:1254–1266.
- 137.** Maxson S, Lopez EA, Yoo D, et al. Concise review: Role of mesenchymal

- stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:142–149.
- 138.** Rodríguez TM, Saldías A, Irigo M, et al. Effect of TGF- β 1 stimulation on the secretome of human adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Transl Med* 2015;4:894–898.
- 139.** Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, et al. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: Role of mesenchymal stem cell-derived TGF- β . *J Immunol* 2010;184:5885–5894..
- 140.** Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, et al. Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 770–774.
- 141.** Di Sabatino A, Pickard KM, Rampton D, et al. Blockade of transforming growth factor β upregulates T-box transcription factor T-bet, and increases T helper cell type 1 cytokine and matrix metalloproteinase-3 production in the human gut mucosa. *Gut* 2008;57:605–612.
- 142.** Bulau AM, Nold MF, Li S, et al. Role of caspase-1 in nuclear translocation of IL-37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(7):2650-5.
- 143.** Wu H, Mahato RI. Mesenchymal stem cell-based therapy for type 1 diabetes. *Discov Med* 2014;139–143
- 144.** Davey GC, Patil SB, O'Loughlin A, O'Brien T. Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus. *Front Endocrinol* 2014;5-86
- 145.** Madec AM, Mallone R, Afonso G, et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia* 2009;52: 1391–1399.
- 146.** Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 2005;106:419–427.
- 147.** Hess D, Li L, Martin M, et al. Bhatia, Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 2003;21:763–770.
- 148.** Daneshmandi S, Karimi MH, Pourfathollah AA. TGF- β engineered mesenchymal stem cells (TGF- β /MSCs) for treatment of Type 1 diabetes (T1D) mice model. *Int Immunopharmacol* 2017;44:191-196
- 149.** Luo H, Zhang Y, Zhang Z, Jin Y, The protection of MSCs from apoptosis in nerve regeneration by TGF β 1 through reducing inflammation and promoting VEGF-dependent angiogenesis. *Biomaterials* 2012;33:4277–4287.
- 150.** Madec AM, Mallone R, Afonso G, et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia* 2009;52(7):1391-9.
- 151.** English K, Mahon BP, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells; role in tissue repair, drug discovery and immune modulation. *Curr Drug Deliv* 2014;11:561–571.

- 152.** English K, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a015560
- 153.** Ding Y, Xu D, Feng G, et al. Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogenic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase- 2 and -9. *Diabetes* 2009; 58:1797–1806.
- 154.** Ito T, Itakura S, Todorov I, et al. Mesenchymal stem cell and islet cotransplantation promotes graft revascularization and function. *Transplantation* 2010;89:1438–1445.
- 155.** Kim YH, Wee YM, Choi MY, et al. Interleukin (IL)-10 induced by CD11b(fl) cells and IL-10-activated regulatory T cells play a role in immune modulation of mesenchymal stem cells in rat islet allografts. *Mol Med* 2011;17:697– 708.
- 156.** Rackham CL, Chagastelles PC, Nardi NB, et al. Co-transplantation of mesenchymal stem cells maintains islet organisation and morphology in mice. *Diabetologia* 2011;54:1127–1135.
- 157.** Wu H, Wen D, Mahato RI. Third-party mesenchymal stem cells improved human islet transplantation in a humanized diabetic mouse model. *Mol Ther* 2013;21:1778–1786.
- 158.** Cunha JP, Leuckx G, Sterkendries P, et al. Human multipotent adult progenitor cells enhance islet function and revascularisation when co-transplanted as a composite pellet in a mouse model of diabetes. *Diabetologia* 2017;60(1):134-14.