



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOSUPRESORA DE LAS CÉLULAS  
TRONCALES MESENQUIMALES HUMANAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA,  
SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y PLACENTA

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**MARTA ELENA CASTRO MANRREZA**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. ISABEL ENRIQUE MIRANDA PERALTA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

MEXICO D.F. MAYO, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 17 de febrero de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **CASTRO MANRREZA MARTA ELENA** con número de cuenta **93655286** con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOSUPRESORA DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES HUMANAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA, SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y PLACENTA"**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS**:

Presidente: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL  
Vocal: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA  
Secretario: DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA  
Suplente: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ  
Suplente: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de abril de 2014

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, por todo el apoyo recibido durante este tiempo.
- Al CONACYT por la beca y el apoyo recibido para la realización de este trabajo (Clave:87183).
- Al Programa para la Formación de Investigadores y al Fondo de Investigación en Salud IMSS, por el apoyo recibido para la realización de este trabajo (Clave: 1159 y 1014).
- A los miembros del comité tutor, integrado por el Dr. Edelmiro Santiago Osorio y el Dr. Enrique Isabel Miranda Peralta, quienes gracias a sus observaciones enriquecieron este estudio.

- Al Dr. Juan José Montesinos Montesinos por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Mil gracias por todo el apoyo brindado y por la confianza.
- A la Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal, la Dra. Leticia Rocha Zavaleta y el Dr. Andrés Eliú Catell Rodríguez, quienes enriquecieron el escrito con sus valiosas sugerencias.
- Al Dr. Héctor Mayani por sus valiosas sugerencias al trabajo, por conformar este grupo de investigación de tanta calidad humana y académica.
- A la Dra. Eugenia Flores Figueroa por las enseñanzas del citómetro de flujo y por los consejos.
- A la Dra. Karina Chávez y la Dra. Victoria Legorreta por su ayuda en las determinaciones de citocinas y PGE<sub>2</sub>.
- Al Dr. Alberto Monroy por enriquecer este trabajo con sus observaciones.
- A la laboratorista Martina Flores por todo su apoyo en el laboratorio.
- A la M. en C. Karina Patricia Estrada González, por su ayuda en la obtención de células troncales mesenquimales de médula ósea.
- A la Biol. Erika Hernández Estévez por su ayuda en la obtención de células troncales mesenquimales de placenta.
- A la Dra. Roxana Pelayo y la Dra. Lourdes Arriaga Pizano por su asesoría en lo análisis de citometría.
- Al M. en C. Ignacio Martínez Martínez por la revisión del escrito y sus acertados comentarios.
- A todos los integrantes de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI, que hacen posible un ambiente de trabajo tan agradable. En especial quiero agradecer todos los buenos momentos a: Marti, Erika, Karina, Purizaca, Paty, Luis, Ileana, Miguel, Moni, Lalo, Dafne y Sócrates.
- A Lolita por darme la oportunidad de llegar a esta unidad de investigación.
- A Nachito y Juanito por todo su apoyo.

*Para el lucero de la tarde, te amo.*

*Para Nacho, gracias por todo tu apoyo incondicional.*

## ÍNDICE

<b>ABREVIACIONES.....</b>	<b>i</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>Células Troncales.....</b>	<b>1</b>
<b>Células Troncales Mesenquimales.....</b>	<b>2</b>
<b>Propiedades inmunosupresoras de las MSCs.....</b>	<b>6</b>
<b>Células NK.....</b>	<b>6</b>
<b>Células dendríticas.....</b>	<b>7</b>
<b>Linfocitos B.....</b>	<b>8</b>
<b>Linfocitos T.....</b>	<b>9</b>
<b>Factores solubles involucrados en la inmunosupresión de las MSCs.....</b>	<b>14</b>
<b>Moléculas de membrana involucradas en la inmunosupresión de las MSCs...</b>	<b>17</b>
<b>Regulación de las propiedades inmunosupresoras en las MSCs.....</b>	<b>18</b>
<b>MSCs y enfermedad injerto contra hospedero.....</b>	<b>22</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>24</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>27</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>29</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>72</b>
<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>83</b>

## ABREVIACIONES

<b>BM:</b>	Médula ósea
<b>BM-MSCs:</b>	Células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea
<b>BrdU:</b>	5-bromo-2-deoxiuridina
<b>CBA:</b>	Cytometric bead array
<b>CD:</b>	Célula dendrítica
<b>CDi:</b>	Célula dendrítica inmadura
<b>CDm:</b>	Célula dendrítica madura
<b>CML:</b>	Cultivo mixto de linfocitos
<b>CTLA-4:</b>	Antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos
<b>EGF:</b>	Factor de crecimiento epidermal
<b>ELISA:</b>	Ensayo inmunoenzimático
<b>FBS:</b>	Suero fetal bovino
<b>GVHD:</b>	Enfermedad injerto contra hospedero
<b>HGF:</b>	Factor de crecimiento de los hepatocitos
<b>HLA-G1:</b>	Antígeno de leucocitos humanos G1
<b>HLA-G5:</b>	Antígeno de leucocitos humanos G5
<b>ICAM-I:</b>	Molécula de adhesión intercelular
<b>IDO:</b>	Indolamina 2,3-dioxigenasa
<b>IFN<math>\gamma</math>:</b>	Interferon- $\gamma$
<b>IL-10:</b>	Interleucina 10
<b>ISCT:</b>	Sociedad Internacional de Terapia Celular
<b>MFI:</b>	Intensidad media de fluorescencia
<b>MNC:</b>	Células mononucleares
<b>MSCs:</b>	Célula troncal mesenquimal
<b>NK:</b>	Célula asesina natural
<b>PBMC:</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PD-L1:</b>	Ligando 1 de muerte programada
<b>PGE<sub>2</sub>:</b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PHA:</b>	Fitohemaglutinina



<b>PL:</b>	Placenta
<b>PL-MSCs:</b>	Células troncales mesenquimales derivadas de placenta
<b>SEM:</b>	Error estándar de la media
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TNF<math>\alpha</math>:</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>Treg:</b>	Linfocito T regulador
<b>UCB:</b>	Sangre de cordón umbilical
<b>UCB-MSCs:</b>	Células troncales mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical
<b>VCAM-I:</b>	Molécula de adhesión celular vascular

## RESUMEN

Las células troncales mesenquimales, también denominadas células estromales mesenquimales (MSCs, del inglés Mesenchymal stem/stromal cells), tienen capacidad inmunosupresora y pueden interactuar con componentes celulares del sistema inmune innato y adquirido, ejerciendo así un profundo efecto sobre la respuesta inmune. En particular, las MSCs afectan la proliferación y diferenciación de los linfocitos T, principalmente a través de la producción de moléculas inmunosupresoras y la generación de linfocitos T reguladores (Treg). Diferentes estudios realizados con poblaciones de células mononucleares totales han evidenciado la participación de MSCs en la inmunosupresión de linfocitos T. Sin embargo, pocos estudios han analizado el efecto inmunosupresor de las MSCs sobre poblaciones aisladas de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, lo que es importante debido a que poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son las principales células efectoras en enfermedades inmunológicas como la enfermedad de injerto contra el hospedero (GVHD, del inglés Graft Versus Host Disease). Así, la determinación del potencial de inmunosupresión de las MSCs sobre los linfocitos T, es importante en términos de terapia celular.

Actualmente la principal fuente de MSCs es la médula ósea (BM, del inglés Bone Marrow) y debido a las propiedades inmunosupresoras observadas en las BM-MSCs, se han empleado en protocolos de terapia celular para disminuir la GVHD. Sin embargo, la BM como fuente de MSCs presenta varias desventajas, es difícil conseguir donadores y el procedimiento de obtención es invasivo, por ello es importante encontrar fuentes alternativas de MSCs y determinar si tienen la misma capacidad inmunosupresora. Con el propósito de contribuir al conocimiento de las propiedades inmunosupresoras de las MSCs provenientes de sangre de cordón umbilical (UCB, del inglés Umbilical Cord Blood) y placenta (PL) sobre linfocitos T

CD3<sup>+</sup>, realizamos un estudio comparativo con BM-MSCs en términos de su capacidad para inhibir la proliferación, el efecto sobre marcadores de activación y la expresión de moléculas inmunosupresoras de membrana y secretadas. Además, analizamos su capacidad para generar poblaciones de linfocitos T con fenotipo de Treg.

En resumen, nuestro estudio muestra que las PL-MSCs tienen menor capacidad inmunosupresora que las BM-MSCs y las UCB-MSCs. Así, en contraste con las PL-MSCs, tanto las BM-MSCs como las UCB-MSCs inducen una disminución significativa de la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, incrementan la secreción de IL-10 y PGE<sub>2</sub> e inducen la diferenciación de linfocitos con fenotipo de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>. De manera interesante, las BM-MSCs y las UCB-MSCs tienen propiedades inmunosupresoras similares y los resultados sugieren que las UCB-MSCs, más que las PL-MSCs podrían ser una fuente alterna apropiada de MSCs, para el tratamiento de diversos padecimientos relacionados con el sistema inmune, como la GVHD, rechazo de injerto o enfermedades autoinmunes.

## ABSTRACT

Bone marrow (BM) Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs) have immunosuppressive properties. MSCs can interact with both innate and adaptive immune cells and thus exert profound effects on immune responses. In particular, MSCs affect T cell proliferation and differentiation primarily through the production of immunosuppressive molecules and the generation of regulatory T cells. Several studies using peripheral blood mononuclear cells have demonstrated MSCs involvement in T cell immunosuppression. However, few studies have been performed with enriched populations of CD3<sup>+</sup> T cells. This is important because CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are the major effector cells in immunological diseases such as graft-versus-host disease (GVHD). Thus, determination of the immunosuppressive potential of MSCs against T cells, it is very important for cell therapy.

BM is the main source of MSCs and because of their immunosuppressive properties, BM-MSCs have been used in cell therapy protocols to reduce GVHD. However, BM as a source of MSCs presents some disadvantages, such as the difficulty in finding donors and invasiveness of the collection procedure. Because of this, it is important to obtain MSCs from other sources than BM and determine if they have the same immunosuppressive properties. In an attempt to contribute to our understanding of the immunosuppressive properties of MSCs from BM, UCB and PL against CD3<sup>+</sup> T cells, we performed a comparative study of MSCs from three sources with regard to their potential for the inhibition of proliferation, effects on activation markers, and expression of immunosuppressive membrane and secreted molecules. We also assessed the capacity of MSCs to generate T-cell subsets displaying a regulatory phenotype in co-cultures.

In summary, our study shows that PL-MSCs possess less immunosuppressive potential than do BM-MSCs and UCB-MSCs, however for the three sources, T cell contact is essential for immunosuppression process. Unlike PL-MSCs, BM-MSCs and UCB-MSCs reduce CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell proliferation, increase IL-10 and PGE<sub>2</sub> expression and favored the generation of T-cell subsets displaying a regulatory phenotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>. Interestingly BM-MSCs and UCB-MSCs have similar immunosuppressive properties and the results suggest that UCB-MSCs, rather than PL-MSCs, would be a better alternative to BM-MSCs in cell therapy protocols for the treatment of immunological diseases such as GVHD.

# INTRODUCCIÓN

## Células Troncales

Las células troncales, se definen con base en sus características funcionales. Son células no diferenciadas, con capacidad de autorrenovación, es decir, de producir células idénticas a la inicial (lo cual permite el mantenimiento de la población de células troncales) y capacidad para generar al menos un tipo celular diferenciado con funciones específicas en el cuerpo (Weissman 2000). Durante el desarrollo de los mamíferos, se generan diferentes tipos de células troncales y cada una de ellas posee determinado potencial de diferenciación; con base en esta capacidad se han clasificado en: totipotentes, pluripotentes y multipotentes (Thomson et al., 1998; Lemoli et al., 2005) (Fig. 1).

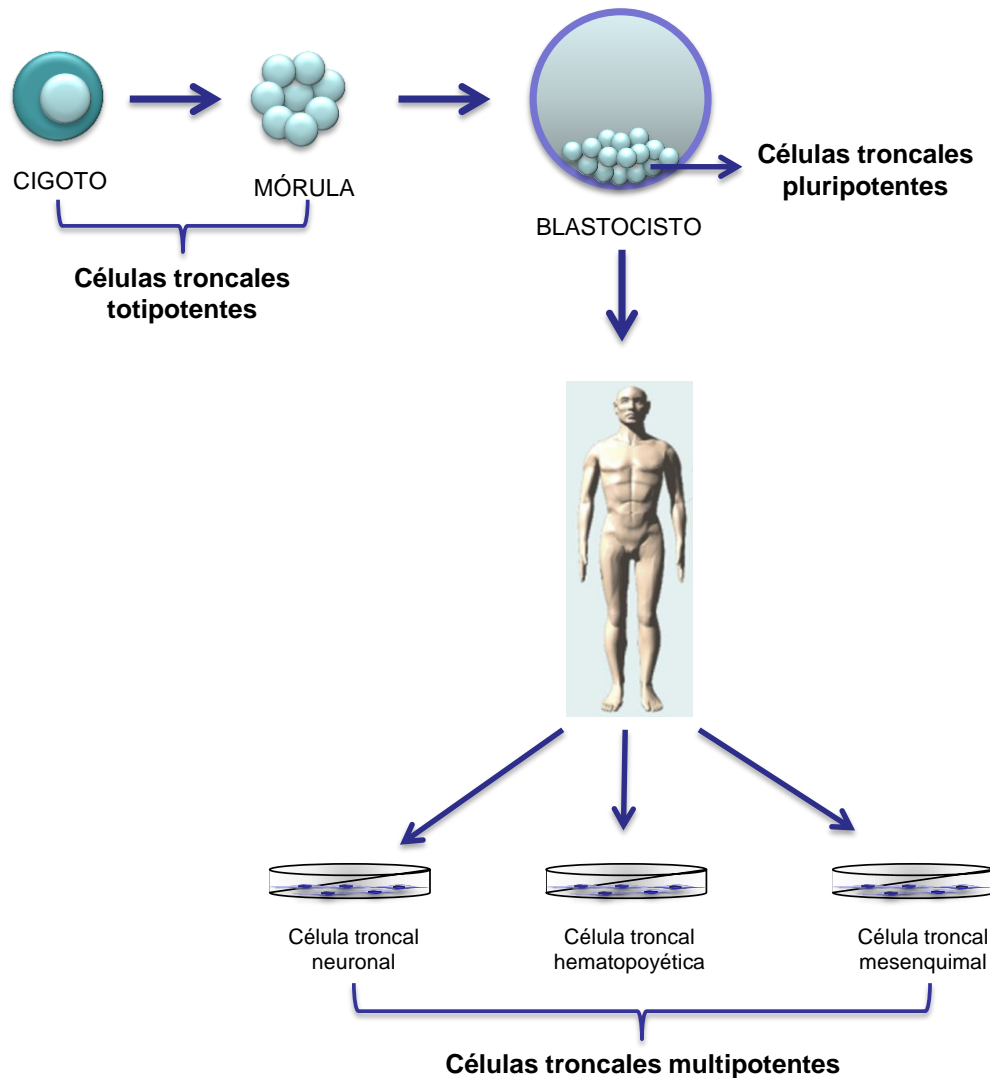
Las células troncales totipotentes, se originan desde la formación del huevo o cigoto y están presentes hasta el estadio de mórula, en la cual las ocho células que conforman esta estructura son de esta naturaleza. Estas células troncales tienen la capacidad de formar todos los tipos celulares de un organismo, así como las estructuras extraembrionarias (Rossant 2001; Herzog et al., 2003). Continuando con el desarrollo embrionario, en el estadio de blastocisto, las células de la masa interior de la blástula son capaces de formar todos los tipos celulares de un organismo adulto, estas células se denominan como células troncales pluripotentes o células troncales embrionarias (Thomson et al., 1998). Otras células que tienen esta propiedad son las células germinales primordiales obtenidas de la cresta gonadal. Las tres capas germinales que se integran durante el desarrollo embrionario se generan a partir de las células troncales pluripotenciales: ectodermo (que origina piel y linajes neurales), mesodermo (que da origen a la sangre, músculo, cartílago, tejido óseo y adiposo) y endodermo (que origina tejidos del tracto respiratorio y digestivo) (Thomson et al., 1998). Finalmente en la etapa

adultas, existen células troncales en la mayoría de los tejidos, que se denominan células troncales multipotentes y son capaces de formar todos los tipos celulares diferenciados del tejido al cual pertenecen, si el tejido del cual provienen está conformado por un solo tipo celular, entonces se denominan unipotentes (Rossant 2001). De manera general, las células troncales de adulto tienen capacidad de autorrenovación y diferenciación limitadas; aunque, recientemente, se ha mostrado que también son capaces de generar tipos celulares con características de otros tejidos, lo cual plantea el concepto de plasticidad en este tipo de células (Herzog et al., 2003). Un ejemplo de células troncales multipotentes son las que se localizan en la médula ósea: las células troncales hematopoyéticas (HSC por sus siglas en inglés) y las células troncales mesenquimales, también denominadas células estromales mesenquimales (MSCs, del inglés Mesenchymal Stem/Stromal Cells) (Herzog et al., 2003; Salem y Thiernemann, 2010).

### **Células Troncales Mesenquimales**

Las MSCs son células troncales adultas, que originalmente se aislaron de la BM (Friedenstein et al., 1974). Las BM-MSCs tienen la capacidad de originar algunas células del estroma de la BM como adipocitos, reticulares y osteoblastos, que en conjunto con otras células mantienen la hematopoyesis (Pittenger et al., 1999; Bianco et al., 2008). Las MSCs proliferan *in vitro* como células adherentes y son capaces de desarrollar unidades formadoras de colonias, con alta capacidad de autorrenovación y proliferación (Friedenstein et al., 1974; Pittenger et al., 1999). Debido a que, hasta el momento, no se ha definido un marcador para las MSCs, la Sociedad Internacional de Terapia Celular ha establecido que estas poblaciones celulares obtenidas *in vitro*, deben cumplir ciertas características para que puedan ser consideradas

como MSCs. Es necesario que sean positivas para los marcadores CD105, CD73, CD90, además de expresar bajo niveles de HLA-I y ser negativas para HLA-II, CD11b, CD14, CD34, CD45 y CD31; aunado a lo anterior, deben tener capacidad de diferenciación a diferentes linajes mesenquimales entre ellos hueso, cartílago y tejido adiposo (Pittenger et al., 1999; Dominici et al., 2006).



**Figura 1. Origen de las células troncales.** Las células troncales totipotentes, se originan con la formación del cigoto y están presentes hasta el estadio de mórula. Las células troncales pluripotentes o células troncales embrionarias se localizan en la masa interior de la blástula. Finalmente las células troncales multipotentes son aquellas que se localizan en los tejidos de un adulto (Modificado de Watt y Driskell, 2009).

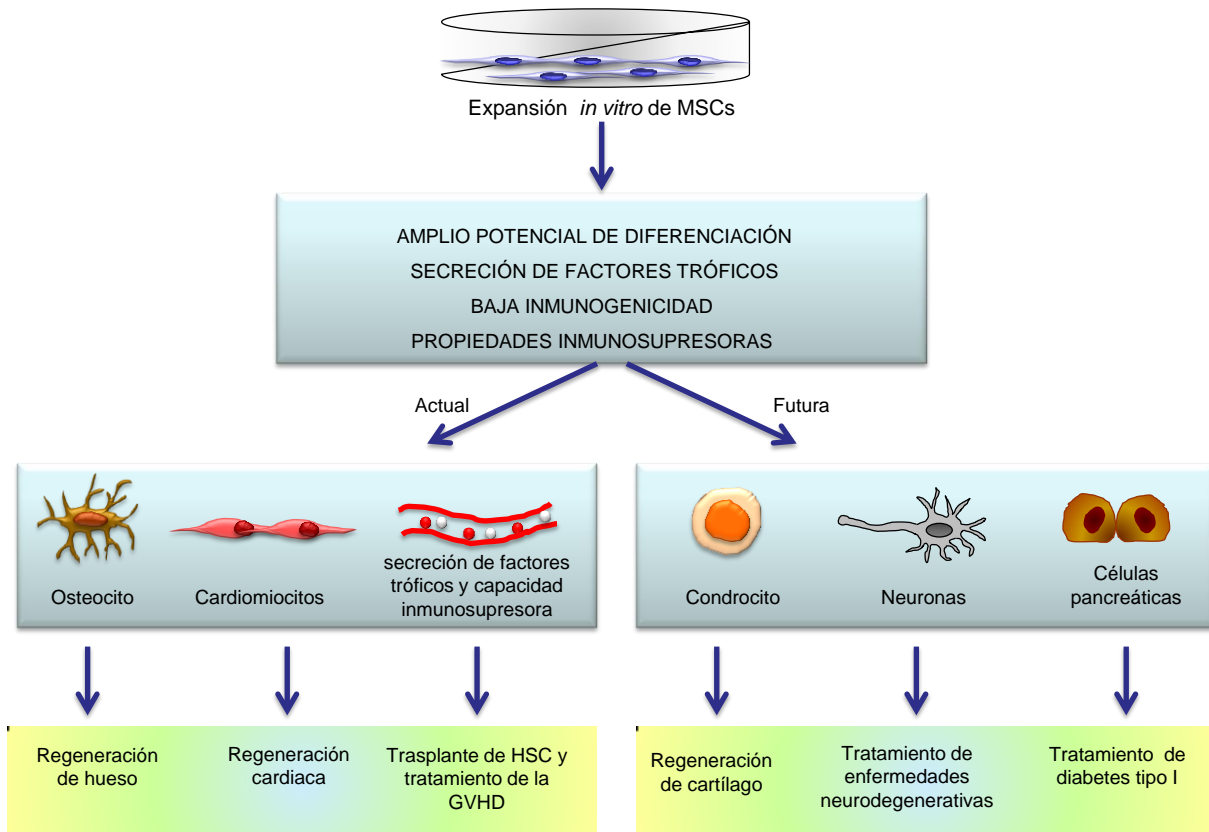


Las MSCs cultivadas *in vitro* poseen cuatro propiedades biológicas que las hacen candidatos ideales para emplearlas en terapia celular: a) amplio potencial de diferenciación (plasticidad), b) secretan factores tróficos que favorecen la remodelación de tejidos, c) baja inmunogenicidad y d) tienen propiedades inmunosupresoras. Debido a estas características son numerosos los padecimientos en los que las MSCs son potencialmente aplicables (Montesinos y Castro, 2011) (Fig. 2).

Se ha demostrado que las MSCs además de tener la capacidad de generar diferentes linajes del mesodermo (adipocitos, condrocitos, osteocitos, fibroblastos y miocitos) (Pittenger et al., 1999); también tienen la capacidad de generar linajes celulares pertenecientes a las otras capas germinales: ectodermo (neuronas) (Kopen et al., 1999) y endodermo (hepatocitos y células pancreáticas) (Snikers et al., 2009; Prabakar et al., 2012). Originalmente, debido a su potencial de diferenciación las MSCs-BM comenzaron a emplearse para el tratamiento de la osteogénesis imperfecta y en el daño al miocardio (Phinney y Prockop 2007). Se consideró que el beneficio observado en estos protocolos de terapia celular, se debió principalmente a la capacidad de diferenciación osteogénica y miogénica de las MSCs. Sin embargo, actualmente numerosos reportes indican que aunado al potencial de diferenciación, el mayor beneficio es inducido por la secreción de factores tróficos y capacidad inmunosupresora (Phinney y Prockop 2007; Prockop y Oh, 2012; Ma et al., 2014).

Diversos estudios han demostrado las propiedades inmunosupresoras de las MSCs, las cuales son capaces de interactuar con células del sistema inmune innato: (células asesinas naturales, -NK- del inglés Natural Killer) y adaptativo (células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T), ejerciendo un profundo efecto en la respuesta inmune. Este efecto inmunosupresor de las MSCs, puede darse a través de contacto celular y/o mediante la secreción de diversos factores (Meisel et al., 2004; Aggarwal y Pittenger 2005; Jiang et al.,

2005; Krampera et al., 2006; Ryan et al., 2007). Debido a estas características las MSCs son potencialmente aplicables en enfermedades en las cuales se involucre el sistema inmune, como padecimientos autoinmunes y la GVHD (Ghannam et al., 2010)



**Figura 2. Aplicación actual y futura de las MSCs en terapia celular.** Debido a las cuatro propiedades señaladas en la figura, las MSCs actualmente se aplican como tratamiento en trastornos de hueso, corazón y en la enfermedad injerto contra hospedero (GVHD). Así como, en el mejoramiento del trasplante de HSC. En el futuro podrían ser empleadas en otros padecimientos (Modificado de Montesinos y Castro, 2011).

## **Propiedades inmunosupresoras de las MSCs**

Las BM-MSCs ya se han empleado en ensayos clínicos para la prevención y tratamiento de la GVHD (Ringdé et al., 2006; Sundin et al., 2007; Battiwalla y Hematti, 2009; Toubai et al., 2009; Salem et al., 2010). Sin embargo, aún no se conocen con exactitud los mecanismos empleados por estas células para inducir inmunosupresión, por ello, es necesario realizar más estudios encaminados a contribuir al conocimiento biológico de las MSCs. A continuación se revisará el efecto de las MSCs sobre algunas células del sistema inmune.

### ***Células NK***

Los linfocitos NK son células importantes para la inmunidad innata, participando en la defensa del cuerpo contra infecciones y cáncer. Estas células ejercen su función efectora por la secreción de citocinas como  $IFN\gamma$ ,  $TNF\beta$ , IL-10 y GM-CSF; además presentan actividad citotóxica espontánea y dependiente de anticuerpos. La función de las células NK es regulada por un balance en la transmisión de señales por receptores activadores e inhibidores que interactúan con moléculas específicas de HLA en las células blanco (Sotiropoulou et al., 2006).

Se ha demostrado que las MSCs afectan el fenotipo, proliferación, potencial citotóxico y secreción de citocinas de las células NK. Es de notarse que estas células al ser activadas con IL-2 son capaces de secretar  $IFN\gamma$ . Sin embargo, cuando su activación se realiza en presencia de MSCs, la secreción de esta citocina disminuye significativamente (Aggarwal y Pittenger, 2005). Además, se ha observado una disminución en la proliferación y actividad lítica de

células NK, activadas con IL-2 en presencia de MSCs (Spaggiari et al., 2006) y aloantígenos (Kramprera et al., 2006). La IL-15 es otra citocina que promueve la proliferación, supervivencia y función efectora de las células NK, pero las MSCs, a través de la secreción de factores, son capaces de inhibir la proliferación inducida por la IL-15. Por otro lado, se ha observado que es necesario el contacto celular entre las MSCs y las células NK, para inhibir su citotoxicidad en líneas de células tumorales (Sotiropoulou et al. 2006).

### ***Células dendríticas***

Las células dendríticas son las verdaderas células presentadoras de antígenos del cuerpo. Derivan de células CD34<sup>+</sup> de la BM e *in vitro* se pueden generar a partir de monocitos estimulados con GM-CSF e IL-4. La principal función de estas células es el procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T vírgenes y de memoria. También son capaces de interactuar con otros componentes del sistema inmune como linfocitos B y células NK. Una CD debe madurar para ser capaz de iniciar una respuesta inmune y durante este proceso, las CD aumentan la expresión de HLA-II y moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86. Por otro lado, se ha demostrado que una célula dendrítica inmadura además de no activar a los linfocitos T, es capaz de inducir tolerancia. Lo cual se caracteriza, por la incapacidad de los linfocitos T de responder al antígeno, aun cuando sea presentado por otra CD madura (Blanco et al., 2008).

Aggarwal y Pittenger (2005), observaron que las MSCs son capaces de inhibir la secreción de TNF $\alpha$  por CD activadas con LPS, inhibiendo además su maduración, migración a ganglios linfáticos y su capacidad para estimular a los linfocitos T aloreactivos (Zhang, et al., 2009).

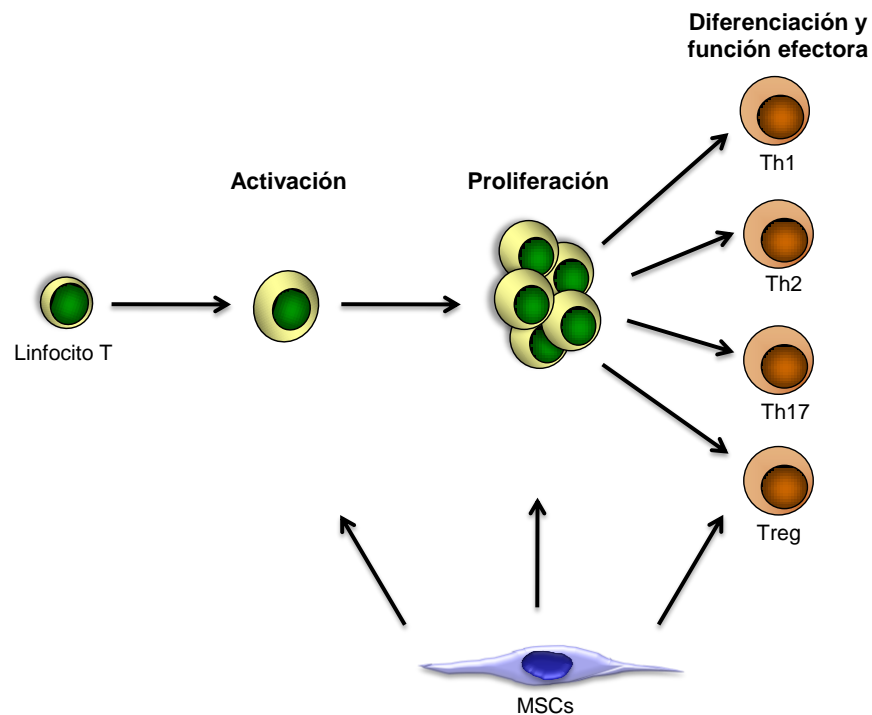
Asimismo, se ha observado que las CD inmaduras tratadas con GM-CSF, IL-4 y LPS en presencia de MSCs, expresan menor cantidad del marcador de maduración CD83, aunque la presentación de antígenos y la expresión de moléculas co-estimuladoras no se altera, sugiriendo que las MSCs pueden mantener el estado inmaduro de las CD. Por otra parte, el cocultivo de MSCs y CD maduras disminuye la expresión de HLA-DR, CD1a, CD80 y CD86, en estas últimas, indicando que las MSCs pueden inducir a las CD maduras hacia un estado inmaduro, con menor capacidad para estimular a los linfocitos T (Jiang et al., 2005). Además, las MSCs también inhiben la secreción de IL-12 por parte de las CD. Se sabe que una producción insuficiente de esta citocina por las CD está relacionada con inducción de anergia y tolerancia de los linfocitos T (Jiang et al., 2005; Beyth et al., 2005).

### ***Linfocitos B***

Los linfocitos B están involucrados en la respuesta inmune adaptativa, son las células responsables de la inmunidad humoral y están especializadas en la producción de anticuerpos. Son pocos los estudios que analizan el efecto de las MSCs sobre los linfocitos B, sin embargo, se ha demostrado que las MSCs disminuyen la proliferación de estas células por detención del ciclo celular en la fase G0/G1 y no por inducción de apoptosis. Además, también son capaces de afectar su diferenciación ya que la producción de IgM, IgG e IgA disminuye (Corcione et al., 2006; Tabera et al., 2008).

## *Linfocitos T*

Cuando un linfocito T es activado, prolifera y se diferencia para llevar a cabo su función efectora. Así, se ha demostrado que las MSCs son capaces de modular cada una de estas fases y de influir en la capacidad de respuesta inmune de estas células. A continuación se describen las etapas en las cuales los linfocitos T son regulados hacia la inmunosupresión por las MSCs, aunque desde el punto de vista biológico se sabe que no hay límites claros entre la activación, proliferación, diferenciación y función efectora (Fig. 3).



**Figura 3. Efecto inmunosupresor de las MSCs.** Las MSCs son capaces de modular la activación, proliferación, diferenciación y función efectora de los linfocitos T (modificado de Abbas y Lichtman, 2006).

### *Activación*

Durante su activación, los linfocitos T expresan moléculas propias de esta etapa; entre ellas encontramos a CD25, CD69, CD38, CTLA-4 y HLA-DR, además secreta citocinas como IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-12 etc. Actualmente, existen resultados contradictorios acerca del efecto de las MSCs sobre la activación de los LT, algunos estudios han mostrado que las BM-MSCs previenen la expresión de marcadores tempranos de activación como CD25 and CD69 en células T estimuladas con fitohemaglutinina (PHA, del inglés phytohemagglutinin) (Le Blanc et al., 2004; Groh et al., 2005). Otros han observado que las BM-MSCs no tienen efecto sobre la expresión de estas moléculas (Krampera et al., 2006; Ramasamy et al., 2008). Al parecer estos resultados contradictorios posiblemente se deben a diferencias en las poblaciones de linfocitos T empleadas. Groh y col (2005) observaron que la activación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés peripheral blood mononuclear cells) con PHA en presencia de BM-MSCs resulta en disminución del porcentaje de células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> que expresan CD25, CD38 y CD69. Empleando el mismo modelo, otros autores también encontraron disminución en el porcentaje de células CD3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> (Le Blanc et al., 2004). De manera contraria, la activación de PBMC con anticuerpos en presencia de BM-MSCs, no modifica la expresión de CD25 y CD69 en las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Ramasamy et al., 2008). Asimismo, en estudios con poblaciones enriquecidas en LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activadas con aloantígenos no se observan cambios en la expresión de CD25, CD69 y CTLA-4 (Krampera et al., 2006). Sin embargo, un estudio reciente empleando poblaciones enriquecidas de linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados con anti-CD2/CD3/CD28 en presencia de BM-MSC, demostró un incremento en la expresión de CD69<sup>+</sup> en las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Araujo et al., 2012). Los resultados contradictorios obtenidos hasta el

momento, pueden deberse principalmente a las diferentes poblaciones de linfocitos T empleadas y la forma de activarlas.

El efecto de las MSCs sobre la secreción de citocinas expresadas por los linfocitos T activados, también ha arrojado resultados contradictorios. Algunos estudios han demostrado que la presencia de MSCs no afecta (Sheng et al., 2008; Chiesa et al., 2011) o disminuye la secreción de IFN $\gamma$  por los linfocitos T activados (Aggarwal y Pittenger, 2005; Ramasamy et al., 2008). Pero otros han observado, que el efecto de las MSCs sobre la secreción de IFN $\gamma$  depende de la fuente de linfocitos T empleada (Kronsteiner et al., 2011). En este estudio los autores demuestran que la activación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> con anti-CD3/CD28 en presencia de MSC de tejido adiposo, resulta en incremento de IFN $\gamma$ , mientras que este efecto no se observa cuando se activan PBMC con el mismo estímulo.

### *Proliferación*

Diversos estudios han demostrado que las MSCs son capaces de disminuir la proliferación de linfocitos T activados con aloantígenos, mitógenos (PHA) o a través de la estimulación directa del TCR con anti-CD3/CD28.

Los primeros estudios que analizaron el efecto de las BM-MSCs en la proliferación de linfocitos T, emplearon MSCs irradiadas y co-cultivadas con PBMC estimuladas con aloantígenos, observándose que las MSCs son capaces de inhibir la proliferación de manera dosis dependiente (Le Blanc, 2003; Rasmusson et al., 2003; Meisel et al., 2004; Le Blanc et al., 2004; Krampera et al., 2006; Ryan et al., 2007). Posteriormente se demostró que las MSCs, además de inhibir la proliferación inducida por aloantígenos, son capaces de inhibir la proliferación inducida por activadores policlonales como PHA (Bacigalupo et al., 2005;



Aggarwal y Pittenger, 2005; Beyth et al., 2005) o anti-CD3/CD28 (Ramasamy R, et al., 2008; Kronsteiner et al., 2011, Castro-Manreza et al., 2014). El efecto inmunosupresor de las MSCs se ha analizado sobre poblaciones totales de PBMC y sobre poblaciones enriquecidas en LT CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, en todos los casos se ha demostrado que las MSCs son capaces de disminuir la proliferación de estas poblaciones. Se ha observado que la inmunosupresión es independiente de la inducción de apoptosis (Sotiropoulou et al., 2006; Krampera et al., 2006) y que se lleva a cabo a través de mecanismos independientes y dependientes del contacto celular. Entre los factores secretados por las MSCs se han identificado TGFβ, HGF, IDO, PGE<sub>2</sub>, IL-10 y HLA-G5 (Meisel et al., 2004; Ryan et al., 2007; Selmani et al., 2008). Mientras que en los mecanismos dependientes del contacto célula-célula, se ha involucrado a PD-L1 y HLA-G1 (Sheng et al., 2008; Selmani et al., 2008; Giuliani et al., 2011). Actualmente, hay controversia con relación a si es indispensable el contacto directo entre las MSCs y los linfocitos T para la inhibición de la proliferación de estos últimos. Algunos autores sugieren que las MSCs ejercen su mecanismo inmunosupresor independientemente del contacto célula-célula (Di Nicola et al., 2002; Rasmusson et al., 2005; Krampera et al., 2006), mientras que otros indican que es indispensable el contacto celular para que se lleve a cabo la inmunosupresión de forma eficiente (Augello et al., 2005; Xu et al., 2007; Selmani et al., 2008; Sheng et al., 2008; Giuliani et al., 2011). Sin embargo, parece ser que los mecanismos empleados por las MSC en la inmunosupresión dependen de las poblaciones celulares involucradas, el modo de activación, la fuente de MSCs y la presencia o ausencia de contacto célula-célula (Rasmusson et al., 2005; Kronsteiner et al., 2001).

### *Diferenciación y función efectora.*

Dependiendo del microambiente en el que se encuentren, cuando los linfocitos T cooperadores  $CD4^+$  (Th0) son activados por la presencia de patógenos o señales de daño, pueden diferenciarse hacia diferentes poblaciones: Th1, Th2, Th17 o T reguladoras (Treg); cada población se caracteriza por la secreción de determinadas citocinas y su función es esencial para la eliminación de patógenos en el organismo, resolución de la inflamación y mantenimiento de la homeostasis inmunológica. Diversos estudios sugieren que las MSCs son capaces de modular la diferenciación, función y balance de estas subpoblaciones, induciendo el desarrollo de una respuesta inmune anti-inflamatoria. Así, la activación de linfocitos  $CD45RA^+$  en condiciones inductoras Th1 o Th2 en presencia de MSCs, resulta en inhibición de la secreción de  $IFN\gamma$  por parte de las células tipo Th1, e incremento en la secreción de IL-4 por las células tipo Th2 (Aggarwal y Pittenger, 2005). Además, las MSCs inhiben la diferenciación de linfocitos Th17 a partir de células  $CD4^+$  vírgenes y la producción de citocinas proinflamatorias como: IL-17, IL-22,  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$ . Por otro lado, se promueve la secreción de IL-10 y la expresión del factor de transcripción Foxp3, lo cual sugiere la diferenciación de poblaciones de linfocitos T reg (Ghannam et al., 2010). Asimismo, se ha demostrado que la presencia de MSCs durante el proceso de diferenciación de poblaciones Th1 y Th17, favorece la diferenciación de poblaciones T reguladoras  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ . Sin embargo, este efecto no se observa cuando las MSCs son agregadas en cultivos de poblaciones maduras Th1 o Th17 (Crawford et al., 2013). En conjunto estos resultados indican que las MSCs son capaces de afectar la diferenciación y función de subpoblaciones inflamatorias de linfocitos T, en las cuales afecta su capacidad de producir citocinas proinflamatorias y además induce un fenotipo de Treg.

Algunos estudios han demostrado la diferenciación de linfocitos T con fenotipo de Treg en presencia de MSCs. Maccario y cols, observan que las MSCs alogénicas favorecen la diferenciación de sub-poblaciones de linfocitos T  $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$  (Maccario et al., 2005). Asimismo, se ha visto que la activación de PBMC con IL-2 en presencia de MSCs incrementa el porcentaje de LT  $CD4^+CD25^+$  (Aggarwal y Pittenger, 2005). Por otra parte, el co-cultivo de PBMC con MSCs genera una población de linfocitos T  $CD4^+Foxp3^+$  con capacidad inmunosupresora, capaz de inhibir la proliferación de linfocitos T inducida por aloantígenos o por activadores policlonales (Prevosto et al., 2007; English et al., 2009).

### ***Factores solubles involucrados en la inmunosupresión inducida por las MSCs.***

#### *TGF $\beta$ <sub>1</sub> y HGF*

Las primeras moléculas involucradas en la inmunosupresión mediada por las MSCs sobre linfocitos T activados con aloantígenos, fueron el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ <sub>1</sub>, del inglés Transforming Growth Factor beta1) y el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF, del inglés Hepatocyte Growth Factor), se demostró que ambas citocinas, por si mismas, son capaces de disminuir la proliferación de linfocitos T inducida por aloantígenos, además su bloqueo con anticuerpos, restablece parcialmente la proliferación de los linfocitos T (Di Nicola et al., 2002; Groh M et al., 2005). Las MSCs producen estas moléculas de forma constitutiva (Ryan et al., 2007) y al parecer actúan de forma sinérgica. Además, TGF $\beta$ <sub>1</sub> está involucrada en la generación de Treg  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  por las MSCs (English et al., 2009). Estos resultados sugieren que estas citocinas participan en la supresión de la proliferación mediada por las MSCs en un cultivo mixto de linfocitos (CML), pero es de notar que existen otros mecanismos involucrados.

### *Indolamino-2,3-dioxigenasa*

La indolamino-2,3-dioxigenasa (IDO) es una enzima involucrada en el catabolismo del aminoácido triptófano, se encarga de catalizar la conversión de triptófano a quinurenina y se ha propuesto que la inhibición de la proliferación de los linfocitos T puede deberse al agotamiento de este aminoácido esencial o a través de la acumulación del metabolito quinurenina en el medio. Existen evidencias experimentales que apoyan ambas hipótesis. Se ha demostrado que la adición de triptófano exógeno es capaz de restablecer la proliferación de linfocitos T inducida por aloantígenos en presencia de MSCs (Meisel et al., 2004). Asimismo, la adición del metabolito quinurenina a un CML en ausencia de MSCs, por si mismo es capaz de inhibir la proliferación, aunque en forma menos evidente que la ejercida por las MSCs (Ryan et al., 2007). Aunado a lo anterior, el uso de inhibidores competitivos de IDO reduce el efecto inmunosupresor ejercido por las MSCs sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados con aloantígenos (Krampera et al., 2006). Sin embargo, la proliferación no se re-establece a los niveles observados en un CML sin MSCs, lo cual sugiere la existencia de otros mecanismos (Meisel et al., 2004).

### *Prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>)*

Otra molécula involucrada en la capacidad de inmunosupresión de las MSCs es la Prostaglandina 2 (PGE<sub>2</sub>). Este mediador lipídico se deriva de la conversión del ácido araquidónico a prostaglandina por acción de las enzimas COX1 y COX2 (Ryan et al., 2007). Estas enzimas y la PGE<sub>2</sub> son expresadas constitutivamente por las MSCs y su expresión se incrementa en un ambiente inflamatorio (Aggarwal y Pittenger, 2005; Ryan et al., 2007). Se ha demostrado que la PGE<sub>2</sub> disminuye la proliferación, estimula la secreción de IL-4 e IL-10 y promueve la diferenciación de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Kalinski, 2012). Diversos estudios

demuestran que la PGE<sub>2</sub> es una molécula efectora de la capacidad inmunosupresora de las MSCs, ya que al bloquear su síntesis con indometacina o NS-398, incrementa la proliferación de los linfocitos T, aunque no se reestablece por completo (Rasmusson et al., 2005; Aggarwal and Pittenger, 2005, Ryan et al., 2007; Avanzani et al., 2009).

### *IL-10*

La IL-10 también está involucrada en la inmunosupresión inducida por las BM-MSCs. Se ha demostrado que estas células constitutivamente expresan el RNAm y la proteína de la IL-10 (Ryan et al., 2007). Además, en co-cultivo con linfocitos T activados en presencia de MSCs adultas o fetales, se incrementan la concentración de esta citocina en los sobrenadantes (Groh et al., 2005; Ryan et al., 2007; Avanzani et al., 2009; Giuliano et al., 2011). Al parecer el contacto celular entre las BM-MSCs y los linfocitos T es importante para que se de este evento (Auguello et al., 2005; Prevosto et al., 2007, Selmani et al., 2008). Mediante el uso de anticuerpos, se ha observado que esta citocina participa en la inmunosupresión mediada por las BM-MSCs, además de estar involucrada en la generación de Treg (Groh et al., 2005; Ryan et al., 2007). Además, la IL-10 es capaz de estimular la expresión y secreción de HLA-G5, otra molécula involucrada en la inmunosupresión por las MSCs (Selmani et al., 2008).

### *HLA-G5*

Las moléculas HLA-G son moléculas de HLA no clásicas caracterizadas por un limitado polimorfismo alélico y patrón de expresión restringido a ciertos tejidos. Existen isoformas unidas a la membrana (HLA-G1,-G2,-G3 y G4) y formas solubles (HLA-G5,-G6 y G7). Se ha demostrado que las BM-MSCs expresan la isoforma unida a membrana HLA-G1 y la isoforma soluble HLA-G5 y que la expresión de estas moléculas es favorecida por la IL-10. A su vez

HLA-G5, mediante un mecanismo de retroalimentación positiva, estimula la secreción de IL-10. El uso de anticuerpos contra ambas moléculas prácticamente restablece la proliferación de PBMC activadas con aloantígenos en presencia de MSCs. Al parecer es necesario el contacto directo entre las MSCs y los linfocitos T para que se presente esta retroalimentación positiva entre la IL-10 y HLA-G5, y pueda generarse un ambiente inmunosupresor, que se exagera por la generación de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> inducida por ambas moléculas (Selmani et al., 2008).

### ***Moléculas de membrana involucradas en la inmunosupresión de la MSCs***

Se ha reportado la participación de la vía PD-1/PD-L1, HLA-G1 y algunas moléculas de adhesión, en la inmunosupresión mediada por las MSCs. PD-L1 (B7-H1; CD274) y su receptor (PD-1/CD279) constituyen una vía de co-inhibición en los linfocitos T. Esta vía participa en el desarrollo de la tolerancia y la terminación de la respuesta inmune para evitar el daño en los tejidos. La vía PD-1/PD-L1 ejerce una función inhibitoria crítica cuando hay estimulación persistente del antígeno, como ocurre durante el encuentro con antígenos propios, una infección viral crónica o en los tumores. Esta vía previene la autoinmunidad y contribuye directamente al microambiente inmunosupresor presente en el tumor, todo ello mediante la regulación de los linfocitos T (Loise et al., 2010). Mediante el uso de anticuerpos se ha demostrado la participación de PD-L1 en la inmunosupresión mediada por las MSCs (Augello et al., 2005; Chang et al., 2006; Mourez et al., 2007; Sheng et al., 2008; Tipnis et al., 2010).

Asimismo, se ha sugerido la importancia de HLA-G1 en la inmunosupresión de las MSCs. Giuliano y cols, empleando linfocitos T activados con anti-CD3/CD28, en presencia o ausencia de MSCs, demuestran que la disminución en la proliferación de los linfocitos T es mediada principalmente a través del contacto celular y reportan incremento en la expresión de HLA-G1 en las MSCs en co-cultivo. Además, el uso de anticuerpos contra esta molécula prácticamente re-establece la proliferación de los linfocitos T (Giuliano et al., 2011).

Algunos estudios han demostrado la importancia del contacto célula-célula en la inmunosupresión de las MSCs. La participación de las moléculas de adhesión ICAM-I and VCAM-I expresadas en las MSCs durante la inmunosupresión se ha puesto en evidencia mediante el uso de anticuerpos. Al bloquear estas moléculas en un modelo de ratón, se observa que se restablece parte de la proliferación de los esplenocitos activados con anti-CD3 (Ren et al., 2010). Aunado a lo anterior, la expresión de estas moléculas se incrementa en MSCs expuestas a IFN $\gamma$ . En conjunto estos datos sugieren que bajo condiciones inflamatorias las MSCs son capaces de incrementar su capacidad de reclutar poblaciones de linfocitos T inflamatorias y modular su función hacia un fenotipo regulador, cómo se ha demostrado para la población Th17 (Ghannam et al., 2010).

### ***Regulación de las propiedades inmunosupresoras de las MSCs***

Se ha demostrado que las MSCs deben ser “activadas” para que lleven a cabo la inmunosupresión de forma eficiente. Diversas evidencias indican, que dicha “activación” requiere de la presencia de citocinas pro-inflamatorias derivadas de linfocitos T, macrófagos y células NK, lo cual indica que se establecen mecanismos de regulación bidireccionales entre

las MSCs y las células inmunes. En este proceso es necesaria la participación de citocinas como IFN $\gamma$ , solo o en combinación con TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$  (Ghannam S, et al., 2010) (Fig. 4).

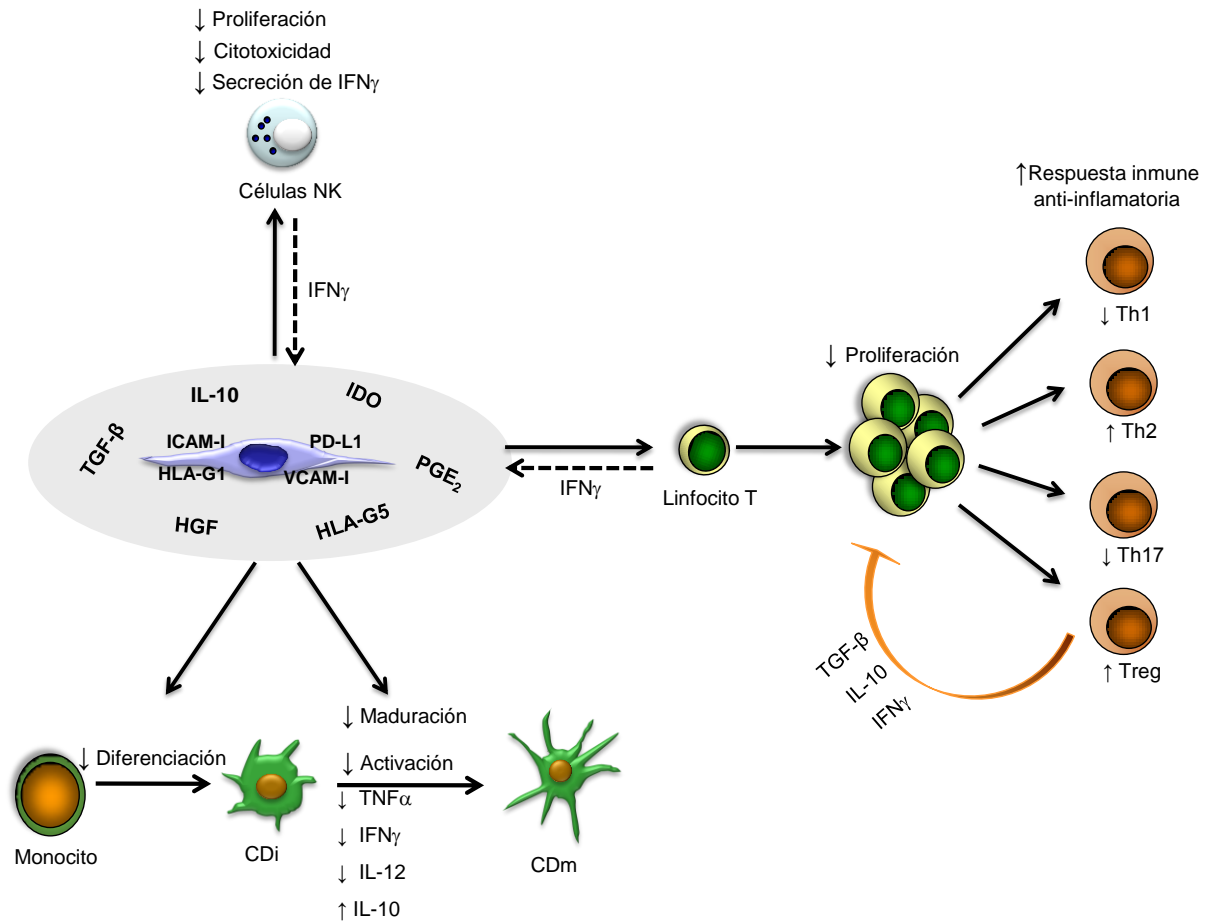
La importancia de un ambiente inflamatorio en la capacidad inmunosupresora de las MSCs, se ha evidenciado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. En los primeros se ha observado que la exposición de las MSCs a IFN $\gamma$  induce la expresión de IDO (Meisel R et al., 2004; Ryan et al., 2007) y PD-L1 (Augello et al., 2005), e incrementa la secreción de PGE $_2$  (Aggarwald y Pittenger, 2005; Avanzani et al., 2009). Estas moléculas participan en la inmunosupresión mediada por las MSCs. Asimismo, el co-cultivo de MSCs y células NK activadas con IL-15, induce las propiedades inmunosupresoras de las MSCs, ya que el medio condicionado obtenido de estos co-cultivos es capaz de inhibir la proliferación de las células NK (Sotiropoulou et al., 2006). Por otra parte, se ha demostrado que las células NK son capaces de producir IFN $\gamma$  cuando interactúan con MSCs (autólogas o alogénicas), la exposición de las MSCs al IFN $\gamma$  induce incremento en la expresión de HLA-I en las MSCs, y esto a su vez, disminuye la secreción de citocinas y la actividad citotóxica de las células NK (Spaggiari et al., 2008) (Fig. 4).

La importancia de las altas concentraciones de IFN $\gamma$  en la inmunosupresión de las MSCs, también se ha demostrado en estudios *in vivo* realizados en modelo murino, en los cuales el efecto benéfico de las MSCs en el tratamiento de la GVHD, se refleja en disminución significativa de la mortalidad. En este estudio, los mejores resultados en la supervivencia de los ratones, se obtienen cuando las MSCs se administran al momento en que la concentración sérica de IFN $\gamma$  es alta, es decir una vez que se ha desarrollado la GVHD. Asimismo, la administración de MSCs pre-activadas con altas concentraciones de IFN $\gamma$  es muy eficaz en



prevenir el desarrollo de GVHD, resultando en 100% de supervivencia de los ratones. Por otro lado, la administración de MSCs tratadas con bajas dosis de IFN $\gamma$  no mejora la supervivencia (Polchert et al., 2008).

Resultados similares se han observado en ensayos clínicos. Se ha demostrado que la administración de MSCs en pacientes con GVHD refractaria a esteroides, en los cuales hay niveles elevados de IFN $\gamma$ , resulta en mejoría significativa de los pacientes (Ringden et al., 2006; Le Blank et al., 2008; Kebriaei et al., 2009). Sin embargo, cuando las MSCs se administran al momento de realizar el trasplante de HSC la incidencia de GVHD grado II/IV no se modifica e incluso hay alta probabilidad de recaídas (Ning et al., 2008). En conjunto estos resultados indican que la administración de MSCs se debe realizar cuando hay altas concentraciones de IFN $\gamma$ , lo cual favorece su capacidad inmunosupresora y, en consecuencia, la resolución de la GVHD.



**Figura 4. Propiedades inmunosupresoras de las MSCs.** Las BM-MSCs regulan la función de diferentes componentes celulares del sistema inmune (células NK, células dendríticas y linfocitos T). El efecto inmunosupresor de las MSCs, puede darse a través de contacto celular y/o mediante la secreción de diversos factores. Entre los primeros se ha involucrado a PD-L1, HLA-G1, ICAM-I y VCAM-I. Mientras que, entre los factores secretados se han identificado TGF $\beta$ , HGF, IL-10, IDO, PGE $_2$  y HLA-G5. Asimismo, las citocinas pro-inflamatorias (ejemplo: IFN $\gamma$ ) secretadas por las células NK y los linfocitos T activados, favorecen la inmunosupresión de las MSCs, ya que incrementan o inducen la secreción de moléculas inmunosupresoras (Modificado de Montesinos y Castro, 2011).

## **MSCs y enfermedad injerto contra hospedero**

Debido a sus propiedades inmunosupresoras, las MSCs provenientes de BM se han empleado principalmente en el trasplante de HSC, ya que son capaces de prevenir y tratar la GVHD (Ringdé et al., 2006; Sundin et al., 2007; Battiwalla y Hematti, 2009; Toubai et al., 2009; Salem et al., 2010).

Después de un trasplante de HSC, la GVHD se presenta cuando los linfocitos T del donador reconocen a los antígenos histoincompatibles del receptor (aloantígenos) y montan una respuesta inmune en contra de ellos (respuesta inmune alogénica). La GVHD puede ser aguda o crónica, dependiendo del tiempo de aparición y la intensidad del daño en los tejidos. La GVHD aguda se presenta en los primeros 100 días después del trasplante, mientras que la crónica ocurre después de este tiempo (Ferrara et al., 2009). Aun no se conoce con exactitud la fisiopatología de este padecimiento, sin embargo se han propuesto tres fases que inducen la aparición de esta enfermedad: 1) activación de las células presentadoras de antígenos (CPAs) del hospedero debido al régimen de acondicionamiento para el trasplante; 2) activación de los linfocitos T, los cuales proliferan y se diferencian en respuesta a los antígenos histoincompatibles presentados por las CPAs y 3) fase efectora celular e inflamatoria, en la cual diferentes componentes celulares del sistema inmune (linfocitos T citotóxicos y células NK) y citocinas inflamatorias ( $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL-1, etc.) actúan en conjunto, promoviendo la inflamación y daño tisular en diferentes órganos del paciente, este puede ser tan extenso que incluso puede provocar la muerte (Goker et al., 2001; Rezvani y Storb, 2008; Paul, 2008; Reddy et al., 2009).

Algunos estudios han demostrado la eficacia del uso de las BM-MSCs en el tratamiento y prevención de la GVHD grado III-IV refractaria a esteroides, tanto en niños como en adultos. En ambos casos se ha observado reducción en la incidencia y severidad de la GVHD, incremento significativo de la supervivencia y no se observaron efectos tóxicos después de la administración de las MSCs (Ringden et al., 2006; Introna et al., 2013; Resnick et al., 2013; Muroi et al., 2013; Ball et al., 2013). Sin embargo, otros estudios han reportado poca eficacia de las BM-MSCs en el tratamiento de esta patología (Von Bonin et al., 2009; Muller et al., 2008). Además, se ha sugerido que el co-trasplante de HSC y BM-MSCs puede prevenir la GVHD, pero existe alta probabilidad de recaída (Ning et al., 2008).

Los datos contradictorios obtenidos en estos ensayos clínicos pueden deberse a diferencias en el método de expansión de las MSCs, al número de células administradas, al número de dosis, el diagnóstico (GVHD aguda o crónica), al intervalo en el desarrollo de la GVHD y la administración de MSCs, etc. Para tratar de eliminar estas variables, se han realizado ensayos clínicos con una preparación universal de BM-MSCs, llamada Prochymal®, y los resultados han mostrado la eficacia y seguridad de esta preparación para el tratamiento de la GVHD (Kebriaei et al., 2009; Prasad et al., 2011).

No se conocen con exactitud los mecanismos biológicos por los cuales, *in vivo*, las MSCs favorecen la resolución de la GVHD. Sin embargo, se ha sugerido que algunos mecanismos encontrados *in vitro*, también se reproducen en el contexto fisiológico. Así, en pacientes con GVHD tratados con MSCs, se observa incremento en las poblaciones CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> y Tr1, así como una disminución en la población Th17<sup>+</sup> (Jitschin et al., 2013).

## ANTECEDENTES

### *Fuentes alternas a las BM-MSCs y propiedades inmunosupresoras.*

Como ya se mencionó, la mayoría de los estudios encaminados al entendimiento de los mecanismos inmunosupresores de las MSCs se han realizado empleando BM-MSCs, asimismo, los ensayos clínicos principalmente usan MSCs obtenidas de esta fuente. Sin embargo, la obtención de MSCs a partir de BM presenta varias desventajas: es difícil conseguir donadores, el procedimiento de obtención es invasivo (punción lumbar) y costoso, además se ha demostrado que hay disminución significativa en el número y la capacidad de diferenciación de MSCs conforme aumenta la edad del individuo (Caplan, 2009; Despoina et al., 2010). Se ha demostrado que durante el proceso de senescencia se afectan varios aspectos de la biología de las BM-MSCs, entre ellos la proliferación, capacidad de diferenciación y estabilidad del genoma (Wagner et al., 2009; Despoina et al., 2010). Ello puede influir en la calidad de las MSCs obtenidas y su eficacia en el tratamiento de ciertas patologías. Debido a lo anterior, es necesaria la búsqueda de fuentes alternativas de MSCs, así como determinar si las células obtenidas de ellas presentan la misma capacidad inmunosupresora que las provenientes de BM.

En la actualidad se ha logrado la obtención de MSCs de varios tejidos: músculo esquelético, tejido adiposo, cordón umbilical, sangre de cordón umbilical, membranas sinoviales, pulpa dental, fluido amniótico, placenta y páncreas (Salem y Thiernemann, 2010). También se han obtenido de tejidos fetales como sangre, hígado, médula ósea y pulmón (Phinney y Prockop, 2007). En la mayoría de los casos las MSCs obtenidas son heterogéneas

en cuanto a su capacidad de proliferación y diferenciación, sin embargo todas ellas expresan el perfil de marcadores característicos de las MSCs.

Recientemente, en nuestro laboratorio se logró la obtención de MSCs de sangre de cordón umbilical (UCB, del inglés Umbilical Cord Blood) y placenta (PL, del inglés Placenta), las cuales presentan similitudes biológicas con aquellas provenientes de BM en relación a su morfología, inmunofenotipo y potencial de diferenciación hacia osteoblastos y condroblastos (Montesinos et al., 2009). Sin embargo, se desconoce si estas células tienen la misma capacidad inmunosupresora que las MSCs provenientes de BM. UCB y PL tienen ventajas sobre la BM, ya que son fuentes de fácil acceso y su obtención no representa un riesgo para el donador. Actualmente diversos laboratorios realizan ensayos comparativos en cuanto a la capacidad inmunosupresora entre MSCs obtenidas de diferentes fuentes para determinar cuál de ellas sería más apropiada que la médula ósea.

Algunos estudios han analizado de forma independiente la capacidad de inmunosupresión de MSCs derivadas de UCB (Yoo et al., 2009; Wang et al., 2009) y PL (Li et al., 2005; Chang et al., 2006). Empleando PBMC activadas con PHA o aloantígenos, se ha determinado que las UCB-MSCs tienen la misma capacidad inmunosupresora que las de BM-MSCs (Avanzini et al., 2009; Wang et al., 2009). Mientras que, en el caso de PL-MSCs los resultados obtenidos son contradictorios, algunos autores sugieren que BM-MSCs y PL-MSCs tienen la misma capacidad inmunosupresora (Li et al., 2005; Jones et al., 2007), mientras que otros han sugerido que tienen mayor capacidad inmunosupresora (Chang et al., 2006). Sin embargo hasta el momento no existe un estudio que analice la capacidad inmunosupresora de BM-, UCB- y PL-MSCs bajo las mismas condiciones experimentales.

Como ya se mencionó, varios estudios realizados con células mononucleares totales han evidenciado la participación de BM-MSCs en la inmunosupresión de linfocitos T (Le

Blanc et al., 2004; Rasmusson et al., 2005; Krampera et al., 2006; Ryan et al., 2007; Ramasamy et al., 2008; Selmani et al., 2008). Sin embargo, pocos estudios se han realizado con linfocitos T CD3<sup>+</sup> enriquecidos (Le Blanc et al., 2004; Najar et al., 2010; Kronsteiner et al., 2011), esto es importante en el contexto de la GVHD, debido a que poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son las principales células efectoras en esta patología (Kuzmina et al., 2012). Por ello es necesario determinar el potencial de inmunosupresión de MSCs sobre estos tipos celulares, ya que es relevante en términos de terapia celular. Aunado a lo anterior, se ha sugerido la influencia del contexto celular en las propiedades inmunosupresoras de las BM-MSCs. Así, se ha observado que se debe considerar la fuente de células T empleadas, la forma de activarlas y la ausencia o presencia de contacto celular con las MSCs (English et al., 2009; Kronsteiner et al., 2011). Por lo anterior, es importante analizar el efecto de las MSCs derivadas de BM, UCB y PL sobre una población enriquecida en linfocito T CD3<sup>+</sup>, para contribuir al conocimiento sobre sus propiedades inmunosupresoras y así ayudar a determinar cuál de ellas sería la fuente más apropiada como alternativa a las BM-MSCs en protocolos de terapia celular.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En neoplasias hematológicas, el tratamiento de elección con fines curativos es el trasplante alogénico de células hematopoyéticas. Sin embargo la GVHD, es una de las complicaciones post-trasplante más comunes. Debido a su capacidad inmunosupresora las MSCs provenientes de BM se han empleado en el tratamiento y prevención de la GVHD. En la actualidad, la BM representa la fuente principal de MSCs, sin embargo presenta algunas desventajas como la dificultad de encontrar donadores, su obtención es a través de un proceso invasivo y además el número de MSCs disminuye con la edad del individuo (Caplan 2009; Choumerianou et al., 2010). Debido a ello es importante obtener MSCs de fuentes alternativas a la BM. Nuestro grupo de investigación ha obtenido MSCs provenientes de UCB y PL, ambas de fácil acceso y no representan riesgo para el donador. En un estudio previo demostramos que UCB-MSCs y PL-MSCs tienen propiedades morfológicas, inmunofenotípicas y capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica similares a aquellas provenientes de BM (Montesinos et al., 2009). Sin embargo, no sabemos si poseen el mismo potencial de inmunosupresión.

## **HIPÓTESIS**

La capacidad de inmunosupresión de UCB-MSCs y PL-MSCs sobre linfocitos T CD3<sup>+</sup>, será igual o superior a la observada con BM-MSCs. Por lo tanto, podrían ser una fuente alterna a las BM-MSCs en protocolos de terapia celular.



## OBJETIVOS

*Objetivo general:* Determinar si las MSCs derivadas de UCB y PL comparten la misma capacidad inmunosupresora que aquellas derivadas de BM.

### *Objetivos particulares*

1. Realizar la caracterización biológica y funcional (morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación) de las MSCs provenientes de médula ósea, sangre de cordón umbilical y placenta.
2. Evaluar la capacidad inmunosupresora de las MSCs provenientes de médula ósea, sangre de cordón umbilical y placenta.
  - 2.1 Evaluar el efecto de las MSCs sobre la proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup>.
  - 2.2 Determinar el efecto de las MSCs sobre la expresión de moléculas de activación: CD25, CD69 y CTLA-4, en linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados.
  - 2.3 Determinar la expresión de moléculas inmunosupresoras de membrana: CTLA-4 en linfocitos T y PD-L1 en MSCs.
  - 2.4 Determinar el efecto de las MSCs sobre la secreción de citocinas IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4 e IL-10 en los co-cultivos.
  - 2.5 Cuantificar la concentración de PGE<sub>2</sub> en los co-cultivos de MSCs con linfocitos T activados.
  - 2.6 Evaluar la capacidad de las MSCs para inducir la formación de linfocitos T reguladores en los co-cultivos de MSCs con linfocitos T activados.

## METODOLOGÍA

### Obtención de MSCs

**Obtención de MSCs de Médula ósea.** Las muestras de BM se obtuvieron de 5 donadores voluntarios de acuerdo a los lineamientos del Hospital Bernardo Sepulveda (Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS México) los cuales incluyen el consentimiento expreso de los donadores. El aspirado de BM se colocó en un tubo que contiene 15 ml de RPMI 10% SFB, posteriormente se lavó con PBS y con la suspensión celular se hizo un gradiente de densidad con Ficoll-Paque Plus (gravedad específica < 1.077 g/ml GE; Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), las células se centrifugaron durante 30 min a 300 g. La interfase se lavó con PBS 3% de SFB EDTA 1 mM. El botón de CMN fue resuspendido en low-glucose Dulbecco's Modified Eagle medium (Lg-DMEM, GIBCO) suplementado con 15% de SFB. El número total de células nucleadas y viabilidad se determinó mediante conteo con solución de Turck y azul tripano respectivamente. De 50 a 100 millones de CMN fueron sembradas en una caja petri de 100 mm, las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y después de 4 días se hizo un lavado con PBS para quitar todas las células no adherentes. Se realizó cambio de medio dos veces por semana. Cuando los cultivos alcanzaron un 80-90% de confluencia las células fueron cosechadas para su resiembra y criopreservación.

**Obtención de MSCs de Sangre de Cordón Umbilical.** Se procesaron 5 muestras de UCB las cuales fueron colectadas de acuerdo a lineamientos institucionales del Hospital Troncoso, IMSS, México D.F. Con la muestra sin diluir se realizó un gradiente de densidad y las células se procesaron con la misma técnica anteriormente descrita para BM. La suspensión de CMN fue resuspendida en Lg-DMEM 15% de SFB y se sembró en una caja Petri de 100 mm, 4 días

después se retiraron las células no adherentes y se agregó medio nuevo. Se realizó cambio de medio dos veces por semana, cuando los cultivos alcanzaron un 80-90% de confluencia, las células fueron cosechadas para su resiembra y criopreservación.

**Obtención de MSCs provenientes de Placenta:** Se procesaron 5 muestras de placenta, las cuales fueron colectadas de acuerdo a lineamientos institucionales del Hospital Troncoso, IMSS, México D.F. La obtención de las MSCs de placenta, se realizó mediante un proceso de disgregación enzimática y mecánica que se describe a continuación. Una muestra de placenta de aproximadamente 3 cm<sup>2</sup> se colocó en una caja petri de 100 mm y se lavó con PBS para retirar el exceso de sangre. Posteriormente la muestra lavada se cortó en pedazos pequeños de aproximadamente 3 mm, el tejido disgregado se colocó en un matraz Erlenmeyer de 50 ml y se le agregaron 8 ml de una solución de 0.05% tripsina-0.02% EDTA (GIBCO). El matraz con la muestra se incubó a 37°C durante 20 minutos con agitación constante. La suspensión celular se colectó y se filtró con una malla de nylon de 500 µm. El filtrado se centrifugó a 300 g durante 9 minutos y el botón celular fue resuspendido en PBS. Con la suspensión celular se hizo un gradiente de densidad y la muestra se procesó con la misma técnica anteriormente descrita para BM. Las MSCs se sembraron en una caja petri de 100 mm con 10 ml de medio Lg-DMEM, a los 4 días se retiraron las células no adheridas y se realizó cambio de medio dos veces por semana, cuando los cultivos alcanzaron un 80-90% de confluencia las células fueron cosechadas para su resiembra y criopreservación.

## **Resiembra y criopreservación de MSCs de BM, UCB y PL.**

Los cultivos de BM, UCB y PL se mantuvieron hasta alcanzar entre el 80-90% de confluencia. Una vez que llegaron a la confluencia, las células se colectaron utilizando una solución de 0.05% tripsina-0.02% EDTA (GIBCO) durante 5 minutos a 37°C, se lavaron con PBS al 10% SFB y se centrifugaron por 6 minutos a 300 g. El botón celular fue resuspendido en medio, una parte de la suspensión celular obtenida se usó para resiembra y expansión de las MSCs, mientras que el resto se congeló en medio Lg-DMEM al 50% de SFB adicionado con 10% de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich), a una concentración de  $1-2 \times 10^6$  cel/ml de medio de congelación y se almacenaron en nitrógeno líquido. De cada muestra se realizaron resiembras de los cultivos confluentes y se congelaron células en resiembra 1, 2 y 3. Las MSCs obtenidas de la segunda resiembra se emplearon para realizar la caracterización biológica de inmunofenotipo y diferenciación.

## **Caracterización de MSCs**

### **Inmunofenotipo**

Las células se cosecharon incubándolas con una solución de 0.05% tripsina-0.02% EDTA (GIBCO) durante 5 minutos, posteriormente se realizó un lavado con PBS 10% de SFB. Un total de  $1.5 \times 10^5$  células fueron resuspendidas en 100 µl de PBS 3% de SFB EDTA 1mM e incubadas durante 20 minutos a 4°C protegidas de la luz con alguno de los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados a FITC, PE o APC dirigidos contra CD73, CD90 y CD45 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) CD105, CD13, CD14, (Caltag, Buckingham, UK), HLA-ABC, HLA-DR, CD31 y CD34 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Posteriormente

las células se lavaron con 500 µl de PBS 1X, 3% de SFB, EDTA 1mM y se fijaron con FACS Lysing Solution (BD, Bioscience San Jose, CA). Las células marcadas fueron analizadas en un equipo Coulter Epics Altra Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) y se colectaron un mínimo de 10000 eventos. Los datos fueron analizados con el software FlowJo 7.6.

### **Capacidad de diferenciación**

*Diferenciación adipogénica:* Las MSCs se cultivaron en medio adipogénico Stem Cells Kits™ (STEMCELL Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada) durante 14 días, realizando cambios de medio 2 veces por semana. Para evaluar la diferenciación adipogénica se determinó la presencia de lípidos mediante la tinción con rojo oleoso (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Kern et al., 2006).

*Diferenciación condrogénica:*  $2 \times 10^5$  MSCs fueron centrifugadas a 150 g durante 5 min para formar un botón celular en el fondo del tubo (micromasa). Esta fue incubada durante 28 días con medio de diferenciación condrogénico comercial (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc, Maryland, USA) suplementado con 10 ng/ml de TGFβ (Cambrex) realizando cambios de medio dos veces por semana. Las micromasas resultantes fueron embebidas en parafina y posteriormente se cortaron y tiñeron con azul alcian (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para evidenciar la presencia de glucosaminoglicanos.

*Diferenciación osteogénica:* Las MSCs se cultivaron en medio para diferenciación osteogénica Stem Cells Kits™ (STEMCELL Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada), durante 21 días (con cambios de medio dos veces por semana). Para evaluar la diferenciación

osteogénica se usó la técnica de Von Kossa para detectar depósitos de calcio y tinción de fosfatasa alcalina (Kern et al., 2006).

### **Obtención de linfocitos T CD3<sup>+</sup>**

A partir de muestras de sangre periférica de 3 donadores voluntarios se obtuvieron las células mononucleares mediante un gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque Plus (gravedad específica < 1.077 g/ml GE; Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Los linfocitos T CD3<sup>+</sup> se obtuvieron empleando CD3 MicroBeads human con columnas MS MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La pureza de la suspensión obtenida de los linfocitos T CD3<sup>+</sup> se determinó mediante citometría de flujo como se describe en la sección “Análisis por citometría de flujo”. En los experimentos únicamente se emplearon suspensiones con pureza mayor al 97%. Los linfocitos T CD3<sup>+</sup> se mantuvieron durante 24 horas en medio RPMI 1640, 10% SFB, 2mM L-glutamina, 100U/ml de penicilina, 100 µg/ml de streptomycin y 100 µg/ml de gentamicina (GIBCO).

### **Estimulación de linfocitos T CD3<sup>+</sup>**

Los linfocitos T CD3<sup>+</sup> fueron cultivadas en medio RPMI 1640, la activación se realizó con dynabeads CD3/CD28 T cell expander (Invitrogene, California), en proporción 1:1 (25 µl de dynabeads / 1X10<sup>6</sup> linfocitos T). Quince horas antes de cosechar el cultivo (3-4 días de activación), las células se marcaron con 10 µM de BrdU (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) para determinar la proliferación celular como se describe en “Análisis por citometría de flujo”.

## **Co-cultivos MSCs / linfocitos T CD3<sup>+</sup>**

Se realizaron co-cultivos de MSCs/linfocitos T CD3<sup>+</sup> permitiendo o inhibiendo el contacto célula-célula. Los co-cultivos en donde se permite el contacto célula-célula se realizaron en placas de 24 pozos (Corning, Corning, NY). Se sembraron  $1.5 \times 10^5$  linfocitos T CD3<sup>+</sup> y se activaron como se describió en la sección “Estimulación de linfocitos T CD3<sup>+</sup>” en ausencia o presencia de  $1.5 \times 10^5$  MSCs de BM, UCB o PL (MSCs: linfocitos T; 1:1). Las perlas cubiertas con anticuerpo estuvieron presentes durante todo el tiempo del co-cultivo. Los cultivos donde se inhibe el contacto celular se realizaron en cámaras transwell (Corning, Corning, NY). Ciento cincuenta mil MSCs de BM, UCB o PL se colocaron en la cámara inferior y  $1.5 \times 10^5$  linfocitos T CD3<sup>+</sup> se colocaron en la cámara superior sobre la membrana semipermeable con poro de 0.4 mm. Los linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados en ausencia de MSCs se utilizaron como controles positivos de proliferación, secreción de citocinas y expresión de moléculas. Las MSCs de BM, UCB o PL cultivadas en ausencia de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, fueron empleadas como controles de la expresión basal de moléculas y factores secretados por las MSCs. Los cultivos se mantuvieron durante 1-4 días para hacer las evaluaciones correspondientes de proliferación, expresión de moléculas por citometría de flujo y secreción de citocinas (ver análisis por “citometría de flujo”, “análisis cuantitativo de citocinas” y “evaluación cuantitativa de PGE<sub>2</sub>”).

## **Ensayos de proliferación**

A los tres o cuatro días de activación de los linfocitos T CD3<sup>+</sup> y 15 horas antes de cosecharlas, las células se marcaron con 10  $\mu$ M de BrdU (BD Pharmigen, San Diego). La proliferación de

linfocitos CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se evaluó empleando el BrdU Flow Kits (BD Pharmigen, San Diego), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados en ausencia de MSCs se usaron como controles positivos y se consideraron como el 100% de proliferación. El nivel de proliferación observado en los co-cultivos se normalizó respecto a su control.

### **Análisis por citometría de flujo**

Además de los anticuerpos monoclonales usados para caracterizar el inmunofenotipo de las MSCs, también se emplearon anticuerpos monoclonales conjugados a FITC, PE o APC que reconocen los marcadores de superficie CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, CTLA-4, BrdU (BD Biosciences), Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA, USA) y sus respectivos controles de isotipo para caracterizar a los linfocitos T. Asimismo, empleamos anti-PD-L1-PE (BD Biosciences) para detectar esta molécula en las MSCs. Un total de  $1-2 \times 10^5$  células bloqueadas previamente con SFB o Bloqueador de receptores Fc (Blocking Reagent Human Miltenyi Biotec, Germany) se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS 3% SFB, EDTA 1 mM y se incubaron con el anticuerpo correspondiente durante 20-30 minutos, después las células se lavaron con 1 ml de PBS 3% SFB, EDTA 1 mM y se fijaron con FACS Lysing Solution (BD, Bioscience San Jose, CA). Para la detección intracelular de CTLA-4 se empleó el buffer Cytotfix/cytoperm (BD Pharmigen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. En el caso de Foxp3 se usó el Kit Foxp3 Fixation/Permeabilization concentrate and diluent (eBioscience San Diego, CA). Las células se almacenaron a 4°C en la oscuridad hasta su análisis en un Coulter Epics Altra Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), donde se colectaron un mínimo de 10,000 eventos. Los datos fueron analizados con el software FlowJo 7.6. Se



determinó el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia (MFI, del inglés Mean Fluorecence Intensity).

### **Cuantificación de citocinas**

Para cuantificar la concentración de citocinas secretadas, se obtuvieron los sobrenadantes de varias condiciones de cultivo: sobrenadantes de linfocitos T CD3<sup>+</sup> no activadas o de MSCs cultivadas en ausencia de linfocitos T CD3<sup>+</sup> (controles negativos); sobrenadante de linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados en ausencia de MSCs (control positivo) y sobrenadantes de co-cultivos con BM, UCB o PL MSCs y linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados. Los sobrenadantes se almacenaron a -70°C hasta su uso. La determinación de citocinas se realizó por CBA (del inglés, cytometric bead array; BD Bioscience San Jose, CA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se mezclaron 10 µl de las perlas de captura que reconocen cada una de las citocinas (IFN $\gamma$ , IL-10, IL-4 y TNF $\alpha$ ), esta mezcla se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Durante este tiempo, mediante diluciones seriales se preparó la curva estándar de cada una de las citocinas (0-5000 pg/ml). Posteriormente 50 µl de cada sobrenadante o de cada uno de los puntos de la curva estándar se mezclaron con 50 µl de las perlas de captura, los tubos se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Después se hizo un lavado con 1 ml de buffer de lavado y el botón fue resuspendido en 300 µl del mismo buffer y las muestras se analizaron inmediatamente en el citómetro

## **Cuantificación de PGE<sub>2</sub>**

La concentración de PGE<sub>2</sub> en los sobrenadantes se evaluó por enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) usando Prostaglandin E<sub>2</sub> human ELISA Kit (Invitrogen). De acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se utilizó como control el sobrenadante de las MSCs cultivadas en ausencia de linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Mediante diluciones seriales se preparó una curva estándar de PGE<sub>2</sub> de 0.03 a 4.0 ng/ml, posteriormente se pipetearon 100µl de las muestras problema o de cada uno de los puntos de la curva estándar, en los pozos de la microplaca, cada muestra se cuantificó por duplicado. En cada uno de los pozos, previamente cubiertos con un anti-ratón policlonal de cabra, se agregaron 50 µl de PGE<sub>2</sub> marcada con fosfatasa alcalina y 50 µl anti-PGE<sub>2</sub> monoclonal de ratón, excepto en los pozos que corresponden al blanco. La placa se incubó durante dos horas a temperatura ambiente con agitación, posteriormente los pozos se lavaron para eliminar todo lo no adherido. Después, se adicionó el sustrato de la fosfatasa alcalina (*p*NPP, del inglés *para*-nitrophenyl phosphate) y la placa se incubó durante una hora, finalmente se leyó a 412 nm en un lector de ELISA (DYNATEC MR5000).

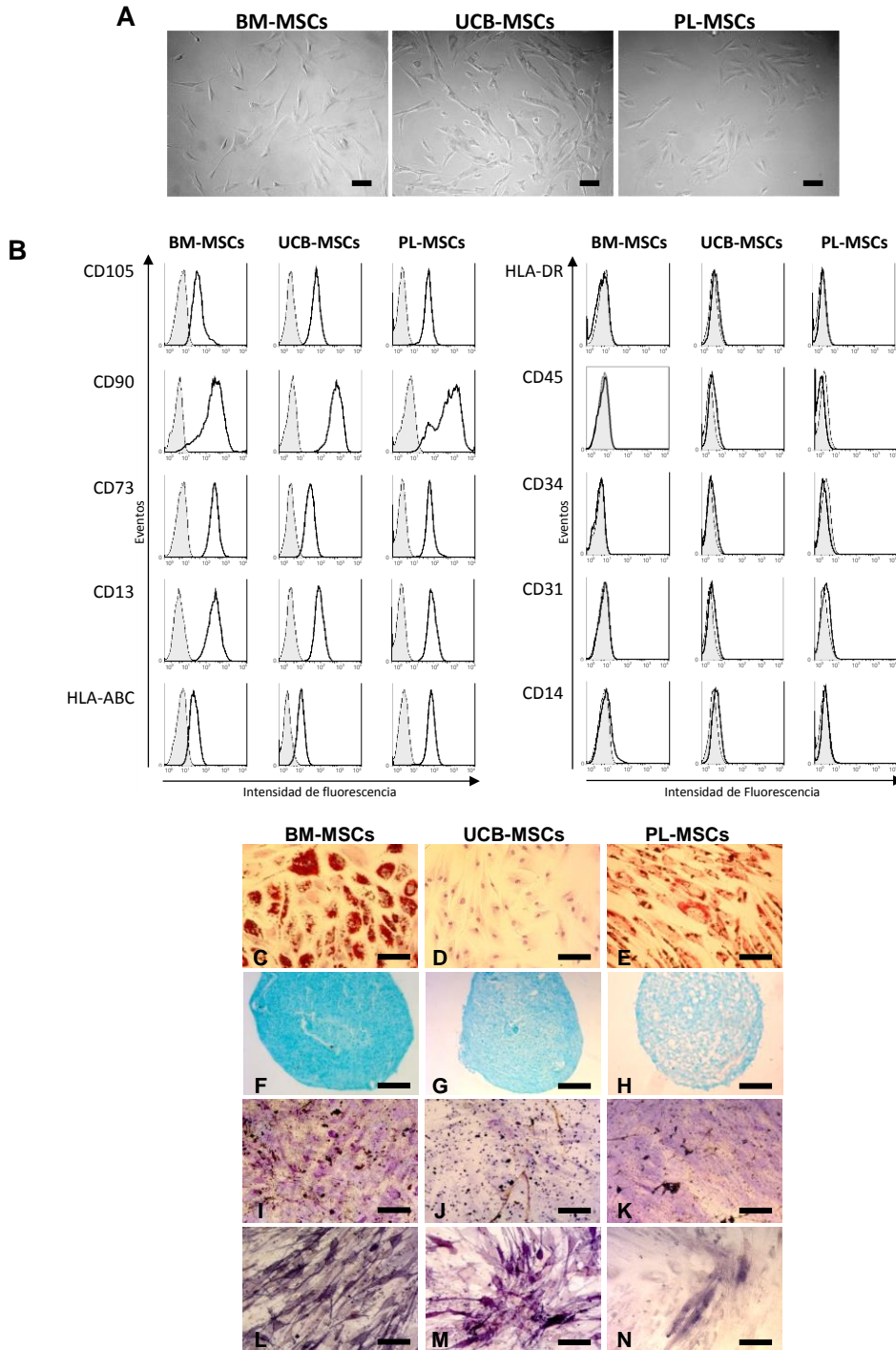
## **Análisis estadístico**

Los datos son expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM), calculada de 3-10 experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS 20.0. La comparación entre los grupos se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis seguido por Mann-Whitney U Test. Valores de  $P < 0.05$  se consideraron significativos.

## RESULTADOS

**Las MSCs provenientes de BM, UCB y PL presentaron morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciaciones similares.**

Los resultados obtenidos de la caracterización de las MSCs obtenidas de BM ( $n=5$ ), UCB ( $n=5$ ) y PL ( $n=5$ ), demuestran que nuestras poblaciones celulares presentaron morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación similares a los reportados previamente (Montesinos et al., 2009). Las MSCs de las tres fuentes tuvieron la morfología fibroblastoide característica de este tipo de células (Fig. 5A). Además, se observó un alto porcentaje de los marcadores de superficie característicos para MSCs (CD105, CD90 y CD73) establecidos por la ISCT (Dominici et al., 2006). También expresaron bajos niveles de HLA-ABC; y fueron negativas para HLA-DR, marcadores hematopoyéticos (CD34, CD45 y CD14) y endoteliales (CD31) (Fig. 5B). Asimismo, las MSCs de las tres fuentes tuvieron capacidad de diferenciación osteogénica y condrogénica (Fig 5 F-N). Sin embargo, solamente las MSCs derivadas de BM y PL tuvieron potencial adipogénico a diferencia de aquellas provenientes de UCB que no mostraron dicho potencial (Fig. 5 C-E).

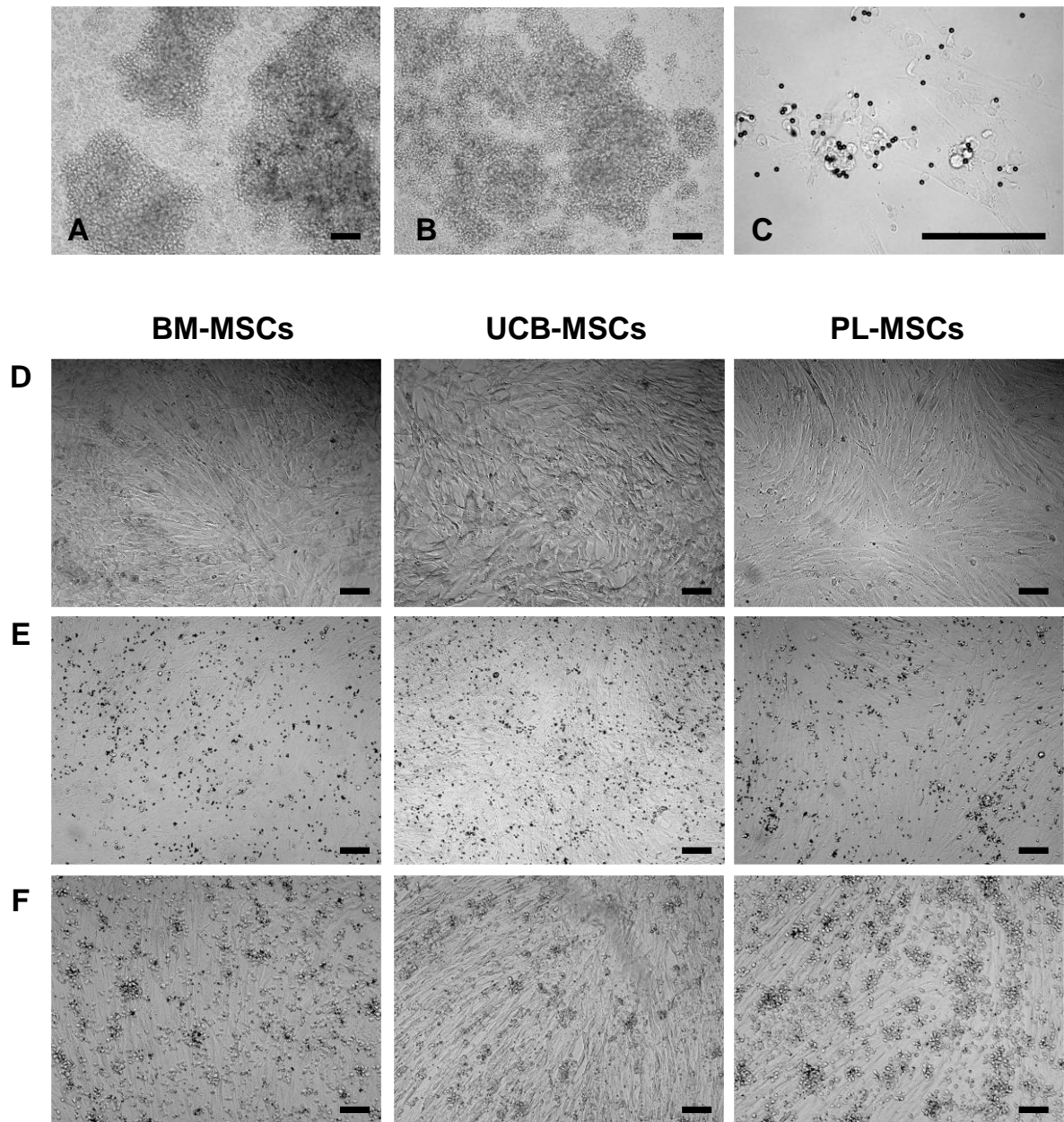


**Figura 5. Caracterización funcional de MSCs de BM, UCB y PL.** A) Morfología observada en los cultivos de MSCs de la fuente indicada (Objetivo 10X). B) Inmunofenotipo de las MSCs, histogramas representativos de los marcadores analizados. C-N) MSCs de las tres fuentes se cultivaron en medios de diferenciación adipogénico, osteogénico y condrogénico. C-E) Diferenciación adipogénica, indicada por la acumulación de vacuolas lipídicas teñidas con rojo oleoso (Objetivo 20X). F-H) Diferenciación condrogénica indicada por la tinción con azul alciano de los glucosaminoglicanos (Objetivo 20X). I-N) Diferenciación osteogénica, indicada por los depósitos de calcio teñidos con Von Kossa (I-K) o fosfatasa alcalina (L-N) (Objetivo 20X). Se Muestra un experimento representativo. Barra de escala indica 100  $\mu$ m.

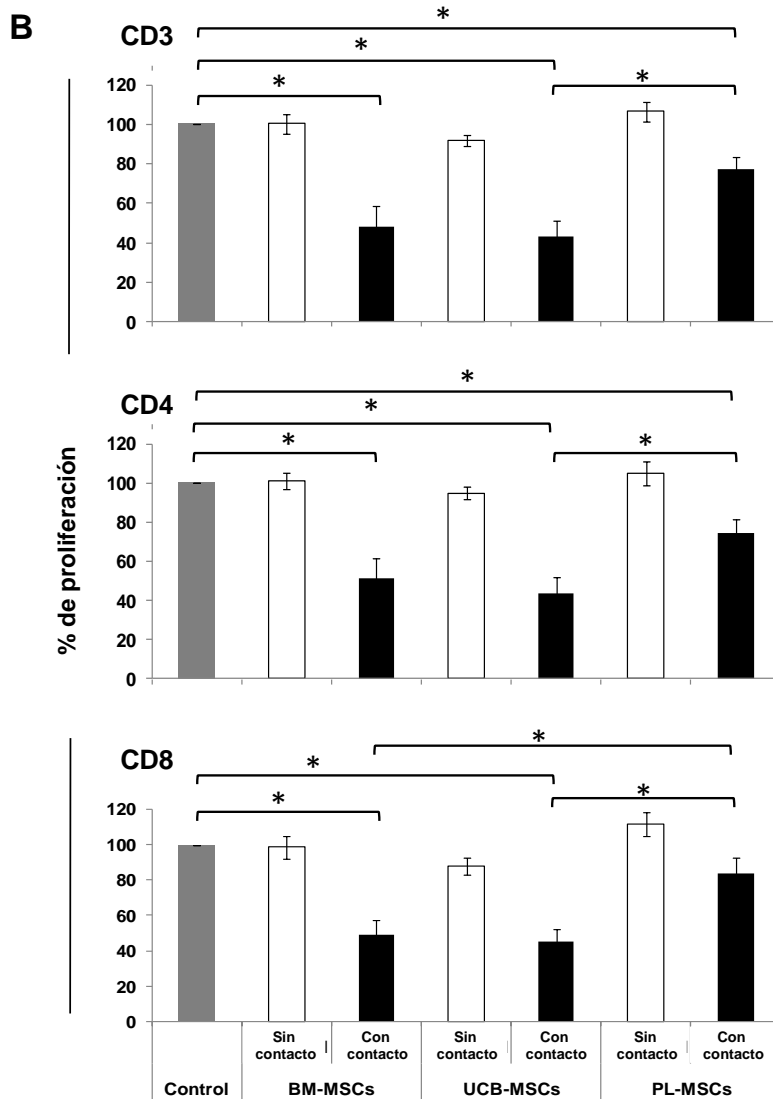
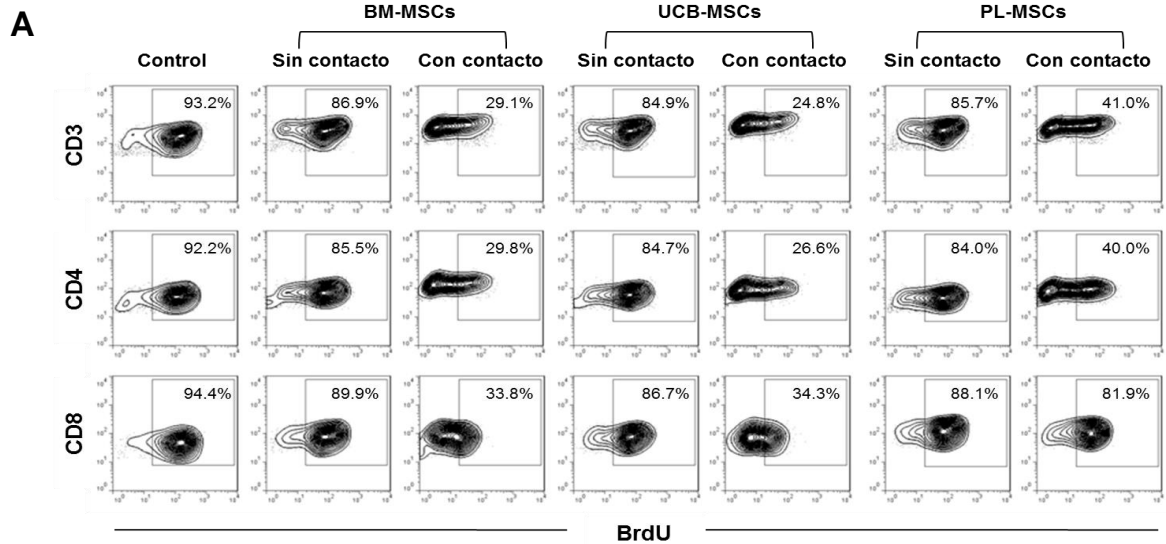
## **La proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> es inhibida por MSCs derivadas de BM y UCB**

Se ha demostrado que BM-MSCs, UCB-MSCs y PL-MSCs disminuyen la proliferación de CMSP activadas con mitógenos o aloantígenos (Krampera et al., 2006; Wang et al., 2009; Chang et al., 2005). Algunos estudios han demostrado la importancia del tipo de población evaluada (PBMC o linfocito T CD3<sup>+</sup>) y la presencia de contacto celular en los co-cultivos en la inmunosupresión ejercida por las BM-MSCs (Kronsteiner et al., 2011), por esta razón decidimos analizar el efecto directo de las MSCs sobre una población enriquecida en linfocitos T CD3<sup>+</sup>, para disminuir la interferencia de otros componentes celulares como linfocitos B, monocitos y células dendríticas. Obtuvimos una población enriquecida en linfocitos T CD3<sup>+</sup> (pureza  $\geq 97\%$ ) que fueron activados con anti-CD3/CD28 en presencia o ausencia de BM-MSCs, UCB-MSCs o PL-MSCs. En los co-cultivos LT/MSCs se evitó el contacto celular (sin contacto) (Fig. 6B) o se permitió el contacto célula-célula (con contacto) (Fig. 6E y F). La proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados en ausencia de MSCs se consideró como el 100% de proliferación (Control positivo) (Fig. 6A). En las figuras 7A y B, se puede observar que las MSCs de BM y UCB disminuyen significativamente la proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> ( $48.2\% \pm 10.1\%$  y  $42.9\% \pm 7.8\%$ , respectivamente;  $P < 0.05$ ), CD4<sup>+</sup> ( $51.2\% \pm 10.4\%$  y  $43.6\% \pm 8.2\%$ , respectivamente;  $P < 0.05$ ) y CD8<sup>+</sup> ( $49.0\% \pm 8.3\%$  y  $44.8\% \pm 7.4\%$ , respectivamente;  $P < 0.05$ ), mientras que las MSCs de PL únicamente disminuyen de forma significativa la proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> ( $77.0\% \pm 6.2\%$ ;  $P < 0.05$ ) y CD4<sup>+</sup> ( $74.5\% \pm 6.8\%$ ;  $P < 0.05$ ) pero no la de linfocitos T CD8<sup>+</sup> ( $83.7\% \pm 8.8\%$ ) (Fig. 7A y B). Es importante mencionar que esta disminución se observó únicamente en los co-cultivos con contacto. Asimismo, en los co-cultivos en presencia de UCB-MSCs observamos una mayor

disminución de la proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en comparación con los co-cultivos con PL-MSCs ( $P < 0.05$ ). Mientras que, en los co-cultivos con BM-MSCs únicamente observamos disminución en la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en comparación con PL-MSCs ( $P < 0.05$ ). Estos resultados nos sugieren que BM-MSCs y UCB-MSCs presentan una mayor capacidad de inhibición de la proliferación de linfocitos T que PL-MSCs y que es necesario el contacto entre los linfocitos T y las MSCs para que se lleve a cabo dicha inhibición.



**Figura 6. Las BM-MSCs, UCB-MSCs y PL-MSCs disminuyen la proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup>.** A) Proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados en ausencia de MSCs. B) Proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados en presencia de MSCs evitando el contacto celular. C) Micropartículas anti-CD3/CD28 (objetivo 40X). D) Monocapa de MSCs de la fuente indicada sembrada 24 horas antes del co-cultivo. E) Co-cultivos de 24 horas permitiendo el contacto celular. F) Co-cultivo de 4 días permitiendo el contacto celular. A, B, D-F) Objetivo 10X. Barras de escala indican 100  $\mu$ m.

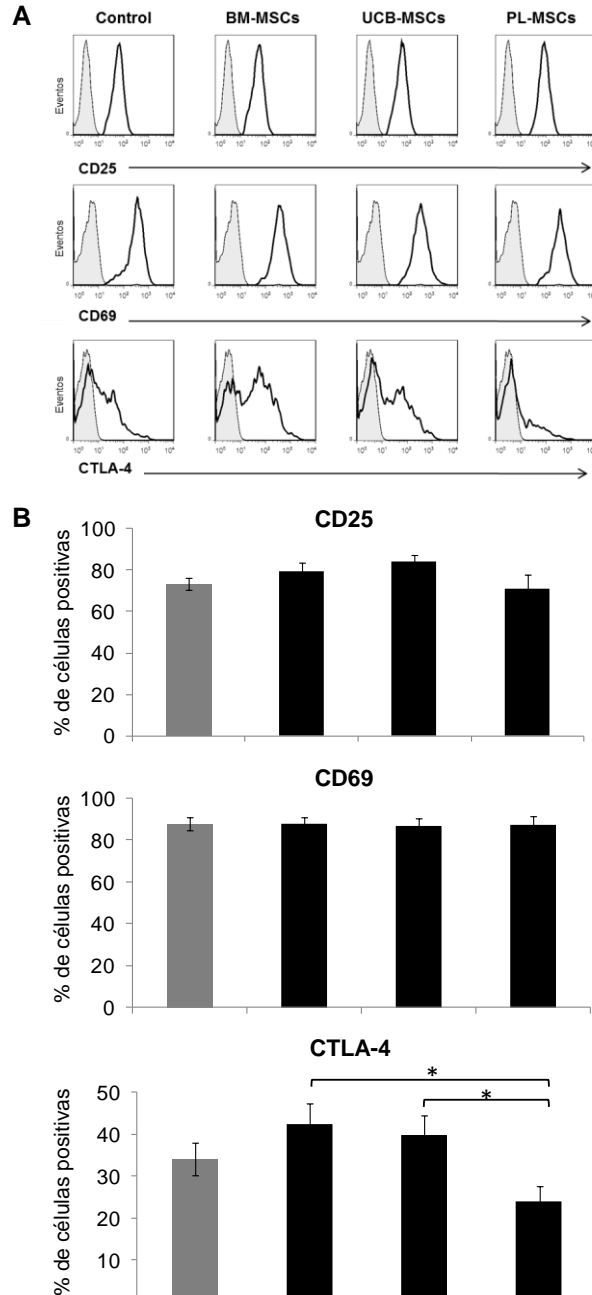


**Figura 7. BM-MSCs y UCB-MSCs disminuyen la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> mediante contacto celular.** Linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados con anti-CD3/CD28 se co-cultivaron en presencia de BM-MSCs, UCB-MSCs o PL-MSCs en relación 1:1 (linfocitos T:MSCs). Los co-cultivos se realizaron permitiendo (con contacto, barras negras) o evitando el contacto célula-célula (sin contacto, barras blancas). La proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados en ausencia de MSCs se consideró como el control positivo (100% proliferación,  $n=10$ , barras grises). El porcentaje de incorporación de BrdU se determinó sobre la región CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> al día 3-4 de cultivo. A) Gráficos de contorno representativos de un experimento. B) Media  $\pm$  SEM del porcentaje de proliferación ( $n=10$  co-cultivos con contacto, para cada una de las fuentes;  $n=5$  co-cultivos sin contacto, para cada una de las fuentes). \*Indica diferencia estadísticamente significativa con  $P<0.05$ .



**Las MSCs derivadas de las tres fuentes no afectan la expresión de CD25 y CD69, sin embargo PL-MSCs disminuye la expresión de CTLA-4.**

La activación de linfocitos T con antígenos o mitógenos rápidamente induce la expresión de marcadores de activación como: CD25, CD69 y CTLA-4 (Wang et al., 2008). Debido a que observamos inhibición de la proliferación de los linfocitos T en los co-cultivos con contacto celular, decidimos analizar si la presencia de las MSCs en dichos co-cultivos, afecta la expresión de CD25, CD69 y CTLA-4. La expresión de tales moléculas en linfocitos T activados en ausencia de MSCs se consideró como el control positivo (control). Observamos que la expresión de CD25 y CD69 no es afectada por las MSCs de las tres fuentes (Fig. 8A y B). Asimismo, la expresión de CTLA-4 no se modifica en los co-cultivos con BM-MSCs y UCB-MSCs (Fig. 8B). Sin embargo, interesantemente observamos una disminución significativa de la expresión de CTLA-4 en linfocito T en presencia de PL-MSCs ( $23.8\% \pm 3.7\%$ ) en comparación con BM-MSCs and UCB-MSCs ( $42.3\% \pm 5.0\%$  y  $39.5\% \pm 4.8\%$ , respectivamente;  $P < 0.05$ ) (Fig. 8B).

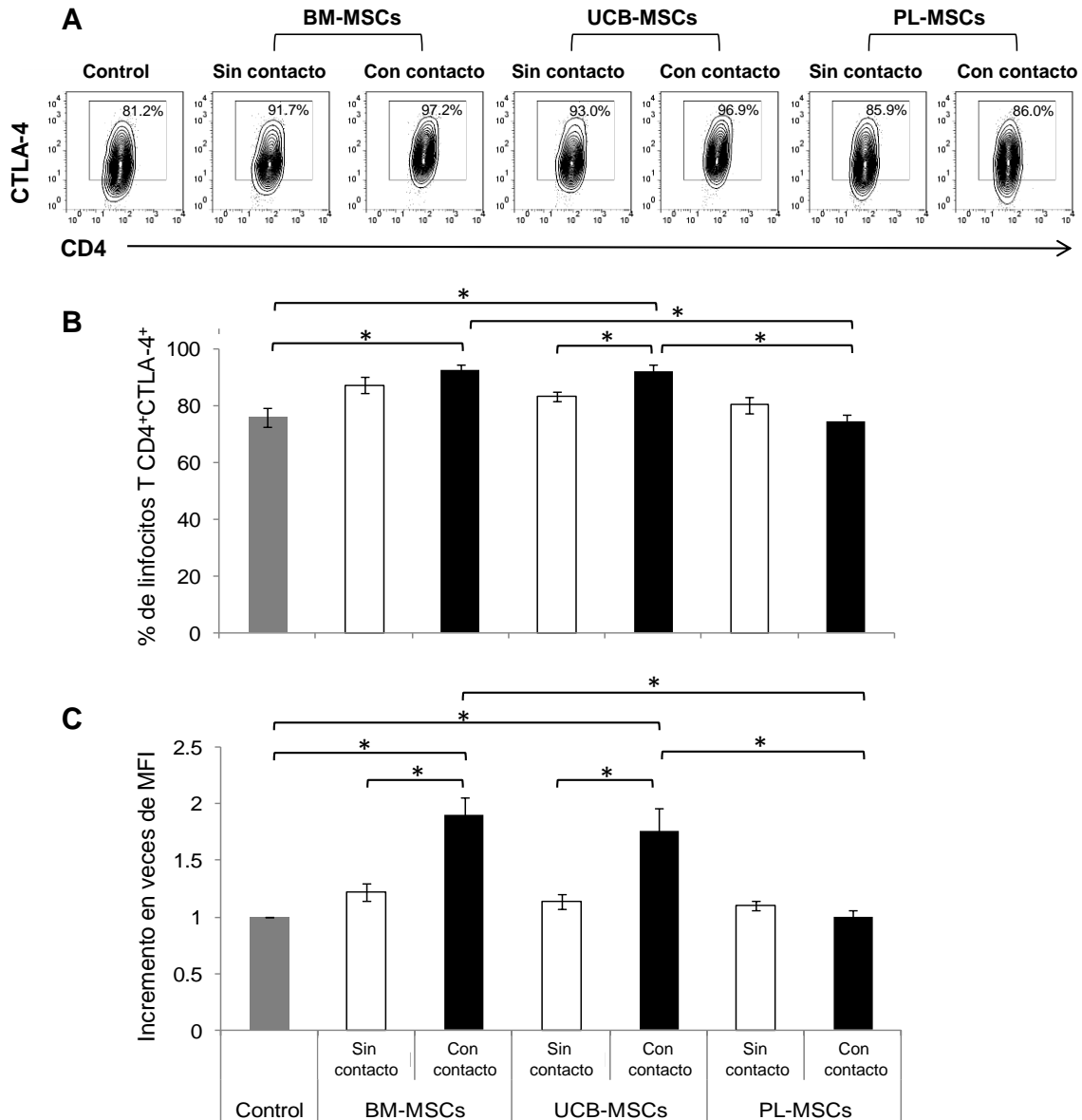


**Figura 8. Efecto de las MSCs sobre la expresión de CD25, CD69 y CTLA-4.** Linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados con anti-CD3/CD28 se co-cultivaron en presencia de BM-MSCs, UCB-MSCs o PL-MSCs en relación 1:1 (linfocitos T:MSCs) (barras negras). Los co-cultivos se realizaron permitiendo el contacto celular. La expresión de las moléculas en linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados en ausencia de MSCs se consideró como el control positivo (control, barras grises). El porcentaje de expresión de los marcadores se determinó sobre la población de linfocitos T CD3<sup>+</sup> a las 48 horas de cultivo (CD25) o 24 horas (CD69 y CTLA-4). A) Histogramas representativos de la expresión de CD25, CD69 y CTLA-4. B) Mean  $\pm$  SEM del porcentaje de expresión (CD25: control, BM-, UCB- y PL-MSCs  $n=7$  experimentos individuales para cada fuente; CD69: control, BM-, UCB- y PL-MSCs  $n=7$  experimentos individuales para cada fuente y CTLA-4: control, BM-, UCB- y PL-MSCs  $n=10$  experimentos individuales para cada fuente). \* Indica diferencia estadísticamente significativa con  $P < 0.05$ .

## **Las MSCs derivadas de BM y UCB incrementan la expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.**

Debido a que CTLA-4 es un regulador negativo importante de la respuesta inmune y su máxima expresión se alcanza entre las 24 y 48 horas post-activación (Wing et al., 2011; Jago et al., 2004), decidimos analizar si los cambios en su expresión observados a las 24 horas de co-cultivo, se mantenían a los 3 días y si la ausencia o presencia de contacto celular afectaba dicha expresión. Para ello realizamos co-cultivos con y sin contacto celular y medimos el porcentaje y la MFI de CTLA-4 en la población CD4<sup>+</sup> (Fig. 9A) y CD8<sup>+</sup>. La expresión de CTLA-4 en linfocitos T activados en ausencia de MSCs se consideró como el control positivo (control). Observamos que únicamente en los co-cultivos en los cuales se permitió el contacto celular, las MSCs derivadas de BM y UCB son capaces de incrementar significativamente el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> (92.6%±1.8% y 92.1%±2.5%, respectivamente) respecto al control (76.0%±3.4%;  $P<0.05$ ) (Fig. 4B), así como la MFI de CTLA-4<sup>+</sup> (1.9 y 1.8 veces, respectivamente;  $P<0.05$ ) (Fig. 9C). Por su parte, en los co-cultivos sin contacto entre los linfocitos T y las MSCs no se observa incremento tanto en el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> CTLA-4<sup>+</sup>, como en la MFI y los valores fueron significativamente más bajos que en los co-cultivos con contacto de BM- y UCB-MSCs ( $P<0.05$ ) (Fig. 9B y C). Asimismo, observamos que la presencia de PL-MSCs no incrementa la expresión de CTLA-4 e incluso los valores de MFI son significativamente menores (74.7%±2.3% e MFI: 1.1 veces) en comparación con BM-MSCs (92.6%±1.8% e MFI: 1.9 veces;  $P<0.05$ ) y UCB-MSCs (92.1%±2.5% e MFI: 1.8 veces;  $P<0.05$ ) (Fig. 9B y C). Por otra parte, en la población de LT CD8<sup>+</sup> no observamos cambios significativos en la expresión de CTLA-4 en ninguno de los co-cultivos (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que es necesario el contacto entre las MSCs y los

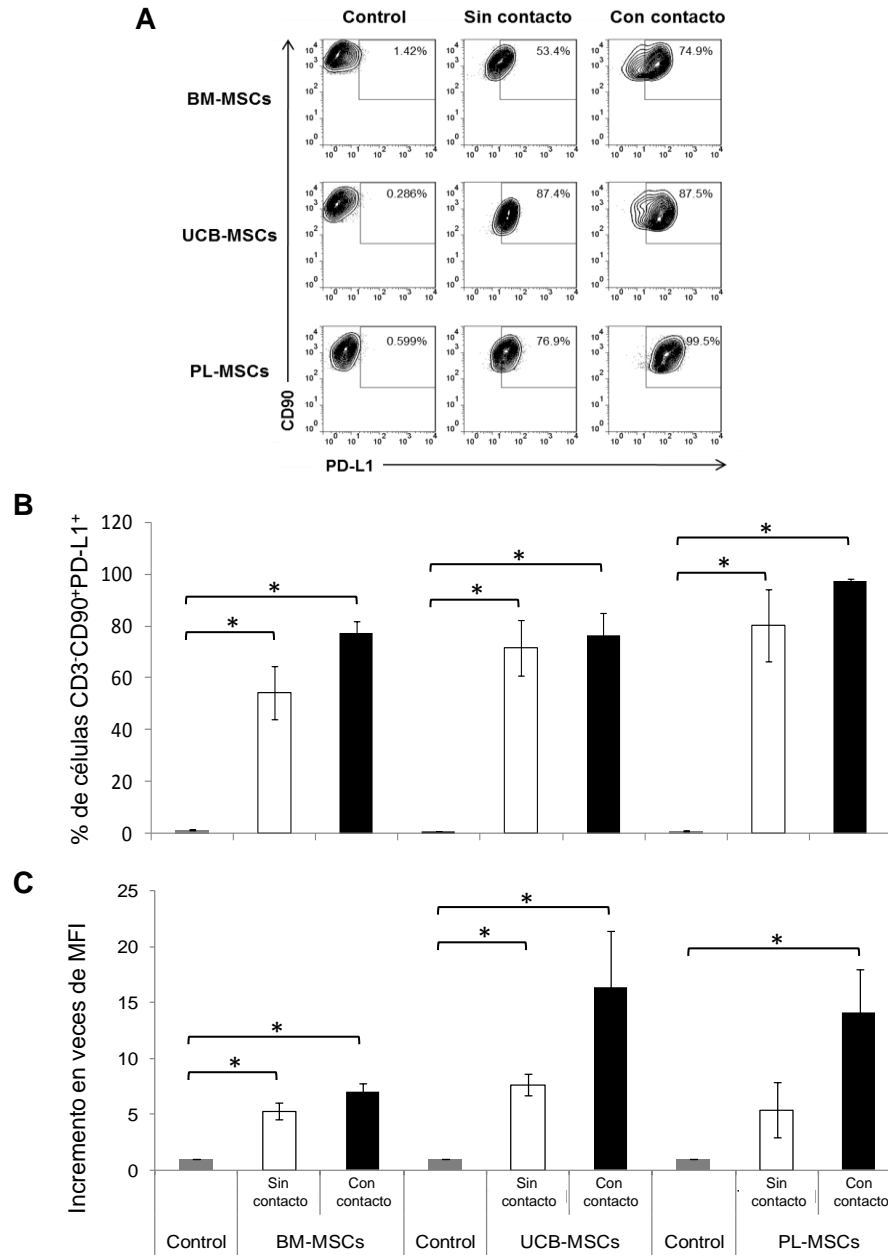
linfocitos T CD4<sup>+</sup> para que se incremente la expresión de CTLA-4 y que esta molécula puede participar en la disminución de la proliferación observada en estos co-cultivos.



**Figura 9. BM-MSCs y UCB-MSCs incrementan la expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.** Linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados con anti-CD3/CD28 se co-cultivaron en presencia de BM-MSCs, UCB-MSCs o PL-MSCs en relación 1:1 (linfocitos T:MSCs). Los co-cultivos se realizaron permitiendo (con contacto, barras negras) o evitando el contacto célula-célula (sin contacto, barras blancas). La expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados en ausencia de MSCs se consideró como el control de expresión (control, barras grises,  $n=7$ ). El porcentaje de la población CTLA-4<sup>+</sup> y el incremento en veces de la MFI de CTLA-4 se determinó sobre la región CD4<sup>+</sup> después de 3 días de cultivo. A) Gráficos de contorno representativos de un experimento. B) Media $\pm$ SEM del porcentaje de LT CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>. C) incremento en veces de la MFI de CTLA-4 en la población CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> ( $n=7$  co-cultivos con contacto, para cada una de las fuentes;  $n=7$  co-cultivos sin contacto, para cada una de las fuentes). \* Indica diferencia estadísticamente significativa con  $P < 0.05$ .

## **La expresión de PD-L1 se incrementa en las MSCs de BM, UCB y PL, en presencia de linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados**

Por otra parte, debido a que el contacto celular es muy importante para la inhibición de la proliferación observada, decidimos evaluar la expresión de PD-L1, una molécula involucrada en la inhibición de linfocitos T a través del contacto célula-célula (Sheng et al., 2008). Para ello, analizamos la expresión de PD-L1 en las MSCs presentes en los co-cultivos con y sin contacto celular (Fig. 10A). El porcentaje y MFI de PD-L1 en MSCs cultivadas en ausencia de linfocitos T, se consideró como la expresión basal de esta molécula (control). Los resultados muestran que la presencia de los linfocitos T activados incrementa el porcentaje de MSCs PD-L1<sup>+</sup> (CD3<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>;  $P < 0.05$ ) en los co-cultivos, tanto en ausencia como en presencia de contacto celular de BM-MSCs (control:  $1.5 \pm 0.3\%$ ; sin contacto:  $54.3 \pm 10.2\%$  y con contacto:  $77.0 \pm 4.6\%$ ), UCB-MSCs (control:  $0.11 \pm 0.03\%$ ; sin contacto:  $71 \pm 10.7\%$  y con contacto:  $76.3 \pm 8.7\%$ ) o PL-MSCs (control:  $0.29 \pm 0.11\%$ ; sin contacto:  $80.0 \pm 13.8\%$  y con contacto:  $97.4 \pm 1.0\%$ ) (Fig. 10B). Resultados similares se obtuvieron al analizar la MFI de PD-L1 en donde también se observaron incrementos significativos ( $P < 0.05$ ) en co-cultivos con BM-MSCs (sin contacto: 5 veces y con contacto: 7 veces), UCB-MSCs (sin contacto: 7 veces y con contacto: 16 veces) y PL-MSCs (sin contacto: 5 veces y con contacto: 14 veces) (Fig. 10C). Estos resultados sugieren que PD-L1 podría estar involucrada en la actividad inmunosupresora mediada por las MSCs a través de contacto célula-célula. Además, debido a que la expresión de PD-L1 se incrementa tanto en los cultivos con y sin contacto celular, ello indica que dicho incremento podría deberse a la presencia de un mediador soluble que estimula la expresión de PD-L1 en las MSCs.



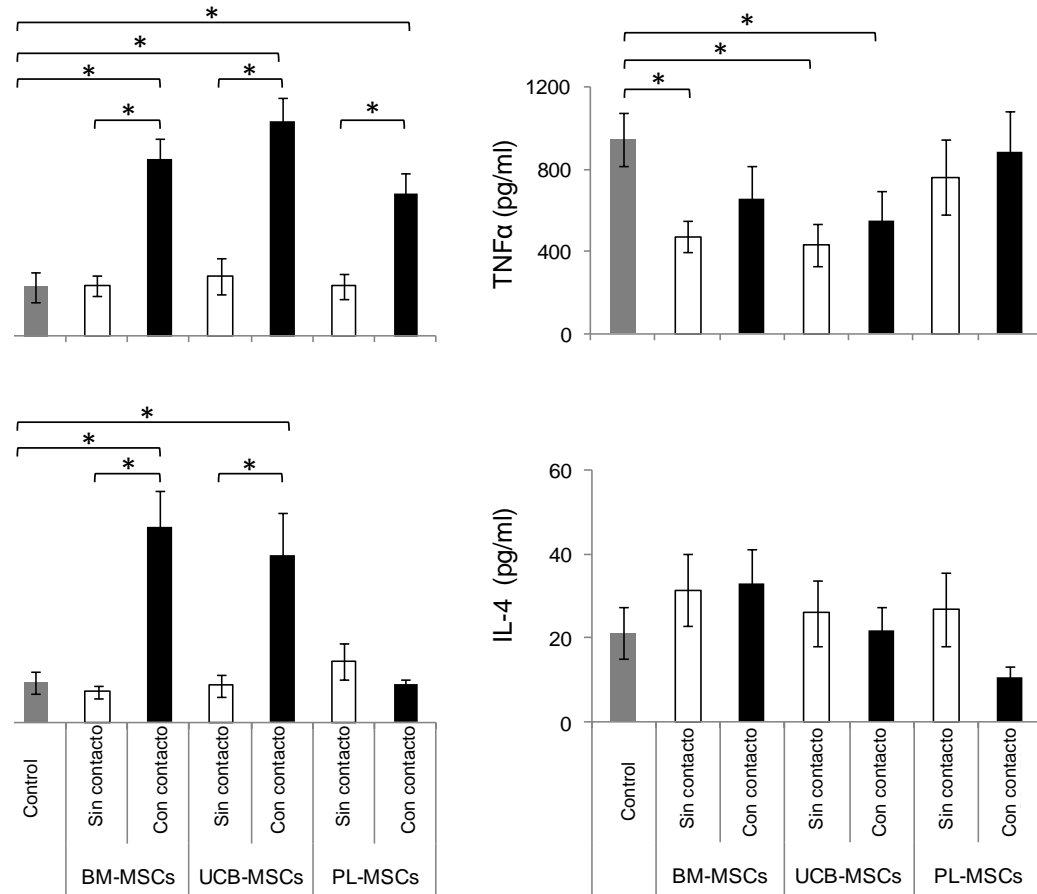
**Figura 10. La expresión de PD-L1 se incrementa en las MSCs en presencia de linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados.** Linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados con anti-CD3/CD28 se co-cultivaron en presencia de BM-MSCs, UCB-MSCs o PL-MSCs en relación 1:1 (linfocitos T:MSCs). Los co-cultivos se realizaron permitiendo (con contacto, barras negras) o evitando el contacto célula-célula (sin contacto, barras blancas). La expresión de PD-L1 en MSCs cultivadas en ausencia de linfocitos T CD3<sup>+</sup> se consideró como el control (control, barras grises,  $n=6$ ) El porcentaje de la población PD-L1<sup>+</sup> y el incremento en veces de la MFI de PD-L1 se determinó sobre la región CD3<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> después de 3 días de cultivo. A) Gráficos de contorno representativos de un experimento. B) Media $\pm$ SEM del porcentaje de MSCs CD3<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>. C) Incremento en veces de MFI de PD-L1 en la población CD3<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>. BM-MSCs:  $n=6$  con contacto,  $n=6$  sin contacto; UCB-MSCs:  $n=5$  con contacto,  $n=5$  sin contacto y PL-MSCs:  $n=4$  con contacto,  $n=4$  sin contacto (experimentos individuales). \*Indica diferencia estadísticamente significativa con  $P < 0.05$ .

## **Disminución de la concentración de TNF $\alpha$ e incremento de IFN $\gamma$ e IL-10 en los co-cultivos con BM-MSCs y UCB-MSCs**

Estudios previos han demostrado la importancia del IFN $\gamma$  en la expresión de PD-L1 en BM-MSCs (Mourez et al., 2007; Sheng et al., 2008) y PL-MSCs (Chang et al., 2006), así como en la inducción de las propiedades inmunosupresoras de las MSCs solo o en presencia de otras citocinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$ . Además, la disminución de la proliferación observada en los co-cultivos podría estar relacionada con la presencia de citocinas inmunosupresoras tipo Th2 como IL-4 e IL-10 (Aggarwal et al., 2005; Krampera et al., 2006). Con base en lo anterior decidimos evaluar la presencia de citocinas que pudieran participar en la respuesta inmunosupresora de las MSCs de las tres fuentes. Para ello determinamos la concentración de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 e IL-4 presente en los co-cultivos en ausencia o presencia de contacto celular. La concentración de citocinas detectadas en el medio condicionado de linfocitos T activados en ausencia de MSCs se consideró como el control positivo. Detectamos una mayor concentración de IFN $\gamma$  e IL-10 en los co-cultivos con contacto celular en presencia de BM-MSCs (IFN $\gamma$ : 10761.4 $\pm$ 1192 pg/ml, IL-10: 463 $\pm$ 87 pg/ml;  $P$ <0.05) y UCB-MSCs (IFN $\gamma$ : 13031.9 $\pm$ 1409.8 pg/ml, IL-10: 393 $\pm$ 103 pg/ml;  $P$ <0.05), comparado con los cultivos control (IFN $\gamma$ : 2976 $\pm$ 936 pg/ml, IL-10: 95 $\pm$ 25 pg/ml;  $P$ <0.05). (Fig. 11). Sin embargo, en los co-cultivos con PL-MSCs, únicamente detectamos incremento en la concentración de IFN $\gamma$  (8690 $\pm$ 1147 pg/ml;  $P$ <0.05), pero no en IL-10 (88.3 $\pm$ 12.2 pg/ml) (Fig. 11), respecto al control. En los co-cultivos sin contacto, las concentraciones de IFN $\gamma$  (BM-MSCs: 3047 $\pm$ 593 pg/ml, UCB-MSCs: 3596 $\pm$ 1101 pg/ml; PL-MSCs: 3023 $\pm$ 749 pg/ml) e IL-10 (BM-MSCs: 72 $\pm$ 14 pg/ml, UCB-MSCs: 87 $\pm$ 27 pg/ml; PL-MSCs: 143 $\pm$ 42 pg/ml) son

similares a las observadas en linfocitos T activados en ausencia de MSCs (IFN: 2976±936 pg/ml; IL-10: 95±25 pg/ml). En nuestros resultados se observa una tendencia a disminuir la concentración de TNF $\alpha$  en los co-cultivos con BM-MSCs y UCB-MSCs, esta tendencia únicamente es significativa en los co-cultivos con contacto celular con UCB-MSCs (544±151 pg/ml;  $P<0.05$ ) y con ambas fuentes en los sistemas sin contacto (BM-MSCs: 479±76 pg/ml, UCB-MSCs: 430±105 pg/ml;  $P<0.05$ ) comparados con los cultivos control (944±130pg/ml). Por otra parte, no se observaron cambios significativos en las concentraciones de IL-4 en cualquier condición de cultivo (Fig. 11). Estos resultados sugieren que BM-MSCs y UCB-MSCs en contacto con linfocitos T activados, inducen la secreción de IFN $\gamma$  e IL-10 y la disminución de TNF $\alpha$  en los co-cultivos, ello en contraste con PL-MSCs que únicamente induce incremento en la concentración de IFN $\gamma$  y no tiene efecto sobre IL-10 y TNF $\alpha$ .



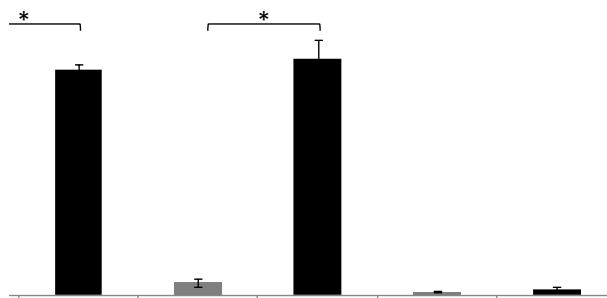


**Figura 11. En los co-cultivos con contacto entre BM-MSCs o UCB-MSCs y LT CD3<sup>+</sup> se incrementa la expresión de IFN $\gamma$  e IL-10.** Linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados con anti-CD3/CD28 se co-cultivaron en presencia de BM-MSCs, UCB-MSCs o PL-MSCs en relación 1:1 (linfocitos T:MSCs). Los co-cultivos se realizaron permitiendo (con contacto, barras negras) o evitando el contacto célula-célula (sin contacto, barras blancas). A los tres días se determinó la concentración de las citocinas en los sobrenadantes de los co-cultivos mediante CBA. La concentración de citocinas detectada en el medio condicionado de linfocitos T activados en ausencia de MSCs, fueron consideradas como la expresión basal de estas citocinas (control, barras grises, n=7). Se muestra la media $\pm$ SEM de la concentración de citocinas (n=7 para todas las condiciones experimentales). \* Indica diferencia estadísticamente significativa con  $P < 0.05$ .

### BM-MSCs y UCB-MSCs inducen la secreción de PGE<sub>2</sub>

La PGE<sub>2</sub> es un mediador involucrado en la disminución de la proliferación de los linfocitos T, estimula la secreción de IL-4 e IL-10 y promueve la diferenciación de Treg adaptativos (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) (Kalinski, 2012). Debido a que detectamos cantidades incrementadas de IFN $\gamma$  en los co-cultivos de BM-MSCs y UCB-MSCs y tomando en cuenta que las BM-MSCs

tienen la capacidad de secretar PGE<sub>2</sub> al ser estimuladas con INF $\gamma$  (Aggarwald y Pittenger, 2005), decidimos evaluar la cantidad de PGE<sub>2</sub> presente en los co-cultivos con contacto celular entre MSCs y linfocitos T activados. La concentración de PGE<sub>2</sub> detectada en el medio condicionado de MSCs cultivadas en ausencia de linfocitos T activados, se consideró como la expresión basal de esta molécula (control). Observamos que únicamente en los co-cultivos con BM-MSCs y UCB-MSCs se incrementa de forma significativa la secreción de PGE<sub>2</sub> (32.0 $\pm$ 0.6 ng/ml y 33.5 $\pm$ 2.6 ng/ml, respectivamente;  $P < 0.05$ ), mientras que en los co-cultivos con PL-MSCs los niveles de PGE<sub>2</sub> permanecen prácticamente igual a los observados en los cultivos control (0.8 $\pm$ 0.3 y 0.5 $\pm$ 0.14 ng/ml respectivamente) (Fig. 12). Estos resultados indican potenciales distintos de inducción de PGE<sub>2</sub> entre BM-MSCs/UCB-MSCs y PL-MSCs y sugieren que PGE<sub>2</sub> podría participar en la inhibición de la proliferación de linfocitos T observada en los co-cultivos con MSCs de BM y UCB en los que se permite el contacto celular.



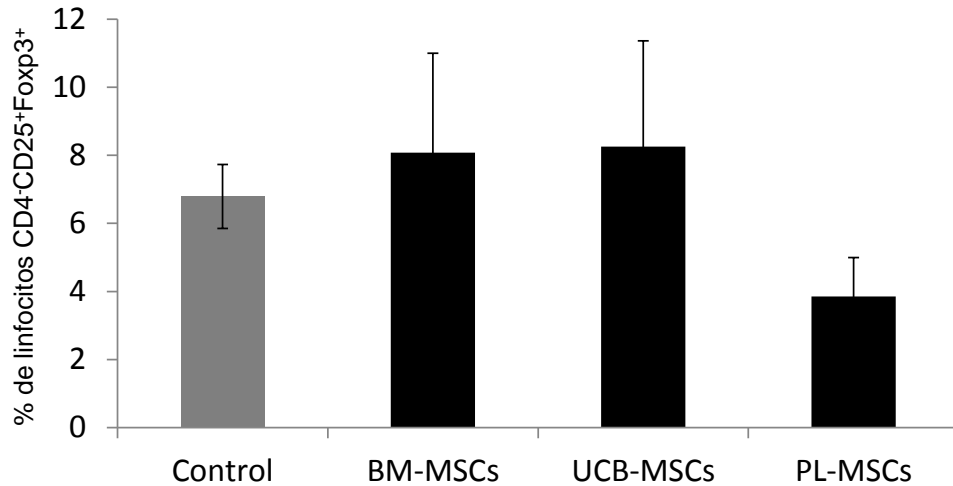
**Figura 12. La expresión de PGE<sub>2</sub> es inducida en co-cultivos con BM-MSCs y UCB-MSCs.** BM-MSCs, UCB-MSCs o PL-MSCs se co-cultivaron en ausencia o presencia de linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados con anti-CD3/CD28. Los co-cultivos se realizaron en relación 1:1 (linfocitos T:MSCs) y permitiendo el contacto celular (barras negras). La concentración de PGE<sub>2</sub> en el sobrenadante se determinó por ELISA después de 3 días de cultivo. La concentración de PGE<sub>2</sub> detectada en el medio condicionado de MSCs cultivadas en ausencia de linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados, fue considerada como la expresión basal de esta molécula (control, barras grises,  $n=3$ ). Los datos son mostrados como la media $\pm$ SEM ( $n=3$ , experimentos independientes para cada una de las fuentes, se realizaron evaluaciones por duplicado). \*Indica diferencia estadísticamente significativa con  $P < 0.05$ .

## **BM-MSCs y UCB-MSCs inducen la generación de linfocitos T reguladores.**

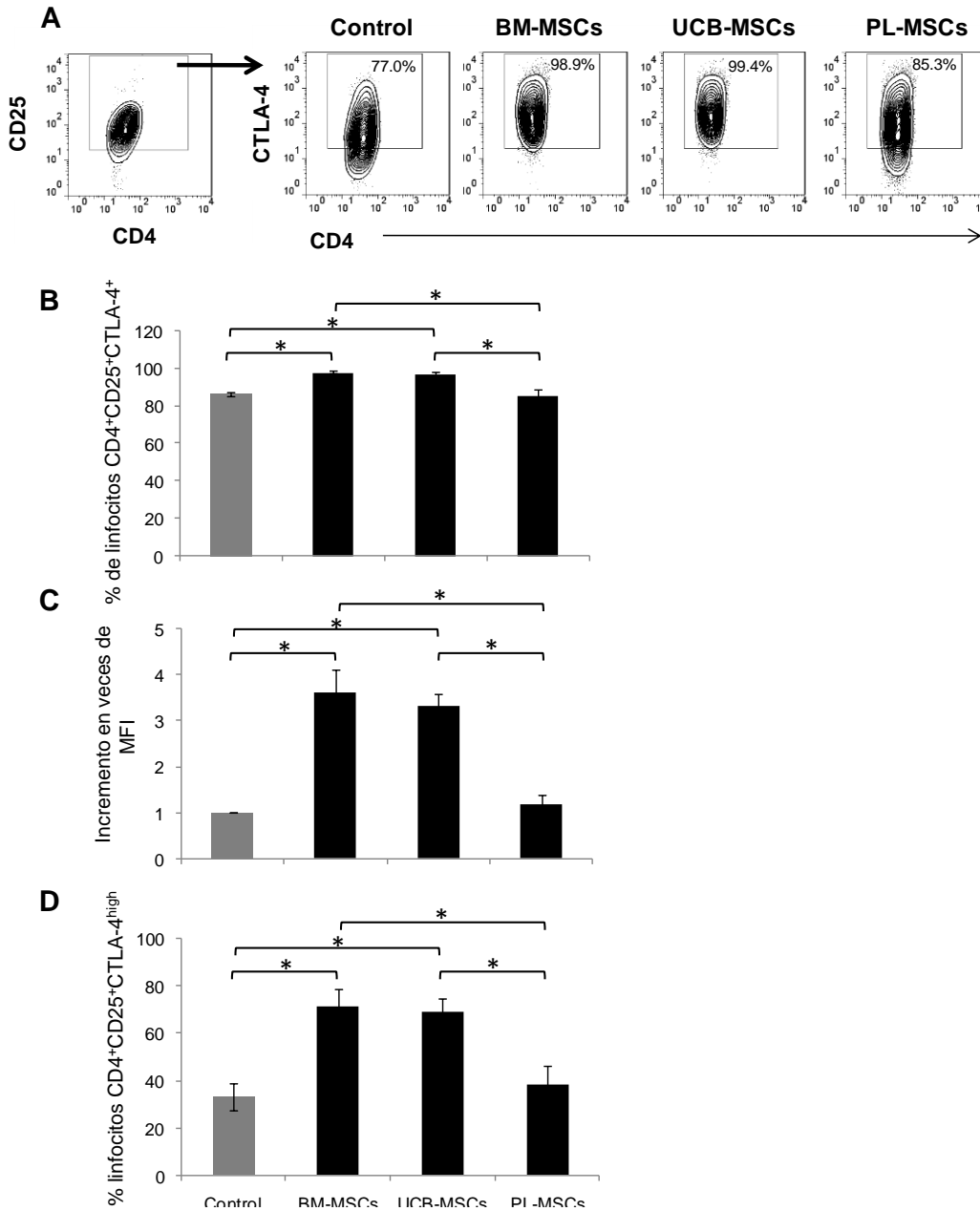
Diversos estudios señalan que  $\text{IFN}\gamma$ , IL-10 y PGE2 son moléculas que participan en la inducción de Treg (Feng et al., 2008; Selmani et al., 2008; English et al., 2009). Debido a que detectamos un incremento en la cantidad de dichas moléculas en los co-cultivos con contacto en presencia de BM-MSCs y UCB-MSCs y que en estas mismas condiciones observamos inhibición de la proliferación de linfocitos T  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  e incremento de la subpoblación linfocitos T  $\text{CD4}^+\text{CTLA-4}^+$ , decidimos analizar si estos hallazgos estaban relacionados con la generación de poblaciones con fenotipo de Treg  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ . Asimismo, dado que CTLA-4 es una molécula constitutivamente expresada por los Treg y esencial para que lleven a cabo su función (Wing et al., 2010), también analizamos la generación de poblaciones de linfocitos T que desplieguen un fenotipo regulador:  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CTLA-4}^+$  y  $\text{CD8}^+\text{CD25}^+\text{CTLA-4}^+$ . Para ello se obtuvo la población de linfocitos T de los co-cultivos con contacto en presencia de MSCs y se determinó sobre la fracción  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  el porcentaje de linfocitos T  $\text{Foxp3}^+$ . También se analizó sobre las fracciones  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  y  $\text{CD8}^+\text{CD25}^+$  el porcentaje de la población  $\text{CTLA-4}^+$  y  $\text{CTLA-4}^{\text{high}}$ . El porcentaje de linfocitos T  $\text{Foxp3}^+$ ,  $\text{CTLA-4}^+$  y  $\text{CTLA-4}^{\text{high}}$  así como la MFI de  $\text{CTLA-4}^+$  en la fracción  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  observada en linfocitos T activados en ausencia de MSCs, se consideró como la población basal de linfocitos T que despliega un fenotipo de Treg (control).

No encontramos incremento significativo en la generación de linfocitos Treg  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$  en los co-cultivos de BM-MSCs y UCB-MSCs. Sin embargo, en los co-cultivos con PL-MSC si hay una tendencia a disminuir esta población aunque no es estadísticamente significativa (Fig. 13). En contraste, observamos que la presencia de MSCs

de BM y UCB incrementan tanto el porcentaje de células  $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$  sobre el control ( $98\pm0.6\%$ ,  $97\pm0.9\%$  y  $86\pm1.2\%$ , respectivamente;  $P<0.05$ ) (Fig. 14A y B), así como la MFI de CTLA-4 en los linfocitos T  $CD4^+CD25^+$  (2.6 veces y 2.3 veces sobre el control, respectivamente;  $P<0.05$ ) (Fig. 14A y B). Asimismo, observamos que ambas fuentes de MSCs también inducen incremento en el porcentaje de células  $CD4^+CD25^+CTLA^{high}$  (control:  $32.8\pm5.7\%$ , BM-MSCs:  $71.1\pm7.5\%$ , UCB-MSCs:  $69\pm5.5\%$ ;  $P<0.05$ ) (Fig. 14D). En contraste, en los co-cultivos de PL-MSCs no se observó incremento significativo en la población  $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$  tanto en el porcentaje (Control:  $86.5\pm1.2\%$ , PL-MSCs:  $85.6\pm3.3\%$ ), como en la MFI (control: 1 veces y PL-MSCs: 1.2 veces). De igual manera no observamos incremento en el porcentaje de la población  $CD4^+CD25^+CTLA^{high}$  en PL-MSCs (Control:  $32.8\pm5.7\%$ , PL-MSCs:  $37.9\pm8.3\%$ ). De manera interesante los valores obtenidos en los porcentajes y niveles de expresión de CTLA-4 en PL-MSCs son significativamente inferiores ( $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$ :  $85.6\pm3.3\%$ , MFI: 1.2-fold,  $CD4^+CD25^+CTLA^{high}$ :  $37.9\pm8.3\%$ ;  $P<0.05$ ) a los observados en aquellos de MSCs de BM ( $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$ :  $98\pm0.6\%$ , MFI: 3.6-fold,  $CD4^+CD25^+CTLA^{high}$ :  $71.1\pm7.5\%$ ) y UCB ( $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$ :  $96.9\pm0.9\%$ , MFI: 3.3-fold,  $CD4^+CD25^+CTLA^{high}$ :  $69\pm5.5\%$ ) (Fig. 14). Por otra parte, los cambios en la expresión de CTLA-4 en los linfocitos T  $CD8^+CD25^+$  no fueron significativos en ninguno de los co-cultivos (datos no mostrados).



**Figura 13. Las MSCs no inducen la diferenciación de poblaciones de linfocitos T reguladoras Foxp3<sup>+</sup>.** Linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados con anti-CD3/CD28 se co-cultivaron en presencia de BM-MSCs, UCB-MSCs o PL-MSCs en relación 1:1 (linfocitos T:MSCs). Los co-cultivos se realizaron permitiendo el contacto celular (barras negras). El porcentaje de la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> se determinó a los 3 días de cultivo. El porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> detectadas en linfocitos T activados en ausencia de MSCs fueron considerados como control (control, barras grises). Se muestra la media±SEM del porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ( $n=3$ , experimentos independientes para cada una de las fuentes y el control).



**Figura 14. BM-MSCs y UCB-MSCs inducen la generación de poblaciones de linfocitos T con fenotipo regulador.** Linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados con anti-CD3/CD28 se co-cultivaron en presencia de BM-MSCs, UCB-MSCs o PL-MSCs en relación 1:1 (linfocitos T:MSCs). Los co-cultivos se realizaron permitiendo el contacto celular (barras negras). El porcentaje de la población CTLA-4<sup>+</sup> y CTLA-4<sup>high</sup> y el incremento en veces de MFI de CTLA-4 se determinó sobre la región CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> después de 3 días de cultivo. El porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> detectadas en linfocitos T activados en ausencia de MSCs fueron considerados como control (control, barras grises). A) Gráficos de contorno representativos de un experimento. B) Se muestra la media±SEM del porcentaje de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>. C) Incremento en veces de MFI de CTLA-4<sup>+</sup> en la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>. D) Media±SEM del porcentaje de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>high</sup> (n=4, experimentos independientes para cada una de las fuentes y el control). \*Indica diferencia estadísticamente significativa con P< 0.05.

## DISCUSION

Las MSCs han demostrado tener capacidad de inmunosupresión y debido a ello actualmente las BM-MSCs se han empleado en el tratamiento de la enfermedad injerto contra hospedero, patología en la cual los linfocitos T son las principales células efectoras que atacan a los tejidos del paciente (Duffner et al., 2004). Si bien la BM es la principal fuente de MSCs, presenta algunos inconvenientes como la falta de donadores, la dificultad para obtenerlas y además el número de MSCs disminuye con la edad del individuo (Caplan, 2009). Nuestro grupo de investigación ha demostrado que MSCs provenientes de fuentes alternativas a la BM como UCB y PL presentan características morfológicas, inmunofenotípicas y capacidad de diferenciación similares a las BM-MSCs (Montesinos et al., 2009). El efecto inmunosupresor de las BM-MSCs ha sido reportado por varios autores (Di Nicola et al., 2002; Le Blanc et al., 2004; Meisel et al., 2004; Aggarwal y Pittenger, 2005; Rasmusson et al., 2005; Krampera et al., 2006; Selmani et al., 2008). Sin embargo, es poco conocido si las MSCs derivadas de UCB y PL comparten las propiedades inmunosupresoras de las BM-MSCs y así puedan ser consideradas como fuentes alternas en protocolos de aplicación clínica.

Algunos estudios con MSCs obtenidas de fuentes adultas (BM o tejido adiposo-TA-) y fuentes neonatales (UCB y PL) han comparado diferentes características de estas células como: morfología, proliferación, inmunofenotipo, capacidad de diferenciación y soporte hematopoyético. No se han reportado diferencias significativas en cuanto a la morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación condrogénica y osteogénica entre las MSCs derivadas de BM y PL (Kern et al., 2006; Montesinos et al., 2009). Sin embargo, se ha sugerido que UCB-MSCs no tienen capacidad de diferenciación adipogénica, pero en contraste posee mayor capacidad de proliferación que las BM- y TA-MSCs (Kern et al.,

2006). Además se ha visto, que las MSCs derivadas de BM y UCB tienen mayor capacidad de soporte hematopoyético que las TA-MSCs (Wagner et al., 2007). Este estudio es el primero que describe bajo las mismas condiciones de cultivo, la comparación entre las MSCs de BM, UCB y PL respecto a sus propiedades de inmunosupresión sobre una población enriquecida en linfocitos T CD3<sup>+</sup>.

Las MSCs de las tres fuentes cubrieron los criterios establecidos por la ISCT (Dominici et al., 2006) en relación a inmunofenotipo y capacidad de diferenciación osteogénica y condrogénica. Sin embargo, como demostramos previamente (Montesinos et al., 2009), las UCB-MSCs no presentaron capacidad adipogénica a diferencia de BM-MSCs y PL-MSCs, lo cual ha sido corroborado por otros grupos de trabajo (Wagner et al., 2005; Kern et al., 2006). Aunado a lo anterior, de manera cualitativa observamos, que PL-MSCs tiene menor capacidad adipogénica que BM-MSCs. Es interesante resaltar, que las MSCs de ambas fuentes neonatales no presentan la misma capacidad de diferenciación adipogénica que la observada en la fuente adulta, este aspecto puede estar relacionado al hecho de que en los adultos, se incrementa la formación de adipocitos en la BM y por tanto estas MSCs pueden tener mayor tendencia hacia este linaje, comparadas con la fuentes neonatales, las cuales pueden estar predispuestas a generar tejidos de soporte (hueso y cartílago) importantes para esta etapa del desarrollo. Esta hipótesis es apoyada por estudios previos que sugieren diferencias en la capacidad adipogénica entre MSCs de niños y adultos (Muraglia et al., 2000).

La mayoría de los estudios previos analizan la capacidad inmunosupresora de las BM-MSCs y otras fuentes alternativas como amnios, PL, gelatina de Wharton o cordón umbilical sobre CMSP activadas con aloantígenos o PHA (Krampera et al., 2006; Selmani et al., 2008; Ramasamy et al., 2008; Najjar et al., 2010; Manochantr et al., 2013), pocos trabajos analizan la inmunosupresión de las BM-MSCs sobre poblaciones enriquecidas de linfocitos T CD3<sup>+</sup>



(Le Blanc et al., 2004; Di Ianni et al., 2008; Kronsteiner et al., 2011; Luan et al., 2013), lo cual es importante en el contexto de la GVHD, porque los linfocitos T son las principales células efectoras en esta enfermedad (Duffner et al., 2004). Aunado a lo anterior, el efecto inmunosupresor de UCB-MSCs sobre esta población no se conoce aún. Para evaluar este aspecto, analizamos el efecto inmunosupresor de las MSCs provenientes de las tres fuentes sobre la proliferación de una población enriquecida en linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Observamos que las MSCs de BM, UCB y en menor grado PL-MSCs disminuyen la proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> activados con anti-CD3/CD28, únicamente cuando hay contacto directo entre las dos poblaciones celulares. Resultados similares fueron obtenidos con BM-MSCs de ratón (Xu et al., 2007). Además, varios trabajos han demostrado que la falta de contacto celular afecta la inmunosupresión ejercida por las MSCs, ya que la disminución de la proliferación de los linfocitos T activados es menos evidente (Di Nicola et al., 2003; Li et al., 2007; Selmani et al., 2008; Sheng et al., 2008; Wang et al., 2009; Giuliani et al., 2011; Tipnis et al., 2010).

A pesar de la importancia del contacto celular en la inmunosupresión ejercida por las MSCs poco se conoce sobre los mecanismos involucrados en este proceso. Al respecto se ha mostrado que la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-I y VCAM-I en las MSCs, disminuye la proliferación de esplenocitos activados con anti-CD3 (Ren et al., 2010). También se sabe que ambas moléculas tienen la capacidad de inducir la expresión de CTLA-4 en linfocitos T (Damle et al., 1994), la cual está involucrada en la inhibición de la proliferación de estas células (Jago et al., 2004). Además, el contacto entre las MSCs y los LT incrementa la expresión de moléculas inmunosupresoras como IL-10, HLA-G1 y HLA-G5 (Augello et al., 2005; Prevosto et al., 2007; Selmani et al., 2008; Giuliani et al., 2011), las cuales también afectan la proliferación de los linfocitos T. Se ha demostrado, que HLA-G1 se incrementa en las MSCs cultivadas con linfocitos T activados (Giuliani et al., 2011) y al parecer esta

molécula es la responsable de estimular la secreción inicial de IL-10, la cual estimula la secreción de HLA-G5 en las MSCs, a su vez, esta molécula mediante un mecanismo de retroalimentación positivo estimula la secreción de IL-10. Se ha demostrado que el incremento en la secreción de HLA-G5 es más evidente en co-cultivos con contacto celular entre las MSCs y los linfocitos T (Selmani et al., 2008).

Cuando analizamos si las poblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$  son igualmente afectadas por las MSCs de las tres fuentes, observamos que las BM-MSCs y UCB-MSCs son capaces de disminuir significativamente la proliferación de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , mientras que las PL-MSCs únicamente disminuyeron la proliferación de los Linfocitos T  $CD4^+$ . Estas observaciones concuerdan con trabajos previos que demuestran que las MSCs de BM y UCB tienen la misma capacidad inmunosupresora sobre células mononucleares de sangre periférica en MLR y ensayos de activación con PHA (Wang et al., 2009; Avanzini et al., 2009). Asimismo, Chang y cols (2006), empleando un modelo de CMSP activadas con aloantígenos, reportaron que PL-MSCs disminuyen de forma más eficiente la proliferación de linfocitos T  $CD4^+$  que la de linfocitos T  $CD8^+$ . Nuestros resultados demuestran por primera vez que bajo las mismas condiciones de cultivo las MSCs provenientes de BM y UCB tienen un mayor potencial de inmunosupresión sobre la población de linfocitos T  $CD3^+$  que aquellas provenientes de PL.

La inhibición de la proliferación de linfocitos T observada podría estar relacionada con la disminución en la expresión de CD25, CD69 y CTLA-4. Varios estudios han descrito el efecto de las MSCs provenientes de BM sobre la expresión de estas moléculas (Le Blanc et al., 2004; Groh et al., 2005; Krampera et al., 2006; Ramasamy et al., 2008). Sin embargo, se desconoce el efecto de UCB-MSCs y PL-MSCs. Nosotros encontramos que MSCs de las tres fuentes analizadas no modifican la expresión de CD25 y CD69 en linfocitos T  $CD3^+$

activados, lo cual concuerda con estudios previos con BM-MSCs (Krampera M et al., 2006; Ramasamy R et al., 2008).

Por otra parte, observamos que las MSCs de BM y UCB no modifican la expresión de CTLA-4 a las 24 horas, a diferencia de PL que la disminuye significativamente, respecto a BM y UCB-MSCs. Al respecto, se ha demostrado que BM-MSCs no modifica la expresión de CTLA-4 en poblaciones enriquecidas en linfocitos T CD4+ y CD8+ activados (Krampera et al., 2006), lo cual concuerda con nuestros resultados. La tendencia en la expresión de CTLA-4 observada a las 24 horas de cultivo con MSCs de las tres fuentes, se hizo significativa a los tres días de cultivo y este efecto únicamente se observó en condiciones de contacto entre las MSCs y los linfocitos T, donde observamos un incremento significativo en la expresión de CTLA-4 en linfocitos T activados en presencia de BM y UCB-MSCs, pero no en co-cultivos con PL-MSCs. Es importante mencionar que el incremento en la expresión de CTLA-4 concuerda con la mayor capacidad de ambas fuentes de disminuir la proliferación de linfocitos T, lo cual sugiere la participación de poblaciones de Treg CTLA-4+ en dicho proceso de inhibición.

Debido a que observamos disminución de la proliferación de linfocitos T únicamente en los co-cultivos con contacto, supusimos que PD-L1, una molécula involucrada en la inmunosupresión ejercida por las MSCs a través del contacto célula-célula (Sheng et al., 2008), podría incrementar su expresión en las MSCs. Nuestros resultados demuestran que las MSCs de las tres fuentes incrementan la expresión de PD-L1 en los co-cultivos con o sin contacto celular. Resultados similares fueron observados en BM-MSCs (Mourez et al., 2007; Sheng et al., 2008) y PL-MSCs (Chang et al., 2006). Sin embargo, este es el primer estudio que muestra el incremento en UCB-MSCs.

El IFN $\gamma$  puede actuar como una citocina inmunosupresora capaz de inhibir directamente la proliferación, inducir apoptosis en linfocitos T (Feng et al., 2008; Lu y Waller 2009), estimular la síntesis de moléculas inmunosupresoras como la IDO, PGE $_2$  y PD-L1 en MSCs (Meisel et al., 2004; Aggarwal et al., 2005; Sheng et al., 2008) y favorecer la capacidad inmunosupresora de las MSCs (Krampera et al., 2006; Ryan et al., 2007; Polchert et al., 2008). Por tal razón decidimos analizar la expresión de esta molécula en nuestros co-cultivos con y sin contacto celular. Detectamos incremento significativo de IFN $\gamma$  en el sobrenadante de los co-cultivos con contacto celular en presencia de las MSCs derivadas de las tres fuentes. Este resultado podría explicar el incremento en la expresión de PD-L1 en los co-cultivos con y sin contacto celular, pues se sabe que esta citocina, aún a bajas concentraciones, es capaz de estimular la expresión de esta molécula en las MSCs derivadas de BM (Mourez et al., 2007) y cordón umbilical (Mourez et al., 2007; Tipnis et al., 2010). En los co-cultivos con PL-MSCs, posiblemente el IFN $\gamma$  estimula la secreción de IDO (Chang et al., 2006; Jones et al., 2007). La cual es una enzima capaz de agotar el triptófano, lo que resulta en la inhibición de la proliferación de los linfocitos T CD4 $^+$  y CD8 $^+$ . No obstante se ha propuesto que estos últimos son más resistentes a este mecanismo de inmunosupresión que los CD4 $^+$  (Boasso et al., 2005) lo cual explicaría porque observamos disminución de la proliferación de linfocitos T CD4 $^+$ , pero no de CD8 $^+$  en los co-cultivos con PL-MSCs. Nuestros resultados contradicen reportes previos en donde la presencia de BM-MSCs no afecta o bien disminuye la secreción de IFN $\gamma$  por las linfocitos T activados (Sheng et al., 2008; Ramasamy et al., 2008, Chiesa et al., 2012); no obstante, recientemente se reportó que el efecto de las MSCs sobre la secreción de IFN $\gamma$  depende de la fuente de linfocitos T empleada. Así, se ha observado que la presencia de BM-

MSCs favorece la secreción de  $\text{IFN}\gamma$  por los LT  $\text{CD3}^+$  activados con anti- $\text{CD3}/\text{CD28}$  (Kronsteiner et al., 2011).

Todos estos resultados apoyan nuestras observaciones, en las cuales las MSCs al estar en contacto con los linfocitos T activados, incrementan la secreción de  $\text{IFN}\gamma$  y esto aparentemente se correlaciona con la menor proliferación de los linfocitos T. En este contexto, PD-L1 podría participar activamente por contacto celular, como se ha demostrado previamente en BM-MSCs y PL-MSCs (Sheng et al., 2008; Lu et al., 2009).

De igual manera, la disminución de la proliferación observada en los co-cultivos podría estar relacionada con la presencia de citocinas inmunosupresoras. Se ha demostrado que la activación de linfocitos T en presencia de BM-MSCs disminuye la secreción de citocinas pro-inflamatorias tipo Th1 ( $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$ ) e induce la secreción de citocinas anti-inflamatorias tipo Th2 (IL-4 e IL-10) (Aggarwal and Pittenger et al., 2005). Además,  $\text{IFN}\gamma$  junto con  $\text{TNF}\alpha$  incrementa la inmunosupresión de las MSCs al favorecer la secreción de moléculas inmunosupresoras como la  $\text{PGE}_2$  (Aggarwal and Pittenger et al., 2005., Krampera et al., 2006). Por ello, también analizamos la secreción de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-10 e IL-4. Los resultados demuestran que no hay un incremento significativo en la expresión de IL-4, lo que nos sugiere que no se genera una respuesta evidente tipo Th2 en presencia de las MSCs provenientes de las tres fuentes. Sin embargo, observamos disminución en la secreción de  $\text{TNF}\alpha$  en los co-cultivos con BM y UCB-MSCs, lo cual sugiere una disminución de la respuesta tipo Th1, como ha sido previamente demostrado (Aggarwal and Pittenger et al., 2005). Por otra parte, se presenta un incremento significativo de IL-10 en los co-cultivos con contacto de BM-MSCs y UCB-MSCs. Interesantemente no observamos cambios en el patrón de secreción de  $\text{TNF}\alpha$  e

IL-10 en los co-cultivos con PL-MSCs lo cual está relacionado con su menor potencial inmunosupresor.

Se ha observado que la IL-10 es importante en la inmunosupresión mediada por las BM-MSCs, además de estar involucrada en la generación de linfocitos Treg (Ryan et al., 2007; Selmani et al., 2008). Reportes previos han demostrado que la inhibición del contacto celular entre las BM-MSCs y linfocitos T afecta el incremento de la secreción de IL-10 (Aguello et al., 2005; Prevosto et al., 2007; Selmani et al., 2008). Así, en nuestro sistema, la inmunosupresión ejercida por las BM-MSCs y UCB-MSCs a través del contacto celular, pudiera llevarse a cabo mediante mecanismos similares; dado que ambas fuentes de MSCs estimulan la expresión de CTLA-4 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> e incrementan la concentración de IL-10 e IFN $\gamma$  en los sobrenadantes de los co-cultivos, de manera contraria esto no se observa en los co-cultivos con las PL-MSCs.

Las altas concentraciones de IFN $\gamma$  e IL-10 observadas en los sobrenadantes de los co-cultivos con BM-MSCs y UCB-MSCs, sugieren que en nuestro sistema probablemente se está generando una población de linfocitos Treg tipo Tr1, los cuales se caracterizan por la secreción de ambas citocinas. Esta idea es apoyada por estudios recientes, en los cuales, mediante un modelo *in vivo* de arteriosclerosis del trasplante (arterias obstruidas), se demostró que la administración local de BM-MSCs es capaz de prevenir esta patología, a través del incremento local de IFN $\gamma$  e IL-10 (Jui et al., 2012). Posteriormente, en estudios *in vitro* se observó que la presencia de BM-MSCs favorece la generación de linfocitos T<sub>R</sub>1 con el fenotipo IL-10<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (Hsu et al., 2013). La función inmunosupresora de ambas citocinas sería relevante en el proceso de resolución de la inflamación en enfermedades autoinmunes o trasplantes.

Por otra parte, se ha demostrado que el  $\text{IFN}\gamma$  estimula la secreción de  $\text{PGE}_2$  en las MSCs (Rasmusson et al., 2005; Aggarwal and Pittenger et al., 2005, Ryan et al., 2007; Avanzani et al., 2009). La  $\text{PGE}_2$  es un factor lipídico importante en la inmunosupresión mediada por las MSCs sobre linfocitos T: disminuye su proliferación, estimula la secreción de IL-4 e IL-10 y promueve la generación de linfocitos Treg adaptativos  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$  (Kalinski, 2012). Nosotros detectamos incremento de  $\text{PGE}_2$  en los co-cultivos con contacto de BM-MSCs y UCB-MSCs, debido probablemente a la presencia de  $\text{IFN}\gamma$ , como lo han sugerido estudios con BM-MSCs (Aggarwal y Pittenger et al., 2005; Ryan et al., 2007; Rasmusson et al., 2005). Sin embargo, no observamos incremento en la concentración de  $\text{PGE}_2$  en los co-cultivos con PL-MSCs, lo cual indica que el  $\text{IFN}\gamma$  no es la única molécula que induce la secreción de  $\text{PGE}_2$ . Así, probablemente  $\text{TGF}\beta$  y EGF pueden participar en dicha inducción, como se ha demostrado previamente en células de amnios (Kniss et al., 1993). Al momento no se ha publicado la participación de  $\text{PGE}_2$  en la inmunosupresión mediada por las PL-MSCs y nuestros resultados sugieren que la  $\text{PGE}_2$  podría participar en la inmunosupresión mediada por las MSCs de BM y UCB pero no en las de PL.

Debido a que encontramos altas concentraciones de  $\text{IFN}\gamma$ , IL-10 y  $\text{PGE}_2$  en los co-cultivos con contacto celular realizados en presencia de BM-MSCs y UCB-MSCs y dado que estas citocinas favorecen la generación de linfocitos Treg (Feng et al., 2008; Selmani et al., 2008; English et al., 2009), decidimos determinar la presencia de estas poblaciones en nuestros co-cultivos. No detectamos incremento en la generación de linfocitos T  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$  y  $\text{CD8}^+\text{CD25}^+\text{CTLA-4}^+$  en las tres fuentes analizadas, sin embargo observamos incremento significativo en las poblaciones de linfocitos T con inmunofenotipo de Treg ( $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CTLA-4}^+$ ) en co-cultivos con BM-MSCs y UCB-MSCs lo cual concuerda

con estudios previos (Maccario et al., 2005; Avanzini et al., 2009). Este es el primer estudio que analiza la capacidad de PL-MSCs para inducir la generación de Treg. Bajo nuestras condiciones estas células no tienen la capacidad de generar linfocitos T con inmunofenotipo de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> T, lo cual concuerda con su menor capacidad para disminuir la proliferación de linfocitos T observada en este estudio. Se ha propuesto que CTLA-4 es capaz de inducir la expresión de IDO en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, lo cual podría suceder en nuestro sistema, dado que este efecto depende de la presencia de INF $\gamma$  (Boasso et al., 2005), citocina que detectamos en cantidades incrementadas en los co-cultivos, en donde también se generan las poblaciones de linfocitos T que despliegan fenotipo regulador.

Aunque encontramos diferencias entre PL-MSCs y BM-MSCs, al parecer el potencial de inmunosupresión no está relacionado con la edad o etapa ontogénica, debido a que tal propiedad fue similar entre BM-MSCs y UCB-MSCs. Se ha demostrado que durante el senescencia se afectan principalmente tres aspectos de las MSCs: proliferación, capacidad de diferenciación y estabilidad del genoma (Wagner et al., 2009); lo cual puede influir en la calidad de las MSCs. Aunque se ha sugerido que la disminución en la capacidad de regeneración de tejidos durante el senescencia, puede deberse en parte al número de MSCs presentes en tales tejidos (Caplan, 2009; Raggi y Berardi et al., 2012). Así, se ha demostrado que un recién nacido posee una MSC por cada 10000 CMN de BM, mientras que en un adolescente la frecuencia de MSCs es diez veces menor. Asimismo, en la etapa adulta (30-50 años) se encuentra una MSC por cada 250-400 mil CMN. Debido a que observamos capacidad inmunosupresora similar entre las MSCs derivadas de BM y UCB, sugerimos que esta propiedad de las MSCs no es afectada por la etapa ontogénica.



Las células troncales obtenidas de diferentes fuentes, tienen propiedades similares a las BM-MSCs, tales como capacidad de formar colonias, inmunofenotipo y potencial de diferenciación. Sin embargo, aunque comparten algunas características, no son poblaciones iguales. La heterogeneidad observada en estas poblaciones puede reflejar diferencias en la función biológica del tejido del cual provienen. En este contexto, se sabe que al finalizar el embarazo la principal función de la placenta, en particular del amnios y el corion, es la producción de PGE<sub>2</sub>. Durante la labor de parto se incrementa la concentración de PGE<sub>2</sub> en el fluido amniótico, estimulando las contracciones del útero y la expulsión del producto (Challis et al., 2002). La producción de este mediador lipídico en la placenta es regulada por varios factores, entre ellos la IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y el cortisol (Peltier 2003). Es probable que estos mismos mecanismos estén involucrados en la estimulación de la secreción de PGE<sub>2</sub> en las PL-MSCs. Por ello, no observamos incremento en su secreción, lo cual repercute en su capacidad inmunosupresora. Debido a lo anterior, es importante considerar todas estas propiedades al momento de elegir una fuente apropiada de MSCs para emplearla en protocolos clínicos. Así como el contexto fisiológico en el cual se van a administrar.

En resumen, nuestro estudio evidencia que las PL-MSCs poseen menor potencial de inmunosupresión que BM-MSCs y UCB-MSCs. Sin embargo, el contacto entre las MSCs de las tres fuentes y los linfocitos T CD3<sup>+</sup> es esencial para el proceso de inmunosupresión. A diferencia de PL-MSCs, BM-MSCs y UCB-MSCs disminuyen la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, incrementan la expresión de IL-10, IFN $\gamma$  y PGE<sub>2</sub> e inducen la generación de linfocitos T con fenotipo regulador CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>. En conjunto, estos datos sugieren que BM-MSCs y UCB-MSCs tienen propiedades inmunosupresoras similares. Este es el primer estudio comparativo entre las propiedades inmunosupresoras de las tres fuentes de

MSCs sobre poblaciones enriquecidas en linfocitos T CD3<sup>+</sup> y sugiere que UCB-MSCs serían una mejor fuente alternativa a las BM-MSCs, para ser utilizadas en protocolos de terapia celular para tratamientos de enfermedades inmunológicas como GVHD, rechazo de injerto o enfermedades autoinmunes.

## CONCLUSIONES

- Las MSCs derivadas de BM y UCB presentan mayor potencial de inmunosupresión sobre una población enriquecida en linfocitos T CD3<sup>+</sup> que PL-MSCs. Sin embargo, para las tres fuentes el contacto entre las MSCs y los linfocitos T es esencial para el proceso de inmunosupresión.
- La mayor capacidad inmunosupresora observada en las BM-MSCs y UCB-MSCs sobre los LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, se acompaña del incremento en la expresión de IFN $\gamma$ , IL-10 y PGE<sub>2</sub> e inducción de la generación de linfocitos T con fenotipo regulador CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CTLA-4<sup>+</sup>.
- La presencia de MSCs derivadas de las tres fuentes inducen incremento en la expresión de IFN $\gamma$ , lo cual estimula la expresión de PD-L1 en las MSCs.

## PERSPECTIVAS

Las MSCs tienen propiedades inmunosupresoras sobre diferentes componentes del sistema inmune y emplean diversos mecanismos para llevarla a cabo. Sería interesante determinar, mediante el uso de anticuerpos, el grado de participación de PD-L1, CTLA-4, IL-10 y PGE<sub>2</sub> en la inmunosupresión observada en nuestro sistema, así como analizar, mediante ensayos funcionales en cultivo mixto de linfocitos, la capacidad inmunosupresora de las poblaciones de linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> encontrada en los co-cultivos. Aunado a lo anterior, también sería interesante comprobar si realmente se está generando una población de linfocitos T reguladores tipo Tr1, productores de IL-10 e IFN $\gamma$ , y determinar mediante ensayos funcionales su capacidad inmunosupresora.

Con nuestro trabajo establecimos algunas diferencias en las propiedades inmunosupresoras de las MSCs derivadas BM, UCB y PL sobre una población enriquecida en linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Nuestros datos contribuyen al conocimiento biológico de las MSCs obtenidas de estas tres fuentes. Esto es importante dado que su uso en algunos protocolos de terapia celular es ya una realidad. Determinar las diferencias en su biología, puede favorecer una mejor decisión para su uso. En este sentido, sería importante determinar si las diferencias observadas en la capacidad inmunosupresora entre las MSCs de BM, UCB y PL, se mantiene en un contexto de activación por aloantígenos en un cultivo mixto de linfocitos, así como analizar su efecto inmunosupresor sobre otras células del sistema inmune como células dendríticas y células NK. Aunado a lo anterior, también sería importante validar los hallazgos *in vitro* en un modelo murino de enfermedad injerto contra hospedero.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK y Lichtman AH. (2006). Activación de los linfocitos T. En: *Inmunología celular y molecular*. Abbas AK y Lichtman AH ed. Elsevier, España, pp 163-188.
- Aggarwal S y Pittenger MF. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815–1822.
- Araujo FS, Haddad R, Farias KC, Souza Ade P, Palma PV, Araujo AG, Orellana MD, Voltarelli JC, Covas DT, Zago MA, Panepucci RA. (2012). Mesenchymal stem cells promote the sustained expression of CD69 on activated T lymphocytes: roles of canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B signalling. *J Cell Mol Med* 16:1232-1244.
- Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 35:1482-1490.
- Avanzini MA, Bernardo ME, Cometa AM, Perotti C, Zaffaroni N, Novara F, Visai L, Moretta A, Del Fante C, Villa R, Ball LM, Fibbe WE, Maccario R, Locatelli F. (2009). Generation of mesenchymal stromal cells in the presence of platelet lysate: a phenotypic and functional comparison of umbilical cord blood- and bone marrow-derived progenitors. *Haematologica* 94:1649-1660.
- Challis JR, Sloboda DM, Alfaidy N, Lye SJ, Gibb W, Patel FA, Whittle WL, Newnham JP. (2002). Prostaglandins and mechanisms of preterm birth. *Reproduction* 124:1-17.
- Bacigalupo A, Valle M, Podestà M, Pitto A, Zocchi E, De Flora A, Pozzi S, Luchetti S, Frassoni F, Van Lint MT, Piaggio G. (2005). T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia. *Exp Hematol* 33:819-827.
- Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, van Tol MJ, Contoli B, Zwaginga JJ, Avanzini MA, Conforti A, Bertaina A, Giorgiani G, Jol-van der Zijde CM, Zecca M, Le Blanc K, Frassoni F, Egeler RM, Fibbe WE, Lankester AC, Locatelli F. (2013). Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 163:501-509.
- Battiwalla y Hematti MD. (2009). Mesenchymal Stem Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cytotherapy* 11: 503–515.
- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105:2214-2219.

- Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2:313-319.
- Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:41-52.
- Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Winkler C, GM Shearer. (2005). Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. *Blood* 105:1574-1581.
- Caplan AI. (2009). Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 217:318-324.
- Castro-Manreza M, Mayani H, Monroy-Garcia A, Flores-Figueroa E, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet V, Santiago-Osorio E, Montesinos JJ. (2014). Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: A comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells. *Stem Cells Dev* Jan 15. [Epub ahead of print].
- Chang CJ, Yen ML, Chen YC, Chien C, Huang HI, Bai CH, y Yen BL. (2006). Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. *Stem Cells* 24:2466-2477.
- Chang Dong LI, Wei Yuan Zhang, He Lian LI, Xiao Xia Jiang, Yi Zhang, Peih sien Tang, Ning Mao. (2005). Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation. *Cell Research* 15:539-547.
- Chiesa S, Morbelli S, Morando S, Massollo M, Marini C, Bertoni A, Frassoni F, Bartolomé ST, Sambuceti G, Traggiai E, Uccelli A. (2011). Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci* 108:17384-17389.
- Choumerianou DM, Martimianaki G, Stiakaki E, Kalmanti L, Kalmanti M, Dimitriou H. (2010). Comparative study of stemness characteristics of mesenchymal cells from bone marrow of children and adults. *Cytotherapy* 12:881-887.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107:367-372.
- Crawford L, Kurte M, Bravo-Alegría J, Contreras R, Nova-Lamperti E, Tejedor G, Noël D, Jorgensen C, Figueroa F, Djouad F, Carrión F. (2013). Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res Ther* 4:65.

- Damle NK, Klussman K, Leytze G, Myrdal S, Aruffo A, Ledbetter JA, Linsley PS. (1994). Costimulation of T lymphocytes with integrin ligands intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 induces functional expression of CTLA-4, a second receptor for B7. *J Immunol* 152:2686-2697.
- Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, Sportoletti P, Falzetti F, y Tabilio A. (2008). Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol* 36:309-318.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99:3838-3843.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317.
- Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, Reddy P, Ordemann R, Liu C, Ferrara JL, Teshima T. (2004). Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 172:7393-7398.
- English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. (2009). Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+ CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 156:149–160.
- Feng G, W Gao, Strom TB, Oukka M, Francis RS, Wood KJ, Bushell A. (2008). Exogenous IFN-gamma ex vivo shapes the alloreactive T-cell repertoire by inhibition of Th17 responses and generation of functional Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 38:2512-27.
- Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. (2009). Graft-versus-host disease. *Lancet* 2:1550-61.
- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2:83-92.
- Ghannam S, Pene J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H. (2010). Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol* 185:302–312.

- Giuliani M, Fleury M, Vernochet A, Ketrroussi F, Clay D, Azzarone B, Lataillade JJ, Durrbach A. (2011). Long-lasting inhibitory effects of fetal liver mesenchymal stem cells on T-lymphocyte proliferation. *PLoS One* 6:e19988.
- Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. (2001). Acute graft-vs-host disease: Pathobiology and management. *Exp Hematol* 29: 259-277.
- Groh ME, B Maitra, E Szekely and ON Koc. (2005). Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol* 33:928–934.
- Herzog EL, Chai L, Krause DS. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 15:3483-3493.
- Hsu WT, Lin CH, Chiang BL, Jui HY, Wu KK, Lee CM. (2013). Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10+IFN- $\gamma$ +CD4+ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. *J Immunol* 190:2372-2380.
- Introna M, Lucchini G, Dander E, Galimberti S, Rovelli A, Balduzzi A, Longoni D, Pavan F, Masciocchi F, Algarotti A, Micò C, Grassi A, Deola S, Cavattoni I, Gaipa G, Belotti D, Perseghin P, Parma M, Pogliani E, Golay J, Pedrini O, Capelli C, Cortelazzo S, D'Amico G, Biondi A, Rambaldi A, Biagi E. (2013). Treatment of Graft versus Host Disease with Mesenchymal Stromal Cells: a Phase I Study on 40 Adult and Pediatric Patients. *Biol Blood Marrow Transplant* Dec 6. [Epub ahead of print]
- Jago CB, Yates J, Câmara NO, Lechler RI, Lombardi G. (2004). Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clin Exp Immunol* 136:463-471.
- Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105:4120–4126.
- Jitschin R, Mougiakakos D, Von Bahr L, Völkl S, Moll G, Ringden O, Kiessling R, Linder S, Le Blanc K. (2013). Alterations in the cellular immune compartment of patients treated with third-party mesenchymal stromal cells following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells* 31:1715-1725.
- Jones BJ, Brooke G, Atkinson K, McTaggart SJ. (2007). Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells. *Placenta* 28:1174-1181.
- Jui HY, Lin CH, Hsu WT, Liu YR, Hsu RB, Chiang BL, Tseng WY, Chen MF, Wu KK, Lee CM. (2012). Autologous mesenchymal stem cells prevent transplant arteriosclerosis by enhancing local expression of interleukin-10, interferon- $\gamma$ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Cell Transplant* 21:971-984.



- Kalinski P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* 188:21-28.
- Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, Devetten M, Jansen J, Herzig R, Schuster M, Monroy R, Uberti J. (2009). Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 15:804-811.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24:1294-1301.
- Kniss DA, Zimmerman PD, Fertel RH, Iams JD. (1993). Transforming growth factor-beta potentiates epidermal growth factor-induced prostaglandin E2 production in amnion cells. *Prostaglandins* 45:27-33.
- Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:386-398.
- Kronsteiner B, Wolbank S, Peterbauer A, Hackl C, Redl H, van Griensven M, Gabriel C. (2011). Human mesenchymal stem cells from adipose tissue and amnion influence T-cells depending on stimulation method and presence of other immune cells. *Stem Cells Dev* 20:2115-2026.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci* 96:10711-10716.
- Kuzmina LA, Petinati NA, Parovichnikova EN, Lubimova LS, Gribanova EO, Gaponova TV, Shipounova IN, Zhironkina OA, Bigildeev AE, Svinareva DA, Drize NJ, Savchenko VG. (2012). Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. *Stem Cells Int* 2012:968213.
- Le Blanc K, Rasmusson I, Gotherstrom C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, Rosendahl K, Tammik C, Ringden O. (2004). Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 60:307-315.
- Le Blanc. (2003). Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 5:485-489.

- Lemoli RM, Bertolini F, Cancedda R, De Luca M, Del Santo A, Ferrari G, Ferrari S, Martino G, Mavilio F, Tura S. (2005). Stem cell plasticity: time for a reappraisal? *Haematologica* 90:360-381.
- Li CD, Zhang WY, Li HL, Jiang XX, Zhang Y, Tang PH, Mao N. (2005). Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation. *Cell Res* 15:539-547.
- Loise M. Francisco, Peter T. Sage, and Arlene H. Sharpe. (2010). The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity. *Immunol Rev* 236: 219–242.
- Lu Y y Waller EK. (2009). Dichotomous role of interferon-gamma in allogeneic bone marrow transplant. *Biol Blood Marrow Transplant* 15:1347-1353.
- Luan X, Li G, Wang G, Wang F, Lin Y. (2013). Human placenta-derived mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation and support the culture expansion of cord blood CD34<sup>+</sup> cells: a comparison with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* 45:32-38.
- Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 21:216-225.
- Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. (2005). Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4<sup>+</sup> T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 90:516-525.
- Manochantr S, U-pratya Y, Kheolamai P, Rojphisian S, Chayosumrit M, Tantrawatpan C, Supokawej A, Issaragrisil S. (2013). Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord. *Intern Med J* 43:430-439.
- Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenasemediated tryptophan degradation. *Blood* 103:4619–4621.
- Montesinos JJ y Castro ME. (2011). Células Troncales Mesenquimales. En: *Células Troncales y Medicina Regenerativa*. Pelayo R, Santana-Olalla J y Velasco I edt. Buena Onda, México, pp 119-138.
- Montesinos JJ, Flores-Figueroa E, Castillo-Medina S, Flores-Guzmán P, Hernández-Estévez E, Fajardo-Orduña G, Orozco S, Mayani H. (2009). Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy* 11:163-176.

- Mourez R, François M, Boivin MN, Stagg J, Galipeau J. (2007). Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J Immunol* 179:1549-1558.
- Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Isensee G, Lang P, Neunhoeffler F, Dominici M, Greil J, Handgretinger R (2008). Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 40:25-32.
- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113:1161-1166.
- Muroi K, Miyamura K, Ohashi K, Murata M, Eto T, Kobayashi N, Taniguchi S, Imamura M, Ando K, Kato S, Mori T, Teshima T, Mori M, Ozawa K. (2013). Unrelated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a phase I/II study. *Int J Hematol* 98:206-213.
- Najjar M, Raicevic G, Boufker HI, Fayyad KH, De BC, Meuleman N, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. (2010). Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol* 264:171-179.
- Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J, Yu Z, Li B, Xu C, Li Y, Wang J, Hu J, Lou X, Chen H. (2008). The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia* 22:593-599.
- Paul J. Martin. (2008). Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: Implications for a Future Therapeutic Approach *Keio J Med* 57: 177-183.
- Peltier MR. (2003). Immunology of term and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol* 2;1:122.
- Phinney DG, Prockop DJ. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 25:2896-2902.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, Genrich K, Mehrotra S, Setty S, Smith B, Bartholomew A. (2008). IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol* 38:1745-1755.

- Prabakar KR, Domínguez-Bendala J, Molano RD, Pileggi A, Villate S, Ricordi C, Inverardi L. (2012). Generation of glucose-responsive, insulin-producing cells from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2:1321-1339.
- Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, Talano JA, Jacobsohn D, Broadwater G, Monroy R, Kurtzberg J. (2011). Efficacy and Safety of Ex-vivo Cultured Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal(TM)) in Pediatric Patients with Severe Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease in a Compassionate Use study. *Biol Blood Marrow Transplant* 17:534-541.
- Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankarand SR, Vasandan AB. (2010). Pro-inflammatory cytokines, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* 5:e9016
- Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. (2007). Generation of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica* 92: 881-888.
- Prockop DJ, Oh JY. (2012). Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther* 20:14-20.
- Raggi C y Berardi AC. (2012). Mesenchymal stem cells, aging and regenerative medicine. *Muscles Ligaments Tendons J* 2:239-242.
- Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, Vidyadaran S, Dazzi F. (2008). The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol* 251:131–136.
- Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. (2005). Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 305:33–41.
- Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76: 1208-1213.
- Reddy P, Arora M, Guimond M, Mackall CL. (2009). GVHD: a continuing barrier to the safety of allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 15:162-168.
- Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, Roberts AI, Le AD, Shi S, Shao C, Shi Y. (2010). Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 184:2321-2328.

- Resnick IB, Barkats C, Shapira MY, Stepensky P, Bloom AI, Shimoni A, Mankuta D, Varda-Bloom N, Rheingold L, Yeshurun M, Bielorai B, Toren A, Zuckerman T, Nagler A, Or R. (2013). Treatment of severe steroid resistant acute GVHD with mesenchymal stromal cells (MSC). *Am J Blood Res* 19:225-238.
- Rezvani AR, Storb RF. (2008). Separation of graft-vs.-tumor effects from graft-vs.-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Autoimmun* 30:172-179.
- Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H, et al. (2006). Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Therapy-Resistant Graft-versus-Host Disease. *Transplantation* 81:1390–1397.
- Rossant J. (2001). Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells* 19:477-482.
- Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. (2007). Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 149:353–363.
- Salem HK, Thiemermann C. (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 28:585-96.
- Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. (2008). Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem Cells* 26:212–222.
- Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, Shen B, Yin S, Liu W, Cui L, Li N. (2008). A critical role of IFN $\gamma$  in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res* 18:846-857.
- Sioud M, Mobergslin A, Boudabous A, Fløisand Y. (2010). Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. *Scand J Immunol* 71:267-274.
- Snykers S, De Kock J, Rogiers V, Vanhaecke T. (2009). In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells*. 27:577-605.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. (2006). Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 24:74-85.
- Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. (2006). 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* 15:1484-1490.

- Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111:1327-1333.
- Sundin M, Ringdén O, Sundberg B, Nava S, Götherström C, Le Blanc K. (2007). No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica* 92:1208-1215.
- Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, Benito A, Ocio E, Sánchez-Guijo FM, Cañizo C, San Miguel JF. (2008). The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica* 93:1301-1309.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147
- Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS. (2010). Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunol Cell Biol* 88:795-806.
- Toubai T, Paczesny S, Shono Y, Tanaka J, Lowler KP, Malter CT, Kasai M, Imamura M. (2009). Mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther* 4:252-259.
- Von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A, Richter K, Wuschek N, Hölig K, Platzbecker U, Illmer T, Schaich M, Schetelig J, Kiani A, Ordemann R, Ehninger G, Schmitz M, Bornhäuser M. (2009). Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant* 43:245-251.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33:1402-1416.
- Wagner W, C Roderburg, F Wein, A Diehlmann, M Frankhauser, R Schubert, V Eckstein and AD Ho. (2007). Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 25:2638-2647.

- Wagner W, Bork S, Horn P, Kronic D, Walenda T, Diehlmann A, Benes V, Blake J, Huber FX, Eckstein V, Boukamp P, Ho AD. (2009). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One* 4:e5846.
- Wang M, Windgassen D, Papoutsakis ET. (2008). Comparative analysis of transcriptional profiling of CD3+, CD4+ and CD8+ T cells identifies novel immune response players in T-cell activation. *BMC Genomics* 9:225.
- Wang M, Yang Y, Yang D, Luo F, Liang W, Guo S, Xu J. (2009). The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Immunology* 126:220-232.
- Watt FM y Driskell RR. (2010). The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 12:155-163.
- Weissman IL. (2000). Stem cells: units of developmentdevelopment, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100:157-168.
- Wing K y Sakaguchi S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 11:7-13.
- Wing K, Yamaguchi T y Sakaguchi S. (2011). Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol* 32:428-433.
- Xu G, Zhang L, Ren G, Yuan Z, Zhang Y, Zhao RC, Shi. (2007). Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Res* 17:240-248.
- Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, Lee JE, Kim YJ, Yang SK, Jung HL, Sung KW, Kim CW, Koo HH. (2009). Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol* 259:150-156.

# células troncales

## y medicina regenerativa

Rosana Pelayo  
Jesús Santa-Olalla  
Iván Velasco



**Programa**  
**Universitario de**  
**Investigación en**  
**Salud**



GRUPO MEXICANO DE  
INVESTIGACIÓN EN  
CÉLULAS TRONCALES



# CELULAS TRONCALES Y MEDICINA REGENERATIVA

## EDITORES:

**Rosana Pelayo**

Investigadora  
Unidad de Investigación Médica  
en Enfermedades Oncológicas  
Instituto Mexicano del Seguro Social

**Jesús Santa-Olalla**

Investigador  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

**Iván Velasco**

Investigador  
Instituto de Fisiología Celular  
Universidad Nacional Autónoma de México



Primera edición 2011  
D.R. © 2011 Universidad Nacional Autónoma de México  
Ciudad Universitaria, México,  
Del. Coyoacán, 04510, D.F.

ISBN: 978-607-02-2568-0

Diseño de portada:  
D.G. Betzabel Bojalil  
Diseño y formación de interiores:  
D.G. Viktor Manuel Sánchez Virgen

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio  
sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.  
Impreso y hecho en México por Ediciones Buena Onda S.A. de C.V.  
Printed and made in Mexico.

Métodos para la detección de la proliferación celular y la neurogénesis en el cerebro humano .....	109
Zonas con actividad de neurogénesis en el cerebro adulto humano .....	110
Proliferación, migración y neurogénesis en la corriente migratoria rostral .....	111
Conclusiones .....	112
Agradecimientos .....	113
Referencias .....	114

## Capítulo V

Células troncales mesenquimales .....	119
---------------------------------------	-----

**Juan José Montesinos & Marta Elena Castro**

Resumen

Introducción

Biología de las células troncales mesenquimales .....	120
Plasticidad de las células troncales mesenquimales .....	123
Capacidad de soporte hematopoyético de las células troncales mesenquimales .....	127
Inmunorregulación por las células troncales mesenquimales .....	130
Células troncales mesenquimales y terapia celular .....	133
Soporte hematopoyético y enfermedad injerto contra hospedero ...	134
Enfermedades autoinmunes .....	135
Regeneración de tejidos .....	136
Conclusiones .....	137
Agradecimientos .....	138
Referencias .....	139

# In Vitro Evidence of the Presence of Mesenchymal Stromal Cells in Cervical Cancer and Their Role in Protecting Cancer Cells from Cytotoxic T Cell Activity

Juan J. Montesinos,<sup>1</sup> María de L. Mora-García,<sup>2</sup> Héctor Mayani,<sup>3</sup> Eugenia Flores-Figueroa,<sup>4</sup>  
Rosario García-Rocha,<sup>5</sup> Guadalupe R. Fajardo-Orduña,<sup>1</sup> Marta E. Castro-Manreza,<sup>1</sup>  
Benny Weiss-Steider,<sup>2</sup> and Alberto Monroy-García<sup>5</sup>

Mesenchymal stromal cells (MSCs) have been isolated from different tumors and it has been suggested that they support tumor growth through immunosuppression processes that favor tumor cell evasion from the immune system. To date, however, the presence of MSCs in cervical cancer (CeCa) and their possible role in tumor growth remains unknown. Herein we report on the presence of MSCs in cervical tissue, both in normal conditions (NCx-MSCs) and in CeCa (CeCa-MSCs), and described several biological properties of such cells. Our study showed similar patterns of cell surface antigen expression, but distinct differentiation potentials, when we compared both cervical MSC populations to MSCs from normal bone marrow (BM-MSCs, the gold standard). Interestingly, CeCa-MSCs were negative for the presence of human papilloma virus, indicating that these cells are not infected by such a viral agent. Also, interestingly, and in contrast to NCx-MSCs, CeCa-MSCs induced significant downregulation of surface HLA class I molecules (HLA-A\*0201) on CaSki cells and other CeCa cell lines. We further observed that CeCa-MSCs inhibited antigen-specific T cell recognition of CaSki cells by cytotoxic T lymphocytes (CTLs). HLA class I downregulation on CeCa cells correlated with the production of IL-10 in cell cocultures. Importantly, this cytokine strongly suppressed recognition of CeCa cells by CTLs. In summary, this study demonstrates the presence of MSCs in CeCa and suggests that tumor-derived MSCs may provide immune protection to tumor cells by inducing downregulation of HLA class I molecules. This mechanism may have important implications in tumor growth.

## Introduction

MESENCHYMAL STROMAL CELLS (MSCs) are a heterogeneous subset of stem cells that can be isolated from many adult tissues. They can differentiate into cells of the mesodermal lineage, such as adipocytes, osteocytes, and chondrocytes, as well as cells of other embryonic lineages [1]. MSCs can interact with cells of both the innate and adaptive immune systems and exert profound effects in immune responses, primarily through the production of immunosuppressive molecules, including prostaglandin E<sub>2</sub>, nitric oxide, indoleamine 2,3-dioxygenase, soluble (s) major histocompatibility complex (MHC), class I, G5 (sHLA-G5), transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ), and interleukin-10 (IL-10) [1,2], that affect several functions of immunocompetent cells, such as the lymphocyte cytotoxic activity [3].

Some studies suggest that MSCs contribute to the formation of tumor stroma and provide a permissive niche for tumor development through immunosuppression processes that favor evasion from the immune system [4,5]. Such processes have been implicated in several aspects of epithelial tumor biology, such as tumor growth, neoplastic progression, angiogenesis, and metastasis [6,7]. MSCs have been isolated from different tumor types such as ovarian carcinomas [8], giant cell tumors of bone [9], neuroblastomas [10], osteosarcomas [11], lipomas [12], and gastric cancer [13]; however, the presence of MSCs in cervical cancer (CeCa) and their possible role in such tumor growth have not been documented.

It has been shown that tumors have multiple mechanisms to evade the immune response. Among them, they possess the ability to block the maturation and function of antigen-

<sup>1</sup>Mesenchymal Stem Cells Laboratory, Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico.

<sup>2</sup>Immunobiology Laboratory, Cellular Differentiation and Cancer Unit, FES-Zaragoza, UNAM, Mexico City, Mexico.

<sup>3</sup>Hematopoietic Stem Cells Laboratory, Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico.

<sup>4</sup>Niche and Hematopoietic Microenvironment Laboratory, Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico.

<sup>5</sup>Immunology and Cancer Laboratory, Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico.

presenting cells (APCs) and cause alterations in T cell signal transduction and function [14]. In this context, the lack or suppression of MHC class I surface expression in cancer cells is accompanied by a reduction in the recognition and lysis of tumor cells by CD8<sup>+</sup> CTLs, which is further associated with disease progression [15]. Abnormalities in the surface expression of MHC class I molecules are common in CeCa cells and such abnormalities are often associated with defects in elements of the antigen-processing machinery and are usually influenced by the tumor environment [16,17]. Interestingly, MSCs have been shown to induce changes in the maturation and function of normal APCs, including reduced expression of MHC class I and II antigens and costimulatory molecules, resulting in APCs unable to support T cell response [18].

On the other hand, it is known that MSCs produce and secrete IL-10 [19], a pleiotropic cytokine that displays immunoregulatory effects and that is associated to MHC class I downregulation [20,21]. Indeed, in CeCa patients, a higher expression of IL-10 in cervical tissue has been correlated with a reduced immune response against tumors and with development of high-grade lesions [22,23].

Based on all of these notions, and in trying to contribute to our understanding of the role of MSCs in tumor biology, in the present study, we have looked for the presence of MSCs in the normal cervix (NCx) and in CeCa, and characterized them in terms of their immunophenotype and differentiation potentials. We have further assessed their capacity to modulate the expression of MHC class I molecules on cervical tumor cells. We have also determined the participation of IL-10 in such an expression, and the ability of MSCs to alter immune recognition by T cells. Throughout this study, we have compared cervix MSCs—both normal and neoplastic—with MSCs derived from normal bone marrow (BM), which are considered as the MSC gold standard.

## Materials and Methods

### *Isolation and culture of BM-derived MSCs*

BM cells, collected according to institutional guidelines, were obtained from five hematologically normal BM transplant donors. MSCs were obtained by a negative selection procedure (RosetteSep™ System; StemCell Technologies, Inc. [STI]) as previously described by our group [24]. Briefly, mononucleated cells were isolated from BM aspirates and were resuspended in low-glucose-DMEM (Lg-DMEM, [Gibco]) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL), and seeded at a density of  $0.2 \times 10^6$  cells per cm<sup>2</sup> into T25 cell culture flasks (Corning, Inc.). After 4 days, the nonadherent cells were removed and a fresh medium was added. When cultures reached 80% confluence, they were digested with trypsin-EDTA (0.05% Trypsin-0.53 mM EDTA; [Gibco]) and subcultured at a density of  $1 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> into T75 flasks (Corning). At the second passage, cells were harvested and analyzed.

### *Isolation and culture of NCx and CeCa-derived MSCs*

NCx samples were obtained from five normal subjects who had hysterectomy surgery. CeCa samples were obtained from biopsies from two patients in stage IIIB and

three patients in stage IIB. These procedures have been approved by the local ethics committee.

In the case of CeCa samples, biopsies were sent to the Pathology Department for routine diagnosis. Another part of the specimen biopsy was immediately frozen at  $-20^\circ\text{C}$  for human papilloma virus (HPV) typing and the remaining was intended to culture.

NCx and CeCa-derived MSCs were obtained by the enzymatic digestion procedure. Cervical biopsy was dissected into small pieces. The chopped tissues were digested with trypsin-EDTA and single-cell suspension was collected by flushing the tissue parts through a 100- $\mu\text{m}$  nylon filter and centrifuged to obtain the cell pellet. Total numbers of mononucleated and viable cells were determined, seeded, and manipulated as described for BM.

### *Cell surface antigen analysis of MSCs*

Flow cytometry analysis of cultured MSCs was performed as described previously [24]. Directly conjugated antibodies used included one or two of the following mAbs: anti-CD13-PE, anti-CD14-PE, anti-CD29-FITC, anti-CD31-FITC, anti-CD34-FITC, anti-CD44-PE, anti-CD45-FITC, anti-CD54-PE, anti-CD62L-FITC, anti-CD105-PE, and anti-HLA-DR-PE (all: Caltag Laboratories); anti-CD49b-PE, anti-CD58-PE, anti-CD73-PE, anti-CD166-PE, and anti-HLA-ABC-FITC (all: Beckton Dickinson/PharMingen), anti-CD90-FITC (Immuno-tech) and anti-CD133-PE (Miltenyi Biotec GmbH). Cells incubated with their corresponding isotype control (Caltag Laboratories) were also included. The labeled cells were analyzed on a Coulter Epics Altra Flow Cytometer (Beckman Coulter) by collecting a minimum of 10,000 events. The data were analyzed with CellQuest software (BD Biosciences).

### *MSCs differentiation*

Differentiation analysis of MSCs was performed as described previously [24]. To induce adipogenic differentiation, cells were incubated for 2 weeks in the adipogenic medium consisting of MesenCult™ (STI) supplemented with MSC adipogenic stimulatory supplements (STI), according to the manufacturer's instructions. Cell morphology was examined under a phase-contrast microscope to confirm the formation of neutral lipid vacuoles. The presence of neutral lipids was visualized by staining with Oil Red O (Sigma- Aldrich).

To induce osteogenic differentiation, a Stem Cell Kit™ (SCK; STI), consisting of MesenCult™ supplemented with 15% osteogenic stimulatory supplements,  $10^{-8}$  M dexamethasone, 0.2 mM ascorbic acid, and 10 mM  $\beta$ -glycerol phosphate, was used. Cells were incubated in the presence of SCK for 3 weeks and osteogenic differentiation was evaluated by detection of calcium deposition stained using the von Kossa technique.

For chondrogenic differentiation,  $2.5 \times 10^5$  cells were centrifuged at 150 g for 5 min to form a pelleted micromass in the bottom of the tube. This was incubated for up to 28 days with the chondrogenic induction medium (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.), consisting of the chondrogenic differentiation basal medium supplemented with SingleQuots of dexamethasone, ascorbate, insulin-transferrin-selenium (ITS)+ supplement, penicillin/streptavidin, sodium pyruvate, proline, and L-glutamine and 10 ng/mL TGF- $\beta$  (Cambrex) was

added. Every 3–4 days, the medium was changed; after 28 days, the micromass was fixed, embedded, microtome cut and stained with Alcian blue or Mason's trichromic dye (Sigma-Aldrich).

#### *HLA class I expression of CeCa cell lines*

Flow cytometry analysis to determine HLA class I expression on cell surface of cultured CaSki (HPV16<sup>+</sup>, HLA-A\*0201<sup>+</sup>), HeLa (HPV18<sup>+</sup>), and C33A (HPV<sup>-</sup>) human CeCa cell lines, was performed as described for MSCs. Monoclonal antibodies were obtained from hybridomas supernatants: PA2.1 (anti-HLA-A2, -A28) mAb was purchased from American Type Culture Collection and the W6/32 mAb, which recognizes a conformational epitope on the intact heavy chain/ $\beta$ 2microglobulin complex, was generously supplied by Dr. Gerd Moldenhauer of the German Cancer Research Center, Heilderberg, Germany. Cell samples were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson & Co.). After gating out cell debris, 10,000 events were analyzed for their fluorescence intensity. In all experiments, the fluorescence intensity was determined at least three times, where each of the 10,000 events were gated and showed as the mean fluorescence intensity (MFI)  $\pm$  SD. The staining with the FITC-labeled secondary antibody alone was considered as a negative control.

#### *HPV typing*

The MY09 and MY11 L1 consensus primers, which recognize a conserved region in the L1 open reading frame, producing a fragment of 450 bp and HPV16 E7-specific primers, which amplify a fragment of 100 bp [25], were used to examine the presence of HPV DNA in the genomic DNA of each  $\beta$ -actin (238 pb)-positive tumor samples and BM-, NCx-, and CeCa-derived MSCs. The positive control consisted of DNA from the CaSki line, which contains the HPV16<sup>+</sup>. The negative control consisted of DNA from the HeLa line, HPV18<sup>+</sup>.

The conditions of amplification were as follows: denaturing at 94°C for 15 s, primer annealing at 58°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min, for a total of 35 cycles, the final cycle included an incubation at 72°C for 10 min. Seven microliters of the amplification product was electrophoresed in 1.5% agarose containing 0.5  $\mu$ g/mL of ethidium bromide and visualized by UV light. The consensus primers used for L1 amplification were MY09: 5'cgctcmarrggawactgatc3' and MY11: 5'gcmcaggwcataayaatgg3', while oligonucleotide sequences used in the HPV16<sup>+</sup> type-specific PCR were sense 5'gatgaaatagatggtccagc3' and antisense 5'gctttgtacgcacaaccgaagc3' [25].

#### *MSC/CeCa cell line cocultures*

CeCa cell lines were cultured alone or cocultured for 24, 48, 72, and 96 h with BM-, NCx-, or CeCa-derived MSCs at different ratios 1:100, 1:10, and 1:1. In these experiments, cells were separated from MSCs by a transwell chamber (Millicell chamber). After coculture, CeCa cell lines were analyzed for HLA class I expression by using PA2.1 and W6/32 monoclonal antibodies.

#### *Conditioned media activity and IL-10 quantification and neutralization activity*

To analyze the activity of conditioned media from either MSC cultures or MSC/CaSki cocultures, CaSki cells were cultured in the presence of 40% of the corresponding conditioned media. After 96 h of cell culture, expression of the total HLA class I molecules and HLA-A2 alleles was determined by flow cytometry as previously described.

To quantify IL-10 contained in the conditioned media of MSCs and MSC/CaSki cell cocultures, we used a Human IL-10 ELISA Development Kit (Peprotech). The assay was performed according to the manufacturer's protocol.

To determine the effect of rhIL-10 on the expression of HLA class molecules, CeCa cells were cultured in the presence of 40% of the conditioned media (derived from either MSC cultures or MSC-CaSki cocultures) or increasing amounts of hrIL-10 (Peprotech), from 0.125 ng/mL to 4 ng/mL. To neutralize the biological activity of rhIL-10 or IL-10 contained in conditioned media of the MSCs and MSC/CaSki cell cocultures, the rabbit anti-human IL-10 neutralizing specific antibody (Peprotech) was added according to the Peprotech's protocol. After 96 h of culture, the expression of HLA class I molecules was determined on the cells by flow cytometry.

#### *In vitro induction of CTL response*

To stimulate CTLs, we used a method previously reported [26]. Briefly, PBLs derived from patients with CeCa and positives for HPV16 and for the HLA-A\*0201 allele, were incubated with the antigenic peptides TLGIVCPIC (86–94 sequence) and YMLDLQPETT (11–20 sequence) derived from the E7 HPV16 protein, which specifically binds to the HLA-A2 allele [27]. The cells were restimulated with the T2 cell line previously loaded with the peptides and in the presence of  $\beta$ 2-microglobulin plus rIL-2 and rIL-15. Cytotoxicity assays were performed on day 21 after purification of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by using the EasySep Negative Human CD8<sup>+</sup> kit (StemCell Tech).

#### *Cytotoxicity assays*

CaSki cells, previously cultured in the presence of rhIL-10 or cocultured with MSCs, in the presence or absence of the human IL-10 neutralizing specific antibody (1.8  $\mu$ g/mL) at different ratios (1:100, 1:50, and 1:25), were used as target cells after labeled with [<sup>51</sup>Cr] (Amersham). Different numbers of effector cells in 50  $\mu$ L of a complete medium were incubated, and then 10<sup>4</sup> [<sup>51</sup>Cr]-labeled target cells were added to triplicate wells of 96-well plates. After 4 h at 37°C, 100  $\mu$ L of the supernatant was harvested and transferred to counting vials and measured on a  $\gamma$ -counter (Cobra Becton Dickinson). For each pretreated cell group [<sup>51</sup>Cr], labeled cells incubated with 5% SDS or medium alone were used to determine maximum and spontaneous releases. Spontaneous release was usually less than 10% and never exceeded 15%. The percentage of specific lysis of each well was calculated as (experimental release–spontaneous release)/(maximal release–spontaneous release)  $\times$  100.

#### *Statistical analysis*

All numerical data were expressed as average of values obtained  $\pm$  SD of experiments made by triplicate. Comparisons

were evaluated by multivariate statistical analysis using Statistical software, version 9.0.0 (SPSS, Inc.). A *P*-value <0.05 was considered significant.

## Results

### *MSCs from BM, NCx, and CeCa showed similar patterns of cell surface antigen expression*

The presence of MSCs had not been demonstrated in NCx or in CeCa tissue. To test this, MSC cultures were established from NCx and CeCa samples and evaluated for expression of cell surface antigens described for BM-MSCs [28]. As expected, MSCs derived from all sources showed a null or dim expression of hematopoietic markers (i.e., CD14, CD34, and CD45), as well as CD133, CD62L, and CD31 (Table 1). In contrast, they all expressed the adhesion molecules CD29, CD44, CD49b, CD58, CD166, and several other cell surface molecules that have been previously reported for BM-MSCs (i.e., CD105, CD73, CD90, and CD13; Table 1) [28]. In addition, MSCs from these sources were positive for HLA-ABC (class I) and negative for HLA-DR (class II). Interestingly, major differences in the expression of certain antigens were observed. Indeed, 50% of BM-MSCs expressed CD49b, whereas in NCx- and CeCa-MSCs, the proportion was significantly higher (99% and 99%, respectively; Table 1). Furthermore, we observed a significantly higher expression of CD54 in NCx-MSCs (80%) and CeCa-MSCs (64%), as compared to BM-MSCs (25%).

### *Distinct differentiation potentials of MSCs from BM, NCx, and CeCa*

MSCs have the ability to differentiate into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes [28]. Adipogenic induction

was apparent in MSC preparations from BM by intracellular accumulation of lipid-rich vacuoles that stained with Oil Red O (Fig. 1A). In contrast, in NCx-MSCs and CeCa-MSCs, we did not observe cells with adipocytic morphology (Fig. 1B, C); only fibroblastoid cells with Oil Red O-positive spots in their cytoplasm were detected. Osteogenic differentiation was observed in all MSC samples, as determined by calcium deposition and defined by von Kossa staining (Fig. 1D–F).

Differentiation toward the chondrogenic lineage was assessed by formation of a matrix-rich, multilayered mass accompanied by accumulation of sulfated proteoglycans, as evidenced by Alcian blue staining (Fig. 1G–I). Interestingly, a distinct type of cartilage formation was observed in pelleted micromasses from NCx and CeCa compared to BM (Fig. 1J–O). Indeed, we observed that in pelleted micromasses from BM samples, cells grouped into small clusters located in the same area, a feature typical of hyaline cartilage [29]; (Fig. 1J, M). In contrast, pelleted micromasses from NCx and CeCa showed minimal matrix formation and predominance of fibrous collagen deposition (as indicated by blue color when using Mason's trichromic stain; Fig. 1K, L, N, O), which indicates the presence of fibrocartilage formation [30].

### *MSCs from cervix were negative for HPV infection*

MSCs derived from the three sources were analyzed to determine the presence of HPV virus by PCR. The CaSki cell line and CeCa tissue samples from patients, both positive for HPV16<sup>+</sup> infection, were used as positive controls and the HeLa cell line was used as a negative control. As shown in Fig. 1P and Q, there were no positive MSCs for HPV infection in contrast to the primary tumor sample from which MSCs were obtained.

### *CeCa-MSCs downregulate the expression of HLA-class I molecules on CeCa cells*

It has been clearly demonstrated that MSCs participate in the formation of tumor stroma and support the growth of neoplastic cells [31]; however, little is known about the way MSCs favor tumor growth. Our hypothesis was that since antigen presentation through HLA class I molecules on the cell membrane of tumor cells is essential for recognition by CTLs, MSCs may favor tumor growth by inducing alterations in the expression of HLA class I molecules on tumor cells.

To test this, we performed cocultures of CaSki cells with MSCs derived from BM, NCx, and CeCa, in transwell chambers and analyzed the effect of MSCs on the constitutive expression of HLA class I molecules on CaSki cells. We observed that, as the number of MSCs was increased in culture, HLA class I molecule expression on CaSki cells diminished in a ratio-dependent manner (Fig. 2A). After 96 h, the lowest expression was present at a 1:1 MSC:CaSki cells ratio (Fig. 2C) diminished by 65%, 30%, and 58% in the presence of BM-, NCx-, and CeCa-derived MSCs, respectively (Fig. 2A), while the HLA-A2 allele was decreased by 77%, 30%, and 62% under the same culture conditions (Fig. 2B). It is noteworthy that HLA class I antigen expression on CaSki cells gradually decreased throughout time (Fig. 2C, D). Interestingly, when the transwells containing MSCs were removed and the media culture was changed by a fresh one,

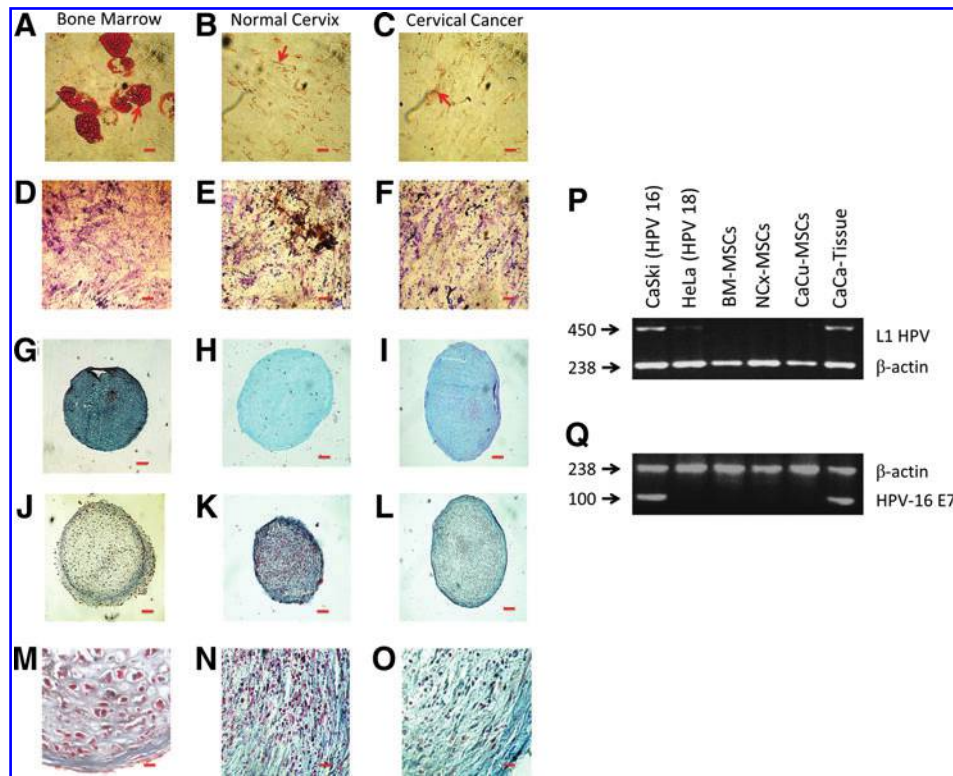
TABLE 1. ANTIGEN EXPRESSION PROFILES ON MSCs FROM BM, NCx, AND CeCa

Ag	BM	NCx	CeCa
CD105	89 ± 12	99 ± 0.2	97 ± 1
CD73	97 ± 3	99	98 ± 0.8
CD90	85 ± 14	99 ± 0.3	94 ± 5
CD13	98 ± 0.9	99	99 ± 0.1
HLA-ABC	94 ± 9	99 ± 0.4	97 ± 1
CD29	95 ± 7	99 ± 0.6	96 ± 1
CD44	89 ± 13	99 ± 0.5	99 ± 0.2
CD49b	50 ± 14	99 <sup>a</sup>	99 ± 0.1 <sup>a</sup>
CD58	75 ± 32	98 ± 1	87 ± 12
CD166	92 ± 11	99 ± 0.1	95 ± 6
CD14	2 ± 2	1 ± 0.5	3 ± 1
CD34	0.1 ± 0.2	4 ± 3	1 ± 0.6
CD45	0.5 ± 0.5	2 ± 0.5	1 ± 0.1
CD31	1 ± 0.7	1 ± 0.6	1 ± 0.1
CD133	1.4 ± 0.4	1.7 ± 1	0.8 ± 0.1
CD62L	0.3 ± 0.3	1 ± 0.2	1
HLA-DR	2 ± 3	1 ± 1	1 ± 0.1
CD54	25 ± 17	80 ± 16 <sup>a</sup>	64 ± 6 <sup>a</sup>

Expression of cell markers was determined by flow cytometry. Results represent mean ± SD and correspond to the proportion (%) of cells positive for each particular antigen.

<sup>a</sup>Significantly different (*P* < 0.05) from values shown for BM (BM, *n* = 5; NCx, *n* = 5; CeCa, *n* = 5).

MSCs, mesenchymal stromal cells; BM, bone marrow; NCx, normal cervix; CeCa, cervical cancer.



**FIG. 1.** Functional characterization of mesenchymal stromal cells (MSCs) from bone marrow (BM), normal cervix (NCx), and cervical cancer (CeCa). MSCs from the three sources (BM,  $n=5$ ; NCx,  $n=5$ ; CeCa,  $n=5$ ) were cultured in the adipogenic, osteogenic, and chondrogenic induction medium for 14, 21, and 28 days, respectively. Adipogenic differentiation was indicated by accumulation of neutral lipid vacuoles that stained with Oil Red O. Arrows indicate cytoplasmic granules positive to staining. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ , (A–C). Osteogenic differentiation was indicated by calcium deposition, which stained with von Kossa dye. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ , (D–F). Chondrogenic differentiation was indicated by the chondrogenic matrix colored by Alcian blue in cryosections from pelleted micromass. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ , (G–I). Chondrogenic differentiation was analyzed by morphology and collagen content in cryosections from pelleted micromass. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$  and 20  $\mu\text{m}$ , (J–L) and (M–O panels are inset from J–L), respectively. In samples from BM, the presence of small clusters of cells, surrounded by a condensed matrix located in the same area, is evident [hyaline cartilage; (J) and (M, inset from J)]. In samples from NCx and CeCa, numerous collagenous fibers, colored by Mason's trichromic dye (blue), are visible as large irregular bundles between groups of chondrocytes [fibrocartilage; (K), (L), (N, inset from K), and (O, inset from L)]. One representative experiment is showed. In (P, Q), detection and typing of HPV were performed by PCR assay. Amplification pattern shows a conserved region of 450 bp in the L1 HPV open reading frame obtained after amplification on CeCa tissue. No bands were detected in BM-, NCx-, and CeCa-derived MSCs (BM,  $n=5$ ; NCx,  $n=5$ ; CeCa,  $n=5$ ) (P). The CaSki cell line positive for HPV16<sup>+</sup> infection was used as a positive control and the HeLa cell line HPV18<sup>+</sup> was used as a negative control.  $\beta$ -actin (230 bp) was used as an internal control (Q). One representative experiment is showed.

after 96 h of cell coculture, CaSki cells recovered the basal expression of both total HLA class I molecules and the HLA-A2 allele (Fig. 2C, D, respectively). These results suggested that soluble factors, secreted into the culture media when MSCs were present, induced downregulation of HLA class I molecules on the tumor cell line, and this effect was strongly increased in the presence of CeCa-MSCs, although in all the cases, it was reversible after removal of MSCs.

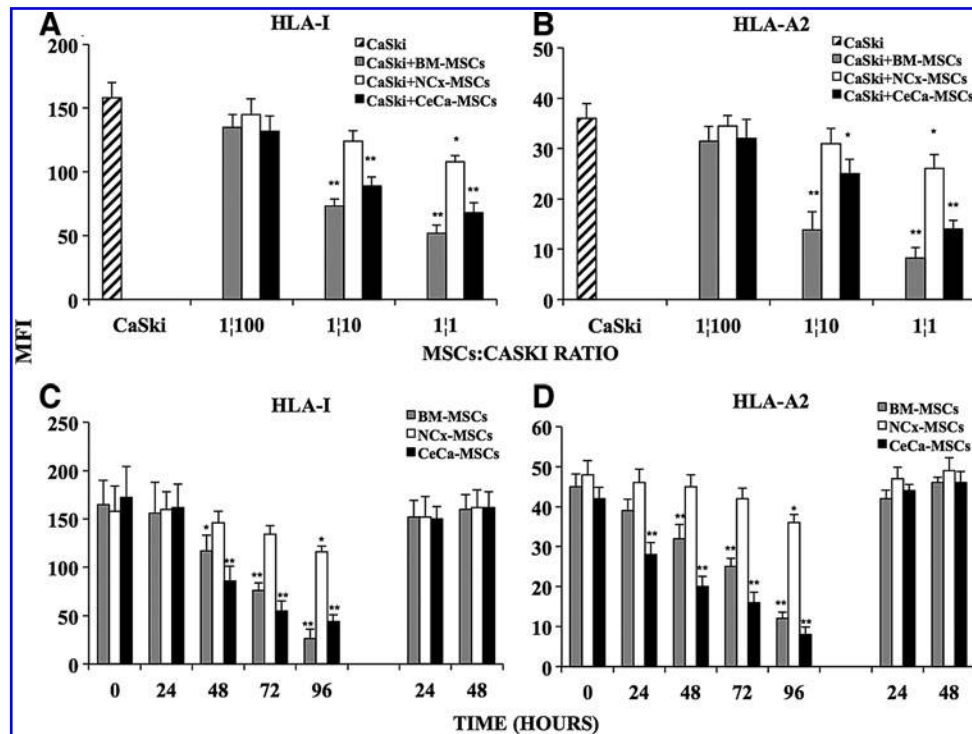
To determine if MSC cocultures have the same effect on different cell types, C33A and HeLa, CeCa cell lines were cocultured during 96 h with MSCs by using transwell chambers, and then the total expression of the HLA class I molecules was determined. Similar to the CaSki cell line, HLA class I downregulation on these different cell types was strongly favored in the presence of CeCa-MSCs and BM-MSCs, but not in the presence of NCx-MSCs (data not shown). These results indicate that downregulation of HLA-

class I molecules by CeCa-MSCs also occurs in different CeCa cell lines via soluble factors.

#### *IL-10 contained in conditioned media from CeCa-MSC/CaSki cell cocultures induced HLA class I downregulation on CeCa cells*

Conditioned media from cultures of BM-, NCx-, CeCa-derived MSCs, as well as from MSC/CaSki cell cocultures, were obtained and evaluated to determine the possible presence of soluble cytokines capable of inducing downregulation of HLA class I on tumor cells. Some authors have reported the capacity of IL-10 to induce HLA class I downregulation on tumor cells [32,33]. To determine the presence of IL-10 in the conditioned media from the different culture conditions, we evaluated the presence of IL-10 by ELISA. In conditioned media from BM-MSC/CaSki and CeCa-MSC/





**FIG. 2.** CeCa- and BM-derived MSCs strongly diminished the expression of HLA class I molecules on CeCa cells. BM-, NCx-, and CeCa-derived MSCs (BM,  $n=5$ ; NCx,  $n=5$ ; CeCa,  $n=5$ ) were seeded into the upper wells in transwell chambers and cocultured at different ratios 1:100, 1:10, and 1:1 with CaSki cells added to the bottom wells. After 96 h, the expression of total HLA class I molecules (**A**) or HLA-A2 allele (**B**) was determined by flow cytometry on CaSki cells cultured alone (▨) or cocultured with MSCs as indicated in Materials and Methods. The expression of total HLA class I molecules (**C**) and HLA-A2 allele (**D**) on CaSki cells was also monitored after 24, 48, 72, and 96 h of coculture with MSCs (at ratio 1:1). Thereafter, the transwell chamber containing MSCs was removed and the medium of the CaSki cells was changed for a fresh one. Expression of HLA molecules on CaSki cells was determined after 24 and 48 h of cell culture. The mean fluorescence intensity (MFI)  $\pm$  SD from 10,000 events is depicted in each cell treatment. \*Indicates significant differences ( $P < 0.05\%$ ) and \*\* ( $P < 0.005\%$ ) in comparison to CaSki cells cultured alone. The data are representative of three independent experiments.

CaSki cocultures, we detected higher IL-10 concentrations ( $>1.2$  ng/mL), as compared to those from CaSki (0.32 ng/mL), BM-MSCs (0.4 ng/mL), NCx-MSCs (0.25 ng/mL), and CeCa-MSCs (0.6 ng/mL) and also NCx-MSCs/CaSki (0.62 ng/mL). Indeed, we detected the highest level of IL-10 in the conditioned media from CeCa-MSC/CaSki cocultures (Fig. 3A).

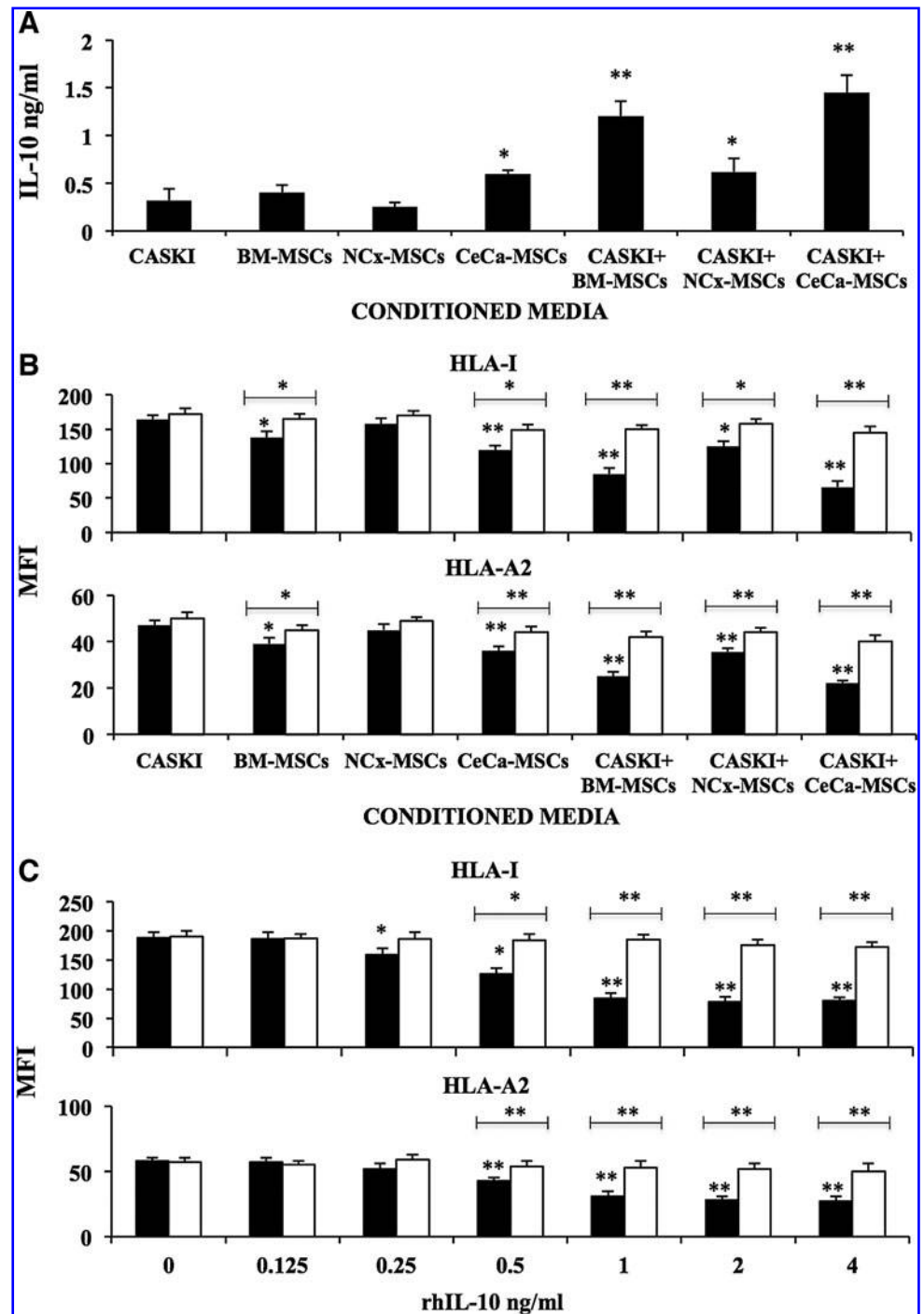
To determine in a more precise manner, the possible participation of IL-10 in HLA downregulation, a specific neutralizing anti-IL-10 antibody was added to CaSki cell cultures established in the presence of 40% conditioned media from MSCs and MSC/CaSki cocultures. As shown in Fig. 3B, the addition of anti-IL-10 significantly reestablished the expression of HLA class I and HLA-A2 on CaSki cells. On the other hand, total HLA class I as well as HLA-A2 downregulation was also observed when CaSki cells were cultured in the presence of increasing amounts of rhIL-10 (0.125–4 ng/mL), and in the same manner, the addition of anti-IL-10 significantly reestablished the expression of HLA molecules on CaSki cells (Fig. 3C). These data indicated that when interacting in coculture, CeCa tumor cells and/or MSCs—particularly those from CeCa or normal BM—increased their capacity to secrete IL-10, and that this cytokine is one of the responsible ones in inducing HLA downregulation on CeCa cells.

#### *CeCa-MSCs favor protection of CeCa cells from cytotoxic T cell activity via IL-10*

To analyze whether the reduced expression of HLA class I molecules on CaSki cells—induced by MSCs in the cell coculture system—affect their recognition by immune cells, T lymphocytes derived from HPV16<sup>+</sup> CeCa patients, positive for the HLA-A2 allele, were stimulated with antigenic peptides that specifically bind to the HLA-A\*0201 allele [27,34], and then challenged against CaSki cells, previously cultured in the presence of rhIL-10 or cocultured with MSCs, in the presence or absence of the human IL-10 neutralizing specific antibody. In all the experiments, T lymphocytes stimulated with E7 epitopes were always capable to lyse the T2 cell line loaded with the proper antigenic peptide and no reactivity on CaSki cells was observed when T lymphocytes were previously stimulated with an irrelevant peptide GILGFVFTL derived from the protein matrix of the influenza-A (data not shown).

As expected, after T cell stimulation, we observed that T lymphocytes were able to lyse CaSki cells in a dose-dependent manner (Fig. 4A). However, when T stimulated lymphocytes were challenged with CaSki cells previously cocultured with CeCa-MSCs and BM-MSCs at a 1:1 ratio, the cytotoxic activity was strongly decreased by 65%–75% in

**FIG. 3.** IL-10 produced in the MSC/CaSki cell cocultures diminished the expression of HLA class I molecules on CeCa cells. **(A)** ELISA assay was performed to determine the content of IL-10 in conditioned media derived either from MSCs cultured alone or MSC/CaSki cell cocultures at a 1:1 ratio (BM,  $n=5$ ; NCx,  $n=5$ ; CeCa,  $n=5$ ). **(B)** CaSki cells were cultured in the presence of 40% (■) of the conditioned media derived from either MSC cultures or MSC/CaSki cocultures at a 1:1; or with 40% of these conditioned media plus 1.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of rabbit anti-human IL-10 neutralizing specific antibody (□). **(C)** CaSki cells were also cultured in the presence of increasing amounts of hrIL-10 from 0.125 ng/mL to 4 ng/mL (■), or with these amounts of hrIL-10 plus 1.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of rabbit anti-human IL-10 neutralizing specific antibody (□). After 96 h, the total HLA class I molecules (HLA-I) and HLA-A2 allele expression on CaSki cells was determined by flow cytometry **(B, C)**. The mean fluorescence intensity (MFI)  $\pm$  SD from 10,000 events is depicted in each cell treatment. Significant differences,  $(P < 0.05)$  and  $(P < 0.005)$  were obtained in comparison to CaSki cells treated with their own conditioned media. The data are representative of three independent experiments.

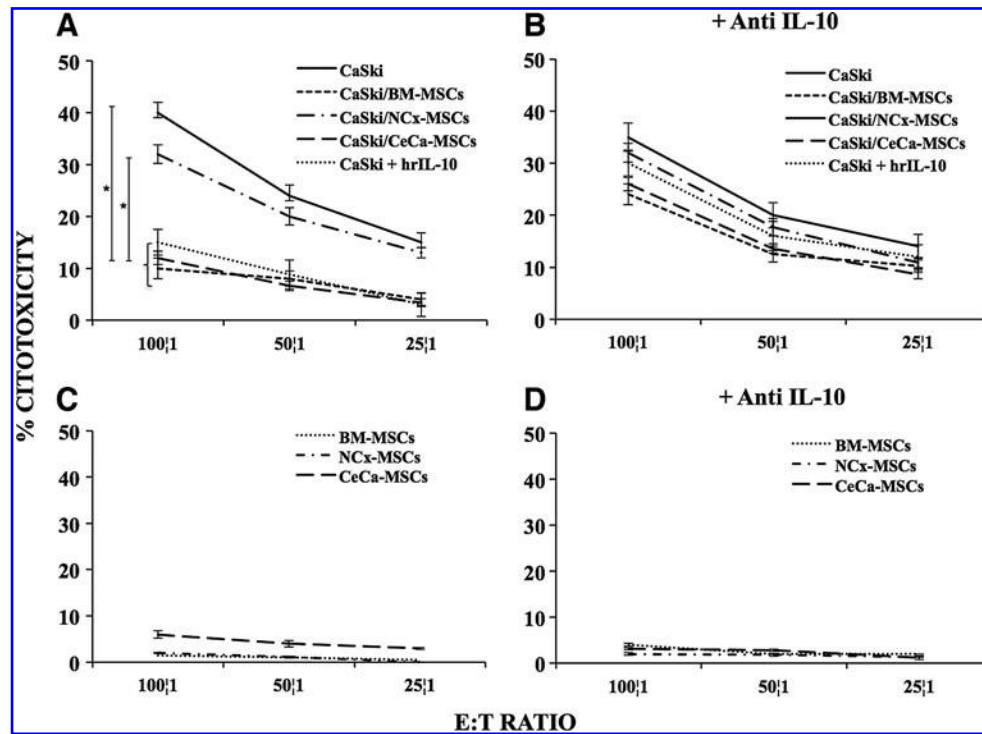


relation to that observed on CaSki cells or CaSki cells previously cocultured with NCx-MSCs (Fig. 4A). The cytotoxic activity of T stimulated lymphocytes was also decreased by 60% on CaSki cells, previously cultured in the presence of rhIL-10 (1 ng/mL; Fig. 4A). In contrast, when T lymphocytes were challenged with CaSki cells previously cocultured with BM-MSCs, CeCa-MSCs, or pretreated with hrIL-10 in the presence of neutralizing anti-IL-10 antibodies, the immune recognition of tumor cells was reestablished (Fig. 4B). On the other hand, T lymphocytes showed no cytotoxic activity on the three types of MSCs in the absence or presence of neutralizing anti-IL-10 antibodies (Fig. 4C, D). These results

support the notion that MSCs have a negative effect on the immune recognition of tumor cells by T cells by down-regulating expression of HLA class I molecules and that IL-10 plays a key role in this process.

## Discussion

MSCs have been shown to possess an immunosuppressive activity [35] and contribute to create a specific tumor microenvironment that promotes tumor survival through immunosuppression conditions that favor the evasion of tumor from the immune system [4,5]. Previous reports have shown



**FIG. 4.** IL-10 produced in the MSC/CaSki cell cocultures diminishes the recognition of CeCa cells by CTLs. CaSki cells were cultured in transwell chambers alone or in the presence of 1 ng/mL of hrIL-10, as well as with BM-, NCx-, or CeCa-MSCs at a ratio of 1:1 (BM,  $n=5$ ; NCx,  $n=5$ ; CeCa,  $n=5$ ), in the absence (A) or presence of neutralizing anti-IL-10 antibody (B). After 96 h, CaSki cells were harvested and challenged against CTLs ( $CD8^+$  T lymphocytes) specific for peptides TLGIVCPIC and YMLDLQPETT derived from the E7 HPV16<sup>+</sup> protein, which is expressed in CaSki cells by HLA-A2. CTL cytolytic activity was tested by a standard 4 h [<sup>51</sup>Cr] release assay at different ratios 100:1, 50:1, and 25:1 effector:target cells (E:T). The CTL cytolytic activity was also performed on BM-, NCx-, or CeCa-MSCs obtained from the cell cocultures with CaSki either in the absence (C) or presence (D) of neutralizing anti-IL-10. \*Indicates significant differences ( $P < 0.05\%$ ) in comparison to CaSki cells cultured alone. The data are representative of three independent experiments and shown as mean values  $\pm$  SD.

the isolation of MSCs from several tumors [8–13]; however, the presence of MSCs has not been demonstrated in NCx or in CeCa tissue. Following this, and taking into consideration the immunosuppressive properties of MSCs [35], we reasoned that the presence of these cells in cervical tumors may represent an important immunoselective advantage for tumor cells to evade the immune recognition.

To test this notion, in the present study, we evaluated the presence of MSCs in NCx and CeCa and analyzed their in vitro capacity to modulate the immune recognition of tumor cells by T cells. We characterized, in a comparative manner, MSCs from the cervix with those from BM in terms of their immunophenotype and differentiation potential. The present study is, to our knowledge, the first study describing the presence of MSCs in the cervix.

As a first approach, we determined the characteristics of BM-, NCx-, and CeCa-derived MSCs, according to the minimal criteria proposed by the ISCT [28]. It is important to indicate that throughout this study, MSCs were used at the second passage, to avoid cellular heterogeneity in primary cultures. In terms of the immunophenotype, the major antigens described for BM-MSCs, such as CD73, CD105, and CD90 [24,36,37], were also expressed on NCx- and CeCa-derived MSCs. CD13 expression was high and homogeneous in all samples from the three sources, as we previously reported for cord blood- and placenta-derived MSCs [24]; thus,

CD13 could represent a specific marker for MSCs from several sources, including the cervix. Expression of CD49b and CD54 was much higher in NCx and CeCa than in BM and these results may reflect that MSCs derived from the cervical tissue are a subpopulation of MSCs—as discussed by others [38]—since they share many MSC properties, but differ in their adipogenic differentiation potential and in the expression of some adhesion molecules. It is also noteworthy that the higher expression of integrins in cervical MSCs may be of importance in homing to cervical tissue [39].

In terms of differentiation potential, our results show that, in contrast to those derived from BM, NCx- and CeCa-derived MSCs were not able to differentiate toward the adipogenic lineage; similar results were reported by our own group for cord blood-derived MSCs [24]. A loss of adipogenic differentiation capacity might be caused by tumor cells through attenuation of TP53 expression that promotes osteoblast differentiation [40], thus possibly inhibiting differentiation into adipocytes. MSCs from all three sources showed osteogenic and chondrogenic potential, which demonstrates the multipotentiality of MSCs derived from NCx and CeCa; however, as in BM, these results may suggest that cultures of MSCs could represent an admixture of morphologically, phenotypically, and functionally different cells, as some authors have proposed [41,42]. Interestingly, fibrocartilage was observed in assays from NCx and CeCa, whereas hyaline

cartilage was predominant in pelleted micromass from BM, which suggests distinct functional capacities between MSCs from NCx and CeCa compared with BM. Together, these results shown some differences in functional capacities of MSCs from three sources, however, studies on gene expression are necessary for a better description of them. Finally, we determined that MSCs derived from NCx and CeCa were negative for HPV infection; thus, HPV does not seem to directly affect the biologic properties of MSCs from the cervix.

We have previously shown the presence of immunologic mechanisms that favor evasion of tumor cells from the cytotoxic activity by CTLs in CeCa, in which, HLA class I expression is involved [26]; in this context, it is possible that those MSCs we detected in CeCa tumor samples participate in such a mechanism. To test this, we analyzed the effect of MSCs on the expression of HLA class I molecules on CeCa cell lines. We observed that in the absence of cell-cell contact, BM- and CeCa-, but not NCx-derived MSCs induced a strong decrease in HLA class I and HLA-A2 expression on different CeCa cell lines, which was dependent on the ratio and time of coculture. This effect was clearly dependent on the presence of MSCs in the coculture, since after MSC removal, CeCa cells recovered their HLA class I and HLA-A2 basal expression in the first 24h, suggesting that soluble factors produced in MSC/CeCa cell cocultures were responsible for this effect. This observation was corroborated when conditioned media obtained from these cocultures produced a significant diminution in HLA class I and HLA-A2 expression on CaSki cells.

The decrease observed in the expression of HLA antigens on CaSki cells may be due to the production of immunosuppressive molecules by MSCs. Indeed, a cytokine-mediated cross talk between MSCs and cancer cells has also been reported [1]. Furthermore, it has been reported that molecules produced by MSCs induce reduced expression of MHC class I on APCs, resulting in APCs unable to support T cell response and pushing APCs away from a proinflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-12) phenotype toward an anti-inflammatory (IL-10 production) phenotype [18,19,43]. In this context, it is known that IL-10 is a pleiotropic cytokine produced by cancer cells [44] and MSCs [19] and that downregulates HLA class I expression and protects tumor cells from allo-specific CTLs [20].

Taking into consideration that IL-10 could influence the decrease of HLA class I expression on CaSki cells cocultured with MSCs, we determined the presence of this cytokine in conditioned media derived from MSC/CaSki cocultures and evaluated the effect of rhIL-10 on such antigen expression. We found that, as compared with the levels observed in conditioned media from cultures of CaSki cells, IL-10 was increased 3.7-fold in conditioned media from CaSki cells cocultured with BM-MSCs, 1.9-fold in those cocultured with NCx-MSCs, and 4.5-fold in those cocultured with CeCa-MSCs. Such IL-10 levels may simply be the sum of the individual production of IL-10 by MSCs and tumor cells in cocultures with NCx-MSCs, but in those with BM-MSCs or CeCa-MSCs, where the IL-10 production was higher than the proper sum of the individual cell types, these differences could be the result of the cross talk between CaSki and MSCs during cell coculture through transwell plates, as recently was reported by Liu and cols. [45], who found that rat-derived BM-MSCs increased the IL-10 intracellular expres-

sion after transwell cell coculture with dendritic cells, suggesting MSC activation in such cell cocultures. In this regard and in trying to determine which is the source of the IL-10 in our cocultures, we have observed, in preliminary assays, that BM-MSCs and CeCa-MSCs in coculture with CaSki cells increased the IL-10 intracellular expression in comparison with their respective monocultures, however, it is possible also that CaSki cells increase IL-10 expression; these two aspects are under investigation. We cannot exclude the possibility that the increase in IL-10 secretion observed in CeCa-MSC-conditioned media compared with that of NCx-MSCs, could be due to an increase in the number of tumor-associated fibroblasts (TAFs) in tumor, since it has been reported that TAFs secrete cytokines with direct immunosuppressive effects such as IL-10 [38].

On the other hand, conditioned media from BM- and CeCa-derived MSCs and rhIL-10 decreased the HLA class I expression on CaSki cells, suggesting an important participation of this cytokine in such a decrease. Addition of anti-IL-10 neutralizing antibodies to the cocultures or cultures in the presence of rhIL-10, significantly inhibited the effect of IL-10 in HLA-I and HLA-A2 expression on CaSki cells. However, other factors different than IL-10 and also produced in these cocultures, could contribute to downregulate the HLA class I expression on CaSki cells and gene expression profiling of the three different MSC populations, might also be helpful in this respect.

Since loss or downregulation of HLA class I molecules seems to be an important mechanism of cancer cells to evade immune recognition by CTLs [16], we analyzed if CaSki cells previously cocultured with MSCs or rhIL-10 fail to be recognized by CTLs. We found that CaSki cells previously cocultured with BM-MSCs, CeCa-MSCs, and rhIL-10 were weakly recognized by peptide-specific CTLs; addition of neutralizing anti-IL-10 Ab in such previous cultures strongly recovered the recognition of CaSki cells by CTLs. No changes in the cytotoxicity percentage was observed in CaSki cells when they were cocultured with NCx-MSCs, which suggests distinct functional capacities between MSCs from NCx compared with BM and CeCa, which may be related with the lowest concentration of IL-10 we detected in the conditioned media of the former. Taken together, these results indicate that IL-10 plays an important role in the downregulation of HLA class I molecules on tumor cells by MSCs, and that this seems to be a key mechanism through which, MSCs protect to cancer cervical cells of cellular immune response by CTLs.

In fact, in CeCa patients, higher expression of IL-10 in cervical tissue correlates with higher grade lesions [46], thus, the presence of MSCs in the tumor microenvironment may strongly contribute to increase the production of IL-10, and so, to downmodulate HLA class I expression on tumor cells. In this regard, the effects of IL-10 on the expression of molecules associated with the antigen processing machinery are also being analyzed and also if BM-MSCs and CeCa-MSCs are capable of MHC class I downregulation on non-CeCa cells.

On the other hand, it is known that a complete loss of human HLA class I molecules on tumor cells results in evasion to cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis, but eventually, tumor cells may result susceptible to natural killer (NK) cell-mediated killing, since NK cells are an important arm of the innate immune system directly involved

in the spontaneous recognition and lysis of virus-infected and tumor cells [47]. However, other associated mechanisms can also contribute to an impaired innate, as well as adaptive, antitumor immune response. For example, IL-10 can contribute by increasing HLA-G expression on HLA class I-deficient cells to escape from NK-mediated lysis through interactions with killer inhibitory receptors on NK cells [48,49]. In CeCa lesions, the expression of both HLA-G and IL-10 associated with HPV infection might play an important role in CeCa progression [50,51]. In fact, it has been recently reported that in tissue samples from biopsies derived from patients with CeCa and with loss or downregulation of HLA class I expression, most of the HLA-G-positive cases (87.5%) exhibited upregulation of the IL-10 [52]. According to our results, CeCa-MSCs can contribute to impairing the antitumor immune response by downregulating HLA class I expression on CeCa cells through IL-10 secretion, however, further studies are necessary to resolve whether HLA-G expression is also induced in CeCa cells in our experimental model.

In summary, we have demonstrated the presence of MSCs in NCx and CeCa. Some differences were observed in terms of their differentiation capacity, as compared to their normal marrow counterpart, but immunophenotype analysis showed great similarities. Our results suggest that the presence of MSCs in CeCa tumors could contribute to generate an immunoselective event that provides advantage for tumor cells to escape host immune surveillance and nullify adoptive cancer immunotherapy, and in this manner, MSCs may play a crucial role in supporting tumor cell growth. Further studies are warranted to elucidate if MSCs participate in some other biologic mechanisms involved in the evasion of immune response by tumor cells.

### Acknowledgments

We thankfully acknowledge the excellent technical assistance of Teresa Apresa García, Ernesto Javier Rivera Rosales, Juan de Dios Moreno Alvarez, and Héctor Sánchez Peña. We are indebted for CONACYT support to A.M.G. (grant no. 106591) and J.J.M.M. (grant no. 87183); DGAPA-PAPIIT support to MLMG (grant no IN223010, IN217013); and Mexican Institute of Social Security, IMSS, support to A.M.G. (grants no. 762, 800, and 1014) and J.J.M.M. (grant no. 062) are gratefully acknowledged.

### Author Disclosure Statement

The authors declare that they have no competing or financial interests.

### References

- Uccelli A, L Moretta and V Pistoia. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 726–736.
- Spaggiari GM, A Capobianco, H Abdelrazik, F Becchetti, MC Mingari and L Moretta. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111:1327–1333.
- Rasmusson I, O Ringdén, B Sundberg and K Le Blanc. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76:1208–1213.
- Djouad F, P Ponce, C Bony, P Tropel, F Apparailly, J Sany, D Noël and C Jorgensen. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102:3837–3844.
- Spaeth E, A Klopp, J Dembinski, M Andreeff and F Marini. (2008). Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 15:730–738.
- Yazhou C, S Wenlv, Z Weidong and W Licun. (2004). Clinicopathological significance of stromal myofibroblasts in invasive ductal carcinoma of the breast. *Tumour Biol* 25: 290–295.
- Tsujino T, I Seshimo, H Yamamoto, CY Ngan, K Ezumi, I Takemasa, M Ikeda, M Sekimoto, N Matsuura and M Monden. (2007). Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 13:2082–2090.
- McLean K, Y Gong, Y Choi, N Deng, K Yang, S Bai, L Cabrera, E Keller, L McCauley, KR Cho and RJ Buckanovich. (2011). Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest* 121:3206–3219.
- Wulling M, Delling G and Kaiser E. (2003). The origin of the neoplastic stromal cell in giant cell tumor of bone. *Hum Pathol* 34:983–993.
- Johann PD, M Vaegler, F Gieseke, P Mang, S Armeanu-Ebinger, T Kluba, R Handgretinger and I Müller. (2010). Tumour stromal cells derived from paediatric malignancies display MSC-like properties and impair NK cell cytotoxicity. *BMC Cancer* 10:501.
- Gibbs CP, VG Kukekov, JD Reith, O Tchigrinova, ON Suslov, EW Scott, SC Ghivizzani, TN Ignatova and DA Steindler. (2005). Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7:967–976.
- Lin TM, HW Chang, KH Wang, AP Kao, CC Chang, CH Wen, CS Lai and SD Lin. (2007). Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human lipoma tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 361:883–889.
- Cao H, W Xu, H Qian, W Zhu, Y Yan, H Zhou, X Zhang, X Xu, J Li, Z Chen and X Xu. (2009). Mesenchymal stem cell-like cells derived from human gastric cancer tissues. *Cancer Lett* 274:61–71.
- Campoli M, S Ferrone, AH Zea, PC Rodriguez and AC Ochoa. (2005). Mechanisms of tumor evasion. *Cancer Treat Res* 61–88.
- Garrido F, I Algarra and AM Garcia-Lora. (2010). The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible “hard” lesions. *Cancer Immunol Immunother* 59:1601–1606.
- Mehta AM, ES Jordanova, GG Kenter, S Ferrone and GJ Fleuren. (2008). Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 57:197–206.
- Brady CS, JS Bartholomew, DJ Burt, MF Duggan-Keen, S Glenville, N Telford, AM Little, JA Davidson, P Jimenez, et al. (2000). Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue Antigens* 55:401–411.
- Jiang XX, Y Zhang, B Liu, SX Zhang, Y Wu, XD Yu and N Mao. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105:4120–4126.
- Beyth S, Z Borovsky, D Mevorach, M Liebergall, Z Gazit, H Aslan, E Galun and J Rachmilewitz. (2005). Human

- mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105:2214–2219.
20. Matsuda M, F Salazar, M Petersson, G Masucci, J Hansson, P Pisa, QJ Zhang, MG Masucci and R Kiessling. (1994). Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med* 180:2371–2376.
  21. Petersson M, J Charo, F Salazar-Onfray, G Noffz, M Mohaupt, Z Qin, G Klein, T Blankenstein and R Kiessling. (1998). Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1. *J Immunol* 161:2099–2105.
  22. Bermudez-Morales VH, LX Gutierrez, JM Alcocer-Gonzalez, A Burguete and V Madrid-Marina. (2008). Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Invest* 26:1037–1043.
  23. Mindiola R, D Caulejas, J Núñez-Troconis, M Araujo, M Delgado and J Mosquera. (2008). Increased number of IL-2, IL-2 receptor and IL-10 positive cells in premalignant lesions of the cervix. *Invest Clin* 49:533–545.
  24. Montesinos JJ, E Flores-Figueroa, S Castillo-Medina, P Flores-Guzmán, E Hernández-Estévez, G Fajardo-Orduña, S Orozco and H Mayani. (2009). Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy* 11:163–176.
  25. Walboomers JM, MV Jacobs, MM Manos, FX Bosch, JA Kummer, KV Shah, PJ Snijders, J Peto, CJ Meijer and N Muñoz. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12–19.
  26. Mora-García Mde L, A Duenas-González, J Hernández-Montes, E De la Cruz-Hernández, E Pérez-Cárdenas, B Weiss-Steider, E Santiago-Osorio, VF Ortíz-Navarrete, VH Rosales, et al. (2006). Up-regulation of HLA class-I antigen expression and antigen-specific CTL response in cervical cancer cells by the demethylating agent hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *J Transl Med* 4:55.
  27. Rensing ME, A Sette, RM Brandt, J Ruppert, PA Wentworth, M Hartman, C Oseroff, HM Grey, CJ Melief and WM Kast. (1995). Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through *in vivo* and *in vitro* immunogenicity studies of HLA-A\*0201-binding peptides. *J Immunol* 154:5934–5943.
  28. Dominici M, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, F Marini, D Krause, R Deans, A Keating, Dj Prockop and E Horwitz. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 8:315–317.
  29. Jeffrey DR and I Watt. (2003). Imaging hyaline cartilage. *Br J Radiol* 76:777–787.
  30. Benjamin M and JR Ralphs. (2004). Biology of fibrocartilage cells. *Int Rev Cytol* 233:1–45.
  31. Studeny M, FC Marini, JL Dembinski, C Zompetta, M Cabreira-Hansen, BN Bekele, RE Champlin and M Andreoff. (2004). Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Nat Cancer Inst* 96:1593–1603.
  32. Tsuruma T, A Yagihashi, T Torigoe, N Sato, K Kikuchi, N Watanabe and K Hirata. (1998). Interleukin-10 reduces natural killer sensitivity and downregulates MHC class I expression on H-ras-transformed cells. *Cell Immunol* 184:121–128.
  33. Yue FY, R Dummer, R Geertsens, G Hofbauer, E Laine, S Manolio and G Burg. (1997). Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 71:630–637.
  34. Kast WM, RM Brandt, J Sidney, JW Drijfhout, RT Kubo, HM Grey, CJ Melief and A Sette. (1994). Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *J Immunol* 152:3904–3912.
  35. Uccelli A, L Moretta and V Pistoia. (2006). Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 36:2566–2573.
  36. Flores-Figueroa E, JJ Montesinos, P Flores-Guzmán, G Gutiérrez-Espíndola, RM Arana-Trejo, S Castillo-Medina, A Pérez-Cabrera, E Hernández-Estévez, L Arriaga and H Mayani. (2008). Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Res* 32:1407–1416.
  37. Flores-Guzmán P, E Flores-Figueroa, JJ Montesinos, G Martínez-Jaramillo, V Fernández-Sánchez, I Valencia-Plata, G Alarcón-Santos and H Mayani. (2009). Individual and combined effects of mesenchymal stromal cells and recombinant stimulatory cytokines on the *in vitro* growth of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood. *Cytotherapy* 11:886–896.
  38. Paunescu V, FM Bojin, CA Tatu, OI Gavriluc, A Rosca, AT Gruia, G Tanasie, C Bunu, D Crisnic, et al. (2011). Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *J Cell Mol Med* 15:635–646.
  39. Karlsson H, T Erkers, S Nava, S Ruhm, M Westgren and O Ringdén. (2012). Stromal cells from term fetal membrane are highly suppressive in allogeneic settings *in vitro*. *Clin Exp Immunol* 167:543–555.
  40. Tataria M, N Quarto, MT Longaker and KG Sylvester. (2006). Absence of the p53 tumor suppressor gene promotes osteogenesis in mesenchymal stem cells. *J Pediatr Surg* 41:624–632.
  41. Vogel W, F Grünebach, CA Messam, L Kanz, W Brugger and HJ Bühring. (2003). Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 88:126–133.
  42. Phinney DG. (2007). Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy. *Cell Cycle* 2884–2889.
  43. Nauta AJ, AB Kruisselbrink, E Lurvink, R Willemze and WE Fibbe. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+ -derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 177:2080–2087.
  44. Todaro M, M Zerilli, L Ricci-Vitiani, M Bini, M Perez Alea, A Maria Florena, L Miceli, G Condorelli, S Bonventre, et al. (2006). Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells. *Cancer Res* 66:1491–1499.
  45. Liu WH, JJ Liu, J Wu, LL Zhang, F Liu, L Yin, MM Zhang and B Yu. (2013). Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK/STAT3 signaling pathway. *PLoS One* 8: e55487.
  46. Clerici M, M Merola, E Ferrario, D Trabattoni, ML Villa, B Stefanon, DJ Venzon, GM Shearer, G De Palo and E Clerici.

- (1997). Cytokine production patterns in cervical intra-epithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 89:245–250.
47. Waldhauer I and A Steinle. (1998). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27:5932–5943.
48. Riteau B, C Menier, I Khalil-Daher, S Martinozzi, M Pla, J Dausset, ED Carosella and N Rouas-Freiss. (2001). HLA-G1 co-expression boosts the HLA class I-mediated NK lysis inhibition. *Int Immunol* 13:193–201.
49. Urosevic M, MO Kurrer, J Kamarashev, B Mueller, W Weder, G Burg, RA Stahel, R Dummer and A Trojan. (2001). Human leukocyte antigen-G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *Am J Pathol* 159:817–824.
50. Yoon BS, YT Kim, JW Kim, SH Kim, JH Kim and SW Kim. (2007). Expression of human leukocyte antigen-G and its correlation with interleukin-10 expression in cervical carcinoma. *Int J Gynaecol Obstet* 98:48–53.
51. Dong DD, H Yang, K Li, G Xu, LH Song, XL Fan, XL Jiang and SM Yie. (2010). Human leukocyte antigen-G expression in cervical lesions: association with cancer progression, HPV 16/18 infection, and host immune response. *Reprod Sci* 17:718–723.
52. Rodríguez JA, L Galeano, DM Palacios, C Gómez, ML Serrano, MM Bravo and AL Combata. (2012). Altered HLA class I and HLA-G expression is associated with IL-10 expression in patients with cervical cancer. *Pathobiology* 79:72–83.

Address correspondence to:

*Dr. Alberto Monroy-García*  
*Oriente 170 No. 160 Colonia Moctezuma 2ª Sección*  
*Delegación Venustiano Carranza C.P. 15530*  
*México City DF*  
*Mexico*

*E-mail: albertomon@yahoo.com*

Received for publication February 6, 2013

Accepted after revision May 1, 2013

Prepublished on Liebert Instant Online May 8, 2013

# Human Mesenchymal Stromal Cells from Adult and Neonatal Sources: A Comparative In Vitro Analysis of Their Immunosuppressive Properties Against T Cells

Marta E. Castro-Manreza,<sup>1,2</sup> Hector Mayani,<sup>3</sup> Alberto Monroy-García,<sup>4</sup> Eugenia Flores-Figueroa,<sup>5</sup>  
Karina Chávez-Rueda,<sup>6</sup> Victoria Legorreta-Haquet,<sup>6</sup> Edelmiro Santiago-Osorio,<sup>7</sup> and Juan José Montesinos<sup>1</sup>

Bone marrow-mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) have immunosuppressive properties and have been used in cell therapies as immune regulators for the treatment of graft-versus-host disease. We have previously characterized several biological properties of MSCs from placenta (PL) and umbilical cord blood (UCB), and compared them to those of BM—the gold standard. In the present study, we have compared MSCs from BM, UCB, and PL in terms of their immunosuppressive properties against lymphoid cell populations enriched for CD3<sup>+</sup> T cells. Our results confirm the immunosuppressive potential of BM-MSCs, and demonstrate that MSCs from UCB and, to a lesser extent PL, also have immunosuppressive potential. In contrast to PL-MSCs, BM-MSCs and UCB-MSCs significantly inhibited the proliferation of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> activated T cells in a cell–cell contact-dependent manner. Such a reduced proliferation in cell cocultures correlated with upregulation of programmed death ligand 1 on MSCs and cytotoxic T lymphocyte-associated Ag-4 (CTLA-4) on T cells, and increased production of interferon- $\gamma$ , interleukin-10, and prostaglandin E2. Importantly, and in contrast to PL-MSCs, both BM-MSCs and UCB-MSCs favored the generation of T-cell subsets displaying a regulatory phenotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>. Our results indicate that, besides BM-MSCs, UCB-MSCs might be a potent and reliable candidate for future therapeutic applications.

## Introduction

MESENCHYMAL STROMAL CELLS (MSCs) comprise a heterogeneous population of multipotent progenitors that possess four biological properties that make them special candidates for cell therapy: a broad differentiation potential, the capacity to produce and secrete factors that promote tissue remodeling, low immunogenicity, and immunosuppressive properties [1,2]. Regarding this last property, MSCs can interact with both innate and adaptive immune cells and thus exert profound effects on immune responses [3–5]; in particular, MSCs affect T-cell proliferation and differentiation

primarily through the production of immunosuppressive molecules and the generation of regulatory T cells (Tregs) [6–9].

Several studies using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) have demonstrated MSCs involvement in T-cell immunosuppression [4,5,8,10–12]. However, few studies have been performed with enriched populations of CD3<sup>+</sup> T cells [10,13,14]. This is important because CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are the major effector cells in immunological diseases such as graft-versus-host disease (GVHD) [15], and thus it is important to determine the immunosuppression properties of MSCs on these populations and determine their potential for cell therapies.

<sup>1</sup>Mesenchymal Stem Cells Laboratory, Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico.

<sup>2</sup>Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City, Mexico.

<sup>3</sup>Hematopoietic Stem Cells Laboratory and <sup>4</sup>Immunology and Cancer Laboratory, Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico.

<sup>5</sup>Niche and Hematopoietic Microenvironment Laboratory, Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico.

<sup>6</sup>Research Unit, Pediatric Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico.

<sup>7</sup>Hematopoiesis and Leukemia Laboratory, FES-Zaragoza, UNAM, Mexico City, Mexico.



Bone marrow (BM) is the main source of MSCs [15]; BM-MSCs have been used in cell therapy protocols to reduce GVHD [15,16]. However, BM presents some disadvantages, such as the difficulty in finding donors, the cost and invasiveness of the collection procedure, and age-related decreases in MSCs numbers [17]. Due to all of these factors, it is important to obtain MSCs from sources other than BM. Our research group has obtained MSCs from umbilical cord blood (UCB) and placenta (PL); both of these sources are easily accessible and pose no risk to the donor. In a previous study, we showed that UCB-MSCs and PL-MSCs have morphological and immunophenotypic properties in addition to adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiation capacities similar to those of BM-MSCs [18]. However, we do not know whether these alternatively sourced cells have the same immunosuppressive potential as BM-MSCs, and thus it is important to determine which of them may be the best MSCs source for use in immunosuppressive cell therapy protocols.

MSCs have been suggested to affect T-cell proliferation through both cell contact-dependent and independent mechanisms. Programmed death ligand 1 (PD-L1) and human leukocyte antigen-G1 (HLA-G1) expression have been linked to the cell contact-dependent mechanisms [8,19–21], while transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), hepatocyte growth factor, interleukin-10 (IL-10), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), nitric oxide, prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>), and human leukocyte antigen-G5 (HLA-G5) have been identified as secreted factors [1,5,8]. Currently, there is controversy regarding the need for direct contact between MSCs and T cells to inhibit T-cell proliferation [4,8,11,19–23]. Additionally, studies of activation marker expression are also controversial. Some studies have shown that BM-MSCs prevent the expression of the early activation markers CD25 and CD69 on phytohemagglutinin (PHA)-stimulated CD4<sup>+</sup> T cells [10,24]. Others have observed that MSCs do not affect activation marker expression on T cells [4,12]. Further, the effects of UCB-MSCs and PL-MSCs on activation marker expression have not been reported.

It is commonly accepted that MSCs-mediated immunosuppression can be accomplished by lymphocyte populations known as Tregs. However, there are also conflicting reports on this subject. Some authors have suggested that MSCs promote the generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> forkhead box P3 (Foxp3) or CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-cell populations [7,8,25–27], while others indicate that BM-MSCs-induced Tregs populations are not Foxp3<sup>+</sup> [4,28]. Apparently, these contradictory findings might be due to the T-cell populations used and the absence or presence of cell contact with BM-MSCs [9]. Further, a role for Tregs in MSCs-mediated immunosuppression has been suggested by the increase of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> Tregs found in cocultures of allogeneic MSCs and mixed lymphocyte reactions (MLR) [6]. Thus, in addition to the expression of surface membrane molecules and soluble mediators, MSC-mediated immunosuppression could be amplified by Tregs activity.

In an attempt to contribute to our understanding of the immunosuppressive properties of MSCs from BM, UCB, and PL against CD3<sup>+</sup> T cells on the basis of these notions, we performed a comparative study of MSCs from

three sources with regard to their potential for the inhibition of proliferation, effects on activation markers, and expression of immunosuppressive membrane and secreted molecules. We also assessed the capacity of MSCs to generate T-cell subsets displaying a regulatory phenotype in cocultures. To our knowledge, this is the first study comparing the immunosuppressive properties of MSCs from three sources to determine which one would be the most appropriate for *in vivo* immunoregulatory applications.

## Methodology

### *Isolation and culture of MSCs derived from BM, UCB, and PL*

BM samples were obtained from 5 volunteer donors according to the ethical guidelines of the Villacoapa Hospital, Mexican Institute for Social Security (IMSS). UCB ( $n=5$ ) and PL ( $n=5$ ) samples were collected according to the institutional guidelines of Troncoso Hospital, IMSS. The isolation of mononuclear cells (MNC) from three sources was performed as previously described [18]. MNC from BM, UCB, or PL were resuspended in low glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL, Rockville, MD) that was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL), 4 mM L-glutamine, 100 U/mL of penicillin, 100  $\mu$ g/mL of streptomycin, and 100  $\mu$ g/mL of gentamicin (all reagents were obtained from Gibco BRL); the cells were seeded at a density of  $0.2 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> in T-25 culture flasks (Corning, Inc./Costar, New York, NY). After a 4-day culture, the nonadherent cells were removed and fresh medium was added to the cultures. Once the cultures reached 80% confluence, the cells were harvested with trypsin (0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA; Gibco BRL), and subcultured at a density of  $0.002 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> in T-75 flasks (Corning, Inc./Costar). At the second passage, the cells were harvested, analyzed, and cryopreserved for future use.

### *Characterization of MSCs*

Immunophenotypic characterization and differentiation capacities of MSCs were performed according to previously described protocols [18]. FITC, PE, or APC-conjugated monoclonal antibodies against CD73, CD90, and CD45 (BD Biosciences, San Diego, CA) CD105, CD13, CD14 (Caltag, Buckingham, United Kingdom), HLA-ABC, HLA-DR, CD31, and CD34 (Invitrogen, Carlsbad, CA) were used for immunophenotypic characterizations as described in the Flow Cytometric Analysis section.

Adipogenic and osteogenic differentiation was induced with Stem Cells Kits<sup>TM</sup> (Stemcell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada). Adipogenic differentiation was determined by visualizing the presence of Oil Red O-stained (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) lipid vacuoles. Osteogenic differentiation was assessed by the detection of von Kossa-stained calcium deposits and alkaline phosphatase staining. Chondrogenic differentiation was induced with a commercial induction medium (Cambrex Bio Science, Walkersville, Inc., Walkersville, MD) that was supplemented with 10 ng/mL of TGF- $\beta$  (Cambrex Bio Science). The resulting micromasses were fixed, embedded, and sliced. Cross sections were stained with Alcian blue dye (Sigma-Aldrich).

### *CD3<sup>+</sup> T-cell collection*

PBMC were obtained from the peripheral blood samples of three volunteer donors by density gradient with Ficoll-Paque Plus (specific gravity <1.077g/mL; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). CD3<sup>+</sup> T cells were obtained by separation with human CD3 MicroBeads and MACS MS columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the supplier's instructions. The purity of the obtained CD3<sup>+</sup> T-cell suspensions was determined by flow cytometry as described in the Flow Cytometric Analysis section, and only suspensions with purity greater than 97% were used in the experiments. CD3<sup>+</sup> T cells were maintained in RPMI medium (RPMI 1640, 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, and 100 µg/mL of gentamicin; all reagents were obtained from Gibco BRL) for 24 h.

### *Stimulation of T cells*

Cultured CD3<sup>+</sup> T cells were activated in RPMI medium with Dynabeads CD3/CD28 T-cell expander (Invitrogen) at a 1:1 ratio (25 µL of dynabeads/1 × 10<sup>6</sup> T cells). Fifteen hours before harvesting the cultures (3–4 days of activation), the cells were labeled with 10 µM of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU; BD Biosciences) to determine cell proliferation as described in the Flow Cytometric Analysis section.

### *Cocultures of MSCs/CD3<sup>+</sup> T cells*

Cocultures of MSCs/CD3<sup>+</sup> T cells were performed in the presence or absence of cell–cell contact. Cocultures with cell–cell contact were performed in 24-well plates. CD3<sup>+</sup> T cells (1.5 × 10<sup>5</sup>) were seeded and activated as described in Stimulation of T Cells section in the absence or presence of 1.5 × 10<sup>5</sup> MSCs from BM, UCB, or PL (MSC:T-cell ratio, 1:1). Antibody-coated beads were present during T-cell cocultures with MSCs. Cultures without cell–cell contact were performed in transwell culture chambers (Corning, Inc./Costar). MSCs from BM, UCB, or PL (1.5 × 10<sup>5</sup> cells) were placed into the lower chambers, and CD3<sup>+</sup> T cells (1.5 × 10<sup>5</sup> cells) were placed into the upper chambers; the chambers were separated by a semipermeable membrane with a 0.4 mm pore size. CD3<sup>+</sup> T cells that were activated in the absence of MSCs were used as positive controls for proliferation, cytokine secretion, and surface molecule expression. BM-MSCs, UCB-MSCs, or PL-MSCs that were cultured in the absence of T cells were used as controls for the basal MSCs expression of surface molecules and secreted factors. The cultures were maintained for 1–4 days to permit concurrent evaluations of proliferation and molecule expression by flow cytometry and cytokine secretion (see Flow Cytometric Analysis, Quantitative Cytokine Analysis, and Quantitative PGE<sub>2</sub> Measurement sections).

### *Proliferation assays*

After 3 or 4 days of T-cell activation, the cells were labeled with 10 µM BrdU (BD Pharmingen, San Diego, CA) at 15 h before harvesting. CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation rates were assessed with a BrdU Flow Kit (BD

Pharmingen) according to the supplier's instructions. CD3<sup>+</sup> T cells that were activated in the absence of MSCs were used as positive controls and were set at 100% proliferation. The levels of proliferation observed in the cocultures were normalized to this control.

### *Flow cytometric analysis*

In addition to monoclonal antibodies against surface markers characteristic of MSCs, we also used FITC, PE, or APC-conjugated monoclonal antibodies against CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, cytotoxic T lymphocyte-associated Ag-4 (CTLA-4), BrdU (BD Biosciences), Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA), and their respective isotype controls to characterize T cells and also PE anti-PD-L1 (BD Biosciences) was used for MSCs. A total of 1–2 × 10<sup>5</sup> cells, previously blocked with Fc receptor blocker (Blocking Reagent Human; Miltenyi Biotec), were resuspended in 100 µL of phosphate-buffered saline (PBS) with 3% FBS and 1 mM EDTA and were incubated with the appropriate antibodies for 20–30 min; the cells were subsequently washed with 1 mL of PBS (with 3% FBS and 1 mM EDTA) and fixed with FACS Lysing Solution (BD Biosciences). Cytofix/Cytoperm buffer (BD Pharmingen) was used according to the supplier's instructions to permit the detection of intracellular CTLA-4. The Foxp3 Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent Kit (eBioscience) was used to detect intracellular Foxp3. The labeled cells were analyzed on a Coulter Epics Altra Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA), and at least 10,000 events were collected per sample. The data were analyzed with FlowJo 2.6 software. The percentages of positive cells and mean fluorescence intensities (MFI) were obtained.

### *Quantitative cytokine analysis*

To quantify the secreted cytokine concentrations, supernatants were obtained from several culture conditions, including nonactivated CD3<sup>+</sup> T cells or MSCs in the absence of T cells (negative controls) and activated CD3<sup>+</sup> T cells in the absence of MSCs (positive control). The supernatants were stored at –70°C until use. Cytokine analyses were performed with a cytometric bead array (BD Biosciences), according to the supplier's instructions.

### *Quantitative PGE<sub>2</sub> measurement*

PGE<sub>2</sub> concentrations in the supernatants were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a Prostaglandin E2 Human ELISA Kit (Invitrogen), according to the supplier's instructions. The supernatant from MSCs that were cultured in the absence of activated CD3<sup>+</sup> T cells was used as control.

### *Statistical analysis*

Data are expressed as the mean and standard error of mean calculated from 3 to 10 independent experiments. Statistical analyses were performed using SPSS statistics 20.0. Comparisons between groups were performed by Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney *U* test. A *P* value < 0.05 was considered to be significant.

## Results

### *Immunophenotype and differentiation capacity of BM-MSCs, UCB-MSCs, and PL-MSCs*

Individual experiments from BM-MSCs ( $n=5$ ), UCB-MSCs ( $n=5$ ), and PL-MSCs ( $n=5$ ) displayed immunophenotypes and differentiation capacities similar to those reported previously [18]. MSCs from the three sources expressed high levels of the characteristic MSCs surface markers CD105, CD90, and CD73 as established by the International Society for Cellular Therapy (ISCT) [29]. Further, the MSCs expressed low levels of HLA-ABC, were HLA-DR-negative, and did not express hematopoietic markers such as CD34, CD45, and CD14 or endothelial markers such as CD31. Meanwhile, MSCs from the three sources were capable of osteogenic and chondrogenic differentiation; however, only BM- and PL-MSCs showed adipogenic potential, unlike UCB-MSCs, which had no such potential (Supplementary Fig. S1; Supplementary Data are available online at [www.liebertpub.com/scd](http://www.liebertpub.com/scd)).

### *CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation is inhibited by cocultivation and cellular contact with BM-MSCs and UCB-MSCs*

BM-MSCs, UCB-MSCs, and PL-MSCs have been shown to decrease the proliferation of mitogen or alloantigen-activated PBMC [4,30,31]. Some studies have demonstrated the importance of the type of population evaluated (PBMC or CD3<sup>+</sup> T cells) and the presence of cell contact in cocultures with MSCs in BM-MSCs-mediated immunosuppression [9,14]. Thus, we decided to analyze the direct effect of MSCs on a CD3<sup>+</sup> T-cell-enriched population to reduce the interference from other cellular components such as B cells, monocytes, and dendritic cells. We isolated CD3<sup>+</sup> T cells (purity  $\geq 97\%$ ) that were activated with anti-CD3/CD28 in the presence or absence of BM-MSCs, UCB-MSCs, or PL-MSCs, and either allowed (Contact) or prevented cell-cell contact (Transwell). Proliferation of activated T cells cultured in absence of MSCs was considered 100% of proliferation response (positive control). No incorporation of BrdU was observed in negative control (nonactivated T cells cultured in absence of MSCs; data not shown). Figure 1A and B show that BM- and UCB-MSCs significantly reduced proliferation of CD3<sup>+</sup> ( $48.2\% \pm 10.1\%$  and  $42.9\% \pm 7.8\%$ , respectively;  $P < 0.05$ ), CD4<sup>+</sup> ( $51.2\% \pm 10.4\%$  and  $43.6\% \pm 8.2\%$ , respectively;  $P < 0.05$ ), and CD8<sup>+</sup> ( $49.0\% \pm 8.3\%$  and  $44.8\% \pm 7.4\%$ , respectively;  $P < 0.05$ ) T cells, while PL-MSCs only reduced the proliferation of CD3<sup>+</sup> ( $77.0\% \pm 6.2\%$ ;  $P < 0.05$ ) and CD4<sup>+</sup> ( $74.5\% \pm 6.8\%$ ;  $P < 0.05$ ) T cells, but not CD8<sup>+</sup> ( $83.7\% \pm 8.8\%$ ) T cells. It is worth mentioning that these reductions were only observed in cocultures with cell-cell contact (Supplementary Fig. S2). Additionally, in UCB-MSCs cocultures, we observed a greater reduction in the proliferation of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> T cells, compared with PL-MSC cocultures ( $P < 0.05$ ); however, in BM-MSCs cocultures, we only observed a decrease in proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells when compared with the PL-MSCs cocultures ( $P < 0.05$ ). These results suggest that BM-MSCs and UCB-MSCs have a greater ability to inhibit T-cell proliferation

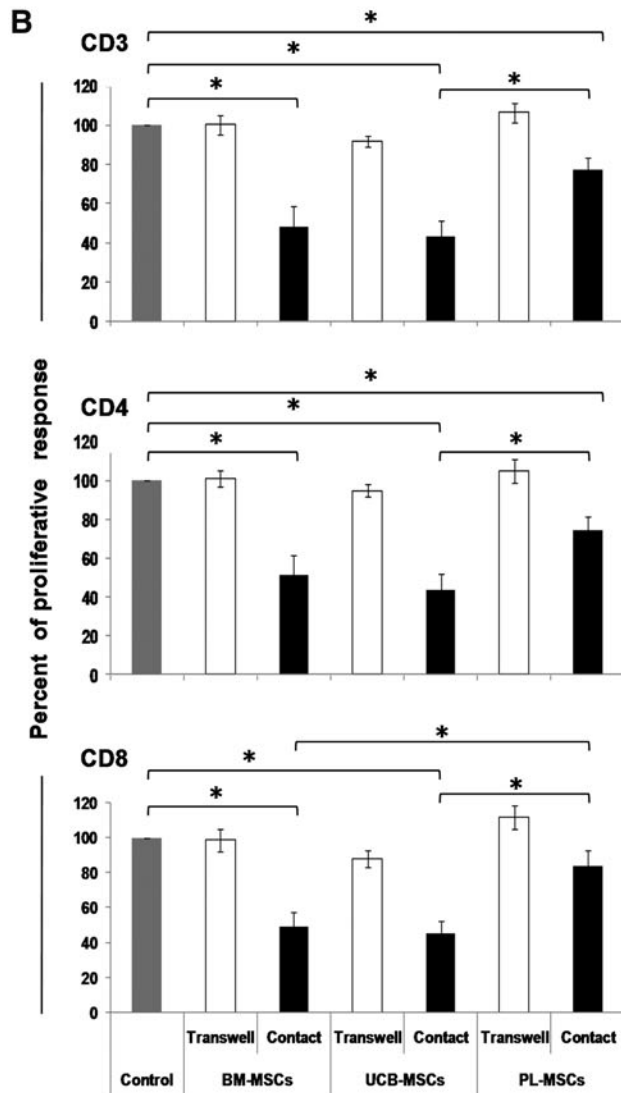
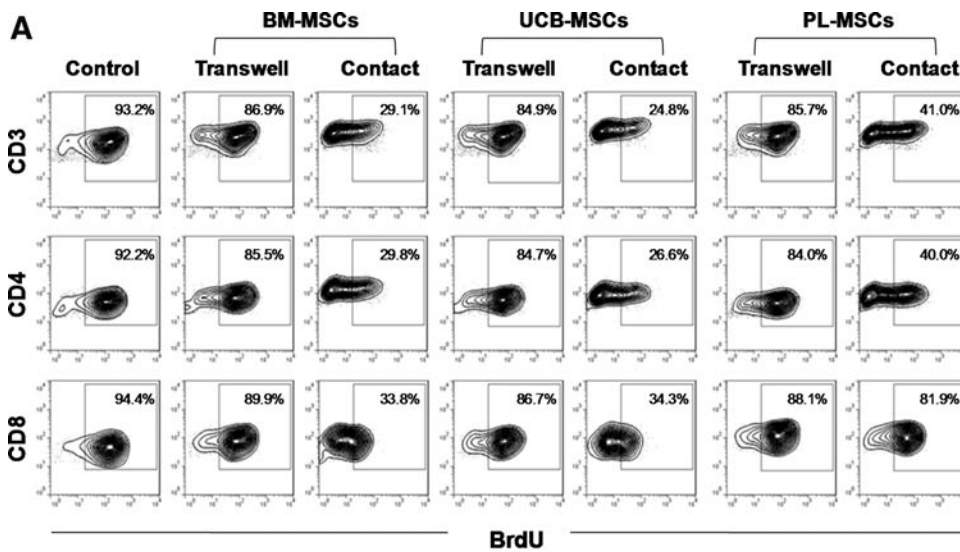
than do PL-MSCs and that contact between the T cells and MSCs is necessary for such inhibition.

### *Effect of BM-, UCB-, and PL-MSCs on T-cell activation*

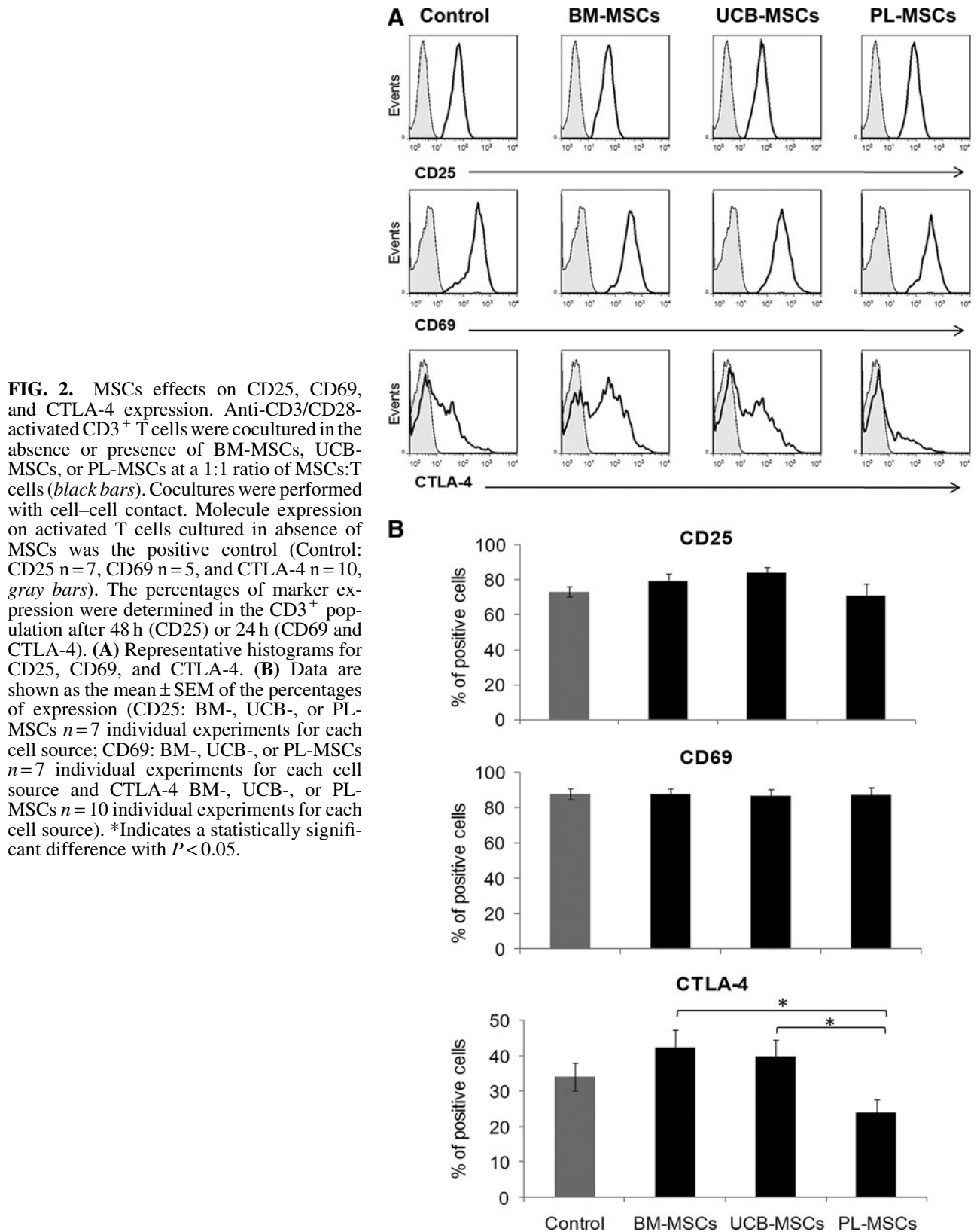
Antigenic or mitogenic T-cell stimulation rapidly induces the expression of the activation markers CD25, CD69, and CTLA-4 [32]. Because we observed inhibited T-cell proliferation in cocultures with cell contact between MSCs and T cells, we decided to examine whether the presence of MSCs in these cocultures could affect the expression of CD25, CD69, and CTLA-4. Expression of such molecules on activated T cells cultured in absence of MSCs was considered as the positive control (Control). Basal expression of molecules in nonactivated T cells was considered as negative control (data not shown). We found that CD25 and CD69 expression was unaffected by any of the MSCs from three sources (Fig. 2A, B). On the other hand, we noted that CTLA-4 expression was not modified in the BM-MSCs and UCB-MSCs cocultures (Fig. 2B). Interestingly, we observed significant decrease in CTLA-4 expression on T cells in PL-MSCs cocultures ( $23.8\% \pm 3.7\%$ ) when compared with BM-MSCs and UCB-MSCs cocultures ( $42.3\% \pm 5.0\%$  and  $39.5\% \pm 4.8\%$ , respectively;  $P < 0.05$ ) (Fig. 2B). No significant differences were observed in MFI values (data not shown).

### *Effects of MSCs on the expression of the immunosuppressive molecules CTLA-4 and PD-L1*

Because CTLA-4 is an important negative regulator of immune responses and achieves maximum expression levels between 24 and 48 h postactivation [33,34], we decided to analyze whether the previously observed changes in CTLA-4 expression remained at 3 days of culture and whether the presence or absence of cell-cell contact affected this expression. We performed cocultures with and without cell-cell contact and measured the percentages and MFI of CTLA-4-positive cells in the CD4<sup>+</sup> population (Fig. 3A). Expression of CTLA-4 in activated T cells cultured in absence of MSCs was considered as the positive control (Control). Basal expression of molecules in nonactivated T cells was considered as negative control (data not shown). We observed that in cocultures with cell-cell contact, BM-MSCs and UCB-MSCs significantly enhanced both the percentage of CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> cells ( $92.6\% \pm 1.8\%$  and  $92.1\% \pm 2.5\%$ , respectively) when compared with control ( $76.0\% \pm 3.4\%$ ;  $P < 0.05$ ) (Fig. 3B) and the CTLA-4 MFI (1.9- and 1.8-fold, respectively;  $P < 0.05$ ) of the CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> population (Fig. 3C). Meanwhile, in cocultures without cell-cell contact, no increases were observed in the percentage of CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> or the CTLA-4 MFI and the MFI values were significantly lower than in cell-cell contact cocultures of BM-MSCs and UCB-MSCs ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3B, C). We also observed that PL-MSCs did not increase CTLA-4 expression levels, and the CTLA-4 percentage and MFI increases in the PL-MSCs cocultures with contact were significantly lower ( $74.7\% \pm 2.3\%$  and MFI: 1.1-fold) than those in the BM-MSCs ( $92.6\% \pm 1.8\%$  and 1.9-fold;  $P < 0.05$ ) and UCB-MSCs cocultures ( $92.1\% \pm 2.5\%$  and 1.8-fold;  $P < 0.05$ ) (Fig. 3B, C). These results suggest the need for MSCs-T-cell contact to promote increased CTLA-4 expression and that



**FIG. 1.** BM-MSCs and UCB-MSCs decrease both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation in a cell contact-dependent manner. Anti-CD3/CD28-activated CD3<sup>+</sup> T cells were cocultured in the presence of BM-MSCs, UCB-MSCs, or PL-MSCs at a 1:1 ratio of MSCs:T cells. Cocultures were prepared in the presence (black bars) or absence (white bars) of cell-cell contact; the latter were performed with transwell chambers. Proliferation of activated CD3<sup>+</sup> T cells cultured in absence of MSCs was the positive control (100% proliferation, *n* = 10, gray bars). The percentage of BrdU incorporation was determined in the CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> populations after 3–4 days of culture. (A) Representative dot plots from an experiment. (B) Data are shown as the mean ± SEM for the percentages of proliferation (BM-MSCs: *n* = 10 with cell-cell contact, *n* = 5 transwell; UCB-MSCs: *n* = 10 with cell-cell contact, *n* = 5 transwell; and PL-MSCs: *n* = 10 with cell-cell contact, *n* = 5 transwell. Individual experiments). \*Indicates a statistically significant difference with *P* < 0.05. BM-MSCs, bone marrow mesenchymal stromal cells; PL, placenta; UCB, umbilical cord blood; BrdU, 5-bromo-2-deoxyuridine; SEM, standard error of mean.

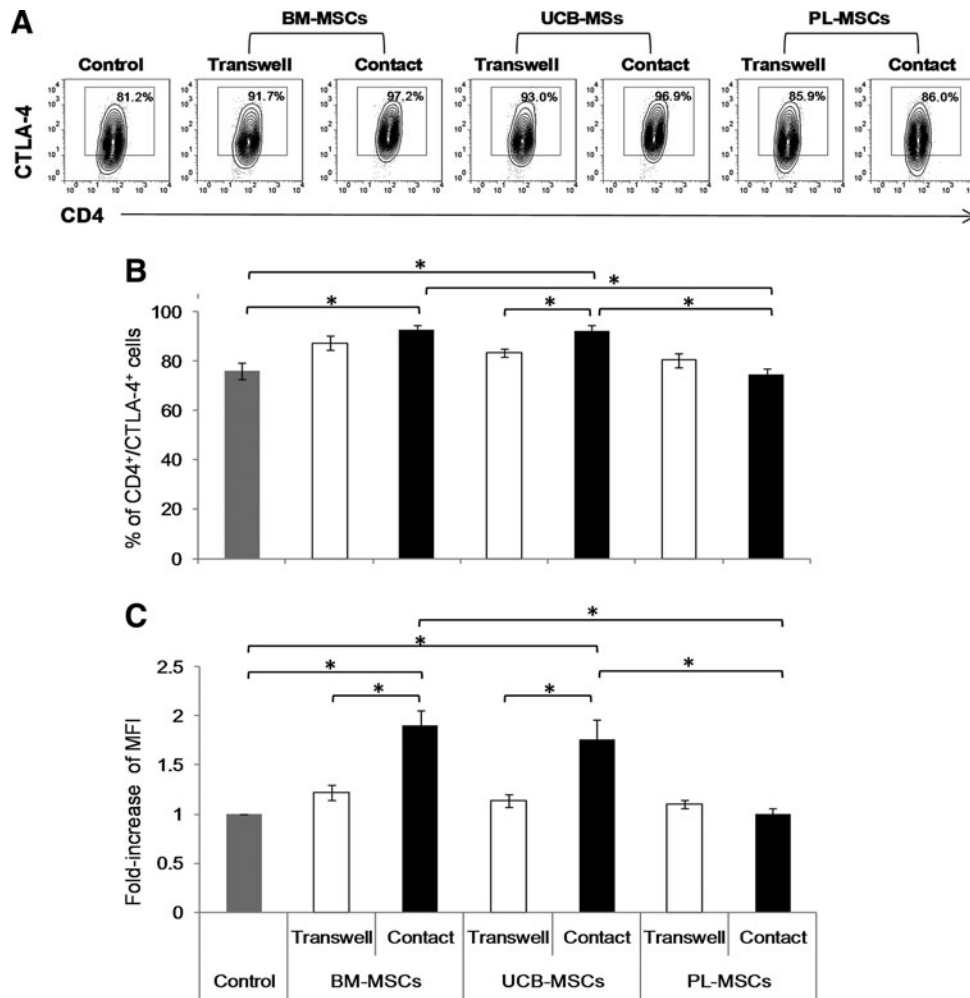


**FIG. 2.** MSCs effects on CD25, CD69, and CTLA-4 expression. Anti-CD3/CD28-activated CD3<sup>+</sup> T cells were cocultured in the absence or presence of BM-MSCs, UCB-MSCs, or PL-MSCs at a 1:1 ratio of MSCs:T cells (*black bars*). Cocultures were performed with cell–cell contact. Molecule expression on activated T cells cultured in absence of MSCs was the positive control (Control: CD25  $n=7$ , CD69  $n=5$ , and CTLA-4  $n=10$ , *gray bars*). The percentages of marker expression were determined in the CD3<sup>+</sup> population after 48 h (CD25) or 24 h (CD69 and CTLA-4). **(A)** Representative histograms for CD25, CD69, and CTLA-4. **(B)** Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of the percentages of expression (CD25: BM-, UCB-, or PL-MSCs  $n=7$  individual experiments for each cell source; CD69: BM-, UCB-, or PL-MSCs  $n=7$  individual experiments for each cell source and CTLA-4 BM-, UCB-, or PL-MSCs  $n=10$  individual experiments for each cell source). \*Indicates a statistically significant difference with  $P < 0.05$ .

CTLA-4 may contribute to the reduced proliferation rates observed in these cocultures.

On the other hand, because cell contact was found to be very important for the inhibition of T-cell proliferation, we decided to evaluate the expression of PD-L1, a molecule that

affects T-cell inhibition in a cell contact-dependent manner [20]. Thus, we analyzed PD-L1 expression on the MSCs present in the cocultures with and without cell contact (Fig. 4A). The percentage and MFI of PD-L1<sup>+</sup> MSCs cultured in absence of activated T cells, was considered as the basal



**FIG. 3.** BM-MSCs and UCB-MSCs increase the frequency and intensity of CTLA-4 expression on CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> T cells. Anti-CD3/CD28-activated CD3<sup>+</sup> T cells were cocultured in the absence or presence of BM-MSCs, UCB-MSCs, or PL-MSCs at a 1:1 ratio of MSCs:T cells. Cocultures were performed with and without (Transwell, *white bars*) cell–cell contact (black bars). CTLA-4 expression on activated T cells cultured in absence of MSCs was the expression control (Control, n=7, *gray bars*). The percentages of CTLA-4<sup>+</sup> cells and the fold changes the CTLA-4 MFI were determined in the CD4<sup>+</sup> population after 3 days of culture. (A) Representative dot plots from an experiment. (B) Data are shown as the mean ± SEM of the percentage of CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> and (C) the fold increases in the CTLA-4 MFI in the CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> population. BM-MSCs: n=7 with cell–cell contact, n=7 transwell; UCB-MSCs: n=7 with cell–cell contact, n=7 transwell; and PL-MSCs: n=7 with cell–cell contact, n=7 transwell (Individual experiments). \*Indicates a statistically significant difference with P<0.05. MFI, mean fluorescence intensity.

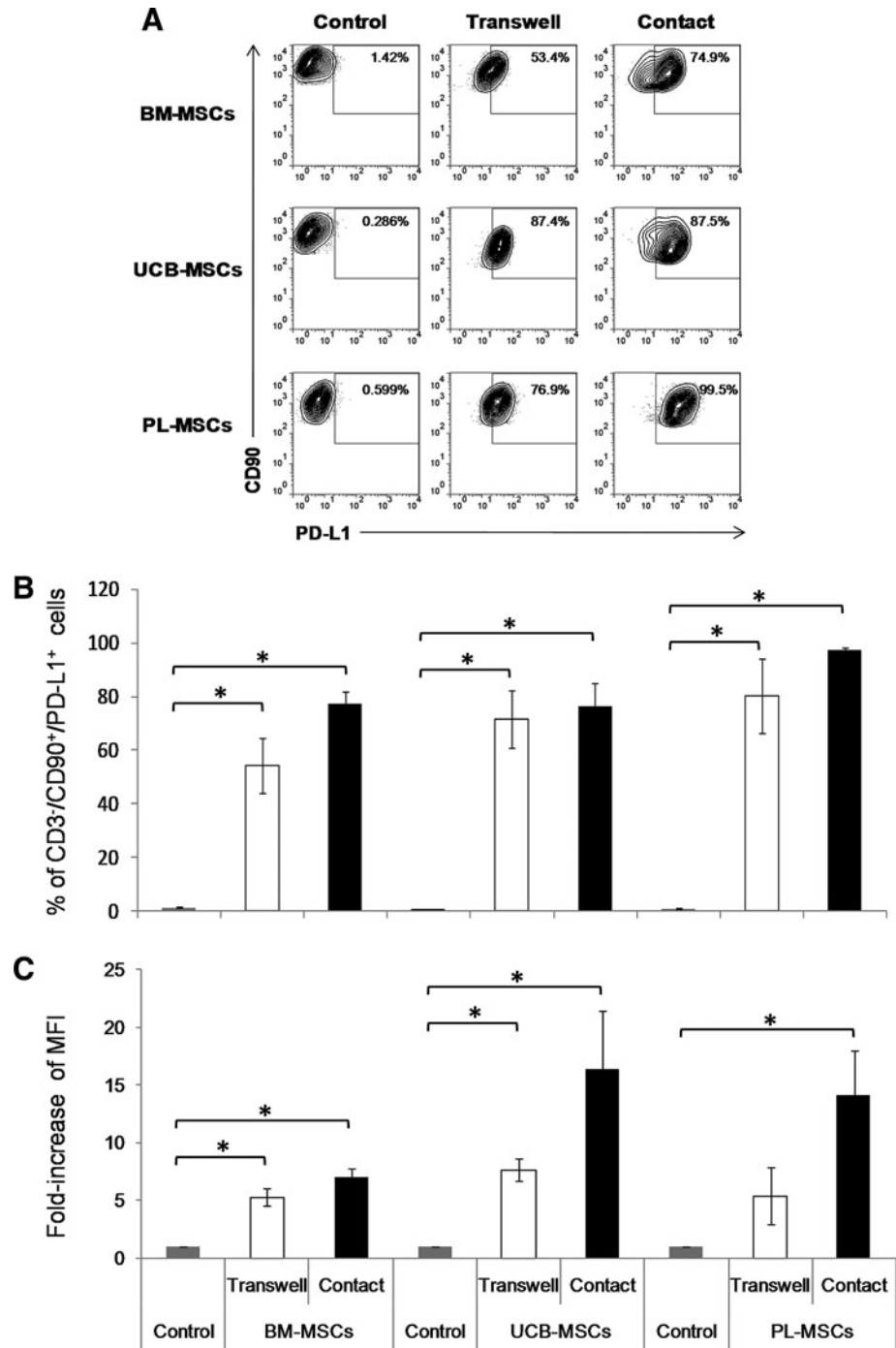
expression of this molecule (Control). The results showed that the presence of activated T cells increased the percentage of PD-L1<sup>+</sup> MSCs (CD3<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>; P<0.05) in the cocultures, regardless of cell contact: BM-MSCs (control: 1.5%±0.3%, transwell: 54.3%±10.2%, and contact: 77%±4.6%), UCB-MSCs (control: 0.11%±0.03%, transwell: 71%±10.7%, and contact: 76.3%±8.7%), and PL-MSCs (control: 0.29%±0.11%, transwell: 80.0%±13.8%, and contact: 97.4%±1.0%) (Fig. 4B). Similar results were obtained from an analysis of the PD-L1 MFI, for which increases (P<0.05) were observed in BM-MSCs (transwell: 5-fold and contact: 7-fold), UCB-MSCs (transwell: 7-fold and contact: 16-fold), and PL-MSCs (transwell: 5-fold and contact: 14-fold) (Fig. 4C). These results suggest that PD-L1 might be involved in MSC-mediated immunosuppressive activity through cell–cell contact. Further, PD-L1 expression was increased in the cultures regardless of cell contact; this

suggests that this increase might be due to the presence of a soluble mediator that stimulates PD-L1 expression on MSCs.

*Decreased tumor necrosis factor alpha and increased interferon-γ and IL-10 levels in cocultures with BM-MSCs and UCB-MSCs*

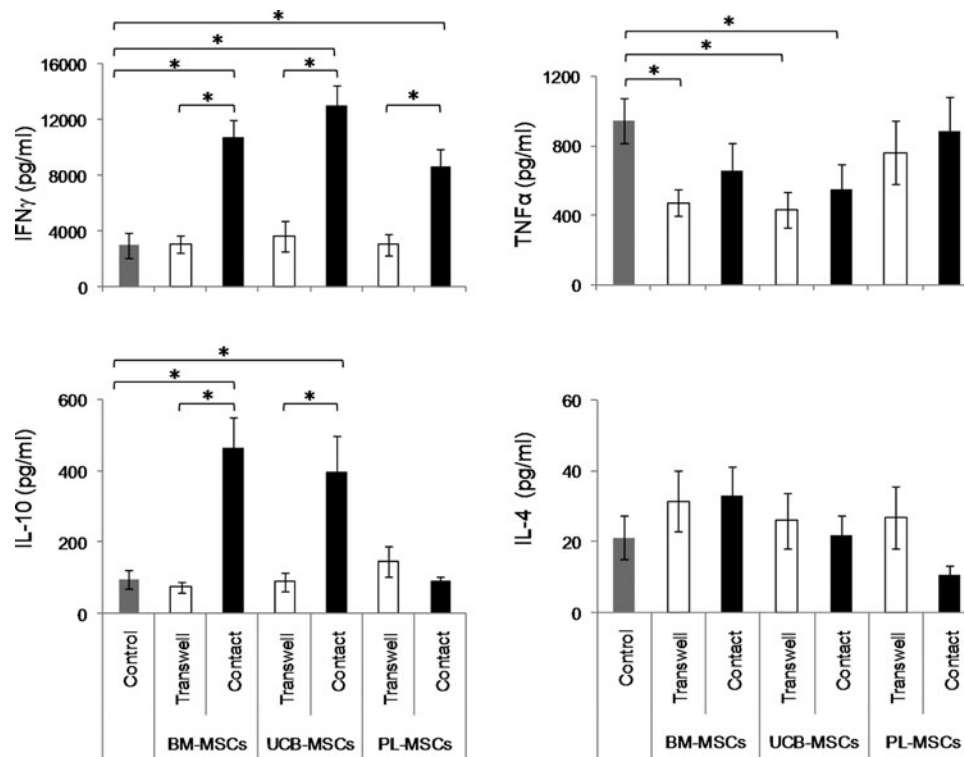
Previous studies have demonstrated the importance of interferon gamma (IFNγ) for PD-L1 expression on BM-MSCs [20] and PL-MSCs [35], and for the induction of the immunosuppressive properties of MSCs, either alone or in the presence of other pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNFα). Further, the decreased proliferation rates observed in cocultures could be related to the presence of immunosuppressive Th2-like cytokines such as IL-4 and IL-10 [2,4]. Based on the above findings, we decided to evaluate the presence of cytokines that might be

**FIG. 4.** PD-L1 expression is increased in MSCs in the presence of activated CD3<sup>+</sup> T cells. BM-MSCs, UCB-MSCs, or PL-MSCs were cocultured in the absence or presence of anti-CD3/CD28-activated CD3<sup>+</sup> T cells at a 1:1 ratio of MSCs:T cells. Cocultures were performed with (Contact, *black bars*) and without (Transwell, *white bars*) cell–cell contact. PD-L1 expression on MSCs cultured in absence of activated T cells was considered as basal expression of such molecule (Control: BM-MSCs  $n=6$ , UCB-MSCs  $n=5$ , PL-MSCs  $n=4$ , *gray bars*). The percentages of PD-L1<sup>+</sup> cells and the fold increase in the PD-L1 MFI were determined in the CD3<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> population after 3 days of culture. (A) Representative dot plots from an experiment. (B) Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of the percentages of CD3<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup> cells and (C) the fold increases in PD-L1 MFI in the CD3<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup> population. BM-MSCs:  $n=6$  with cell–cell contact,  $n=6$  Transwell; UCB-MSCs:  $n=5$  with cell–cell contact,  $n=5$  transwell; and PL-MSCs:  $n=4$  with cell–cell contact,  $n=4$  transwell (Individual experiments). \*Indicates a statistically significant difference with  $P < 0.05$ . PD-L1, programmed death ligand 1.



involved in the immunosuppressive responses of the MSCs from the three sources. Thus, we determined the concentrations of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, and IL-4 in the cocultures with and without cell contact. Concentration of cytokines detected in conditioned medium of activated T cells cultured in absence of MSCs was considered as positive control (Control). We detected higher concentrations of IFN $\gamma$  and IL-10 in cocultures with cell contact in the presence of BM-MSCs (IFN $\gamma$ : 10,761.4  $\pm$  1,192 pg/mL, IL-10: 463  $\pm$  87 pg/mL;  $P < 0.05$ ) and UCB-MSCs (IFN $\gamma$ : 13,031.9  $\pm$  1,409.8 pg/mL, IL-10: 393  $\pm$  103 pg/mL;  $P < 0.05$ ), compared with control cultures (IFN $\gamma$ : 2,976  $\pm$  936 pg/mL, IL-10: 95  $\pm$  25 pg/mL).

However, in PL-MSCs cocultures we detected only an increase in IFN $\gamma$  (8,690  $\pm$  1,147 pg/mL;  $P < 0.05$ ), but not in IL-10 (88.3  $\pm$  12.2 pg/mL) (Fig. 5), compared with control cultures. In cocultures with transwell chambers, the IFN $\gamma$  (BM-MSCs: 3,047  $\pm$  593 pg/mL, UCB-MSCs: 3,596  $\pm$  1,101 pg/mL, and PL-MSCs: 3,023  $\pm$  749 pg/mL) and IL-10 concentrations (BM-MSCs: 72  $\pm$  14 pg/mL, UCB-MSCs: 87  $\pm$  27 pg/mL, and PL-MSCs: 143  $\pm$  42 pg/mL) were similar to those observed in activated T cells in the absence of MSCs. We observed a tendency to decline TNF $\alpha$  secretion in cocultures with cell contact and with transwell chambers in presence of BM-MSCs (contact: 652  $\pm$  160 pg/mL; transwell: 479  $\pm$  76 pg/mL;



**FIG. 5.** IFN $\gamma$  and IL-10 expression are strongly induced in cell-contact cocultures with BM-MSCs and UCB-MSCs. Anti-CD3/CD28-activated CD3<sup>+</sup> T cells were cocultured in the absence or presence of BM-MSCs, UCB-MSCs or PL-MSCs at a 1:1 ratio of MSCs:T cells. Cocultures were performed with (black bars) and without (Transwell, white bars) cell-cell contact. IFN $\gamma$ , IL-10, TNF $\alpha$  and IL-4 concentrations in cell-free supernatants were determined with a cytometric bead array after 3 days of culture. Cytokines concentration detected in conditioned medium of activated T cells cultured in absence of MSCs, were considered as basal expression of such cytokines (Control,  $n=7$ , gray bars). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of the cytokine concentrations (BM-MSCs:  $n=7$  with cell-cell contact,  $n=7$  transwell; UCB-MSCs:  $n=7$  with cell-cell contact,  $n=7$  transwell and PL-MSCs:  $n=7$  with cell-cell contact,  $n=7$  transwell. Individual experiments). \*Indicates a statistically significant difference with  $P < 0.05$ . IFN $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL, interleukin; TNF $\alpha$ , tumour necrosis factor alpha.

$P < 0.05$ ) and UCB-MSCs (contact:  $544 \pm 151$  pg/mL and transwell:  $430 \pm 105$  pg/mL;  $P < 0.05$ ) compared with control cultures ( $944 \pm 130$  pg/mL). Moreover, no significant changes were observed in the concentrations of IL-4 under any of the culture conditions (Fig. 5). These results suggest that BM-MSCs and UCB-MSCs, when in contact with activated T cells, induced secretion of both IFN $\gamma$  and IL-10; PL-MSCs, on the other hand, only induced IFN $\gamma$  secretion. Further, in contrast to PL-MSCs, both BM-MSCs and UCB-MSCs decline TNF $\alpha$  secretion.

#### BM-MSCs and UCB-MSCs induce PGE<sub>2</sub> secretion

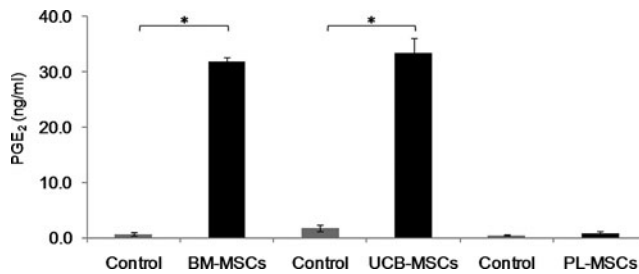
PGE<sub>2</sub> is a mediator that affects T-cell activation, proliferation, and differentiation; as such, it has been shown to decrease proliferation, stimulate IL-4 and IL-10 secretion, and promote adaptive Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) differentiation [36]. Because we detected increased IFN $\gamma$  concentrations in the BM-MSCs and UCB-MSCs cocultures and because BM-MSCs secrete PGE<sub>2</sub> in response to IFN $\gamma$  stimulation [2], we decided to evaluate the PGE<sub>2</sub> concentrations in MSCs and activated T-cell cocultures with cell contact. Concentration of PGE<sub>2</sub> detected in conditioned medium of MSCs cultured in absence of activated T cells, was considered as the basal expression of this molecule (Control). We observed that PGE<sub>2</sub> secretion was signifi-

cantly increased only in the BM-MSCs and UCB-MSCs cocultures ( $32.0 \pm 0.6$  ng/mL and  $33.5 \pm 2.6$  ng/mL, respectively;  $P < 0.05$ ), while the PGE<sub>2</sub> levels in the PL-MSCs cocultures remained similar to those observed in the control cultures ( $0.8 \pm 0.3$  ng/mL and  $0.5 \pm 0.14$  ng/mL, respectively) (Fig. 6). These results indicate different PGE<sub>2</sub> induction potentials between BM-MSCs/UCB-MSCs and PL-MSCs and suggest that PGE<sub>2</sub> might be involved in the inhibition of T-cell proliferation in the BM-MSCs and UCB-MSCs cocultures with cell contact.

#### BM-MSCs and UCB-MSCs induce generation of T-cell subsets displaying a regulatory phenotype

Several studies have indicated that IFN $\gamma$ , IL-10, and PGE<sub>2</sub> are involved in Tregs induction [8,9,37]. Because we detected increased levels of these mediators in the BM-MSCs and UCB-MSCs cocultures with cell contact, which were concomitant with the inhibited CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation and increased CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> T-cell frequencies, we determined whether these findings were related to the generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs. Because CTLA-4 is a molecule that is constitutively expressed on Tregs and is essential to their function [38], we also analyzed the generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> T-cell subsets displaying a regulatory





**FIG. 6.** PGE<sub>2</sub> expression is induced in BM-MSCs and UCB-MSCs cocultures. BM-MSCs, UCB-MSCs, or PL-MSCs were cocultured in the absence or presence of anti-CD3/CD28-activated CD3<sup>+</sup> T cells at a 1:1 ratio of MSCs:T cells. Cocultures were performed with cell–cell contact (*black bars*). PGE<sub>2</sub> concentrations in cell-free supernatants were determined by ELISA after 3 days of culture. PGE<sub>2</sub> concentrations detected in conditioned medium of MSCs cultured in absence of activated T cells were considered as basal expression of such molecule (Control, *gray bars*). Data are shown as the mean ± SEM (Control *n*=3, BM-MSCs *n*=3, UCB-MSCs *n*=3, and PL-MSCs *n*=3). Individual experiments (evaluations were performed in duplicate). \*Indicates a statistically significant difference with *P*<0.05. PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

phenotype [6]. Thus, the T-cell populations from the MSCs cell contact cocultures were obtained. The percentages of Foxp3<sup>+</sup> cells were determined within the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cell fraction, and the percentages of CTLA-4<sup>+</sup> and CTLA-4<sup>high</sup> cells were determined within the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> fractions. The percentage of Foxp3<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup>, and CTLA-4<sup>high</sup> in addition to MFI of CTLA-4<sup>+</sup> of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cell fraction from activated T cells cultured in absence of MSCs was considered as the basal population of T-cell displaying a regulatory phenotype (Control).

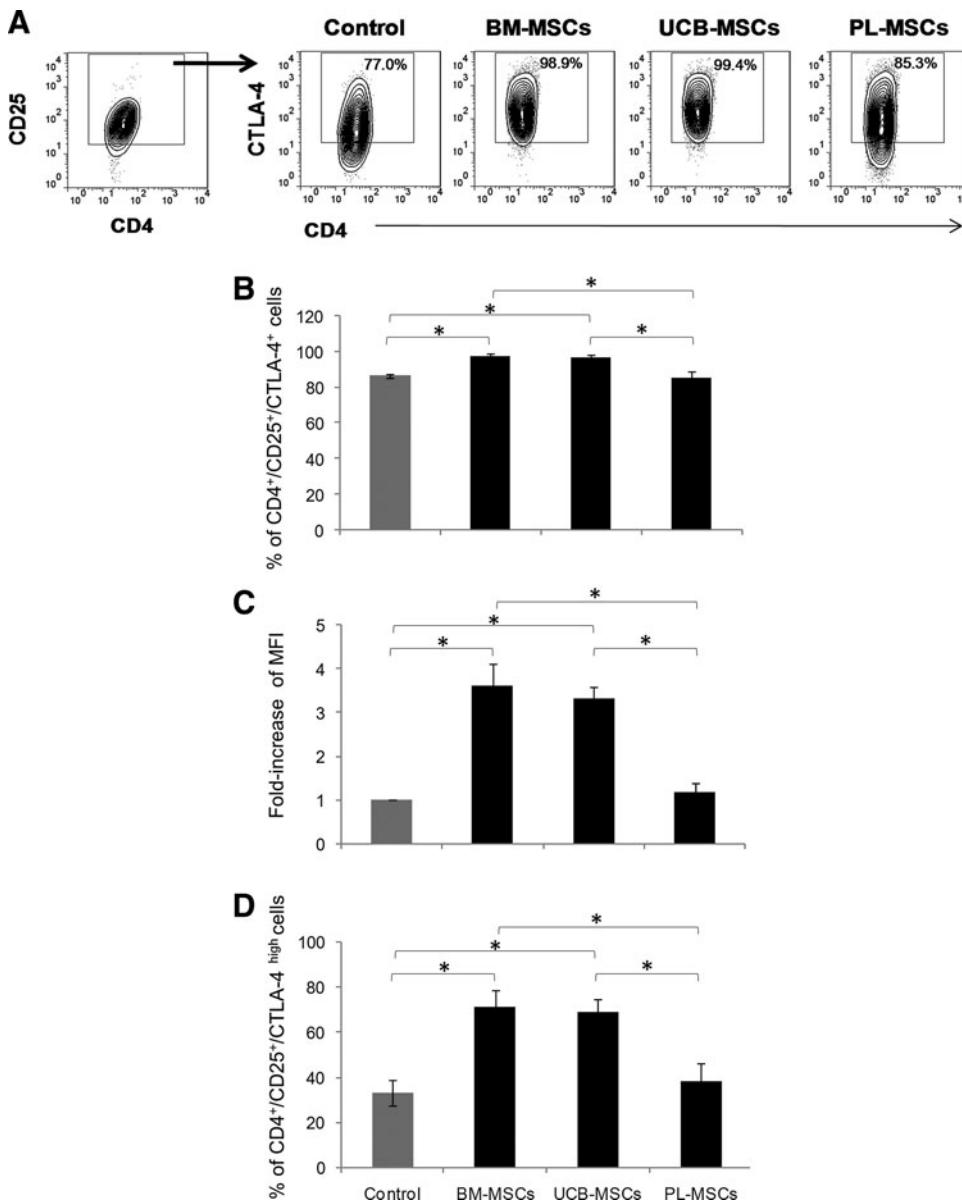
We found no significant increases in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs generation; however, there was a tendency toward reduced percentages of this population in the PL-MSCs cocultures, although this was not statistically significant (data not shown). In contrast, we noted that the presence of either BM-MSCs or UCB-MSCs significantly increased the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> cells over the control (98% ± 0.6%, 97% ± 0.9% and 86% ± 1.2%, respectively; *P*<0.05) (Fig. 7A, B), and the CTLA-4 MFI in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells (2.6-fold and 2.3-fold over the control, respectively; *P*<0.05) (Fig. 7A, C). We also noted that both types of MSCs induced an increase in the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> CTLA<sup>high</sup> cells (control: 32.8% ± 5.7%, BM-MSCs: 71.1% ± 7.5%, and UCB-MSCs: 69% ± 5.5%; *P*<0.05) (Fig. 7D). In contrast, there were no significant increases in the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> population with regard to percentage (Control: 86.5% ± 1.2%, PL-MSCs: 85.6% ± 3.3%) or MFI (control: 1-fold and PL-MSCs: 1.2-fold) in the PL-MSCs cocultures. Similarly, we observed no increase in the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA<sup>high</sup> cells in the PL-MSCs cocultures (Control: 32.8% ± 5.7% and PL-MSCs: 37.9% ± 8.3%). Interestingly, the values obtained for the percentages and expression levels of CTLA-4 in the PL-MSC cocultures were significantly lower (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>: 85.6% ± 3.3%, MFI: 1.2-fold, and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA<sup>high</sup>: 37.9% ± 8.3%; *P*<0.05) than those from the

BM-MSCs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>: 98% ± 0.6%, MFI: 3.6-fold, and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA<sup>high</sup>: 71.1% ± 7.5%) and UCB-MSC cocultures (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>: 96.9% ± 0.9%, MFI: 3.3-fold, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA<sup>high</sup>: 69% ± 5.5%) (Fig. 7). However, we did not observe changes in CTLA-4 on the CD8<sup>+</sup> T cells from any of the tested conditions (data not shown).

## Discussion

MSCs have been reported to be immunosuppressive. Thus, BM-MSCs have been used to treat GVHD, a condition in which donor T cells are the principal effector cells in an immune response against the host tissues [39]. Although BM is the main source of MSCs, it has some disadvantages such as a lack of donors, a difficult harvesting procedure, and reduced numbers of MSCs with age [17]. We have shown that MSCs from alternative sources such as UCB and PL have morphologic and immunophenotypic characteristics and differentiation capacities similar to those of BM-MSCs [18]. Several authors have reported the immunosuppressive effects of BM-MSCs [1,2,4,8,10,11,22]; however, it is little known whether UCB-MSCs and PL-MSCs shared the immunosuppressive properties of BM-MSCs and could thus be considered as alternative sources of MSCs for clinical protocols. Some studies of MSCs from adult [BM and adipose tissue (AT)] and neonatal sources (UCB and PL) have compared different characteristics regarding morphology, expansion potential, multiple differentiation capacity, immunophenotype, and hematopoietic support capacity. No significant differences concerning the morphology, immunophenotype, osteogenic, and chondrogenic differentiation capacity were observed [18,40], however, UCB-MSCs showed no adipogenic differentiation capacity but in contrast showed higher proliferation capacity than BM-MSCs and AT-MSCs, whereas BM-MSCs possessed the shortest culture period and the lowest proliferation capacity [40]. Further, both UCB-MSCs and BM-MSCs are superior to MSCs from AT for maintenance of primitive hematopoietic progenitor cells [41]. This study is the first to compare the immunosuppressive properties of BM-MSCs, UCB-MSCs, and PL-MSCs on an enriched population of CD3<sup>+</sup> T cells while under identical culture conditions.

MSCs from the three sources met the criteria established by the ISCT [29] with regard to immunophenotype, osteogenic, and chondrogenic differentiation capacities; however, as we have previously demonstrated [18], UCB-MSCs showed no adipogenic capacity, unlike BM-MSCs and PL-MSCs, a fact that has been corroborated by other research groups [40]; further, we observed that PL-MSCs has a lower adipogenic capacity than BM-MSCs. Interestingly, MSCs from both neonatal sources do not show the same adipogenic capacity than those from adult source, this aspect could be related to the fact that in adult stage adipocytes formation is increased in BM and therefore BM-MSCs from adults would have higher tendency toward adipogenic lineage compared with MSCs from neonatal sources, which could be predisposed to regenerate supporting tissues (bone and cartilage) important for such developmental stage; this hypothesis is supported by previous studies that suggest differences in adipogenic capacity between MSCs from children and adults [42].



**FIG. 7.** BM-MSCs and UCB-MSCs induce the generation of T-cell subsets displaying a regulatory phenotype. Anti-CD3/CD28-activated CD3<sup>+</sup> T cells were cocultured in the absence or presence of BM-MSCs, UCB-MSCs, or PL-MSCs at a 1:1 ratio of MSCs:T cells. Cocultures were performed with cell-cell contact (*black bars*). The percentages of the CTLA-4<sup>+</sup> and CTLA-4<sup>high</sup> populations and the fold changes in the CTLA-4 MFI were determined in the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> population after 3 days of culture. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> T cells detected in activated T cells cultured in absence of MSCs were considered as control (Control, *gray bars*). (A) Representative dot plots from an experiment. (B) Data are shown as the mean ± SEM of the percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, (C) fold changes in the CTLA-4 MFI in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> cells and (D) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>high</sup> cells. Control *n* = 4, BM-MSCs *n* = 4, UCB-MSCs *n* = 4, and PL-MSCs *n* = 4 (Individual experiments). \*Indicates a statistically significant difference with *P* < 0.05.

Most previous studies analyzed the immunosuppressive capacity of BM-MSCs and other alternative sources such as amnions, PL, Wharton’s jelly, and umbilical cord on allo-antigen or PHA-activated PBMC [4,8,12,13,43]. These studies are important because MSCs act on many of the leukocyte subsets involved directly or indirectly in regulating the immune response in vivo [2,3,24,44]. However, few studies have analyzed BM- and PL-MSCs-mediated immunosuppression on CD3<sup>+</sup> T-cell-enriched populations [10,14,25,45], which is important in the context of GVHD, because they are the major effector cells in this disease [39]. Additionally, the immunosuppressive effects of UCB-MSCs on this T-cell population remain unknown. To assess this, we analyzed the immunosuppressive effects of MSCs from the three sources on the proliferation of a CD3<sup>+</sup> T-cell-enriched population. We noted that BM-MSCs, UCB-MSCs, and to a lesser extent PL-MSCs, suppressed the proliferation of anti-CD3/CD28-activated CD3<sup>+</sup> T cells only in the presence of direct contact between the two cell populations;

similar results were previously obtained with mouse BM-MSCs [23]. Moreover, several studies have reported that a lack of cellular contact affects MSCs-mediated immunosuppression because the reduction of activated T-cell proliferation was less apparent [8,20–22,30,46,47].

Despite evidence of the importance of cell contact in MSCs immunosuppression, little is known about mechanisms involved in this process. In this regard it has been shown that expression of adhesion molecules ICAM-I and VCAM-I on MSCs decline proliferation of splenocytes activated with anti-CD3 antibodies [48] and further, both adhesion molecules have the capacity to induce CTLA-4 expression on T cells [49], which is involved in inhibition of T-cell proliferation [33,34]. In addition, cell contact between MSCs and T cells increase expression of IL-10, HLA-G1, and HLA-G5 immunosuppression molecules [7,8,19,21], which are involved in the inhibition of T-cell proliferation. It appears that HLA-G1, whose expression is increased on MSCs cocultured with activated T cells [21], is the molecule

responsible to stimulate initial secretion of IL-10, which stimulate HLA-G5 secretion in MSCs and through a positive feedback mechanism stimulate secretion of IL-10. In fact, it has been shown that increase in HLA-G5 secretion is more evident in cell contact [8].

When we examined whether CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell populations are equally affected by MSCs from the three sources, we found that BM-MSCs and UCB-MSCs significantly reduced the proliferation of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, whereas PL-MSCs only reduced the proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells. These observations are consistent with previous research, in which BM-MSCs and UCB-MSCs were found to have similar immunosuppressive capacities on PBMC in MLR and PHA activation assays [30,50]. Similarly, Chang et al. [35] used an alloantigen-activated PBMC model to demonstrate that PL-MSCs more efficiently suppressed the proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells relative to CD8<sup>+</sup> T cells. Our results demonstrate for the first time that under identical culture conditions, BM-MSCs and UCB-MSCs have a greater potential for CD3<sup>+</sup> T-cell immunosuppression than PL-MSCs. Similar results were obtained from MSCs from Wharton's jelly, which decline proliferation of PHA-activated PBMC similar to those of BM-MSCs [51].

The observed inhibited T-cell proliferation might be related to the downregulation of activation markers such as CD25, CD69, and CTLA-4. Several studies have described the effect of BM-MSCs on the expression of these molecules [4,10,12,24]; however, it is not known whether UCB-MSCs and PL-MSCs have a similar effect. We found that MSCs from the three sources did not affect CD25 and CD69 expression on activated CD3<sup>+</sup> T cells, which was consistent with previous reports from BM-MSCs [4,12].

Meanwhile, we noted that BM-MSCs and UCB-MSCs did not affect CTLA-4 expression at 24 h, unlike PL-MSCs, which significantly decreased CTLA-4 expression. It was previously demonstrated that BM-MSCs do not affect CTLA-4 in activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell-enriched populations [4], which is consistent with our results. The CTLA-4 expression trends, which were first observed at 24 h of culture with MSCs from the three sources, were most evident after 3 days of culture; this effect was only observed in cell-contact cocultures, wherein we found significant increases in CTLA-4 expression in activated CD4<sup>+</sup> T cells in the presence of BM-MSCs and UCB-MSCs, but not PL-MSCs. It is noteworthy that the increased CTLA-4 expression is consistent with the greater ability of both the BM-MSCs and UCB-MSCs to reduce T-cell proliferation; this suggests the involvement of CTLA-4<sup>+</sup> Tregs populations in this inhibitory process.

Because we observed reduced T-cell proliferation only in the cell-contact cocultures, we assumed that PD-L1, a molecule involved in MSC-mediated immunosuppression through a cell contact-dependent mechanism [20], might be upregulated on MSCs. Our results demonstrated that cocultured MSCs from the 3 sources had increased PD-L1 expression levels regardless of cell contact. Similar results have been observed in BM-MSCs [20], PL-MSCs [35], and Wharton's jelly [47]; however, this is the first study to show this increase in UCB-MSCs.

IFN $\gamma$  can act as an immunosuppressive cytokine and as such, is capable of directly inhibiting proliferation and inducing T-cell apoptosis [37,52], stimulating the synthesis of

immunosuppressive molecules such as IDO, PGE<sub>2</sub>, and PD-L1 in MSCs [1,2,20], and facilitating the immunosuppressive properties of MSCs [4,5,53,54]. Thus, we decided to analyze IFN $\gamma$  expression in our cocultures with and without cell contact. We detected significant increases in the IFN $\gamma$  concentrations in the supernatants from cell contact cocultures in the presence of MSCs derived from the three sources, which is correlated with the increase observed in PD-L1 expression in this culture condition. Interestingly, we also observed increased PD-L1 expression levels in the cocultures regardless of cell contact, which is likely because, even at low concentrations, IFN $\gamma$  can stimulate PD-L1 expression on MSCs, as previously demonstrated in BM-MSCs and umbilical cord-MSCs [47,55]. It is worth mentioning that in PL-MSCs cocultures, IFN $\gamma$  might stimulate the secretion of IDO [35], an enzyme that depletes tryptophan and subsequently promotes the inhibition of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation; however, it has been suggested that CD8<sup>+</sup> T cells are more resistant to IDO-mediated immunosuppression than CD4<sup>+</sup> T cells [56,57], which might explain why we observed reduced CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation in the PL-MSCs cocultures. Unlike PL-MSCs, in BM-MSCs and UCB-MSCs cocultures, besides participation of PD-L1, other molecules and immunosuppressor populations seem to be involved. These results suggest that IFN $\gamma$  and PD-L1 are not the only molecules that are involved in the immunosuppressor effect of MSCs from the three sources. Our results seem to contradict previous reports in which the presence of MSCs from BM, UCB, PL, AT, and Wharton's jelly, either did not affect or decrease IFN $\gamma$  secretion by activated T cells [20,45,58,59]; however, it was recently reported that MSCs-mediated effects on IFN $\gamma$  secretion depend on the T-cell source and the type of activation and the presence of MSCs even favor the secretion of IFN $\gamma$  by CD3<sup>+</sup> T cells activated with anti-CD3/CD28 [14].

All of these results support our observations in which MSCs increase IFN $\gamma$  secretion through contact with activated T cells; apparently, this correlates with reduced T-cell proliferation, in which PD-L1 could actively participate by cell contact, as previously demonstrated in BM-MSCs and PL-MSCs [20,52]. The IFN $\gamma$ -mediated regulation of PD-L1 and its involvement in immunosuppression mediated by UCB-MSCs are ongoing studies in our laboratory.

Similarly, the decreased proliferation observed in the cocultures could be related to the presence of immunosuppressive cytokines. It has been shown that the activation of T cells in the presence of BM-MSCs reduces the secretion of Th1 proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ ) and induces the secretion of Th2 anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) [2]. Further, IFN $\gamma$ , along with TNF $\alpha$ , increases MSCs-mediated immunosuppression by favoring the secretion of immunosuppressive molecules such as PGE<sub>2</sub> [2,4]. Therefore, along with the IFN $\gamma$  secretion patterns in our cocultures, we also analyzed TNF $\alpha$ , IL-10, and IL-4 secretion. The results revealed no significant increases in levels of IL-4; it suggests that a Th2 type response is not generated, however, we observed a decrease in secretion of TNF $\alpha$  in cocultures in presence of BM-MSCs and UCB-MSCs, which suggest that Th1 type response could be decreased as has been previously shown [2]. Moreover, we observed a significant increase in IL-10 secretion in the cell-contact

cocultures with BM-MSCs and UCB-MSCs and interestingly we did not observe changes in TNF $\alpha$  and IL-10 secretion patterns in cocultures with PL-MSCs, which are related to their low immunosuppressive potential.

Through antibody studies, it has been shown that IL-10 is important in BM-MSC-mediated immunosuppression; this cytokine is also involved in Tregs generation [5,8]. Previous reports have shown that the inhibition of cell contact between BM-MSCs and T cells affects IL-10 secretion [7,8,19]. Thus in our system, BM-MSCs and UCB-MSCs-mediated immunosuppression through cell contact could be facilitated by similar mechanisms because both types of MSCs promoted CTLA-4 expression on CD4<sup>+</sup> T cells and increased IL-10 and IFN $\gamma$  concentrations in the coculture supernatants; in contrast, such results were not observed in the PL-MSCs cocultures. Moreover, IFN $\gamma$  stimulates PGE<sub>2</sub> secretion from MSCs. PGE<sub>2</sub> is an important lipid factor in the MSCs-mediated immunosuppression of T cells because it decreases T-cell proliferation, stimulates IL-4 and IL-10 secretion, and promotes adaptive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs generation [36]. We detected increased PGE<sub>2</sub> concentrations in cell-contact cocultures with BM-MSCs and UCB-MSCs. Apparently, the observed increases in PGE<sub>2</sub> might be due to IFN $\gamma$ , as previously suggested by studies of BM-MSCs [2,5,11]; however, no increase in PGE<sub>2</sub> was observed in PL-MSCs cocultures, which indicates that IFN $\gamma$  is not the only molecule that induce PGE<sub>2</sub> secretion; thus, probably TGF- $\beta$  and epidermal growth factor could be secreted and participate in such an induction, as previously demonstrated in amnion cells [60]. Currently, the role of PGE<sub>2</sub> in PL-MSCs-mediated immunosuppression remains unpublished, and our results suggest that PGE<sub>2</sub> might be involved in immunosuppression mediated by BM-MSCs and UCB-MSCs but not by PL-MSCs. Similarly, previous reports have shown the role of PGE<sub>2</sub> in Wharton's jelly-MSCs-mediated immunosuppression [61].

Because we observed high concentrations of IFN $\gamma$ , IL-10, and PGE<sub>2</sub> in the cell-contact cocultures with BM-MSCs and UCB-MSCs, and because these mediators favor Tregs generation [8,9,37], we decided to determine the presence of Tregs in our cocultures. We did not detect any increases in the generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> with any of the MSCs types; however, we did observe significant increases in the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> T-cell subsets displaying a regulatory phenotype in BM-MSCs and UCB-MSCs cocultures; this latter finding is consistent with previous studies [6,50]. To our knowledge, this is the first study to analyze the ability of PL-MSCs to induce Tregs generation, and we observed that under our conditions, these cells are unable to generate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> T-cell subsets displaying a regulatory phenotype; this finding is consistent with the reduced ability of these cells to suppress T-cell proliferation in our study. CTLA-4 has been suggested to induce IDO expression in CD4<sup>+</sup> T cells; this might have occurred in our system because this effect is IFN $\gamma$ -dependent [57], and we detected increased amounts of IFN $\gamma$  in the cocultures that also generated T-cell subsets displaying a regulatory phenotype.

MSCs-mediated immunosuppression through the involvement of Tregs has been recently demonstrated. In an in vivo model of arteriosclerosis transplant, it was demonstrated that local administration of BM-MSCs prevents the disease condition by increasing the local concentrations of IFN $\gamma$  and

IL-10, cytokines produced by Tregs like T<sub>R</sub>1 [62]. Further in vitro studies showed that the presence of BM-MSCs favors the generation of T<sub>R</sub>1, which have an IL-10<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> phenotype [28]. Our laboratory is currently determining whether these Tregs are generated in our cultures and their participation in MSCs-mediated immunosuppression.

Although we found differences between PL-MSCs and BM-MSCs, it seems that the immunosuppression potential is not related with age, because such potential was similar between UCB-MSCs and BM-MSCs. Nevertheless, it has been shown that during aging principally three aspects in MSCs are affected: (1) proliferation, (2) differentiation capacity, and (3) genome stability [63], which influence MSCs quality, although it has suggested that decline in tissue regeneration capacity during aging may be in part due to MSCs present in such tissues [17,64]. Our results suggest that immunosuppression capacity is not affected by age.

In summary, our study shows that PL-MSCs possess less immunosuppressive potential than do BM-MSCs and UCB-MSCs, however for the three sources, T-cell contact is essential for immunosuppression process. Unlike PL-MSCs, BM-MSCs and UCB-MSCs reduce both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation, increase IL-10 and PGE<sub>2</sub> expression and induce generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> T-cell subsets displaying a regulatory phenotype. Interestingly, BM-MSCs and UCB-MSCs have similar immunosuppressive properties. To our knowledge, this is the first study in which the immunosuppressive properties of MSCs from BM, UCB, and PL are compared under identical culture conditions, using a CD3<sup>+</sup> T-cell-enriched population. Our results suggest that UCB-MSCs, rather than PL-MSCs, would be a good alternative to BM-MSCs in cell therapy protocols for the treatment of immunological diseases such as GVHD, graft rejection, or autoimmune diseases.

### Acknowledgments

We thankfully acknowledge the excellent technical assistance of Martina Flores Jiménez, Guadalupe Alarcón Santos, Erika Hernández Estévez, Karina Estrada González, Ileana Mondragón García, Juan de Dios Moreno Alvarez, Luis Chávez Sánchez, Rosana Pelayo Camacho, and Lourdes Andrea Arriaga Pizano. Grant Sponsor: we are indebted to CONACYT for support to J.J.M.M. (grant no. 87183) and IMSS support to J.J.M.M. (grant no. 1159) and A.M.G (grant no. 1014) are gratefully acknowledged. This article constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM). Marta E. Castro-Manreza acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) and the Graduate Program in Biological Sciences of UNAM for the training received during the studies.

### Author Disclosure Statement

The authors declare that they have no competing financial interests.

### References

1. Meisel R, A Zibert, M Laryea, U Gobel, W Daubener and D Dilloo. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit

- allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103:4619–4621.
2. Aggarwal S and MF Pittenger. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815–1822.
  3. Jiang XX, Y Zhang, B Liu, SX Zhang, Y Wu, XD Yu and N Mao. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105:4120–4126.
  4. Krampera M, L Cosmi, R Angeli, A Pasini, F Liotta, A Andreini, V Santarlasci, B Mazzinghi, G Pizzolo, et al. (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:386–398.
  5. Ryan JM, F Barry, JM Murphy and BP Mahon. (2007). Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 149:353–363.
  6. Maccario R, M Podestà, A Moretta, A Cometa, P Comoli, D Montagna, L Daudt, A Ibatci, G Piaggio, et al. (2005). Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4<sup>+</sup> T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 90:516–525.
  7. Prevosto C, M Zancolli, P Canevali, MR Zocchi and A Poggi. (2007). Generation of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica* 92:881–888.
  8. Selmani Z, A Naji, I Zidi, B Favier, E Gaiffe, L Obert, C Borg, P Saas, P Tiberghien, et al. (2008). Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem Cells* 26:212–222.
  9. English K, JM Ryan, L Tobin, MJ Murphy, FP Barry and BP Mahon. (2009). Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4<sup>+</sup> CD25(High) forkhead box P3 + regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 156:149–160.
  10. Le Blanc K, I Rasmusson, C Gotherstrom, C Seidel, B Sundberg, M Sundin, K Rosendahl, C Tammik and O Ringden. (2004). Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 60:307–315.
  11. Rasmusson I, O Ringden, B Sundberg and K Le Blanc. (2005). Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 305:33–41.
  12. Ramasamy R, CK Tong, HF Seow, S Vidyadaran and F Dazzi. (2008). The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol* 251:131–136.
  13. Najar M, G Raicevic, HI Boufker, KH Fayyad, BC De, N Meuleman, D Bron, M Toungouz and L Lagneaux. (2010). Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: combined comparison of adipose tissue, Wharton's jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol* 264:171–179.
  14. Kronsteiner B, S Wolbank, A Peterbauer, C Hackl, H Redl, M van Griensven and C Gabriel. (2011). Human mesenchymal stem cells from adipose tissue and amnion influence T-cells depending on stimulation method and presence of other immune cells. *Stem Cells Dev* 20:2115–2026.
  15. Kuzmina LA, NA Petinati, EN Parovichnikova, LS Lubimova, EO Gribanova, TV Gaponova, IN Shipounova, OA Zhironkina, AE Bigildeev, et al. (2012). Multipotent mesenchymal stromal cells for the prophylaxis of acute graft-versus-host disease—a phase II study. *Stem Cells Int* 2012:968213.
  16. Philippe B, S Luc, PB Valérie, R Jérôme, BR Alessandra and C Louis. (2010). Culture and use of mesenchymal stromal cells in phase I and II clinical trials. *Stem Cells Int* 2010:503593.
  17. Caplan AI. (2009). Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 217:318–324.
  18. Montesinos JJ, E Flores-Figueroa, S Castillo-Medina, P Flores-Guzmán, E Hernández-Estévez, G Fajardo-Orduña, S Orozco and H Mayani. (2009). Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy* 11:163–176.
  19. Augello A, R Tasso, SM Negrini, A Amateis, F Indiveri, R Cancedda and G Pennesi. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 35:1482–1490.
  20. Sheng H, Y Wang, Y Jin, Q Zhang, Y Zhang, L Wang, B Shen, S Yin, W Liu, L Cui and N Li. (2008). A critical role of IFN-gamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res* 18:846–857.
  21. Giuliani M, M Fleury, A Vernochet, F Ketrrousi, D Clay, B Azzarone, JJ Lataillade and A Durrbach. (2011). Long-lasting inhibitory effects of fetal liver mesenchymal stem cells on T-lymphocyte proliferation. *PLoS One* 6:e19988.
  22. Di Nicola M, C Carlo-Stella, M Magni, M Milanese, PD Longoni, P Matteucci, S Grisanti and AM Gianni. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99:3838–3843.
  23. Xu G, L Zhang, G Ren, Z Yuan, Y Zhang, RC Zhao and Y Shi. (2007). Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Res* 17:240–248.
  24. Groh ME, B Maitra, E Szekeley and ON Koc. (2005). Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol* 33:928–934.
  25. Di Ianni M, B Del Papa, M De Ioanni, L Moretti, E Bonifacio, D Cecchini, P Sportoletti, F Falzetti and A Tabilio. (2008). Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol* 36:309–318.
  26. Ghannam S, J Pene, G Torcy-Moquet, C Jorgensen and H Yssel. (2010). Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol* 185:302–312.
  27. Mouggiakakos D, R Jitschin, CC Johansson, R Okita, R Kiessling and K Le Blanc. (2011). The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells. *Blood* 117:4826–4835.
  28. Hsu WT, CH Lin, BL Chiang, HY Jui, KK Wu and CM Lee. (2013). Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10 + IFN- $\gamma$  + CD4<sup>+</sup> regulatory T cells

- to control transplant arteriosclerosis. *J Immunol* 190:2372–2380.
29. Dominici M, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, F Marini, D Krause, R Deans, A Keating, Dj Prockop and E Horwitz. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315–317.
  30. Wang M, Y Yang, D Yang, F Luo, W Liang, S Guo and J Xu. (2009). The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Immunology* 126:220–232.
  31. CD Li, WY Zhang, HL Li, XX Jiang, Y Zhang, PH Tang and N Mao. (2005). Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation. *Cell Res* 15:539–547.
  32. Wang M, D Windgassen and ET Papoutsakis. (2008). Comparative analysis of transcriptional profiling of CD3+, CD4+ and CD8+ T cells identifies novel immune response players in T-cell activation. *BMC Genomics* 9:225.
  33. Wing K, T Yamaguchi and S Sakaguchi. (2011). Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol* 32:428–433.
  34. Jago CB, J Yates, NO Câmara, RI Lechler and G Lombardi. (2004). Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clin Exp Immunol* 136:463–471.
  35. Chang CJ, ML Yen, YC Chen, C Chien, HI Huang, CH Bai and BL Yen. (2006). Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. *Stem Cells* 24:2466–2477.
  36. Kalinski P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* 188:21–28.
  37. Feng G, W Gao, TB Strom, M Oukka, RS Francis, KJ Wood and A Bushell. (2008). Exogenous IFN-gamma *ex vivo* shapes the alloreactive T-cell repertoire by inhibition of Th17 responses and generation of functional Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 38:2512–2527.
  38. Wing K and S Sakaguchi. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 11:7–13.
  39. Duffner UA, Y Maeda, KR Cooke, P Reddy, R Ordemann, C Liu, JL Ferrara and T Teshima. (2004). Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 172:7393–7398.
  40. Kern S, H Eichler, J Stoeve, H Klüter and K Bieback. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24:1294–1301.
  41. Wagner W, C Roderburg, F Wein, A Diehlmann, M Frankhauser, R Schubert, V Eckstein and AD Ho. (2007). Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 25:2638–2647.
  42. Muraglia A, R Cancedda and R Quarto. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113:1161–1166.
  43. Manochantr S, Y U-pratya, P Kheolamai, S Rojphisan, M Chayosumrit, C Tantrawatpan, A Supokawej and S Issaragrisil. (2013). Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord. *Intern Med J* 43: 430–439.
  44. Cutler AJ, V Limbani, J Girdlestone and CV Navarrete. (2010). Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells modulate monocyte function to suppress T cell proliferation. *J Immunol* 185:6617–6623.
  45. Luan X, G Li, G Wang, F Wang and Y Lin. (2013). Human placenta-derived mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation and support the culture expansion of cord blood CD34<sup>+</sup> cells: a comparison with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* 45: 32–38.
  46. Li CD, WY Zhang, HL Li, XX Jiang, Y Zhang, PH Tang and N Mao. (2005). Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation. *Cell Res* 15:539–547.
  47. Tipnis S, C Viswanathan and AS Majumdar. (2010). Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunol Cell Biol* 88:795–806.
  48. Ren G, X Zhao, L Zhang, J Zhang, A L'Huillier, W Ling, AI Roberts, AD Le, S Shi, C Shao and Y Shi. (2010). Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 184:2321–2328.
  49. Damle NK, K Klussman, G Leytze, S Myrdal, A Aruffo, JA Ledbetter and PS Linsley. (1994). Costimulation of T lymphocytes with integrin ligands intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 induces functional expression of CTLA-4, a second receptor for B7. *J Immunol* 152:2686–2697.
  50. Avanzini MA, ME Bernardo, AM Cometa, C Perotti, N Zaffaroni, F Novara, L Visai, A Moretta, C Del Fante, et al. (2009). Generation of mesenchymal stromal cells in the presence of platelet lysate: a phenotypic and functional comparison of umbilical cord blood- and bone marrow-derived progenitors. *Haematologica* 94:1649–1660.
  51. Prasanna SJ, D Gopalakrishnan, SR Shankarand and AB Vasandan. (2010). Pro-inflammatory cytokines, IFN-gamma and TNF-alpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* 5:e9016.
  52. Lu Y and EK Waller. (2009). Dichotomous role of interferon-gamma in allogeneic bone marrow transplant. *Biol Blood Marrow Transplant* 15:1347–1353.
  53. Polchert D, J Sobinsky, G Douglas, M Kidd, A Moadsiri, E Reina, K Genrich, S Mehrotra, S Setty, B Smith and A Bartholomew. (2008). IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol* 38:1745–1755.
  54. Deuse T, M Stubbendorff, K Tang-Quan, N Phillips, MA Kay, T Eiermann, TT Phan, HD Volk, H Reichenspurner, RC Robbins and S Schrepfer. (2011). Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 20: 655–667.
  55. Mourez R, M François, MN Boivin, J Stagg and J Galipeau. (2007). Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J Immunol* 179: 1549–1558.
  56. Jones BJ, G Brooke, K Atkinson and SJ McTaggart. (2007). Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells. *Placenta* 28: 1174–1181.

57. Boasso A, JP Herbeuval, AW Hardy, C Winkler and GM Shearer. (2005). Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. *Blood* 105:1574–1581.
58. Yoo KH, IK Jang, MW Lee, HE Kim, MS Yang, Y Eom, JE Lee, YJ Kim, SK Yang, et al. (2009). Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol* 259:150–156.
59. Chiesa S, S Morbelli, S Morando, M Massollo, C Marini, A Bertoni, F Frassoni, ST Bartolomé, G Sambuceti, E Traggiai and A Uccelli. (2011). Mesenchymal stem cells impair *in vivo* T-cell priming by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:17384–17389.
60. Kniss DA, PD Zimmerman, RH Fertel and JD Iams. (1993). Transforming growth factor-beta potentiates epidermal growth factor-induced prostaglandin E2 production in amnion cells. *Prostaglandins* 45:27–33.
61. Chen K, D Wang, WT Du, ZB Han, H Ren, Y Chi, SG Yang, D Zhu, F Bayardand and ZC Han. (2010). Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin Immunol* 135:448–458.
62. Jui HY, CH Lin, WT Hsu, YR Liu, RB Hsu, BL Chiang, WY Tseng, MF Chen, KK Wu and CM Lee. (2012). Autologous mesenchymal stem cells prevent transplant arteriosclerosis by enhancing local expression of interleukin-10, interferon- $\gamma$ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Cell Transplant* 21:971–984.
63. Wagner W, S Bork, P Horn, D Kronic, T Walenda, A Diehlmann, V Benes, J Blake, FX Huber, et al. (2009). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One* 4:e5846.
64. Raggi C and AC Berardi. (2012). Mesenchymal stem cells, aging and regenerative medicine. *Muscles Ligaments Tendons J* 2:239–242.

Address correspondence to:  
 Juan José Montesinos, PhD  
 Mesenchymal Stem Cells Laboratory  
 Oncology Research Unit  
 Oncology Hospital  
 National Medical Center  
 IMSS  
 Cocheras No. 204  
 Colonia Metropolitana 1ra Sección,  
 Ciudad. Nezahualcóyotl  
 Estado de México 57730  
 México

E-mail: montesinosster@gmail.com

Received for publication August 3, 2013

Accepted after revision January 15, 2014

Prepublished on Liebert Instant Online XXXX XX, XXXX