



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

“ESTUDIO DEL EFECTO INMUNOSUPRESOR MEDIANTE LA SECRECIÓN DE TSG-6  
DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES AMNIÓTICAS HUMANAS SOBRE LA FORMACIÓN DE  
TRAMPAS EXTRACELULARES DEL NEUTRÓFILO”

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS  
PRESENTA:  
M en C. FÁTIMA SOFÍA MAGAÑA GUERRERO

DIRECTOR DE TESIS  
DR. YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR  
DRA. BLANCA HAYDÉ RUIZ ORDAZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA  
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ABRIL DE 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**Agradecimientos**

***Agradezco a mis padres, mis primeros maestros.***

***Agradezco a mis tutores todos sus comentarios y experiencia.***

***Agradezco a los amigos que trabajaron y estuvieron a mi lado y que me han brindado alegrías,  
haciendo cada momento más agradable.***

***Agradezco a cada uno de las personas que durante mi trayectoria contribuyeron a mi crecimiento personal, profesional y académico, lo que me ha permitido llegar al final de una etapa e inicio de un nuevo camino. Gracias***

***Agradecimiento especial***

*Este trabajo fue realizado con el financiamiento de CONACYT proyecto Ciencia Básica 167438, CONACYT-SALUD 273349, CONACYT PROBLEMAS NACIONALES 311; PAPIIT-DGAPA-UNAM: IN215617.*

*La alumna M en C. Fátima Sofía Magaña Guerrero con número de becario 406452 agradece el apoyo recibido de CONACYT para la realización de este trabajo.*

*Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica y en la Unidad Periférica de la Facultad de Medicina de la UNAM, Instituto de Oftalmología Fundación de asistencia Privada Conde de Valenciana IAP. Chimalpopoca #14 , Colonia Obrera. Delegación Cuauhtémoc. C.P. 06800. Ciudad de México.*

## Índice

1.	Resumen .....	1
2.	Abstract .....	2
3.	Abreviaturas .....	3
4.	Introducción .....	5
4.1	Las células troncales mesenquimales.....	5
4.1.2	Las células mesenquimales de membrana amniótica (hAMSC).....	6
4.2.	La proteína del gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral-alfa (TSG-6) .....	8
4.3	Los neutrófilos .....	10
4.3.1	Fagocitosis del neutrófilo. ....	12
4.3.2	Degranulación y producción de especies reactivas del oxígeno .....	13
4.3.3	Trampas extracelulares del neutrófilo (NET).....	14
4.4	Participación de las NET en el desarrollo de inflamación.....	17
5.	Antecedentes.....	20
6.	Planteamiento .....	24
7.	Pregunta .....	25
8.	Hipótesis .....	25
9.	Objetivo general .....	25
10.	Objetivos particulares.....	25
11.	Estrategia experimental .....	26
11.1	Declaraciones éticas .....	26
11.2	Obtención de las células mesenquimales amnióticas humanas .....	26
11.3	Caracterización de las células mesenquimales amnióticas humanas .....	27
11.3.1	Ensayo de generación de unidades formadoras de fibroblasto.....	27
11.3.2	Evaluación de la expresión de los marcadores de linaje mesenquimal por citometría de flujo .....	28
11.3.3	Inmunomarcaje de fluorescencia para los marcadores embrionarios Oct-4 y SSEA-4 .....	28
11.3.4	Diferenciación In vitro de las hAMSC .....	29
11.4	Purificación de PMN de médula ósea de ratón mediante inmunomagneto selección negativa .....	29
11.5	Evaluación de la presencia de TSG-6 en las hAMSC .....	30
11.5.1	Ensayos de RT-PCR.....	30
11.5.2	Secuenciación automatizada de ADN.....	31
11.5.3	Ensayos de Inmunofluorescencia .....	31

11.6 Silenciamiento del gen <i>tsg6</i> mediante siRNA en HAMSC.....	32
11.7 Preparación del medio condicionado (MC) de las hAMSC.....	33
11.8 Inducción de NET con lipopolisacárido en neutrófilos de ratón .....	34
11.9 Tinción de inmunofluorescencia de las NET.....	34
11.10 Cuantificación de neutrófilos con NET liberadas.....	35
11.11 Efecto del medio condicionado las hAMSC sobre la liberación de NET .....	35
11.13 Ensayo de reducción de azul de Nitrotetrazolio (NBT).....	36
11.14 Medición del potencial de membrana mitocondrial.....	37
11.15 Análisis estadístico.....	37
12. Resultados .....	38
12.1 Caracterización de las células mesenquimales amnióticas humanas (hAMSC) .....	38
12.2 Aislamiento y caracterización de neutrófilos de médula ósea de ratón .....	42
12.3 Efecto de los factores solubles de hAMSC sobre la formación de NET .....	44
12.4 Expresión y presencia constitutiva de TSG-6 en las hAMSC.....	48
12.5 Silenciamiento de la proteína TSG-6 en las hAMSC .....	49
12.6 Efecto del silenciamiento de TSG-6 en las hAMSC sobre la inhibición de NET .....	52
12.7 Inhibición de las NET con la proteína TSG6 recombinante humana (rhTSG6) .....	53
12.8 Efecto del MC y TSG-6 sobre el estallido respiratorio y generación de especies reactivas del oxígeno... ..	56
12.9 Efecto del MC y TSG-6 sobre el potencial de membrana mitocondrial .....	59
13. Discusión.....	62
14. Resumen Gráfico .....	72
15. Conclusión .....	73
16. Perspectivas.....	73
17. Bibliografía.....	74
18. Apéndice. Materiales y reactivos .....	82

## Índice de figuras

Figura 1. Anatomía de la membrana amniótica humana	7
Figura 2. Cambios nucleares y citoplasmáticos del neutrófilo durante la NETosis	16
Figura 3. Mecanismo de activación de la elastasa durante la formación de NET	17
Figure 4. La inyección intracameral de hAMSC disminuye la opacidad corneal y el infiltrado inflamatorio en un modelo de quemadura corneal	22
Figura 5. Factores solubles de las hAMSC inmunomodulan las funciones efectoras de los neutrófilos	23
Figura 6. Caracterización morfológica y fenotípica de las hAMSC	40
Figura 7. Las hAMSC tienen la capacidad de diferenciarse a hepatocitos y condrocitos	41
Figure 8. Aislamiento y caracterización de la fracción de células polimorfonucleares de médula ósea de ratón purificadas por inmuno-magneto selección negativa	43
Figura 9. Inducción de trampas extracelulares del neutrófilo (NET) con el estímulo de lipopolisacárido en polimorfonucleares aislados de médula ósea de ratón	46
Figura 10. Los factores solubles secretados por las hAMSC disminuyen la liberación de NET en neutrófilos murinos	47
Figura 11. La proteína del gen 6 estimulado por TNF-alfa (TSG-6) se expresa constitutivamente sobre hAMSC y se silencia mediante siRNA-TSG6	50
Figura 12. Secuenciación del transcrito para el gen tsg-6	51
Figura 13. El silenciamiento de la proteína TSG-6 en las hAMSC recupera la capacidad de liberación de NET en los neutrófilos de ratón	53
Figura 14. TSG-6 recombinante humano disminuye la liberación de NET	55
Figura 15. La disminución de la liberación de NET a través del MC y TSG-6 es dependiente de ROS	58
Figura 16. El mecanismo de inhibición de TSG-6 afecta el potencial de membrana mitocondrial de los neutrófilos de ratón	60

## 1. Resumen

Las células mesenquimales amnióticas humanas (hAMSC) son capaces de secretar diversos factores inmunomoduladores, uno de los cuales podría ser la proteína TSG-6. Las características inmunomoduladoras descritas para las células mesenquimales (MSC) las hacen un buen candidato para su uso en la terapia antiinflamatoria. Las NET son redes liberadas por los neutrófilos compuestas de fibras de DNA extracelular mezcladas con componentes granulares; la función de las NET es delimitar zonas de inflamación y eliminar patógenos. Aunque las NET son un mecanismo de defensa, la liberación y exposición de sus componentes está relacionada con el origen de autoinmunidad y la persistencia de procesos inflamatorios. La proteína TSG-6 es una molécula antiinflamatoria que inhibe la migración de los neutrófilos por lo que podría suprimir la liberación de NET en el neutrófilo. Por lo anterior, en el presente trabajo se obtuvieron y caracterizaron las hAMSC y se evaluó el efecto *in vitro* del factor soluble TSG-6 de las hAMSC sobre la liberación de NET en neutrófilos de ratón.

Las hAMSC se obtuvieron del amnios de membranas donadas voluntariamente y se caracterizaron de acuerdo a los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de la Terapia Celular (ISCT). El efecto del factor soluble TSG-6 de las hAMSC sobre la liberación de NET en neutrófilos estimulados con LPS (N-LPS) se evaluó específicamente con la proteína recombinante y utilizando un sistema de silenciamiento de la proteína con un RNA de interferencia.

Las hAMSC aisladas presentaron una morfología fibroblastoide, así como la capacidad de generar colonias y el potencial de diferenciación a otros linajes celulares; fueron positivas a los marcadores embrionarios SSEA-4 y OCT-4; y expresaron el inmunofenotipo CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. Los factores solubles de las hAMSC disminuyeron significativamente ( $\geq 50\%$ ;  $p < 0.05$ ) la liberación de NET respecto a los N-LPS. Las hAMSC expresaron de manera constitutiva a nivel transcripcional y proteico la molécula TSG-6. El silenciamiento de TSG-6 en las hAMSC, redujo en un 20% el efecto inhibitorio del medio condicionado (MC) sobre la liberación de NET. La proteína recombinante TSG-6 redujo hasta un 50% las NET liberadas en los neutrófilos respecto a N-LPS ( $p < 0.05$ ). El mecanismo de inhibición de TSG-6 sobre las NET depende de la disminución de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y de la alteración del potencial de membrana mitocondrial. Los neutrófilos estimulados con LPS y cultivados con el MC de las hAMSC, disminuyeron en un 30% la producción de anión superóxido, respecto a los N-LPS ( $p < 0.05$ ); la producción de anión superóxido se restauró en un 20% en los neutrófilos estimulados con LPS y cultivados con el MC de las hAMSC silenciadas para la expresión de la proteína TSG-6. Se encontró la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) en un 20% y 50%, respectivamente en los neutrófilos cultivados con el MC de las hAMSC y con la proteína recombinante TSG-6; en comparación, la pérdida del  $\Delta\psi_m$  se redujo un 10% en los neutrófilos que se cultivaron con el MC de las hAMSC silenciadas. Las hAMSC expresan y secretan la proteína inmunomoduladora TSG-6, la cual tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación de NET en neutrófilos murinos a través de un mecanismo dependiente de la reducción de ROS y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial.

## 2. Abstract

Human amniotic mesenchymal cells (hAMSC) are able to secrete various immunomodulatory factors, one of which is the TSG-6 protein. The immunoregulatory properties of mesenchymal stem cells (MSC) make them a good candidate for their use in anti-inflammatory therapies. NETs are networks released by neutrophils composed of extracellular DNA fibers mixed with granular components; the function of NETs is to delimit zones of inflammation and eliminate pathogens. Although the NETs are a mechanism of defense, the release and exposure of its components is related to the origin of autoimmunity and the persistence of inflammatory processes. In particular, the TSG-6 protein is known to be an anti-inflammatory molecule that inhibits the neutrophil migration; so it could suppress the release of NETs into the neutrophils. Therefore in the present work, human amniotic MSC (hAMSC) were obtained and characterized; in addition the *in vitro* effect of the soluble factor TSG-6 of hAMSC over the release of NETs in mouse neutrophils was evaluated.

The hAMSC were obtained from amnions of volunteer donated membranes and were characterized according to the minimum criteria established by the International Society of Cell Therapy (ISCT). The effect of the soluble factor TSG-6 on the release of NETs of stimulated neutrophils with LPS (N-LPS) was specifically assessed, using the conditional medium (MC) from hAMSC and a silencing system for the TSG-6 protein with an interference RNA together with the effect of the recombinant protein.

Isolated hAMSC showed fibroblastoid morphology, as well as the ability to generate colonies and the potential for differentiation to other cell lines; were positive to the embryonic markers SSEA-4 and OCT-4; and expressed the immunophenotype CD105 +, CD73 +, CD90 +, CD29 +, CD44 +, CD34- and CD45-. The soluble factors of the hAMSC significantly decreased ( $\geq 50\%$ ,  $p < 0.05$ ) the release of NETs respect to the N-LPS. The hAMSC constitutively expressed the gene and the protein TSG-6. The silencing of TSG-6 in the hAMSC reduced 20% the inhibitory effect of MC on the release of NETs. The recombinant protein TSG-6 reduced by up to 5% the percentage of NETs released on neutrophils respect to N-LPS ( $p < 0.05$ ). The neutrophils stimulated with LPS and cultured with the MC of the hAMSC, decreased the production of superoxide anion by 30%, respect with the N-LPS ( $p < 0.05$ ); superoxide anion production was restored by 20% in neutrophils stimulated with LPS and cultured with the MC of the hAMSC silenced for the expression of TSG-6. The loss of the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) was found in 20% and 50%, respectively, in the neutrophils cultured with the MC of the hAMSC and with the recombinant protein TSG-6; in comparison, the loss of  $\Delta\psi_m$  was reduced by 10% in the neutrophils that were cultured with the MC of the silenced hAMSC.

The hAMSC express and secrete the immunomodulatory protein TSG-6, this protein has an inhibitory effect on the release of NETs in murine neutrophils. The inhibitory effect of TSG-6 is due to a mechanism dependent on the reduction of ROS and the loss of mitochondrial membrane potential.



### 3. Abreviaturas

<b>CD-</b>	<i>Conjunto de Diferenciación</i>
<b>CR-</b>	<i>Receptor del Complemento</i>
<b>CXCL-</b>	<i>Quimiocina Ligando con motivo (C-X-C)</i>
<b>CXCR-</b>	<i>Receptor de la Quimiocina Ligando con motivo (C-X-C)</i>
<b>DAMP's</b>	<i>Patrones moleculares asociados a daño</i>
<b>DNA</b>	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
<b>ELISA</b>	<i>Inmuno-ensayo Absorbente Ligado a Enzima</i>
<b>FACS</b>	<i>Separación de células activada por fluorescencia</i>
<b>Fc<math>\gamma</math>R</b>	<i>Receptor de la Fracción cristalizable gamma</i>
<b>Fc<math>\gamma</math></b>	<i>Fracción cristalizable gamma</i>
<b>fmlp</b>	<i>Metil-formil-leucil péptido</i>
<b>GTPase</b>	<i>Trifosfatasa de Guanosina</i>
<b>hAMSC</b>	<i>Células Mesenquimales Amnióticas humanas</i>
<b>HLA-</b>	<i>Antígeno Leucocitario Humano</i>
<b>HMGB1</b>	<i>Proteína B1 del Grupo de Alta Movilidad</i>
<b>ICAM-</b>	<i>Molécula de adhesión intracelular</i>
<b>IDO</b>	<i>Dioxigenasa 2,3 indolamina</i>
<b>Ig-</b>	<i>Inmunoglobulina</i>
<b>IL-</b>	<i>Interleucina</i>
<b>INF-</b>	<i>Interferón</i>
<b>INF-R</b>	<i>Receptor para Interferón</i>
<b>LFA-1</b>	<i>Antígeno 1 asociado a la Función Leucocitaria</i>
<b>LL-37</b>	<i>Residuos Leucina-Leucina 37 aminoácidos</i>
<b>MAC-1</b>	<i>Antígeno del Macrófago-1</i>
<b>MACS</b>	<i>Separación de células activada por imán</i>

<b>MHC-</b>	<i>Complejo Principal de Histocompatibilidad</i>
<b>MMP-</b>	<i>Metaloproteasa</i>
<b>MPO</b>	<i>Mieloperoxidasa</i>
<b>MSC</b>	<i>Células mesenquimales</i>
<b>NETs</b>	<i>Trampas extracelulares del neutrófilo</i>
<b>Oct-4</b>	<i>Factor de transcripción 4 unido a octámero</i>
<b>PAMP's</b>	<i>Patrones moleculares asociados a patógenos</i>
<b>PAS</b>	<i>Tinción de ácido peryódico de Shiff</i>
<b>PG</b>	<i>Peptidoglicana</i>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	<i>Prostaglandina E2</i>
<b>PGSL-1</b>	<i>Ligando1 de la Glicoproteína P-Selectina</i>
<b>PI3K</b>	<i>Fosfatidil Inositol 3 cinasa</i>
<b>PKC</b>	<i>Cinasa de la proteína C</i>
<b>rhTSG-6</b>	<i>TSG-6 recombinante humana</i>
<b>RNA</b>	<i>Ácido Ribonucleico</i>
<b>ROS</b>	<i>Especies reactivas del oxígeno</i>
<b>RT-PCR</b>	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa Retro-Transcripción</i>
<b>siRNA</b>	<i>RNA pequeño de interferencia</i>
<b>SOD</b>	<i>Superóxido dismutasa</i>
<b>SSEA-4</b>	<i>Antígeno 4 embrionario específico de etapa</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Factor de Crecimiento Tumoral beta</i>
<b>TLR-</b>	<i>Receptor tipo Toll</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Factor de Necrosis Tumoral alfa</i>
<b>TNFR</b>	<i>Receptor del Factor de Necrosis tumoral</i>

## 4. Introducción

### 4.1 Las células troncales mesenquimales

Las células troncales mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) son células multipotentes con una morfología fibroblastoide que pueden ser obtenidas de diversos tejidos adultos como médula ósea, hígado, tejido muscular, tejido conectivo y tejido adiposo; así como de tejidos fetales como cordón umbilical y placenta <sup>1</sup>. La sociedad internacional de la terapia celular (ISCT, por sus siglas en inglés), en el 2006 estableció los criterios mínimos para la definición de las MSC que incluyen: la adherencia al plástico de las cajas de cultivo; la capacidad de generación de cuerpos embrionarios o unidades formadoras de colonias de fibroblastos (U-FCF, por sus siglas en inglés), la expresión de los antígenos del linaje mesenquimal como CD105, CD90, CD73, CD44, CD29 y la ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD19, CD34, CD11d, CD14 y CD79a, además del potencial de diferenciación hacia uno o más linajes celulares <sup>2</sup>.

En la actualidad el empleo de las MSC como agente terapéutico se debe principalmente a su capacidad de diferenciación multilínea y sus características inmunorreguladoras y antiinflamatorias. Algunos trabajos han reportado que las MSC poseen el potencial de reducir el fenómeno inflamatorio en diversos modelos experimentales como la diabetes y en procesos autoinmunes como la encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE, por sus siglas en inglés) <sup>3</sup>

Las MSC poseen la capacidad de interactuar con diversas células del sistema inmune efectuando mecanismos inmunomoduladores <sup>4</sup>. Existen reportes en los que se menciona que las MSC interfieren con la activación y función presentadora de las células dendríticas <sup>5</sup>, inhibiendo la expresión de moléculas asociadas con la presentación de antígenos como CD40, CD83, CD80, CD86 y HLA-A <sup>6</sup>. De igual manera se ha reportado que las MSC son capaces de inhibir la proliferación y función efectora de los linfocitos T y B <sup>7-9</sup>. Por otro lado, a través de la síntesis de diversos factores solubles como prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) y factor transformante de crecimiento beta (TGF-β) inhiben la producción de citocinas inflamatorias en macrófagos y células mononucleadas, tales como el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), IL-1, IL-6 e IL-12 y aumentan la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10, además que inducen apoptosis de linfocitos <sup>10,11</sup>.

Otros factores solubles inmunomoduladores reportados que pueden ser secretados por las MSC son IL-10, TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> y la proteína del Gen 6- estimulado por el factor de necrosis tumoral-alfa (TSG-6)<sup>4,12,13</sup>.

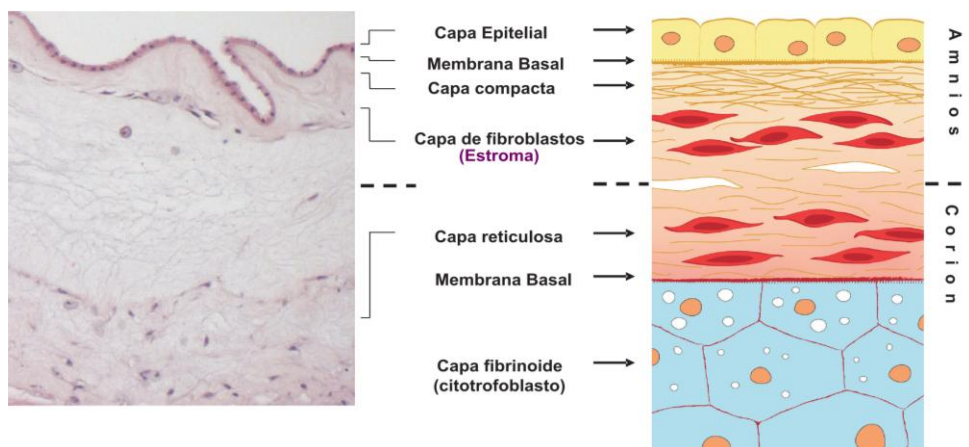
Además de la secreción de factores solubles, las MSC son capaces de realizar mecanismos de regulación dependientes del contacto celular. La supresión de la activación y proliferación e inducción de apoptosis sobre los linfocitos T por parte de MSC aisladas de médula ósea es dependiente del contacto celular a través de FAS ligando (FAS-L)<sup>14</sup>; de manera similar, a través de la expresión de la proteína PDL-1 y el contacto celular, las MSC obtenidas de médula ósea disminuyen la proliferación y diferenciación de células B<sup>15</sup>. Por su parte, la interacción de las MSC a través de CD73 disminuye la activación de los linfocitos T e induce la liberación de TGF- $\beta$ <sup>16</sup>.

#### 4.1.2 Las células mesenquimales de membrana amniótica (hAMSC)

La membrana amniótica (MA) o amnios es la membrana de origen extraembrionario más interna de la placenta. El amnios es una membrana delgada, translúcida, semipermeable y elástica que protege al feto *in útero* y metabólicamente está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis de solutos y agua. La membrana amniótica se compone de cinco capas, mencionadas a continuación: un epitelio simple cúbico pseudociliado, una lámina basal, una capa estromal compacta de tejido conectivo, una capa celular de fibroblastos y finalmente una capa esponjosa que la separa del corion (Figura 1)<sup>17,18</sup>. Además de las funciones fisiológicas de la membrana amniótica durante el embarazo, se ha reportado que esta membrana tiene diversas aplicaciones clínicas, en la regeneración de quemaduras y úlceras de la superficie ocular<sup>19-21</sup>, así como en la supresión de la actividad de algunas células inmunes inflamatorias<sup>22</sup>.

Algunas de las propiedades inmunológicas de la MA han sido atribuidas a sus componentes celulares como las células troncales mesenquimales estromales<sup>23</sup>. Es posible el aislamiento de células mesenquimales derivadas de la membrana amniótica que presentan los criterios mínimos de caracterización de manera similar a otros tipos de MSC descritos, como la expresión de marcadores del linaje mesenquimal y el potencial de diferenciación a otros tipos celulares<sup>24</sup>. Las MSC aisladas de MA además presentan características que impiden su rechazo inmunológico, como la no expresión de moléculas

el complejo principal de histocompatibilidad II (MHC-II) tras la activación con  $\text{IFN-}\gamma$ <sup>25</sup> y la expresión de antígenos leucocitarios humanos no clásicos como HLA-G y HLA-E<sup>26</sup>.



**Figura 1. Anatomía de la membrana amniótica humana.** Microfotografía del tejido placentario teñido con hematoxilina-eosina para la visualización de las capas celulares y membranales (panel izquierdo). Esquema representativo de las capas de la placenta (amnios y corion). Se observan las capas del amnios donde se localizan las células epiteliales y fibroblastos estromales (derecha). Tomado y modificado de Dobрева, M. y cols. *Int J of Dev. Biol.* 2010<sup>15</sup>.

Se ha reportado el uso de las hAMSC como terapia antiinflamatoria en algunos modelos animales de colitis, fibrosis pulmonar y pancreatitis; en estos trabajos se ha encontrado la disminución del proceso inflamatorio a través de la inhibición de citocinas inflamatorias como  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{CXCL1}$  y  $\text{CCL2}$  y la disminución del infiltrado inflamatorio de neutrófilos y macrófagos / monocitos<sup>27-29</sup>. En un modelo de hemorragia intracerebral la aplicación de las hAMSC permitió la disminución del daño neuronal<sup>30</sup> y en un modelo de artritis disminuyó el desarrollo del proceso inflamatorio a través de la reducción de los niveles de  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  y del número de células T hiperreactivas<sup>31</sup>.

Se conoce poco respecto a las características inmunoreguladoras de las hAMSC sin embargo, se ha reportado que a través de la secreción de factores solubles las hAMSC son capaces de modular la activación de linfocitos inflamatorios Th1 y Th17 induciendo una polarización hacia linfocitos T reguladores<sup>32</sup>. Otros trabajos han reportado que de manera similar a las MSC aisladas de médula ósea (BM-MSC, por sus siglas en inglés), las hAMSC son capaces de inducir inmunosupresión a través de la enzima indolamina 2,3

dioxigenasa (IDO) <sup>33</sup>. También se ha reportado que las hAMSC son capaces de modular la polarización M1/M2 de macrófagos hacia el subtipo anti-inflamatorio M2, a través de factores secretados en su medio condicionado <sup>34</sup>. Otros reportes indican que las hAMSC pueden inhibir la diferenciación de las células dendríticas y la proliferación de los linfocitos T <sup>35</sup>, así como inhibir la proliferación de células cancerosas arrestándolas en la fase G0 del ciclo celular por medio de un mecanismo dependiente del contacto celular <sup>36</sup>. Debido a las propiedades inmunológicas e inmunoreguladoras descritas anteriormente, las hAMSC podrían ser una alternativa útil en el desarrollo de nuevas terapias celulares antiinflamatorias.

#### 4.2. La proteína del gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral-alfa (TSG-6)

TSG-6 es una proteína con un peso molecular aproximado de 35 kDa. Esta proteína es miembro de la familia de proteínas de unión a hialuronato <sup>37</sup>. TSG-6 se relaciona con procesos como la artritis reumatoide, la ovulación y principalmente el remodelamiento de la matriz extracelular <sup>38,39</sup>. TSG-6 fue descubierta como una proteína inducida en fibroblastos debido al estímulo de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Sin embargo, la inducción de TSG-6 debido al estímulo de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y LPS se ha reportado en otras células humanas como fibroblastos de piel, mononucleares de sangre periférica, células dendríticas mieloides, condrocitos y células del músculo liso del cérvix <sup>40,41</sup>. La expresión de TSG-6 en el tejido amniótico se ha reportado principalmente en células epiteliales y estromales de la membrana amniótica <sup>42</sup>.

La molécula TSG-6 es capaz de formar complejos con el ácido hialurónico de la matriz extracelular y la proteína CD44, lo que le permite participar en el remodelamiento de tejido <sup>43</sup>. Estructuralmente TSG-6 presenta dos dominios: un dominio de unión *Link* expresado en la familia de proteínas de unión a hialuronato; este dominio le permite a TSG-6 la interacción con diversos glicosaminoglicanos como el hialuronato, condroitín 4-sulfato, dermatán sulfato, heparina y heparán sulfato <sup>44</sup>. El segundo dominio de TSG-6 es un dominio CUB carboxilo terminal expresado y conservado en varias proteínas pero del que aun no se conoce su función. TSG-6 es capaz de generar un complejo a través de su dominio *Link* con la proteína plasmática inhibidora de proteasas de serina llamada inhibidor I $\alpha$ I. Se ha reportado que el complejo TSG-6 / I $\alpha$ I está involucrado en la inhibición de la actividad de la enzima plasmina, una proteasa relacionada con la activación de metaloproteasas de matriz extracelular <sup>45</sup>. Respecto a lo anterior, se ha reportado que TSG-

6 inhibe la actividad de la metaloproteasas MMP-1 y MMP-3, evitando la activación de vías proteolíticas y daño tisular <sup>46</sup>.

Se ha descrito la participación de TSG-6 en la modulación de la respuesta inmune y como tratamiento anti-inflamatorio en diversos modelos experimentales. Entre algunas de las funciones moduladoras de la respuesta inmune reportadas para TSG-6, se conoce que es capaz de inhibir la migración de los neutrófilos por un mecanismo independiente del inhibidor I $\alpha$ I y dependiente de la interacción con la quimiocina CXCL8 <sup>47,48</sup>. Así mismo, se ha visto la participación de TSG-6 en la inhibición de la respuesta inflamatoria de linfocitos Th1 en diabetes experimental <sup>49</sup>. Por otro lado, existen reportes que han descrito la inhibición de la producción de citocinas inflamatorias por parte de TSG-6 en células dendríticas plasmacitoides a través de un mecanismo dependiente de la interacción con el receptor de matriz extracelular CD44 vía la reducción de la fosforilación del factor IRF-7 <sup>50</sup>.

La función antiinflamatoria de TSG-6 se ha evaluado en diversos modelos animales; en un modelo de daño corneal, la inyección de la proteína recombinante TSG-6 reduce el daño inflamatorio y promueve la regeneración de la superficie corneal <sup>51</sup>; de igual forma el uso de TSG-6 inhibe la formación de cicatriz y promueve la reparación tisular en un modelo de daño en orejas de conejo y reduce el proceso inflamatorio agudo en un modelo de daño pulmonar <sup>52,53</sup>.

Debido a las múltiples funciones antiinflamatorias de TSG-6, ha surgido el interés de estudiar la participación de TSG-6 como factor soluble en los mecanismos inmunorreguladores de las MSC. Existen reportes que mencionan que las MSC son capaces de sobre-exresar el factor TSG-6 y a través de su secreción impedir el daño tisular <sup>54,55</sup>. Algunos trabajos han descrito que la reducción de la inflamación en modelos experimentales de daño pulmonar y peritoneal se debe a la secreción del factor TGS-6 por parte de las MSC usadas como tratamiento <sup>56,57</sup>. Lo anterior indica la importancia del factor TSG-6 en el mecanismo anti-inflamatorio de las MSC.

Aunque el mecanismo completo de inhibición empleado por TSG-6 como factor soluble de las MSC aún continua en estudio, algunos trabajos han reportado que parte del mecanismo de inhibición de la molécula TSG-6 sobre de la respuesta inflamatoria depende de su efecto sobre la activación de algunas células inflamatorias. En macrófagos peritoneales se ha reportado la reducción de la señalización de la vía TLR2/NF- $\kappa$ B por TSG-6 secretado por las MSC obtenidas de medula ósea en un modelo de peritonitis

inducida por zimozán<sup>58</sup>; de manera similar en un modelo de inflamación inducido con lipopolisacárido el TSG-6 secretado por las MSC disminuye la respuesta inflamatoria de células de la microglia<sup>59</sup>. Estos reportes permiten sugerir una función inmunorreguladora del factor TSG-6 de las MSC sobre la activación de diversas células del sistema inmune.

#### 4.3 Los neutrófilos

Los neutrófilos son células fagocíticas en la circulación sanguínea que forman parte del sistema inmune innato. Son producidas en la médula ósea a partir de un precursor hematopoyético CD34+ con una frecuencia de producción de  $1-2 \times 10^{11}$  células por día en un adulto. Junto con los eosinófilos y basófilos conforman a la población granular que se deriva de médula ósea<sup>60</sup>.

Los neutrófilos pasan por diferentes estadios de maduración para ser liberados en el torrente sanguíneo, hasta llegar a su estado completamente maduro. Los estadios de maduración del neutrófilo son promielocito, mielocito, metamielocito, célula en banda y célula multilobulada. A través de los estadios de maduración del neutrófilo se ha descrito que se forman tres tipos de gránulos citoplasmáticos: primarios, secundarios y terciarios. Los gránulos primarios (azurófilos) o peroxidasa positivos se forman en la etapa de promielocito y presentan en su interior elastasa, capticina G, proteinasa 3, defensinas, mieloperoxidasa, lisozima y sialidasa; mientras que los gránulos específicos o secundarios junto con los terciarios se forman en las etapas de mielocito y metamielocito<sup>61</sup>. Los gránulos secundarios o específicos contienen proteínas membranales como CD11b/CD18, CD66, CD67, TNFR además de las subunidades del complejo NADPH oxidasa Gp91 phox y p22phox; además de enzimas como la colagenasa y gelatinasa. Finalmente, los gránulos terciarios al igual que los gránulos secundarios contienen los componentes membranales como CD11b/CD18, Gp91 phox y p22 phox, además de metaloproteinasas, gelatinasa, lisozima y  $\beta$ 2-microglobulina<sup>62</sup>. Junto a los tres gránulos anteriores, los neutrófilos presentan un cuarto tipo de gránulo, que corresponde a vesículas secretoras.

Dentro de las vesículas secretoras se internalizan componentes del sistema enzimático NADPH oxidasa como Gp91 phox y p22phox<sup>63</sup>. Las vesículas también sirven para transportar receptores del citosol hacia la membrana como el receptor del complemento CD35, el receptor de Fc $\gamma$ RIII (CD16), el receptor de la



proteína C1q, receptores para interferones alfa y gamma (INF- $\alpha$ 1R e INF- $\alpha$ 2R; INF- $\gamma$ R1 e INF- $\gamma$ R2), receptores del factor de necrosis tumoral alfa (TNFR1, TNFR2) y el receptor del factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ R2); así mismo se pueden encontrar dentro de las vesículas receptores de quimiocinas (CXCR-1,-2) y receptores de patrones moleculares (TLR-1, -2, -4, -6- y -8).

En condiciones homeostáticas y como un mecanismo de protección, los neutrófilos en circulación sanguínea se encuentran en forma inactiva. El proceso de activación del neutrófilo comienza cuando ocurre el reconocimiento de estímulos dañinos y/o inflamatorios.

El reconocimiento de los estímulos microbianos y señales de daño tisular es realizado por los neutrófilos a través de receptores de reconocimiento de patrones que encuentran en su membrana. Los neutrófilos expresan sobre su superficie receptores tipo Toll (TLR-2, -4, -5 y -6), receptores de la fracción cristalizable gamma (Fc $\gamma$ R) y receptores del complemento CR3 y CR4 que reconocen partículas opsonizadas por C3bi y al receptor CR1 (CD35) que reconoce el complejo C3b/C4b <sup>64</sup>, Dectina-1 y el receptor citoplasmático NOD2 <sup>65</sup>. A través de todos estos receptores, los neutrófilos son capaces de reconocer una gran variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) y patrones moleculares asociados a daño (DAMP's) que llevan a su activación. Entre algunos de los estímulos que pueden ser sensados por los neutrófilos se encuentran componentes bacterianos como el lipopolisacárido (LPS) <sup>66</sup> reconocido a través de TLR-4, la peptidoglicana (PG) y zimozán reconocidos por TLR-2 y el receptor NOD. Además de los componentes bacterianos, los neutrófilos son capaces de reconocer moléculas liberadas en daño tisular como HMGB1 y cristales de urato <sup>67</sup>; así mismo existe la activación de neutrófilos dependiente de plaquetas <sup>68</sup>.

Después del reconocimiento de los diversos estímulos inflamatorios, el siguiente paso de activación del neutrófilo es la migración hacia el sitio de daño. La migración de los neutrófilos hacia los tejidos ocurre debido a la presencia de estímulos inflamatorios y quimioatrayentes como la quimiocina IL-8 o CXCL8, mediadores lipídicos como leucotrienos y prostaglandinas <sup>69</sup> y la proteína del complemento C5a <sup>70</sup>. Los estímulos inflamatorios y quimioatrayentes promueven la síntesis y expresión de las moléculas de adhesión L-selectina, el ligando 1 de la glicoproteína P-selectina (PGSL-1), el antígeno 1 de activación tardía (VLA-1), el antígeno 1 asociado a la función leucocitaria (LFA-1) y CD44 <sup>71</sup>; todas estas moléculas le permiten al neutrófilo la adhesión al endotelio para comenzar su activación y transmigración hacia tejidos. El proceso de

transmigración inicia con la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular donde participan las interacciones de las selectinas L y E, además de la unión de las moléculas P-selectina, PSGL-1 y CD44 con sus ligandos expresados en el endotelio; estas interacciones moleculares provocan la disminución de la velocidad de migración del neutrófilo seguido del rodamiento de los neutrófilos sobre el endotelio vascular lo que permite el frenado de los polimorfonucleares sobre el endotelio <sup>72</sup>.

Después del detenimiento del neutrófilo, finalmente ocurre la adhesión firme del neutrófilo hacia el endotelio mediada por la expresión y activación de una familia de moléculas de adhesión llamadas integrinas. Las integrinas consisten en una familia de moléculas heterodiméricas con unión no covalente formadas por dos subunidades, una subunidad común beta  $\beta$  (CD18) y una subunidad alfa  $\alpha$  (CD11a, CD11b, CD11c) <sup>73</sup>. La adhesión firme de los leucocitos hacia el endotelio vascular se debe a la expresión y activación de las integrinas LFA-1(CD11a/ CD18) y MAC-1 (CD11b/CD18) en la superficie celular, que se unen respectivamente a sus ligandos expresados en el endotelio ICAM-1 e ICAM-2 <sup>74</sup>.

Después de la adhesión firme, el neutrófilo debe pasar entre o a través de las células endoteliales, proceso conocido como diapédesis o transmigración endotelial. Para el proceso de transmigración endotelial es necesaria la adhesión dada por las integrinas, así como la actividad de las metaloproteasas de matriz extracelular 6 y 9 (MMP-6 y MMP-9, respectivamente) en los sitios de contacto entre el neutrófilo y el endotelio, para inducir una retracción de la unión endotelial y permitir el tráfico de los neutrófilos infiltrantes<sup>74</sup>.

Una vez en el sitio de inflamación, los neutrófilos son capaces de realizar diversas funciones efectoras como fagocitosis, la liberación de su contenido granular, la producción y secreción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y la liberación de trampas extracelulares (NET, por sus siglas en inglés) <sup>75</sup>.

#### *4.3.1 Fagocitosis del neutrófilo.*

La fagocitosis es un proceso que realizan los neutrófilos, que consiste en el reconocimiento, captura y degradación de microorganismos y células muertas. Los pasos implicados en la fagocitosis consisten en:

a) el reconocimiento de microorganismos opsonizados; b) la endocitosis de estos microorganismos y finalmente c) la formación del complejo fago-lisosoma <sup>76,77</sup>.

Para un mejor reconocimiento y captura de microorganismos, se requiere del proceso de opsonización, que consiste en el recubrimiento de los microorganismos con proteínas del hospedero. Dentro de las proteínas denominadas opsoninas se encuentran proteínas de la cascada del complemento como C3b, C4b y C1q además de anticuerpos de la clase IgG <sup>78</sup>. Estas opsoninas son reconocidas por los receptores CR1 (CD35), CR3, CR4 y FcγIII (CD16) presentes en la superficie de los neutrófilos <sup>79</sup>.

Después de que el patógeno opsonizado ha sido reconocido, es endocitado por la formación de proyecciones de la membrana citoplasmática del neutrófilo, llevando a la formación de una vesícula endocítica que posteriormente se fusiona con gránulos citoplasmáticos específicos o lisosomas. Esto lleva a la formación del complejo fago-lisosomal, en donde ocurre el vaciado de los componentes degradantes del lisosoma para la eliminación del patógeno <sup>80</sup>.

#### *4.3.2 Degranulación y producción de especies reactivas del oxígeno*

Por su parte la formación de especies reactivas del oxígeno o también llamado estallido respiratorio es un mecanismo que depende de la activación del complejo enzimático llamado NADPH oxidasa que corresponde a un complejo formado por las subunidades asociadas a la membrana mitocondrial gp91phox y gp22phox, además de la GTPasa Rac2 y las tres subunidades citosólicas p47phox, p67phox, y p40phox <sup>81</sup>. Este complejo se activa debido a señales como IL-8, TNF- $\alpha$ , LPS, ácido araquidónico y zimozán se promueve la activación de mediadores como fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y proteína cinasa C (PKC) que participan en la fosforilación de los componentes citosólicos de este complejo <sup>81</sup>. La activación de la NADPH oxidasa lleva a un aumento en el consumo de oxígeno y a la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS). A partir del complejo NADPH oxidasa se genera ión superóxido ( $O_2^-$ ) que es el sustrato de la enzima superóxido dismutasa (SOD) para la formación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El  $H_2O_2$  es empleado como sustrato por la mieloperoxidasa (MPO) para la formación de otras especies reactivas como el hipoclorito (HClO). Todas estas moléculas poseen una alta capacidad oxidante que permite la degradación de

microorganismos patógenos<sup>82,83</sup> sin embargo, la liberación excesiva de estos agentes oxidantes pueden dañar los tejidos del hospedero, así como inducir la activación de respuestas inflamatorias debido a la generación de señales de daño o DAMP's<sup>84</sup>.

#### 4.3.3 Trampas extracelulares del neutrófilo (NET)

Las trampas extracelulares del neutrófilo, por sus siglas en inglés denominadas NET son estructuras en forma de redes descritas por *Fuchs* en 2004. Estas trampas extracelulares se encuentran formadas por una estructura a base de fibras de DNA extracelular además de componentes proteicos de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos como elastasa, mieloperoxidasa, lisozima, péptidos antimicrobianos como catelicidina o LL37, lactoferrina, gelatinasa, catepsina B y componentes nucleares como las histonas<sup>85,86</sup>. Las principales funciones descritas para las NET son la delimitación de sitios inflamatorios, así como la retención y eliminación de agentes patógenos<sup>75,87</sup>. Se ha reportado la actividad microbicida de las NET debido a su alto contenido oxidante, en diversos microorganismos como bacterias como *Burkholderia pseudomallei*, *Borrelia burgdorferi*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*; parásitos, por ejemplo promastigotes de *Leishmania amazonensis*; y hongos como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* y *Candida albicans*<sup>88-91</sup>.

El mecanismo de formación y liberación de NET es complejo, sin embargo se ha reportado que la formación de NET comienza con la pre-activación del neutrófilo debido al reconocimiento de un estímulo inflamatorio. La inducción de NET en el neutrófilo se inicia debido a múltiples estímulos, como por ejemplo el reconocimiento de PAMP's específicos a través de receptores tipo Toll, tal es el caso del reconocimiento de lipopolisacárido (LPS) por TLR-4, peptidoglicana (PG) por TLR-1/ TLR-2 y zimosán por TLR-1/ TLR-2. Existen otros estímulos capaces de inducir la liberación de NET como el reconocimiento de CXCL-8 por su receptor CXCR2, la estimulación con el compuesto sintético forbol-acido mirístico (PMA) activador específico de la PKC; así como el reconocimiento de DAMP's como HMBG1 y cristales de ácido úrico. Sin

embargo, también se ha encontrado la liberación de NET a través de un mecanismo dependiente de plaquetas activadas<sup>92</sup>.

La formación de las NET es un mecanismo que consiste en la activación del neutrófilo, seguido de la activación de cascadas de señalización y moléculas que contribuyen con la pérdida de la integridad de la membrana nuclear, así como la descondensación del DNA, seguido de la mezcla intracelular de los componentes nucleares y citoplasmáticos granulares del neutrófilo para finalizar con la ruptura de la membrana citoplasmática y la expulsión de las NET.

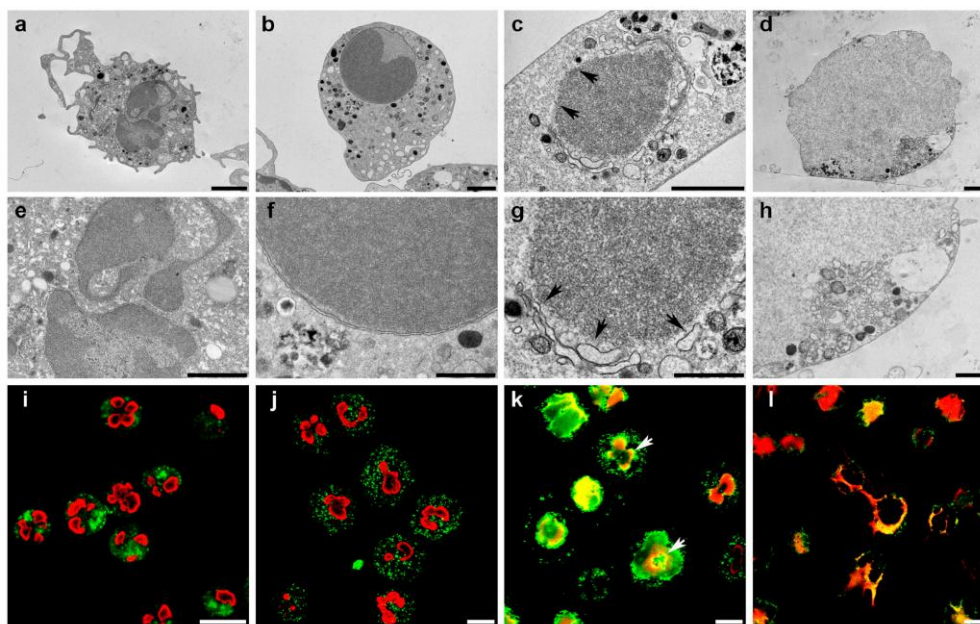
Durante el proceso de NETosis el neutrófilo sufre diversos cambios morfológicos como la pérdida de los lóbulos nucleares y el inicio de la descondensación de la cromatina. Enseguida se presenta la formación de múltiples vesículas generadas a partir de la membrana nuclear y una cromatina completamente descondensada; así mismo puede observarse la pérdida del número de gránulos citoplasmáticos. Una vez que se han perdido la membrana nuclear, la cromatina entra en contacto directo con los componentes granulares del neutrófilo sin la ruptura de la membrana plasmática (Figura 2)<sup>87</sup>. Posteriormente, se mezclan los componentes nucleares como las histonas y DNA con las proteínas granulares elastasa, mieloperoxidasa y LL37 que son los componentes principales de las NET.

En general los pasos necesarios para la formación de las NET descritos indican que después del reconocimiento de algún estímulo, en el neutrófilo se inicia la activación de una cascada de señalización dependiente de la actividad de cinasas de proteína como la PKC, seguido de la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa, que contribuye con la generación de ROS.

Existen reportes que mencionan que la falta de la actividad del complejo enzimático NADPH oxidasa en pacientes con enfermedad granulomatosa impide la formación de NET en estos individuos<sup>93</sup>. Por otro lado se ha visto la participación del peróxido de hidrógeno y otras ROS dentro de los requerimientos necesarios para la formación de las trampas extracelulares<sup>94</sup>.

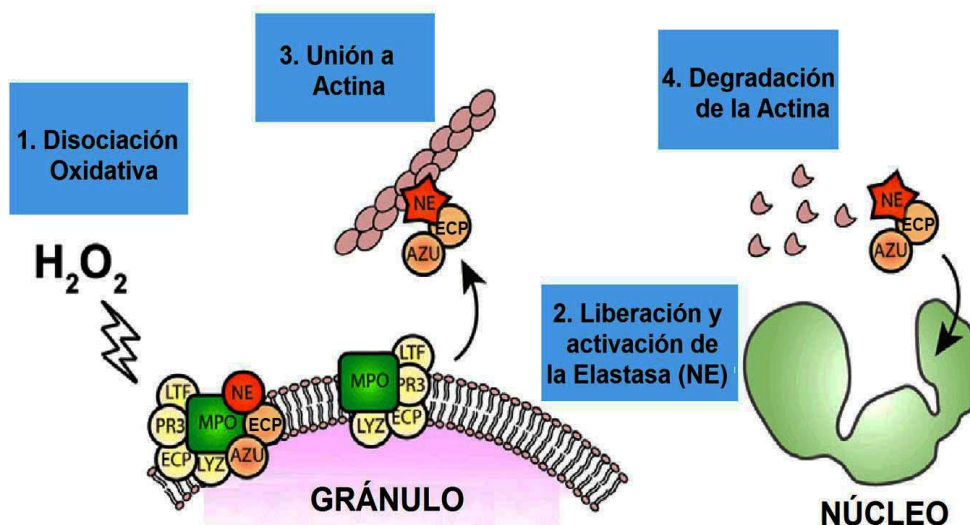
Parte del mecanismo de formación de NET comprende la formación de un complejo llamado “azurosoma” presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, este complejo está formado por mieloperoxidasa, elastasa, captosina G (CG), azurocidina (AZ), proteína catiónica eosinofílica (ECP, por sus siglas en inglés),

lactoferrina (LTF), defencina-1 (HD1) y lisozima. El mecanismo de activación del azurosoma depende de la presencia de peróxido de hidrógeno y de la actividad de la mieloperoxidasa, lo que promueve la liberación del complejo NE/ECP/AZU de los gránulos azurofílicos. Una vez liberado el complejo NE/ECP/AZU éste se asocia a filamentos de actina (F-actina) que son degradados por la actividad de la elastasa, posteriormente, la elastasa ingresa de manera pasiva hacia el núcleo donde contribuye en el procesamiento de las histonas y promueven la descondensación de la cromatina (Figura 3)<sup>95,96,97</sup>. Otro mecanismo descrito que induce la descondensación de la cromatina depende de la enzima PAD-4 encargada de la citrunilación de los residuos de arginina en las histonas, lo que elimina la carga positiva de los residuos de arginina y reduce la afinidad de unión de las histonas con el DNA permitiendo su descompactación<sup>98</sup>.



**Figura 2. Cambios nucleares y citoplasmáticos del neutrófilo durante la NETosis.**

Microfotografías de microscopía de transmisión electrónica y de fluorescencia de los cambios morfológicos durante el desarrollo de la NETosis en neutrófilos estimulados con PMA. Después del estímulo, los neutrófilos pierden sus lóbulos nucleares (b); enseguida comienza la pérdida de la membrana nuclear y la descondensación de la cromatina acompañado de la formación de pequeñas vesículas (c); se observa la disminución del número de gránulos citoplasmáticos (b, c); y finalmente la mezcla del contenido nuclear y componentes granulares (d). Tinción de fluorescencia (paneles i-l) para los complejos DNA-histonas (rojo) y elastasa (verde). Se observa la formación de complejos DNA-histonas y la movilización de elastasa (k), finalmente se liberan estructuras formadas por los componentes nucleares y citoplasmáticos (l). Barras: (a-d) 2  $\mu$ m; (e-h) 1  $\mu$ m; (i-l) 10  $\mu$ m. Tomado de Fuchs TA, y cols. *J Cell Biol.* 2007<sup>87</sup>.



**Figura 3. Mecanismo de activación de la elastasa durante la formación de NET.** El mecanismo de translocación al núcleo y activación de la elastasa es dependiente de la actividad del peróxido de hidrógeno y la mieloperoxidasa. El complejo Elastasa/Azurocidina/ Proteína catiónica eosinofílica (NE/AZ/CG) se liberan de la membrana de los gránulos secundarios hacia el citosol y se asocia a los filamentos de actina del citoesqueleto. La elastasa activada degrada los filamentos de actina, para ingresar posteriormente de manera pasiva hacia el núcleo. *Tomado y modificado de Metzler, K. y cols. Cell Press. 2014*<sup>97</sup>.

#### 4.4 Participación de las NET en el desarrollo de inflamación

Aunque las NET se generan como un mecanismo de defensa de la respuesta inmune innata, éstas se han visto relacionadas con la patogénesis de diversos padecimientos inflamatorios crónicos y autoinmunes. Entre los principales componentes de las NET se encuentran el DNA extracelular, proteínas modificadas como las histonas citrulinadas, enzimas degradantes como proteasas, además de un alto contenido de compuestos oxidantes formados a partir de las ROS como hipoclorito y peróxido de hidrógeno, así como citocinas inflamatorias como IL-17A, todos estos componentes están relacionados con el desarrollo de inflamación.

La trombosis de venas profundas es la principal causa de muerte cardiovascular. Los trombos venosos presentan una estructura laminar, rica en fibrina y con gran cantidad de células rojas y leucocitos <sup>99</sup>. La participación de los neutrófilos y las NET en el desarrollo y la formación de trombosis, se ha reportado en un modelo animal donde se observó la activación del factor tisular de la cascada de coagulación debido a un mecanismo dependiente de la activación de plaquetas y la inducción de NET <sup>100,101</sup>. El factor tisular es una proteína transmembranal que inicia la cascada de coagulación, finalizando con la formación de trombina. Las histonas representan uno de los principales componentes descritos en las NET; diversos trabajos han reportado la activación de plaquetas a través de TLR-2 y TLR-4 debido a la exposición extracelular de histonas. La estimulación de las plaquetas por acción de las histonas además de inducir la agregación plaquetaria genera la formación de trombina de manera independiente de la activación del factor tisular <sup>102</sup>. Sin embargo, la exposición extracelular de las histonas además de contribuir con la activación plaquetaria se ha visto relacionada con el desarrollo de complicaciones cardíacas en pacientes con sepsis <sup>103</sup>. De manera semejante, en pacientes con sepsis se han reportado altos niveles de histonas en plasma que se asocian con la severidad del cuadro inflamatorio debido al daño celular que contribuye a la falla orgánica múltiple y la muerte de los pacientes <sup>104</sup>. Los principales dos problemas aumentan el riesgo de muerte de los pacientes con sepsis, son la formación de trombos junto con el daño orgánico múltiple. Por lo que respecto a lo anterior, la liberación descontrolada de factor tisular trombogénico presente en las NET de pacientes sépticos se relaciona con un cuadro inflamatorio mayor <sup>92,105</sup> y con la formación de trombos, lo que contribuye con la severidad del cuadro séptico <sup>106,107</sup>.

Por otro lado, se ha asociado la exposición de componentes como el DNA extracelular e histonas citrulinadas con el desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y psoriasis <sup>108,109</sup>. Uno de los principales problemas del desarrollo de lupus eritematoso sistémico (LES) es el alto porcentaje de auto-anticuerpos dirigidos contra antígenos nucleares, principalmente contra histonas citrulinadas y DNA de doble cadena; además se asocia el desarrollo de LES con un alto porcentaje de auto-anticuerpos anti-citoplasma del neutrófilo (ANCA) <sup>110</sup>, los cuales están asociados con alto riesgo de desarrollar vasculitis de vasos pequeños <sup>111</sup>. Así mismo, un reporte menciona que el incremento en la liberación de NET por los neutrófilos de pacientes con LES está asociada con los altos niveles de auto-anticuerpos y con la exacerbación del proceso inflamatorio <sup>112</sup>. Una de las complicaciones del LES es la disfunción y daño endotelial, respecto a esto se ha reportado que las NET son



inductoras en parte de este daño endotelial debido la activación de metaloproteasas de matriz extracelular<sup>113</sup>.

Respecto a otras enfermedades autoinmunes, se ha encontrado que el desarrollo de artritis reumatoide depende de la exposición de antígenos citrulinados presentes en las NET; además la presencia de IL-17A y TNF- $\alpha$  induce la liberación de NET en neutrófilos de pacientes con artritis reumatoide (AR)<sup>114</sup> contribuyendo con la persistencia del ambiente inflamatorio. De manera semejante que en la AR, parte de la patogénesis de la psoriasis depende de la liberación excesiva de IL-17A. Existen trabajos que reportan la abundancia de neutrófilos y NET con altas cantidades de IL-17A en la piel de pacientes con psoriasis<sup>115</sup>, aunque también se ha asociado la formación de los complejos entre el péptido antimicrobiano LL37 y RNA o DNA con la activación de células dendríticas maduras y plasmacitoides en las que se induce la secreción de citocinas inflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$  e INF- $\alpha$  respectivamente; además se ha reportado la presencia de complejos RNA-LL37 en la piel de lesiones psoriásicas<sup>116</sup>.

## **5. Antecedentes**

Las células troncales mesenquimales (MSC) son células multipotentes con propiedades antiinflamatorias e inmunoregulatoras que pueden aislarse de diversos tejidos adultos y fetales como la placenta<sup>1</sup>. Específicamente la membrana amniótica la capa mas interna de la placenta, se ha reportado que posee propiedades antiinflamatorias e inhibitorias sobre las células de la respuesta inmune<sup>22</sup>; estas propiedades han permitido el uso clínico de la MA en el tratamiento de la reparación epitelial en piel y córnea<sup>19-21</sup>.

Parte de la función antiinflamatoria e inmunoregulatora de la MA ha sido atribuida a sus componentes celulares conformados por células epiteliales y células fibroblásticas estromales; en particular, ha surgido el interés por el estudio de las células amnióticas estromales (hAMSC) debido que existen reportes que indican que estas células presentan características morfológicas, fenotípicas así como funciones inmunoregulatoras semejantes a otras MSC ya descritas<sup>24</sup>. Además de sus capacidades inmunoregulatoras y antiinflamatorias las hAMSC expresan antígenos leucocitarios humanos no clásicos como HLA-G y HLA-E; la expresión de éstas proteínas es una característica que induce la tolerancia inmune e impide el rechazo inmunológico<sup>26</sup>, lo que permite sugerir a las hAMSC como un candidato prometedor para la terapia celular.

Uno de los mecanismos de inmunoregulación empleados por las MSC es la secreción de diversos factores solubles. Entre algunos de los factores descritos que pueden ser secretados por las MSC se encuentran prostaglandina E2 (PGE2), interleucina-10 (IL-10), factor transformante de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) y la proteína del Gen 6- estimulado por el factor de necrosis tumoral-alfa (TSG-6)<sup>4,12,13</sup>.

La molécula TSG-6 es una proteína capaz de unirse a diferentes glicosaminoglicanos y componentes de la matriz extracelular. En diversos modelos de daño, TSG-6 ha presentado una función antiinflamatoria<sup>51,52,53</sup>. Múltiples reportes han descrito la función inmunosupresora de TSG-6 sobre algunas células de la respuesta inmune como linfocitos, células dendríticas y neutrófilos<sup>47,48,49,50</sup>. TSG-6 es una proteína que puede ser secretada por diversos tipos celulares tras el estímulo de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y LPS<sup>41</sup>. Se ha reportado la expresión de TSG-6 en el tejido amniótico humano, por lo que las hAMSC podrían ser una de las células

productoras y secretoras de esta proteína. La expresión de la proteína TSG-6 en las hAMSC podría sugerir la participación de esta proteína en parte de los mecanismos inmunorreguladores de las hAMSC.

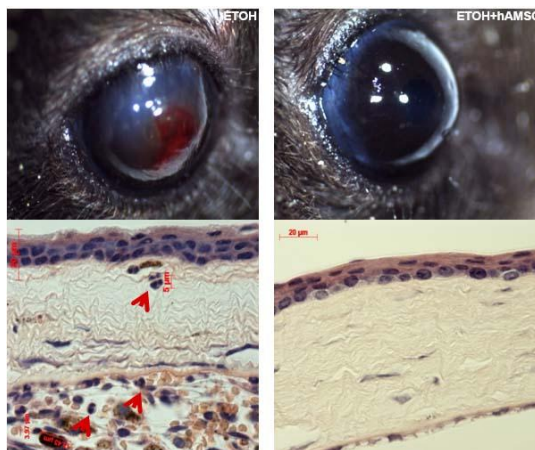
Los neutrófilos son células de la respuesta inmune innata que se encuentran en circulación; dentro de las funciones del neutrófilo se encuentra la liberación de trampas extracelulares o NET. La principal función de las NET es la retención y eliminación de patógenos; sin embargo, la exacerbada liberación de éstas trampas, así como la exposición de autoantígenos que funcionan como señales de daño activadoras de la respuesta inmune han sido asociadas con el desarrollo de diversos procesos inflamatorios y autoinmunes<sup>108</sup>. Varios de los componentes de las NET como las histonas y DNA extracelular, se encuentran relacionados con el desarrollo y exacerbación de inflamación en sepsis y trombosis. De manera semejante la exposición de autoantígenos como el DNA, RNA, proteínas citrulinadas y péptidos antimicrobianos han sido asociados con la principal causa de generación de autoanticuerpos en procesos autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y psoriasis.

Trabajos preliminares en nuestro grupo han mostrado que factores solubles presentes en el medio condicionado de las hAMSC tienen la capacidad de ejercer una función antiinflamatoria e inmunomoduladora sobre células de la respuesta inmune innata como los neutrófilos. En un modelo murino de quemadura corneal en ratones machos de la cepa C57BL6 con etanol al 99%, la inyección intracameral de  $5 \times 10^4$  hAMSC inhibió la inflamación y la migración de células inflamatorias hacia el tejido dañado; 1 semana de la quemadura y el tratamiento se observó clínicamente una disminución de la opacidad corneal, además de la reducción del proceso inflamatorio e inducción de la regeneración epitelial corneal. En los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina se observó el infiltrado en córnea de células inflamatorias que se definieron por su morfología como células polimorfonucleares, infiltrado celular que se redujo debido a la administración intracameral de hAMSC (Figura 4).

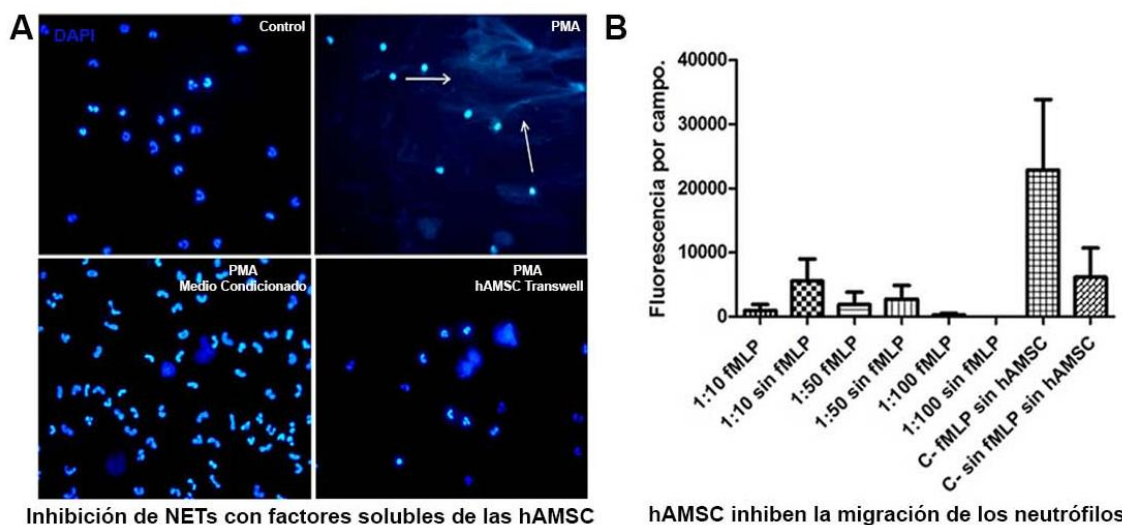
Por otro lado, en ensayos *in vitro* previos se encontró que factores solubles liberados por las hAMSC a través de un sistema transwell o con el medio condicionado de las hAMSC disminuyeron la capacidad de liberación de NET en neutrófilos humanos aislados de sangre periférica estimulados con PMA. Se aislaron neutrófilos humanos de sangre periférica y se estimularon con PMA para inducir la liberación de NET. Enseguida los neutrófilos se incubaron con el medio condicionado de hAMSC o se co-cultivaron con las hAMSC separados con un sistema transwell, para permitir solo el contacto de los factores solubles liberados

por las hAMSC. Después de 3 horas de cultivo se realizó la tinción del DNA extracelular liberado en las NET con DAPI y se visualizaron las trampas extracelulares liberadas. Se encontró que el cultivo con el medio condicionado y con las hAMSC a través del sistema transwell es capaz de disminuir la capacidad de liberar de NETs en los neutrófilos humanos, en comparación a los neutrófilos que solo se incubaron con PMA (Figura 5A).

De forma semejante se encontró en otros resultados que los factores solubles por medio del co-cultivo de hAMSC disminuye la migración de neutrófilos humanos a través de un sistema transwell inducida con el quimioatrayente fmlp. Para evaluar el efecto de las hAMSC sobre la migración de los neutrófilos, se cultivaron hAMSC en las siguientes proporciones 1:10,1:50 y 1:100 sobre una placa de 24 pozos y enseguida se colocaron sobre un sistema transwell neutrófilos humanos aislados de sangre periférica. La quimiotaxis de los neutrófilos se indujo utilizando fmlp. Se cuantificó el área ocupada por las células que migraron a través de la membrana del filtro transwell (Figura 5B). Se encontró que el co-cultivo de neutrófilos con hAMSC disminuye la quimiotaxis inducida con fmlp de los polimorfonucleares a través de un sistema transwell.



**Figura 4. La inyección intracameral de hAMSC disminuye la opacidad corneal y el infiltrado inflamatorio en un modelo de quemadura corneal.** Fotografías clínicas del ojo derecho de ratones machos de la cepa C57BL/6 solo con quemadura (ETOH) o con la inyección intracameral de hAMSC (ETOH-hAMSC) después de una semana del procedimiento (paneles superiores). Cortes histológicos con tinción de hematoxilina-eosina del tejido corneal con infiltrado inflamatorio, en los ojos solo con quemadura de etanol o con el tratamiento en conjunto de hAMSC. El infiltrado inflamatorio está compuesto por células polimorfonucleares (flechas rojas).



**Figura 5. Factores solubles de las hAMSC inmunomodulan las funciones efectoras de los neutrófilos.** Microfotografías de inmunofluorescencia del efecto de los factores solubles de las hAMSC a través de un sistema transwell o medio condicionado sobre la liberación de NET en neutrófilos humanos estimulados con PMA. Se visualizó en DNA extracelular de las NET con DAPI; las NET se observaron como redes en color azul (flechas blancas) (A). Gráfico de barras del área ocupada por los neutrófilos que migraron a través del filtro transwell. Se sembraron diferentes proporciones de hAMSC respecto a neutrófilos humanos que fueron o no estimulados con fmlp para inducir su migración de Las células que migraron se visualizaron con yoduro de propidio y el área se cuantificó con el programa Image J. Los valores se representan como la media y su error estándar  $\pm$  EE, n=3 (B).

Por lo anterior, se propone la existencia de factores secretados por las hAMSC con la capacidad de reducir funciones efectoras de los neutrófilos como las NET que están implicadas en el desarrollo del daño tisular en diversos procesos inflamatorios. Por lo tanto debido a los antecedentes y resultados previos, en el presente trabajo se plantea evaluar el efecto inmunosupresor de los factores solubles secretados por las hAMSC sobre el proceso de liberación de NET en un modelo murino; así mismo se busca evaluar si la proteína TSG-6 es uno de los factores secretados por las hAMSC que participa en el mecanismo inmunosupresor.

## 6. Planteamiento

Las MSC son células con diversas funciones inmunosupresoras y son usadas como terapéutica en procesos inflamatorios. Las hAMSC comparten varias de las funciones supresoras de las MSC y son una alternativa terapéutica accesible, no inmunogénica, con bajo riesgo de uso, que requieren de un mayor estudio para su uso en la clínica. Se sabe que el factor soluble TSG-6 podría ser secretado por las hAMSC, así mismo se conoce de su efecto inmunosupresor en diversos padecimientos inflamatorios. Sumado a esto, se conoce sobre la estrecha relación de la presencia de componentes de las trampas extracelulares del neutrófilo como el DNA extracelular, elastasa, mieloperoxidasa, IL-17 y especies reactivas del oxígeno en la patogénesis de diversos procesos inflamatorios crónicos y en el posible desarrollo de enfermedades autoinmunes. Así mismo, en nuestro laboratorio, ensayos preliminares han determinado que la exposición a factores solubles de las hAMSC disminuye la migración de los neutrófilos *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, se desconoce el efecto de los factores solubles de las hAMSC y los mecanismos que emplean éstos sobre la capacidad de liberación de trampas extracelulares de los neutrófilos. Por lo que en este trabajo se busca evaluar la posible participación de TSG-6 como parte de los mecanismos inmunomoduladores de las hAMSC sobre la formación de trampas extracelulares del neutrófilo.

## **7. Pregunta**

¿La proteína TSG-6 participará en el mecanismo inmunosupresor de las hAMSC sobre la formación de trampas extracelulares del neutrófilo (NET)?

## **8. Hipótesis**

La inhibición de la formación de NET por las hAMSC se debe al efecto inmunosupresor de la molécula TSG-6 secretada por éstas.

## **9. Objetivo general**

Evaluar el efecto inmunosupresor de TSG-6 secretado por las hAMSC sobre la formación de trampas extracelulares del neutrófilo.

## **10. Objetivos particulares**

- Realizar el aislamiento y caracterización de células mesenquimales amnióticas humanas.
- Evaluar el efecto de los factores solubles del medio condicionado de las células mesenquimales amnióticas humanas sobre la liberación de NET.
- Evaluar la presencia y el nivel de expresión de la proteína TSG-6 en las células mesenquimales amnióticas humanas.
- Evaluar el efecto inmunosupresor directo de la proteína TSG-6 recombinante sobre la liberación de NET
- Evaluar el posible mecanismo de acción inmunosupresora de la proteína TSG-6 sobre la liberación de NET.

## **11. Estrategia experimental**

### **11.1 Declaraciones éticas**

Todos los métodos y protocolos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con el Comité de Ética en Investigación (CEI) del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. El protocolo fue aprobado por el CEI del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. El consentimiento informado se obtuvo de las mujeres que donaron voluntariamente sus placentas.

### **11.2 Obtención de las células mesenquimales amnióticas humanas**

Las células mesenquimales amnióticas humanas (hAMSC) se obtuvieron a partir del procesamiento de membranas corio-amnióticas de la placenta. Las membranas se lavaron con solución salina balanceada, para eliminar el exceso de sangre y coágulos. El amnios del corión se separó de manera mecánica y se lavó con solución salina balanceada de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés). Para eliminar restos de sangre la membrana amniótica fue fragmentada en porciones pequeñas (aproximadas de 3X3 cm<sup>2</sup>) y se incubó durante 10 minutos a 37 °C con atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> con tripsina al 0.05% en PBS-EDTA, seguido de una agitación por 30 segundos (todo el procedimiento anterior se repitió tres veces). Con el fin de eliminar las células epiteliales de los fragmentos de la membrana, se realizó la incubación durante 40 minutos a 37°C con atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> con tripsina al 0.05% en PBS-EDTA, cada 10 minutos se realizó la agitación del tejido durante 30 segundos (todo este procedimiento se repitió tres veces). Al final se evaluó la eliminación de las células epiteliales mediante la observación de los fragmentos en el microscopio.

Después de la eliminación de células epiteliales el tejido membranal se cortó en trozos más pequeños y se incubó por 90 minutos a 37°C con atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> con colagenasa II al 0.75%, cada 10 minutos el tejido se agitó durante 30 segundos. Terminado el tiempo de incubación la reacción enzimática se neutralizó con medio de cultivo DMEM-F12 suplementado al 10% con SFB (suero fetal bovino de complementado) y antibióticos 1% (penicilina-estreptomicina [PS]). La suspensión se filtró a través de una malla de 20 µm. Enseguida la suspensión se centrifugó a 500x g por 5 minutos a 20°C. El botón celular



obtenido se cultivó en medio DMEM/F12 suplementado con 20% de SFB y 1% de PS. Se dejaron las células en cultivo hasta su adherencia, después el medio se cambió cada 3 días. Cuando el cultivo ocupó más del 90% del área en la botella de cultivo, las hAMSC fueron crio-preservadas como cultivo primario y otra parte de se mantuvo en cultivo para su caracterización y posterior uso. Para cada uno de los ensayos se usaron células de los pases 2-6.

Para la caracterización de las hAMSC se realizó la evaluación de la expresión de los marcadores de linaje mesenquimal como CD105, CD90, CD73, CD44 y CD29 por citometría de flujo; además se confirmó la ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD34 y CD45. Cada lote de hAMSC usado para los ensayos de este trabajo se caracterizó a través de la expresión de los marcadores del linaje mesenquimal. Como parte de la caracterización de las hAMSC también se realizó el inmunomarcaje para fluorescencia de los marcadores embrionarios Oct-4 y SSEA-4. Cada una de las metodologías se explican a detalle a continuación.

### 11.3 Caracterización de las células mesenquimales amnióticas humanas

De acuerdo a lo reportado en el Primer Taller Internacional de Células Mesenquimales obtenidas de Placenta, se utilizaron los siguientes criterios mínimos requeridos para la definición de las hAMSC: 1) adherencia al plástico de las botellas de cultivo; 2) la capacidad de generar unidades formadoras de fibroblasto (U-UFC); 3) la expresión de un patrón de marcadores de superficie de linaje mesenquimal y expresión de marcadores embrionarios; y 4) la capacidad de diferenciación hacia uno o más linajes celulares.

#### *11.3.1 Ensayo de generación de unidades formadoras de fibroblasto*

Para realizar este ensayo se sembraron en una botella de cultivo T75 de plástico hAMSC con una densidad de dos células por  $\text{cm}^2$  en medio DMEM-F12 suplementado con el 10% de SFB durante 10 días haciendo un remplazo de medio nuevo cada 3 días. Después del tiempo de cultivo las células se tiñeron durante 5 minutos con cristal violeta al 0.5% en metanol. Enseguida las células se lavaron con agua destilada

hasta eliminar el exceso de colorante. El tamaño considerado para las colonias formadas fue de >2 mm de diámetro.

### *11.3.2 Evaluación de la expresión de los marcadores de linaje mesenquimal por citometría de flujo*

Las hAMSC se recolectaron de la botella de cultivo incubando durante 5 minutos a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> con tripsina al 0.25% en PBS-EDTA, se adicionaron 3mL de medio DMEM suplementado y se centrifugó la suspensión celular a 800 x g, 5 minutos a 4°C. Enseguida, las hAMSC se fijaron con PFA al 4% durante 10 minutos y se lavaron con SSB. Las hAMSC fijadas se incubaron durante 30 minutos con los anticuerpos acoplados a flurocromo CD105-FITC, CD90-PE, CD73-FITC, CD29-PE, CD44-PECy7, CD34-APC y CD45-PerCP. Después del tiempo de incubación, las células se lavaron y suspendieron con PBS. Las hAMSC se mantuvieron cubiertas de la luz hasta su adquisición en el clitómetro FACS verse (Becton Dickinson, California, EUA). Se adquirieron 10 000 eventos y el análisis se realizó con el programa Flowjo 7.0.

### *11.3.3 Inmunomarcaje de fluorescencia para los marcadores embrionarios Oct-4 y SSEA-4*

Las hAMSC con un densidad de  $3 \times 10^3$  células/ml por pozo se adhirieron a cubreobjetos circulares (12 mm<sup>2</sup>) cargados con poli-L-lisina y se fijaron con PFA 4% durante 10 minutos. Después de lavar tres veces con PBS, las células se incubaron con solución de bloqueo (5% albúmina-0.05% tritón-PBS) 2h a 4°C. Terminado el bloqueo las hAMSC se dejaron a 4°C toda una noche con los anticuerpos primarios anti-OCT-4 (1:100) y SSEA-4 (1:100) en solución de bloqueo. Posteriormente, se usaron los anticuerpos secundarios anti-conejo acoplado a Alexa Fluor 488 y el anti-ratón acoplado a Alexa Fluor 594 (1:500) en solución de bloqueo. Después de 2 horas de incubación con los anticuerpos secundarios a temperatura ambiente (TA), se realizaron dos lavados con PBS-Tween al 0.05% (PBS-T) y se agregó Vectashield-DAPI para identificar los núcleos. Finalmente, se montaron y sellaron las muestras sobre porta objetos. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio *ApoTome II* y analizadas con el software *Axiovision 2.0* (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

#### 11.3.4 Diferenciación *In vitro* de las hAMSC

Las hAMSC a una densidad de  $2 \times 10^3$  células/ml se sembraron por pozo en medio DMEM-F12 suplementado en una placa de 24 pozos sobre cubre objetos cargados con poli-L-lisina. Las células se dejaron adherir durante 3 días, y después el medio fue remplazado con el respectivo medio de cultivo de diferenciación. Las hAMSC se mantuvieron en cultivo durante 3 semanas con un reemplazo de medio nuevo cada día. Todos los medios de diferenciación fueron preparados con DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB y 1% de PS; además de los respectivos factores específicos de diferenciación como sigue: para la diferenciación condrogénica (6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de insulina, 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  de rhTGF- $\beta$ 1, 300 nmol/L de ácido ascórbico); y para la diferenciación hepatogénica (100 nmol/L de dexametasona y 100 nmol/L de insulina)<sup>117</sup>. Después del cultivo con las diferentes condiciones y para corroborar la diferenciación de linaje celular; se realizaron tinciones de inmunofluorescencia y tinciones histológicas específicas para cada linaje celular evaluado.

**Tinciones histológicas:** Para evaluar la capacidad de diferenciación de las hAMSC hacia condrocitos se realizó la tinción con azul de alcian con la finalidad de determinar la presencia de glicosaminoglicanos. Para corroborar la diferenciación hepatogénica se usó la tinción de PAS (tinción de ácido peryódico de Schiff) para identificar glucógeno, glicoproteínas y glicolípidos.

**Tinciones de inmunofluorescencia:** Las hAMSC se fijaron con PFA al 4% durante 10 minutos a 4°C y se incubaron con solución de bloqueo durante 2 h a 4°C. Posteriormente, se incubó durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios anti-colágeno II y anti-albúmina respectivamente; el exceso de anticuerpo se lavó con PBS-T. Las muestras se incubaron 2 horas a TA con el anticuerpo secundario conjugado anti-conejo Alexa Fluor 488 (1:500) a TA en solución de bloqueo. Finalmente, las muestras se lavaron dos veces con PBS-T y se montaron con Vectashield-DAPI para la identificación de los núcleos. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio *ApoTome II* y analizadas con el software *Axiovision 2.0* (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

#### 11.4 Purificación de PMN de médula ósea de ratón mediante inmunomagneto selección negativa

Se obtuvieron las tibias y fémures de ratones machos de 6-8 semanas de la cepa Balb/c. Para la obtención de células de médula ósea se cortaron las cabezas de cada hueso. Con ayuda de una jeringa para insulina se perfundió medio para neutrófilos (HBSS, 1% glucosa, 0.5% albúmina) a través de cada hueso,

para obtener toda la medula ósea. La suspensión obtenida se homogenizó y filtró a través de una malla de 20  $\mu\text{m}$  con la finalidad de eliminar restos de tejido y hueso. La suspensión filtrada se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos a 10°C. El botón celular se suspendió en PBS y se purificaron los neutrófilos de acuerdo a las instrucciones del kit para purificación de neutrófilos de ratón MACS Miltenyi Biotec.

Brevemente, el proceso de separación se hizo utilizando un cocktail de anticuerpos marcados con biotina dirigidos contra todas las células en la suspensión de medula ósea de ratones exceptuando los neutrófilos. Después de la incubación con el cocktail de anticuerpos biotinados, se incubó la suspensión con perlas metálicas acopladas a anticuerpos anti-biotina. Enseguida, la suspensión se pasó por una columna acoplada a un imán. El procedimiento permite el paso de los neutrófilos a través de la columna y la retención en la columna de las células unidas a los anticuerpos y las perlas metálicas. Los neutrófilos purificados se mantuvieron a 4°C hasta ser adheridos y estimulados para los siguientes ensayos<sup>118</sup>. La pureza de los neutrófilos purificados fue analizada por citometría de flujo con la expresión de la enzima elastasa; así mismo se realizó una tinción para la molécula de adhesión CD11b para corroborar la no activación de los neutrófilos debido al proceso de purificación, ya que se sabe que durante la activación del neutrófilo se puede observar un aumento de la expresión del marcador CD11b<sup>119</sup>. Para la adquisición de las células se usó el citómetro FACS verse (Becton Dickinson, California, EUA). Se adquirieron 10 000 eventos y el análisis se realizó con el programa Flowjo 7.0.

### 11.5 Evaluación de la presencia de TSG-6 en las hAMSC

La presencia de la proteína TSG-6 en las hAMSC se evaluó a nivel transcripcional y proteico. Por lo que se realizaron ensayos de RT-PCR e inmunofluorescencia, respectivamente.

#### *11.5.1 Ensayos de RT-PCR*

Para los ensayos de RT-PCR se usaron  $1.5 \times 10^4$  hAMSC de los pases 2-4 cultivadas con medio DMEM-F12 suplementado a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en placas de 6 pozos. Las células se mantuvieron en cultivo hasta su completa adherencia, enseguida se cultivaron 20 horas previas a la extracción de RNA total con medio sin SFB. El RNA total de las células se extrajo usando el Kit *RNeasy Mini*, *Qiagen* siguiendo las instrucciones del

fabricante. Se realizó la cuantificación del RNA total en el equipo *Nanodrop 2000*. Para las reacciones de retrotranscripción (RT) se utilizaron 100 ng de RNA total de cada una de las muestras, para la RT se usó el *kit Omniscript* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la PCR usando una concentración de 10mM de los iniciadores para beta-2-microglobulina ( $\beta_2m$ ) como gen constitutivo, F=CACCCCACTGAAAAAGATG / R=ATATTA AAAAGCAAGCAAGCA, producto 167pb; y de la Proteína del gen 6 estimulado por TNF alfa (*tsg6*) F=GTCTGTGCTGCTGGATGGAT/R=TAAAGACGCCACCACTCC, producto 178 pb. La reacción de PCR se realizó con el *kit KAPA2G Fast ReadyMix PCR* de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los transcritos se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% en solución amortiguadora TAE 1X y se reveló con bromuro de etidio; las imágenes fueron capturadas y digitalizadas usando el sistema *G-Box y Gene Snap Software versión 7.12.6* (Syngene, London, UK). Las bandas observadas del transcrito de TSG-6 se analizaron cuantitativamente por densitometría en el programa Image J y los valores se normalizaron con respecto al gen constitutivo beta-2 microglobulina ( $\beta_2m$ ). Los resultados se reportan como el índice de la densidad óptica de TSG-6/  $\beta_2m \pm EE$ .

#### 11.5.2 Secuenciación automatizada de ADN

Se secuenciaron directamente los productos *tsg-6* amplificados por RT-PCR para confirmar la identidad del amplicón. La secuencia de nucleótidos se obtuvo utilizando el kit de terminadores marcados con fluorescencia BigDye terminator. Las muestras se analizaron en el secuenciador de *DNA ABI 310* (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia publicada del gen *tsg-6* humano publicado en la base de datos del NCBI (Ensemble transcript ID número ENSG00000123610).

#### 11.5.3 Ensayos de Inmunofluorescencia

Las hAMSC se adhirieron sobre cubreobjetos cargados con poli-L-lisina en una placa de 24 pozos a una densidad de  $3 \times 10^3$  células/ml por pozo. Posterior a la adhesión, y 20 horas previas al ensayo de inmunofluorescencia, se cambió el medio de cultivo suplementado con medio sin SFB. Posteriormente, las células se fijaron con PFA 4% durante 10 minutos y se incubaron con solución de bloqueo durante 2 horas a 4°C. Terminado el tiempo de bloqueo, las hAMSC se dejaron toda una noche a 4°C con un anticuerpo de conejo anti-TSG-6 (1:100) en solución de bloqueo. Al día siguiente, las muestras se lavaron tres veces con

PBS-T y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 564 (1:500) en solución de bloqueo. Finalmente, se evidenciaron los núcleos con DAPI y las muestras se montaron sobre portaobjetos. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio ApoTome II y analizadas con el software Axiovision 2.0 (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

### 11.6 Silenciamiento del gen *tsg6* mediante siRNA en hAMSC

Para los ensayos de silenciamiento se usaron hAMSC de los pases 2-4. Las hAMSC se sembraron a una densidad de  $1.5 \times 10^5$  células/ml en placas de 6 pozos y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas. Veinte horas previas al ensayo de transfección el medio suplementado se cambió por medio sin SFB. Después, las hAMSC se dejaron en incubación con 2 ml de medio OptiMEM. Se realizaron las diluciones en medio de transfección OptiMEM de cada uno de los siRNA a utilizar de acuerdo a las instrucciones del fabricante; se usó una concentración de 20 pM de cada siRNA: siRNA TSG-6 (Santa Cruz sc-39819) y siRNA aleatorio (Santa Cruz sc-37007). Para la transfección se generaron liposomas; para ello se diluyó 1  $\mu$ l lipofectamina por cada pozo con 49  $\mu$ L de medio OptiMEM, se realizaron los cálculos para el total de condiciones usadas. Posteriormente, para la generación de los liposomas en un tubo se mezclaron la lipofectamina diluida y 20 pM de cada uno de los siRNA; la mezcla se homogenizó e incubó a TA durante 20 min. Los liposomas se agregaron a la placa de 24 pozos con las hAMSC; la placa se homogenizó con suavidad y después se incubó durante 6 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Terminado el tiempo de incubación, se retiró todo el medio OptiMEM y los liposomas y se lavó una vez con medio nuevo. Después de la transfección, el medio OptiMEM se reemplazó por 2ml de medio de cultivo suplementado sin antibióticos (DMEM-F12, 10% SFB) y las hAMSC se dejaron en cultivo por 24 horas adicionales. Al final del tiempo de cultivo los sobrenadantes se recolectaron y fueron usados como medio condicionado (MC) para los ensayos respectivos. La disminución de la concentración de TSG-6 en el MC se confirmó a través de ELISA.

**ELISA de TSG-6:** La concentración de la proteína TSG-6 en los medios condicionados procedentes de las hAMSC no transfectadas (MC), hAMSC transfectadas con siRNA aleatorio (hAMSC-AL) y de hAMSC transfectadas con siRNA para TSG-6 (hAMS-TSG-6) se determinaron usando un kit de ELISA de TSG-6 humano. Veinticuatro horas después de la transfección de las hAMSC, se recolectaron los MC e inmediatamente después se realizó el ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Los MC recién

obtenidos junto con la curva estándar se incubaron 2.5 horas a TA sobre la placa de ELISA. Enseguida se lavó cuatro veces con solución de lavado y se colocó el anticuerpo de detección e incubó durante una hora más a TA. Después de 4 lavados, se incubó con una solución de estreptavidina durante 45 minutos a TA. Se repitió el paso de lavado de la placa; finalmente se agregó solución de sustrato-cromógeno TMB y se incubó durante 30 minutos a TA en oscuridad. La reacción se detuvo con la solución de paro e inmediatamente después se leyó la placa en un espectrofotómetro (Multiskan Ascent, Thermo LabSystems, PHL, USA) a 450nm. Los cálculos de la concentración de la proteína se hicieron utilizando la curva estándar.

**RT-PCR de TSG-6 :** Para confirmar el silenciamiento del gen *tsg6* y la disminución en la expresión de la proteína en las hAMSC, se realizaron ensayos de RT-PCR y de citometría de flujo<sup>120</sup>. Los ensayos de RT-PCR se realizaron como ya se describió anteriormente. La tinción de citometría para TSG-6 se hizo como sigue: Las hAMSC se fijaron y permeabilizaron con 0.2 ml de la solución Cytofix/cytoperm-BD a 4 °C durante 20 minutos. Enseguida las células se lavaron con solución de lavado (Permwash solution-BD) y se centrifugaron a 800x g durante 5 minutos. Posteriormente, las células se incubaron a TA por 30 minutos con un anticuerpo primario de conejo anti-TSG-6 (1:100) diluido en solución de lavado. Terminada la incubación, se lavaron y centrifugaron las células una vez; enseguida se colocó el anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 488 (1:500) en solución de lavado y se incubó a TA 30 minutos en oscuridad. Al final de la incubación las células se lavaron nuevamente y se suspendieron en 0.4 ml de PBS. Finalmente, se adquirieron 10 000 eventos en el citómetro FASC verse. Al mismo tiempo de la tinción se realizaron controles del anticuerpo secundario y autofluorescencia de las células. Los resultados de la expresión de TSG-6 se muestran como la intensidad media de la fluorescencia (MIF, por sus siglas en inglés) ± EE.

### 11.7 Preparación del medio condicionado (MC) de las hAMSC

Las células mesenquimales amnióticas humanas con o sin tratamiento de transfección con siRNA se colocaron a una densidad de  $1.5 \times 10^5$  células/ml por pozo en una placa de 6 pozos. Veinticuatro horas después de la adhesión de las hAMSC, se reemplazó el sobrenadante con 2 ml de medio DMEM-F12 suplementado o con DMEM-F12 sin suplemento en el caso del tratamiento de transfección con siRNA (véase procedimiento anterior). Las células se cultivaron durante 24 horas a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Después del tiempo de cultivo se recolectó el sobrenadante y se

consideró como medio condicionado (MC). Todos los medios condicionados se utilizaron inmediatamente después de su recolección. Para los experimentos de inhibición de las NET de los neutrófilos, se usó MC completo sin ninguna dilución junto con el estímulo de LPS.

#### 11.8 Inducción de NET con lipopolisacárido en neutrófilos de ratón

Los neutrófilos purificados de medula ósea de ratón se estimularon con diferentes concentraciones de lipopolisacárido (LPS), durante diferentes tiempos para evaluar la concentración y tiempo adecuados de estimulación para cada ensayo. La concentración de LPS y el tiempo de estímulo adecuados para el sistema y condiciones de trabajo fueron 32  $\mu\text{g/ml}$  de LPS y 90 minutos. Para la inducción de NET en los neutrófilos, se colocaron neutrófilos a una densidad de  $4 \times 10^4$  en 0.1 ml de medio RPMI con o sin estímulo y se dejaron adherir a 37°C durante 20 minutos sobre cubreobjetos cargados con poli-L-lisina en placas de 24 pozos. Terminado el tiempo de adhesión, se agregó a los pozos respectivos hasta un volumen final de 0.5 ml el medio con o sin estímulo de LPS. Después los neutrófilos se incubaron a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> 5% durante 90 minutos.

#### 11.9 Tinción de inmunofluorescencia de las NET

Al final de la incubación de los neutrófilos con cada una de las condiciones evaluadas, se realizó una tinción de inmunofluorescencia para elastasa y el DNA se tiñó con yoduro de propidio (IP) para la visualización de las NET. Para ello las NET se fijaron con PFA al 4% por 10 minutos a TA; enseguida se lavaron dos veces con SSB y se bloquearon durante 2 horas a TA. Después las muestras se incubaron toda una noche a 4°C con un anticuerpo primario de conejo anti-elastasa (1:100); después se lavó dos veces con PBS-T. Posteriormente, las muestras se incubaron 2 horas a TA con un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 488 (1:500). Finalmente, las muestras se lavaron con PBS-T y se visualizó el DNA con IP (0.25  $\mu\text{g/ml}$ ). Las muestras se montaron sobre porta objetos con solución de montaje (1 PBS: 1 glicerol) y se sellaron. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio ApoTome II y analizadas con el software Axiovision 2.0 (Carl Zeiss, Jena, Alemania).



#### 11.10 Cuantificación de neutrófilos con NET liberadas

Para cada condición usada, se seleccionaron cinco campos aleatorios que fueron usados para la cuantificación de neutrófilos con NET liberadas. Los tiempos de exposición para cada uno de los canales usados se mantuvieron constantes durante la captura de las imágenes. Para el análisis cuantitativo se utilizó el programa Image J. Las imágenes usadas correspondían a la combinación de los canales rojo y verde. El análisis se realizó de la siguiente manera: las imágenes adquiridas se cargaron como documentos con terminación JPGE en el programa Image J. Enseguida el brillo y contraste se ajustaron en las imágenes con el objetivo de visualizar mejor las NET. Después del ajuste de brillo y contraste, se generó una imagen binaria en blanco y negro y se restó el fondo. Enseguida se realizó el análisis automático de partículas en la imagen para un tamaño mínimo de 20 píxeles. Los valores obtenidos corresponden al área total ocupada por las NET liberadas. Los valores se presentan como el porcentaje del área total ocupada por las NET liberadas  $\pm$  EE con respecto a los neutrófilos no estimulados<sup>121</sup>. Para la obtención del porcentaje de área ocupada por las NET se consideró la condición sin estímulo como el área basal ocupada y a ésta se le asignó el valor del 100%, a partir de ésta consideración se calcularon los porcentajes de área de las demás condiciones; finalmente se resto el valor basal de 100 a cada condición para representar gráficamente el aumento del porcentaje del área ocupada respecto al basal.

#### 11.11 Efecto del medio condicionado de las hAMSC sobre la liberación de NET

Para evaluar el efecto de los factores solubles sobre la liberación de NET, los neutrófilos de ratón se estimularon con LPS como se describió anteriormente y se incubaron con el medio condicionado respectivo durante 90 minutos. Para evaluar el efecto de TSG-6 del MC de las hAMSC sobre la liberación de NET se realizó el silenciamiento del gen de *tsg6* en las hAMSC como se indicó previamente y se recolectó el sobrenadante de las hAMSC 24 horas posteriores al proceso de transfección. Después de la incubación con cada MC se realizó la inmunotinción de fluorescencia para la visualización y análisis de las NET, como se describió anteriormente.

### 11.12 Inhibición de las NET con TSG-6 recombinante humana (rhTSG-6)

Los neutrófilos de ratón se estimularon para la inducción de NET sobre cubreobjetos cargados con poli-L-lisina en una placa de 24 pozos, como se describió anteriormente. Posteriormente, la placa se incubó por 20 minutos para permitir la adhesión de las células. Después de la adhesión, se adicionaron diluciones seriadas de la proteína rhTSG-6 partiendo de una concentración de 1000 pg/ml hasta 125 pg/ml, usando un factor de dilución 1:2. Los neutrófilos se incubaron por 90 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> de atmósfera. Después de la incubación, los neutrófilos se fijaron, bloquearon y analizaron por inmunofluorescencia como se describió anteriormente.

### 11.13 Ensayo de reducción de azul de Nitrotetrazolio (NBT)

La reducción del NBT se usa para cuantificar especies reactivas del oxígeno como el anión superóxido en ésta se genera como producto un precipitado color azul llamado formazán. Para el ensayo se disolvieron 10 mg de NBT (Sigma Aldrich; N6876) en 1 ml de agua destilada para tener una solución stock a una concentración de 10 mg/ml. La solución se preparó inmediatamente antes de usarse y se mantuvo a 4°C en oscuridad. A partir de la solución stock se preparó una solución de trabajo al 0.3%. Para el ensayo de reducción, los neutrófilos (2x10<sup>5</sup> células/0.1 mL) se estimularon para la liberación de NET (como se explicó anteriormente) e incubaron con todas las condiciones a evaluar. La solución 0.3 % de NBT se agregó a una concentración final de 0.1% en cada pozo. Se evaluó la formación de superóxido en diferentes periodos de tiempo 15, 30, 60 y 90 minutos. Después se retiró el sobrenadante y las células se fijaron con metanol absoluto durante 5 minutos a TA. Enseguida las células se lavaron con 0.5 ml de metanol al 70% y se dejaron secar completamente en oscuridad. Finalmente, los depósitos de formazán se solubilizaron en 120 µl de hidróxido de potasio (KOH) 2M junto con 140 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) para cada pozo. Las muestras se homogenizaron y pasaron a una placa de 96 pozos para finalmente ser leída en el espectrofotómetro Multiskan Ascent a 630 nm. Para la representación de los resultados se calculó la concentración de superóxido (nM). Los valores nM de superóxido se calcularon de acuerdo a la equivalencia (Densidad Óptica; OD por sus siglas en inglés) 0.1 OD =1.9 nM O<sup>-</sup>.

Los resultados se expresan como el aumento del porcentaje de producción de ROS  $\pm$  EE (% ROS  $\pm$  EE) con respecto al porcentaje basal de los neutrófilos sin estímulo considerado el 100% de producción de ROS. Para la evaluación del efecto de la proteína recombinante de TSG-6 sobre la formación de ROS, se siguió la técnica descrita anteriormente; con la única modificación que las muestras se incubaron 15 minutos con las diluciones de la rhTSG6. El análisis de resultados se realizó de la misma manera descrita anteriormente.

#### 11.14 Medición del potencial de membrana mitocondrial

La medición del potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) es un indicativo del correcto funcionamiento mitocondrial. La inhibición del  $\Delta\psi_m$  está relacionada con la disminución de la fluorescencia de la sonda lipófila catiónica 3,3-ioduro de dihexilcarbocianina (DiOC6(3)). Este ensayo se realizó en  $2 \times 10^5$  /ml neutrófilos estimulados con LPS 32  $\mu$ g/ml con en suspensión en tubos con fondo en U, el estímulo y la incubación con los medios condicionados de las hAMSC se hizo durante los tiempos 15, 30, 60 y 90 minutos. Después los tubos se centrifugaron a 300 x *g* y se eliminó el sobrenadante. Enseguida se agregaron 0.2 ml de la sonda DiOC6 (3) (1:200 en PBS) y se incubó durante 15 minutos en oscuridad a TA. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 300 x *g* por 5 minutos. Finalmente, las células se suspendieron en 0.4 ml de PBS y se adquirieron inmediatamente <sup>122</sup> en el citómetro FASC Calibur (California, EUA); se adquirieron 10 000 eventos de cada muestra. El análisis se realizó con el programa FlowJo 7.0. Los datos se representan como el promedio del porcentaje de pérdida del  $\Delta\psi_m$  (% $\Delta\psi_m$  loss)  $\pm$  EE.

#### 11.15 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prism GraphPad 5.0 (La Jolla, CA, USA). Los datos se representaron como la media  $\pm$  el error estándar (EE); los valores se obtuvieron de experimentos individuales y los valores de  $p < 0.05$  se consideraron como estadísticamente significativos. Los datos se analizaron con una prueba de t de Student seguida de una corrección de Welch.

## **12. Resultados**

### **12.1 Caracterización de las células mesenquimales amnióticas humanas (hAMSC)**

Se realizó la caracterización de las células mesenquimales obtenidas de membrana amniótica de acuerdo a los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de la Terapia Celular <sup>26</sup>.

Las células obtenidas de la membrana presentaron adherencia al plástico de las botellas de cultivo y una morfología fibroblastoide (Figura 6A). Así mismo, después de realizar el ensayo de clonogenicidad, se observó la capacidad de las hAMSC de generar colonias de agregados celulares teñidos en violeta mayores a 2 mm<sup>2</sup> (Figura 6B), generados a partir de células cultivadas a una baja densidad.

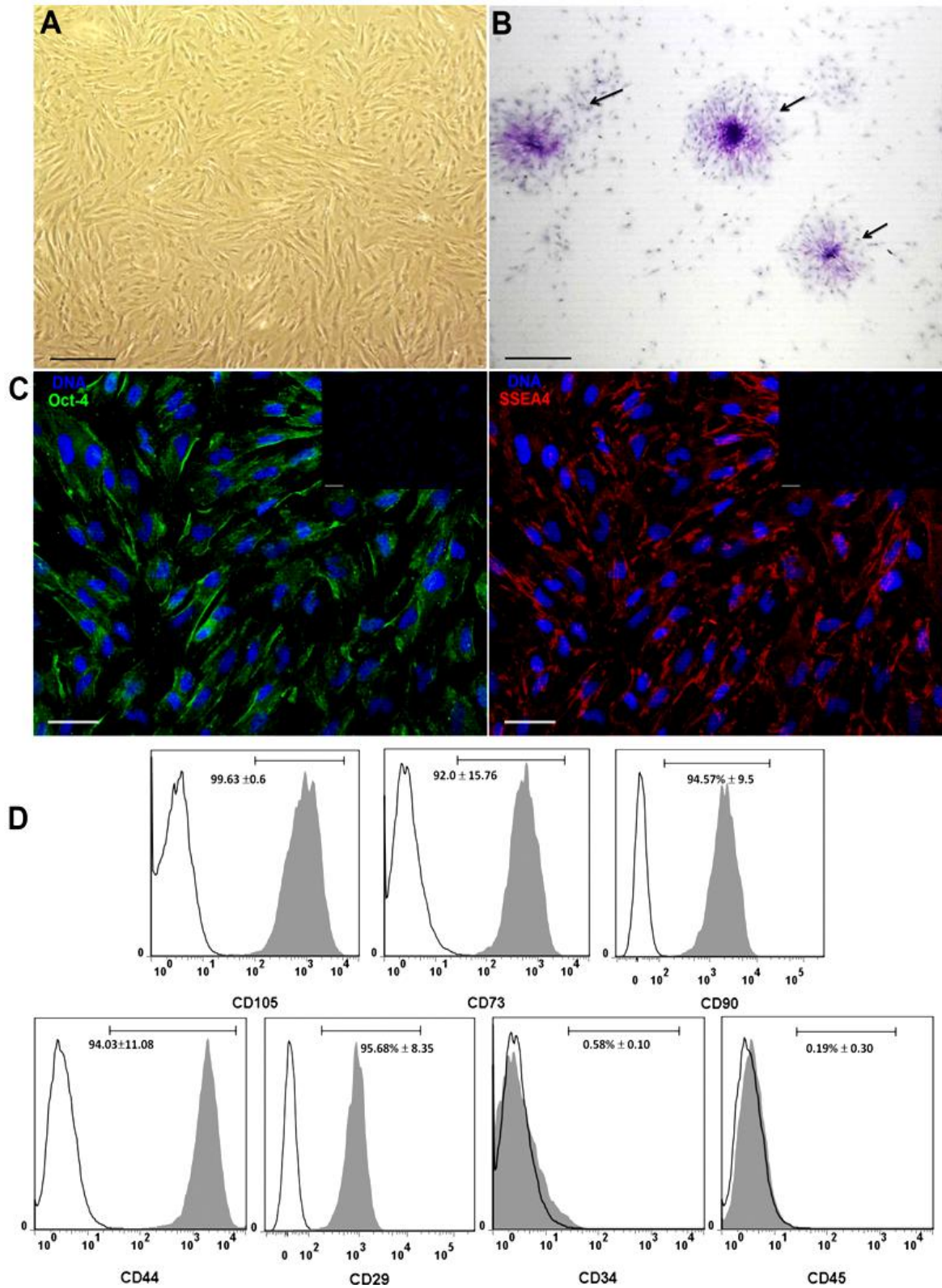
Otro de los criterios mínimos de caracterización de las hAMSC evaluados en este trabajo fue la expresión de marcadores embrionarios de pluripotencialidad <sup>23</sup>. Se evaluó la expresión de los factores de transcripción y marcadores embrionarios OCT-4 y SSEA-4 a través de inmunotinciones de fluorescencia. Después de realizar la tinción con los anticuerpos primarios y secundarios acoplados a un fluorocromo Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594 respectivamente, se encontró que las hAMSC fueron positivas ( $\leq 95\%$ ) a la expresión de los factores de transcripción OCT-4 y SSEA-4 (Figura 6C). Así mismo, se evaluó la capacidad de las hAMSC de expresar en su superficie un patrón de marcadores del linaje mesenquimal particular. Cuando se caracterizó a través de citometría de flujo el inmunofenotipo de las células aisladas y cultivadas obtenidas de la membrana amniótica se encontró que estas células son positivas para la expresión de los marcadores: CD29: 95.68% ( $\pm 8.35$ ); CD44: 94.03% ( $\pm 11.08$ ); CD73: 92.0% ( $\pm 15.76$ ); CD90: 94.57% ( $\pm 9.5$ ); CD105: 99.63% ( $\pm 0.6$ ). Estos resultados se expresan como el promedio  $\pm$  ES (Figura 6D). En contraste a la expresión de los marcadores mesenquimales, se ha descrito como característica de las MSC la negatividad de expresión de marcadores de origen hematopoyético; por lo que también se evaluó esta característica por medio de citometría de flujo, encontrándose que las hAMSC son negativas a la tinción de CD34 y CD45 (<1%) (Figura 6D).

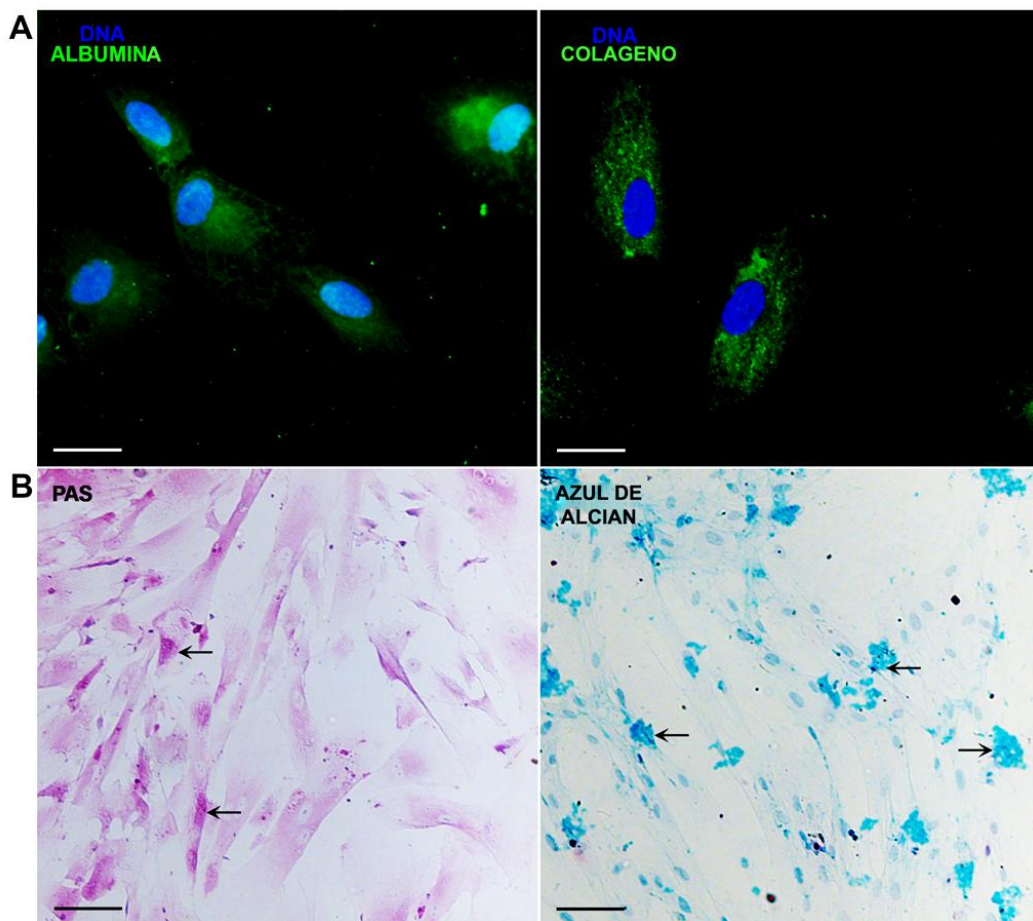
Dentro de los criterios de caracterización según la ISTC se encuentra la capacidad de diferenciación de las MSC hacia diferentes linajes celulares. Respecto a la característica anterior se encontró que las células

mesenquimales amnióticas humanas tienen la capacidad de diferenciarse hacia condrocitos y hepatocitos. La capacidad de diferenciación se evaluó después del cultivo durante 3 semanas de las hAMSC con medio de diferenciación condrogénico y hepatogénico. La capacidad de diferenciación se evaluó a través de la expresión de proteínas específicas de cada tipo celular analizado. La detección de las proteínas específicas de cada tipo celular se realizó mediante inmunofluorescencia; se evaluó la expresión de colágeno tipo II en el caso de las hAMSC cultivadas con medio condrogénico y la expresión de albumina en las hAMSC diferenciadas hacia hepatocitos. Así mismo, se realizaron tinciones histológicas específicas con azul de alcian y PAS respectivamente, para determinar la presencia de glucosaminoglicanos en las hAMSC diferenciadas a condrocitos y glucógeno en las hAMSC cultivadas con medio hepatogénico. Las hAMSC cultivadas con los medios de diferenciación fueron positivas a la expresión de las proteínas colágeno II y albúmina, respectivamente (Figura 7A). Además, se observó la presencia de glicosaminoglicanos evidenciado por la presencia de precipitados azules, debido a la tinción de azul de alcian en las hAMSC cultivadas con medio condrogénico; así como precipitados en color magenta que evidencian la presencia de glucógeno en las células con medio de diferenciación hepatogénico (Figura 7B).

---

**Figura 6. Caracterización morfológica y fenotípica de las hAMSC.** Micrografía de contraste de fases de hAMSC del pase 3 adheridas a una placa de cultivo de poliestireno que muestra la morfología fibroblastoide en forma de huso de las hAMSC (A). Microfotografía de las U-UFC teñidas con cristal violeta de hAMSC cultivadas durante 10 días a una confluencia de  $3 \times 10^3$  células. Las barras de escala representan  $100 \mu\text{m}$  (B). Microfotografías de la tinción para los marcadores embrionarios OCT-4 (panel izquierdo) y SSEA-4 (panel derecho) en las hAMSC. DAPI se utilizó para el contraste de los núcleos. Las barras de escala representan  $20 \mu\text{m}$ ; estas son imágenes representativas de tres ensayos independientes (C). Histogramas de la expresión de los marcadores del linaje mesenquimal expresados en hAMSC del pase 4 analizados por citometría de flujo. Las hAMSC fueron positivas para la expresión de CD105, CD73, CD90, CD44 y CD29; y negativas a la expresión de marcadores los hematopoyéticos CD34 y CD45. Los valores se representan como el promedio del porcentaje de expresión  $\pm$  EE (D).



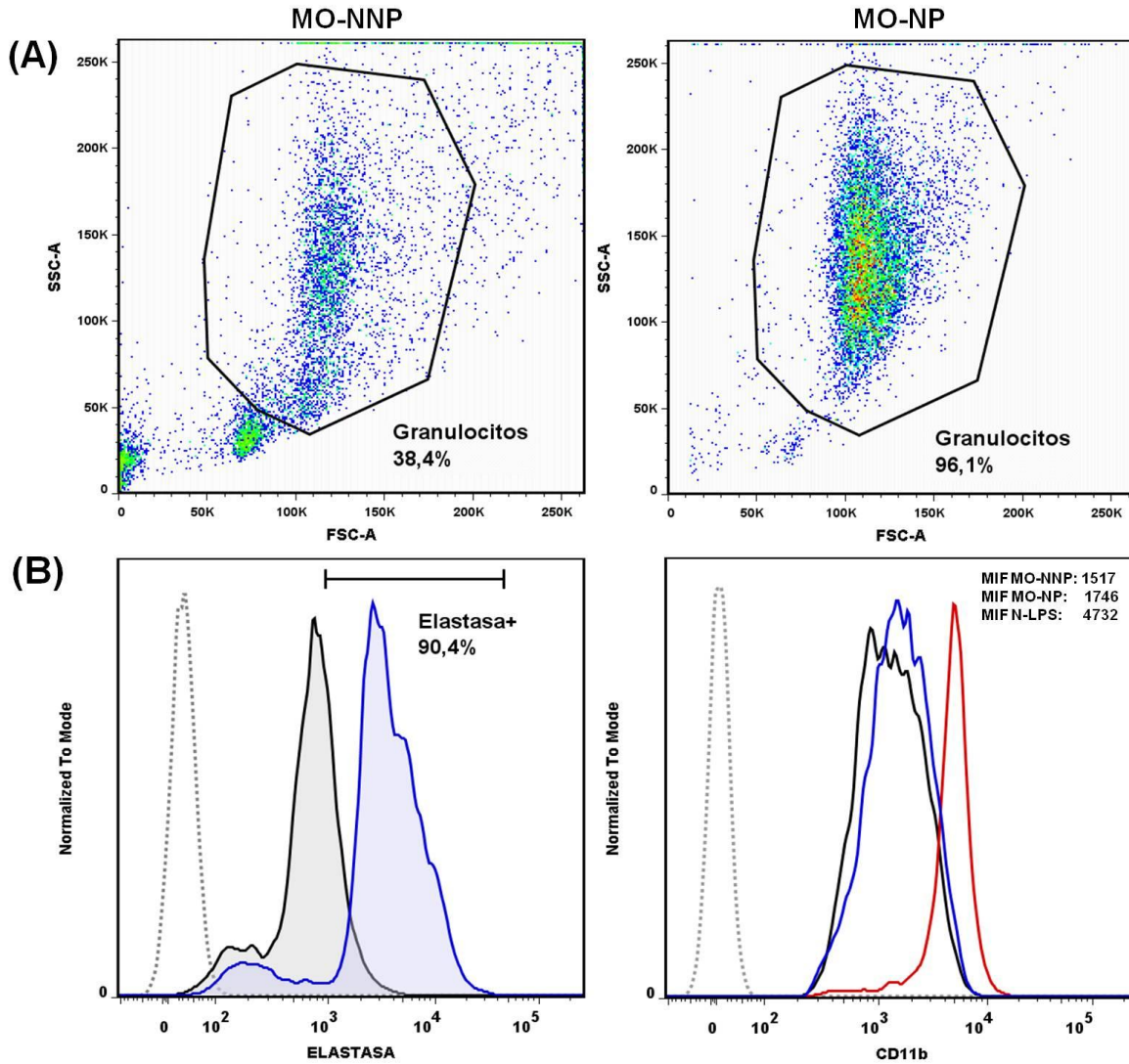


**Figura 7. Las hAMSC tienen la capacidad de diferenciarse a hepatocitos y condrocitos.** Las hAMSC se cultivaron durante 3 semanas con medio de diferenciación hepatogénico o condrogénico. Posteriormente las hAMSC se marcaron contra albúmina o colágeno II y los núcleos se visualizaron con DAPI. Micrografía de fluorescencia de la tinción contra albúmina de las hAMSC cultivadas con medio hepatogénico (panel superior izquierdo) y microfotografía de las hAMSC diferenciadas a condrocitos positivas para colágeno II (panel superior derecho). Las barras de escala representan 20µm. Estas son imágenes representativas de tres ensayos independientes (A). Para corroborar la diferenciación hepatogénica y condrogénica se realizaron tinciones de PAS y azul de alcian. Micrografía de campo claro de las hAMSC diferenciadas a hepatocitos positivas a la presencia de glucógeno evidenciado con la tinción de PAS como precipitados color magenta (panel inferior izquierdo); microfotografía en campo claro de las hAMSC diferenciadas a condrocitos capaces de sintetizar proteoglicanos y glucosaminoglicanos evidenciados como precipitados azules debido a la tinción de azul de alcian (panel inferior derecho) (B). Las barras de escala representan 100 µm. Estas son imágenes representativas de tres ensayos independientes.

## 12.2 Aislamiento y caracterización de neutrófilos de médula ósea de ratón

Se realizó la obtención de neutrófilos purificados de médula ósea de ratón (NP-MO) por medio del *kit MACS Miltenyi Biotec*. Se analizó por citometría de flujo la presencia de elastasa, enzima contenida en los gránulos secundarios de los neutrófilos para evaluar la pureza de la población aislada; y la expresión de la molécula de adhesión CD11b para evaluar la activación de los neutrófilos aislados de la médula ósea. El proceso de selección negativa por inmunomagneto permitió purificar una población de células que de acuerdo a sus características de tamaño y complejidad corresponden a la población de granulocitos. El porcentaje de la población de granulocitos se enriqueció de un 38.4 % hasta un 96% (Figura 8A). Los resultados obtenidos del marcaje para elastasa de la fracción de células purificadas, mostraron que  $\geq 98\%$  de la población aislada fue positiva para la expresión de la elastasa del neutrófilo en comparación con el control de tinción secundario (Figura 8B). Por otro lado, como estrategia para descartar la posible activación de los NP-MO debido al proceso de purificación se realizó la tinción para la molécula de adhesión CD11b. La expresión de CD11b en los NP-MO (histograma azul) fue similar a la encontrada en la población de neutrófilos no purificados de médula ósea de ratón (NNP-MO; histograma negro) (Figura 8B). A través de la intensidad media de fluorescencia (MIF, por sus siglas en inglés), se evaluó la expresión de CD11b en las dos poblaciones NP-MO y NNP-MO y se comparó con una población de neutrófilos que fue estimulada durante 30 minutos con LPS (N-LPS). Se observó un aumento de la MIF de CD11b en la población de N-LPS (Figura 8B), sin embargo este nivel de expresión no se observó en las poblaciones de NP-MO y NNP-MO, por lo que se corroboró que no ocurrió la activación de los neutrófilos purificados debido al proceso de selección negativa por inmunomagneto. Por lo anterior, fue posible aislar de médula ósea de ratón una población de neutrófilos no activados con un pureza  $\geq 98\%$  para poder desarrollar los ensayos de este trabajo.





**Figure 8. Aislamiento y caracterización de la fracción de células polimorfonucleares de médula ósea de ratón purificadas por inmuno-magneto selección negativa.** Gráfico de puntos del tamaño y complejidad del porcentaje de la población de polimorfonuclear de médula ósea no purificada (NNP-MO) comparada con la población polimorfonuclear purificada por selección negativa por inmunomagneto (NP-MO) (A). Histograma de la expresión de la proteína elastasa del neutrófilo en la población polimorfonuclear purificada (histograma azul), comparado con polimorfonucleares purificados sin tinción (histograma gris) (B). Histogramas del nivel de expresión de la molécula de adhesión CD11b en las poblaciones de polimorfonucleares no purificados [NNP-MO; histograma negro], polimorfonucleares purificados [NP-MO; histograma azul] y polimorfonucleares estimulados con lipopolisacárido de *E.coli* LPS [N-LPS; histograma rojo] (C). MIF: intensidad media de fluorescencia.

### **12.3 Efecto de los factores solubles de hAMSC sobre la formación de NET**

Los factores solubles secretados por las hAMSC fueron capaces de disminuir la capacidad de los neutrófilos de ratón de liberar trampas extracelulares. Con la población de neutrófilos de ratón purificada se realizó la inducción de trampas extracelulares utilizando diferentes tiempos de incubación y concentraciones de LPS. Se encontró que la mejor concentración de inducción de NET fue 32  $\mu\text{g/ml}$  de LPS en un tiempo de 90 minutos; condiciones en las que se observó la liberación de DNA ( $p \leq 0.05$ ) comparado con células sin ningún estímulo, junto con un menor grado de degradación de las trampas (Figura 9).

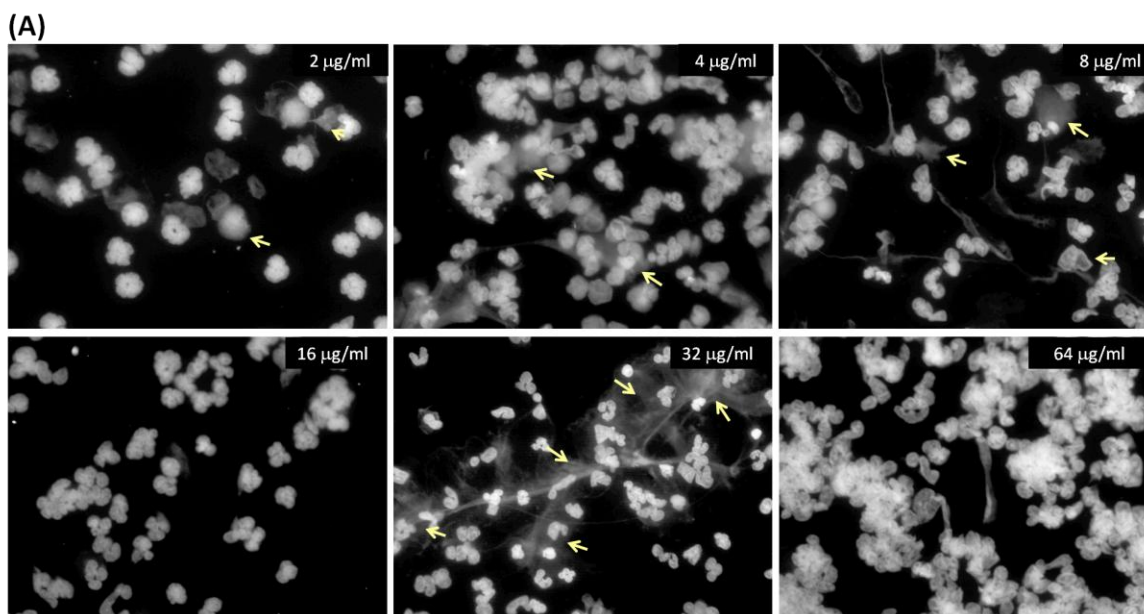
Utilizando las condiciones óptimas de inducción de NET encontradas anteriormente, se cultivaron neutrófilos de ratón con LPS durante 90 minutos a 37°C con atmósfera al 5% de  $\text{CO}_2$ . Al mismo tiempo de estimulación, algunos neutrófilos se incubaron con el medio condicionado obtenido de las hAMSC (MC-hAMSC) y con hAMSC utilizando un sistema transwell (TW-hAMSC) que permite únicamente la interacción de los neutrófilos con moléculas solubles liberadas por las hAMSC.

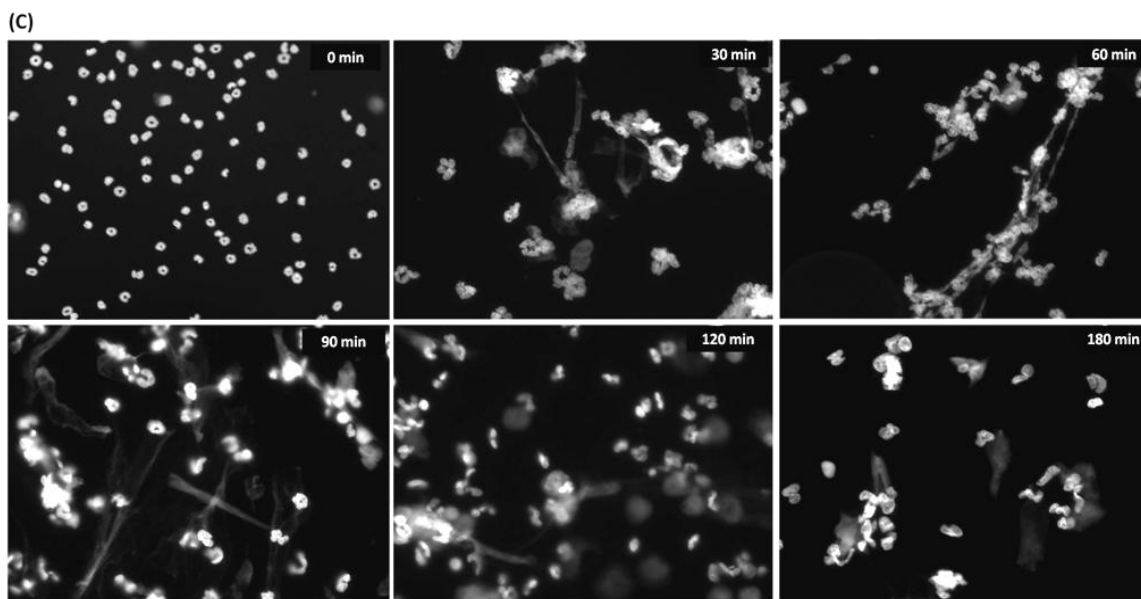
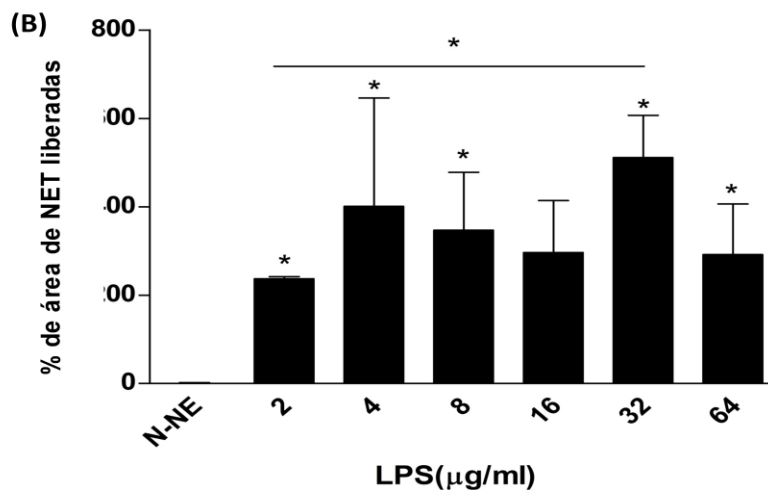
La evaluación del efecto de los factores solubles secretados por de las hAMSC sobre la liberación de trampas extracelulares del neutrófilo se realizó por medio de inmunofluorescencia. Se observó la liberación de estructuras en forma de red alrededor en los neutrófilos que fueron estimulados con LPS (N-LPS); estas estructuras se observaron formadas principalmente por DNA extracelular visualizado con yoduro de propidio (rojo) mezclado con la elastasa (verde), observándose el sobrepuesto de los colores en verde y rojo (flechas blancas) (Figura 10A, panel superior derecho); lo que confirmó la formación de NET en los neutrófilos estimulados. En comparación con los neutrófilos no estimulados (N-NE), las tinciones de DNA y elastasa fueron positivas solo de forma intracelular y ninguna estructura semejante a las NET se observó (Figura 10A, panel superior izquierdo). Sin embargo, se encontró la liberación de DNA y elastasa en algunos campos observados en los N-NE debido a la posible ruptura de células a causa de la manipulación.

Cuando los neutrófilos estimulados se mantuvieron en contacto con el MC-hAMSC se observó en las microfotografías de diferentes campos una disminución del número y área ocupada por las NET liberadas por los neutrófilos (flechas blancas) (Figura 10A, panel inferior izquierdo), cuando se comparó con los campos observados en los N-LPS. De igual manera que con el MC-hAMSC, cuando los N-LPS se co-cultivaron con las

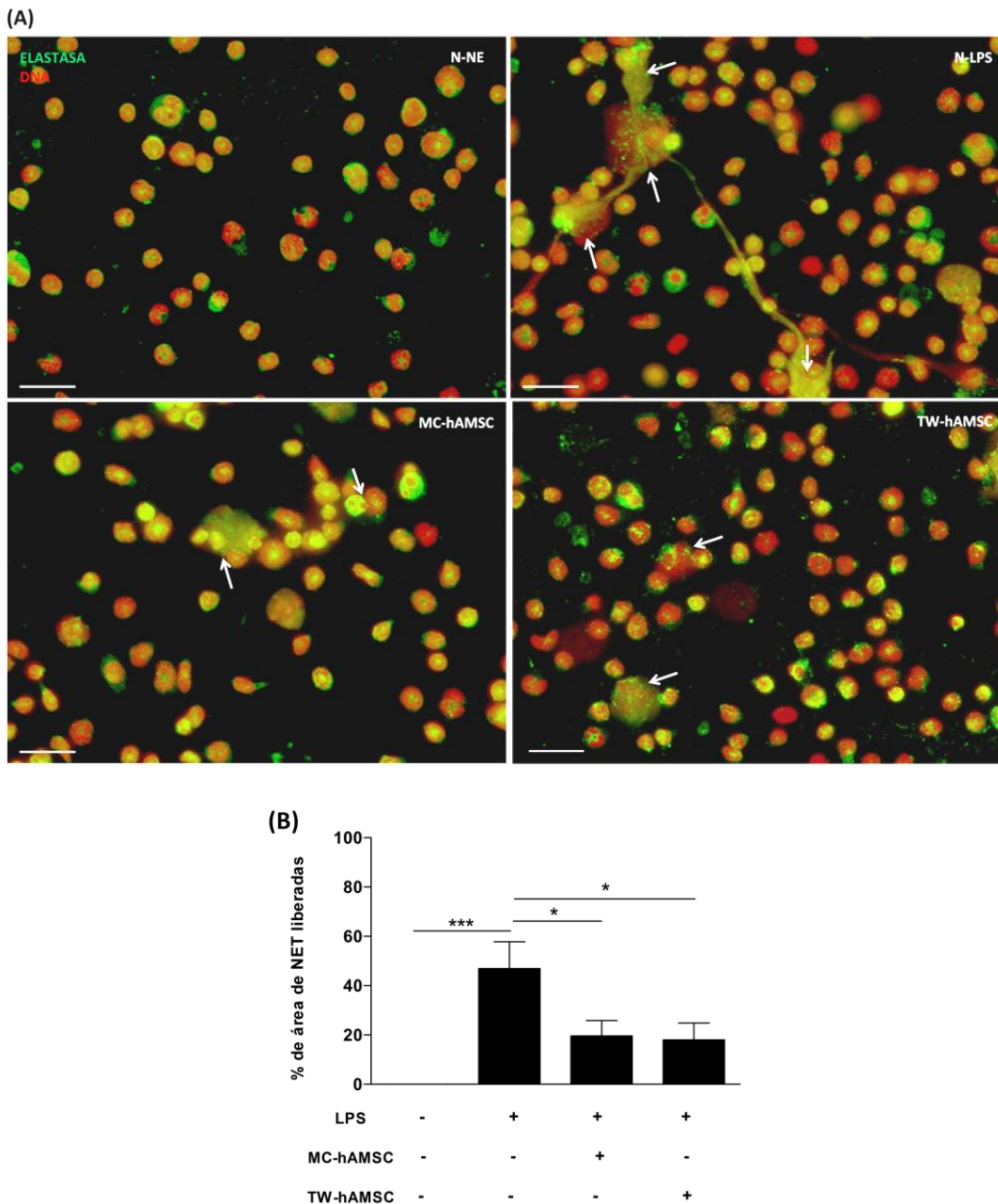
hAMSC usando un sistema transwell, se observó una disminución del área ocupada por las NET liberadas (Figura 10A, panel inferior derecho).

El análisis cuantitativo del área de NET liberadas se realizó haciendo la medición con el programa Image J del área ocupada por las NET en 5 campos aleatorios con aumento de 20X para cada condición. Después se calculó el porcentaje del área ocupada por las células con NET liberadas, considerando el área ocupada por los N-NE como el 100% del área basal ocupada por las células sin NET. Se encontró un porcentaje del 45% del área ocupada por las NET en los N-LPS, estadísticamente significativo ( $***p \leq 0.001$ ) comparado con los N-NE; así mismo, se encontró una disminución estadísticamente significativa ( $*p \leq 0.05$ ) aproximada de un 25% del área ocupada por las NET en los neutrófilos cultivados con MC-hAMSC en comparación a los N-LPS ; finalmente cuando los neutrófilos fueron co-cultivados con las TW-hAMSC se observó una disminución del área de NET liberadas en comparación a las células solo con estímulo, semejante a la observada con el MC-hAMSC. Debido que no se encontraron diferencias significativas estadísticamente ( $p \geq 0.05$ ) entre MC-hAMSC y TW-hAMSC, para posteriores ensayos solo se trabajó con el MC de las hAMSC (Figura 10B). Con los resultados anteriores se confirmó que los factores solubles secretados por las hAMSC presentes en el MC o secretados *in situ* son capaces de disminuir la liberación de trampas extracelulares en neutrófilos estimulados.





**Figura 9. Inducción de trampas extracelulares del neutrófilo (NET) con el estímulo de lipopolisacárido en polimorfonucleares aislados de médula ósea de ratón.** Microfotografías de la liberación de NET en neutrófilos murinos aislados de médula ósea de ratón estimulados durante 180 minutos con diferentes concentraciones [2, 4, 6, 8, 16, 32 y 64 µg/ml] de lipopolisacárido de *E.coli*. El DNA extracelular liberado en las NET se visualizó con la sonda fluorescente DAPI. Las NET liberadas se consideraron como las redes formadas con DNA extracelular (flechas blancas). Imágenes representativas de tres ensayos independientes (A). Gráfico del porcentaje del área ocupada por las NET liberadas de los neutrófilos estimulados durante 180 minutos con las diferentes concentraciones de LPS; \*p ≤ 0.05 [N-NE vs N-LPS 2, 4, 8, 32, 64 µg/ml]; \*p ≤ 0.05 [N-LPS 2 µg/ml vs N-LPS 32 µg/ml]. El área ocupada por las NET se cuantificó utilizando el programa Image J. Los valores se representan como el promedio del porcentaje de NET liberadas ± EE, n=3 (B). Microfotografías de fluorescencia de la cinética de inducción de NET en los neutrófilos de ratón con 32 µg/ml de LPS (C).



**Figura 10. Los factores solubles secretados por las hAMSC disminuyen la liberación de NET en neutrófilos murinos.** Microfotografías de fluorescencia de los neutrófilos murinos aislados de médula ósea estimulados con 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de LPS y cultivados con el medio condicionado de hAMSC (MC-hAMSC) o cocultivados con hAMSC usando un sistema transwell (TW-hAMSC), después de 90 minutos de cultivo. Las NET se observan como estructuras en forma de red o nube compuestas por elastasa y DNA (flechas blancas). La barra de escala representa 20 $\mu\text{m}$ . Estas son imágenes representativas de tres ensayos independientes (A). Gráfico del porcentaje del área ocupada por las NET liberadas. El área ocupada por las NET se cuantificó utilizando el programa Image J en cinco campos aleatorios para cada condición evaluada. Los datos se expresan como la media del porcentaje del área ocupada por las NET liberadas  $\pm$  EE (n = 3), \* $p < 0.05$  [N-LPS vs. MC-hAMSC; N-NE vs. MC-hAMSC]; \*\*\*  $p < 0.0001$  [N-NE vs. N-LPS] (B).

#### 12.4 Expresión y presencia constitutiva de TSG-6 en las hAMSC

Como parte de los factores solubles con funciones inmunosupresoras que se saben pueden ser secretados por las MSC se encuentra la proteína del gen-6 estimulada por TNF-alfa (TSG-6); por lo que se evaluó la expresión y presencia de TSG-6 en las células mesenquimales amnióticas humanas. Los resultados mostraron la expresión constitutiva del gen y la proteína TSG-6 en las hAMSC.

El análisis por inmunofluorescencia de la presencia y localización de la proteína TSG-6 en las hAMSC, mostró que las células mesenquimales presentan la proteína TSG-6 con un patrón de distribución posiblemente vesicular citoplasmático y nuclear (Figura 11A).

Después de la extracción del RNA total de las hAMSC, se buscó el RNAm del gen para la proteína TSG-6 y como gen constitutivo  $\beta$ 2 microglobulina. Se corrieron los amplificados en un gel de agarosa al 1.5% y se cuantificó la expresión por densitometría. Se observó en las fotografías del gel de agarosa la expresión del producto del gen de la proteína TSG-6 en las hAMSC; así mismo se encontró la expresión de  $\beta$ 2 microglobulina. El análisis semi-cuantitativo de la expresión de TSG-6 con respecto a la expresión de  $\beta$ 2 microglobulina mostró la expresión constitutiva del transcrito para la proteína TSG-6 en las hAMSC (Figura 11B). Se realizó la secuenciación automática del DNA del producto del gen obtenido de la RT-PCR. La secuencia de nucleótidos del transcrito para *tsg-6* obtenida (Figura 12) se comparó con las secuencias humanas para el gen *tsg-6* reportadas en la base de datos electrónica del NCBI (Ensemble transcript ID number ENSG00000123610); la homología encontrada fue del 100% entre las secuencias analizadas.

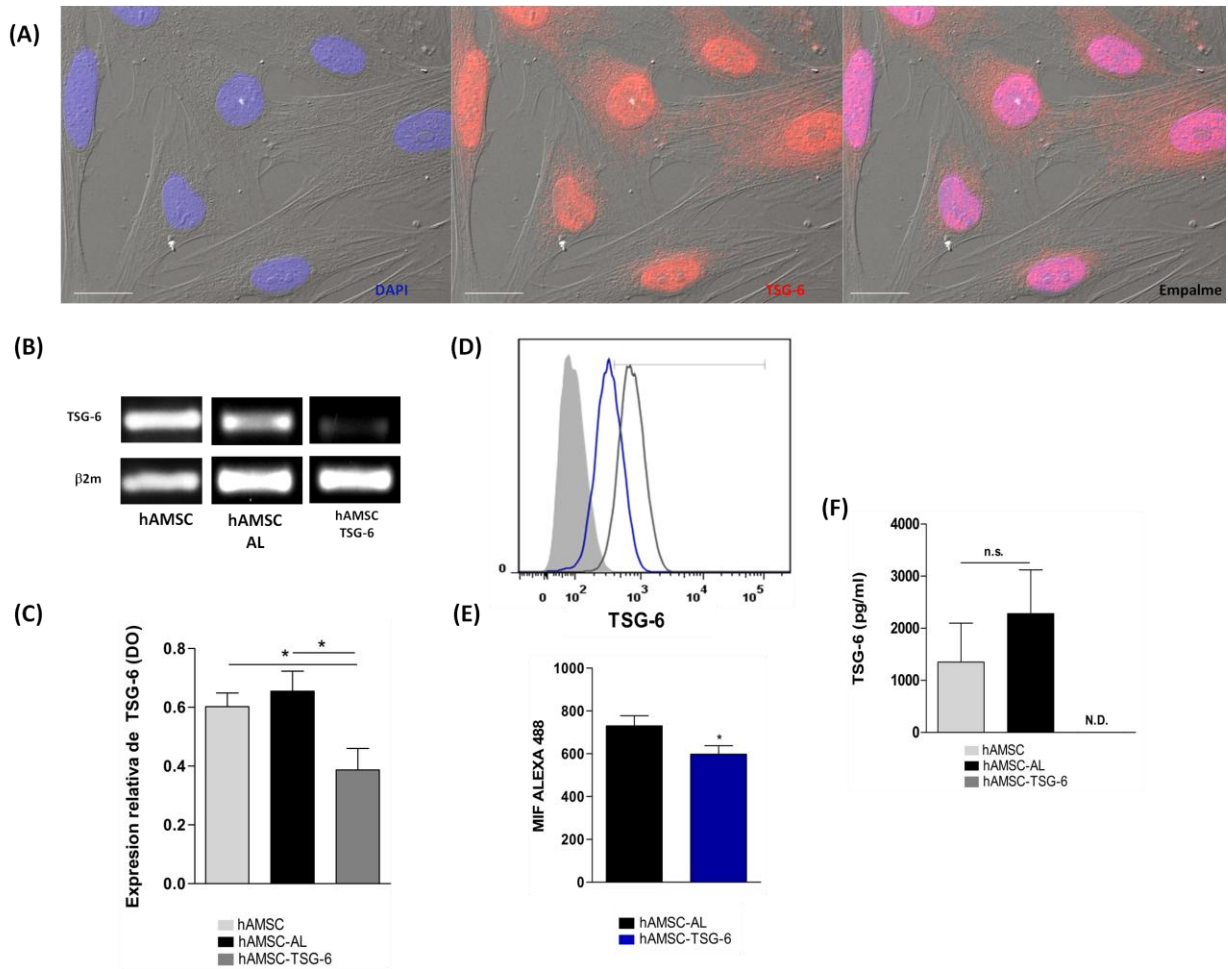
Por lo tanto con lo anterior, la proteína TSG-6 se encuentra presente de manera constitutiva a nivel transcripcional y proteico en las hAMSC y podría ser parte de los factores solubles con actividad inmunosupresora secretado por las hAMSC.

### **12.5 Silenciamiento de la proteína TSG-6 en las hAMSC**

Se realizó el silenciamiento de la proteína TSG-6 en las hAMSC usando un RNA de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés), para posteriormente evaluar la participación de TSG-6 en el mecanismo de inhibición de NET. La transfección de las hAMSC con el siRNA específico para TSG-6 (siRNA-TSG-6) disminuyó la expresión del transcrito y la proteína.

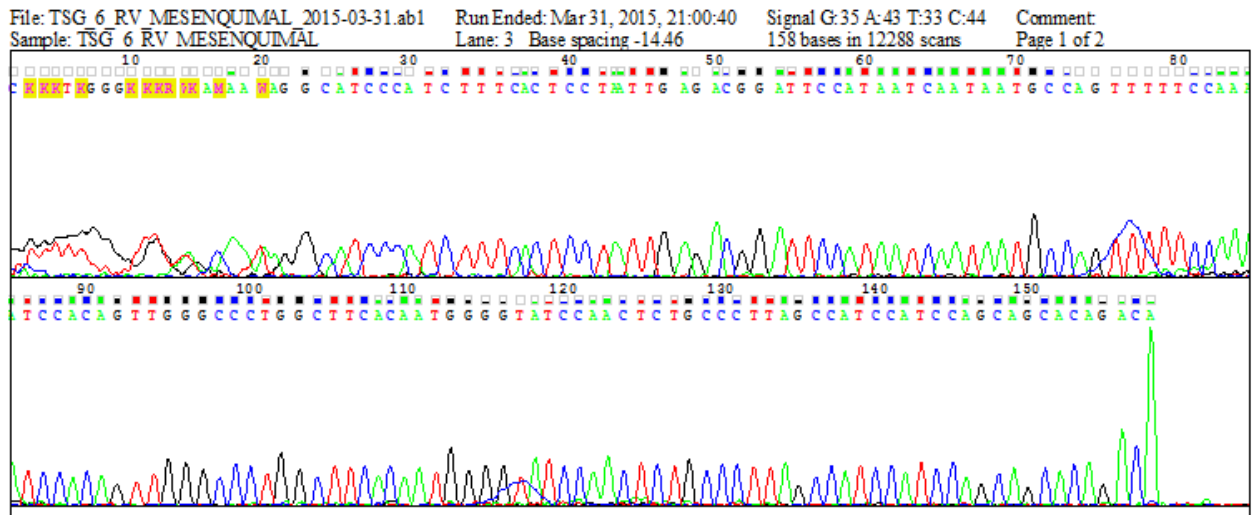
Cuando se realizaron los ensayos de RT-PCR para evaluar la expresión del transcrito de TSG-6, se encontró que la transfección de las hAMSC con el siRNA-TSG-6 disminuyó significativamente la densidad de la banda del transcrito de TSG-6, en comparación con las hAMSC transfectadas con el siRNA aleatorio (siRNA-AL) inespecífico para el mensajero de TSG 6 (\*\* $p \leq 0.01$ ) y con la banda del transcrito de las hAMSC no transfectadas (hAMSC) (\* $p \leq 0.05$ ) (Figura 11B). El análisis por densitometría de las bandas del transcrito para TSG-6 indicó una disminución de la expresión del producto en las hAMSC transfectadas con siRNA-TSG-6 (barra gris) de aproximadamente 0.2 (20%) unidades relativas con respecto a las hAMSC (barra blanca) y hAMSC transfectadas con siRNA-AL (barra negra) (Figura 11B y 11C).

La disminución de la proteína TSG-6 expresada en las hAMSC debido al silenciamiento se evaluó a través de citometría de flujo. La expresión de la proteína TSG-6 en las hAMSC se analizó utilizando la intensidad media de fluorescencia (MIF), se encontró una disminución estadísticamente significativa (\* $p \leq 0.05$ ) del MIF en las hAMSC tratadas con el siRNA-TSG-6 (línea y barra azul) cuando se comparó con el MIF de las hAMSC tratadas con el siRNA-AL (línea y barra negra) (Figura 11D y 11E). De manera semejante no se encontró una concentración detectable de la proteína TSG-6 por ELISA en el MC de hAMSC transfectadas con siRNA-TSG-6 en comparación a los MC de hAMSC sin transfectar y tratadas con el siRNA-AL (Figura 11F).



**Figura 11. La proteína del gen 6 estimulado por TNF-alfa (TSG-6) se expresa constitutivamente sobre hAMSC y se silencia mediante siRNA-TSG6.** Microfotografías de fluorescencia de la tinción de la proteína TSG-6 en las hAMSC junto con DAPI para la visualización de los núcleos y microscopía diferencial de contraste de interferencias (DIC). La barra de escala representa 20  $\mu$ m. Estas imágenes son representativas de tres experimentos independientes (A). Imagen de los productos de PCR de las hAMSC transfectadas con siRNA Aleatorio (hAMSC-AL), siRNA para TSG-6 (hAMSC-TSG-6) y hAMSC no transfectadas (hAMSC). El siRNA aleatorio se utilizó para confirmar el silenciamiento específico del gen para TSG-6 (B). Gráfico de barras de los análisis densitométricos de la expresión del transcrito de TSG-6 normalizados con respecto al gen constitutivo beta-2 microglobulina ( $\beta$ 2m). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EE (n = 3), \*p < 0,05 [hAMSC vs hAMSC-TSG-6; hAMSC-AL vs hAMSC-TSG-6] (C). Histogramas de la expresión de TSG-6 en hAMSC con siRNA Aleatorio (histograma negro; hAMSC-AL) y siRNA TSG-6 (histograma azul; hAMSC-TSG-6); el histograma en gris corresponde a la autofluorescencia (D). Gráfico de barras del valor de la MIF de la expresión de TSG-6 en las hAMSC transfectadas. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EE (n = 3), \*p < 0,05 [hAMSC-AL vs. hAMSC-TSG-6] (E). Gráfico de barras de la concentración evaluada por ELISA de la proteína TSG-6 en el MC de hAMSC tratadas con los siRNA aleatorio o TSG-6 y células no transfectadas. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EE (n = 3). n.s. = no estadísticamente significativo; no detectable (N.D.) (F).





**Figura 12. Secuenciación del transcrito para el gen *tsg-6*.** Electroferograma del exón 3 del gen de TSG-6. Secuencia parcial del exón 3 del gen.

## 12.6 Efecto del silenciamiento de TSG-6 en las hAMSC sobre la inhibición de NET

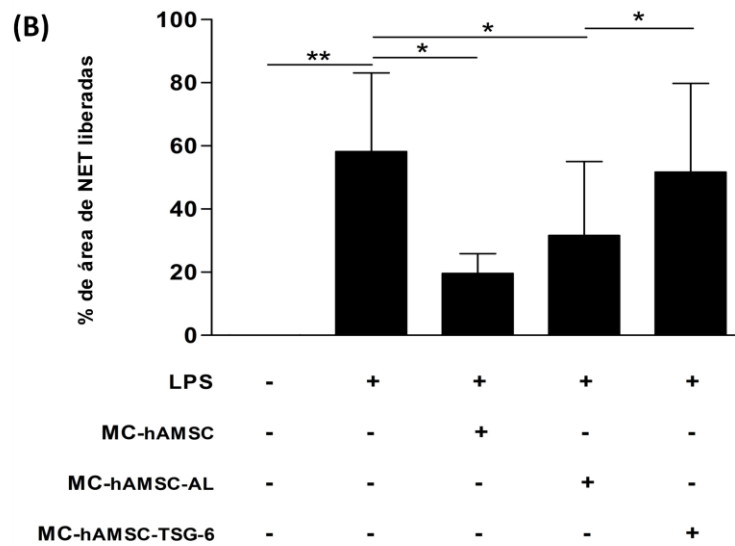
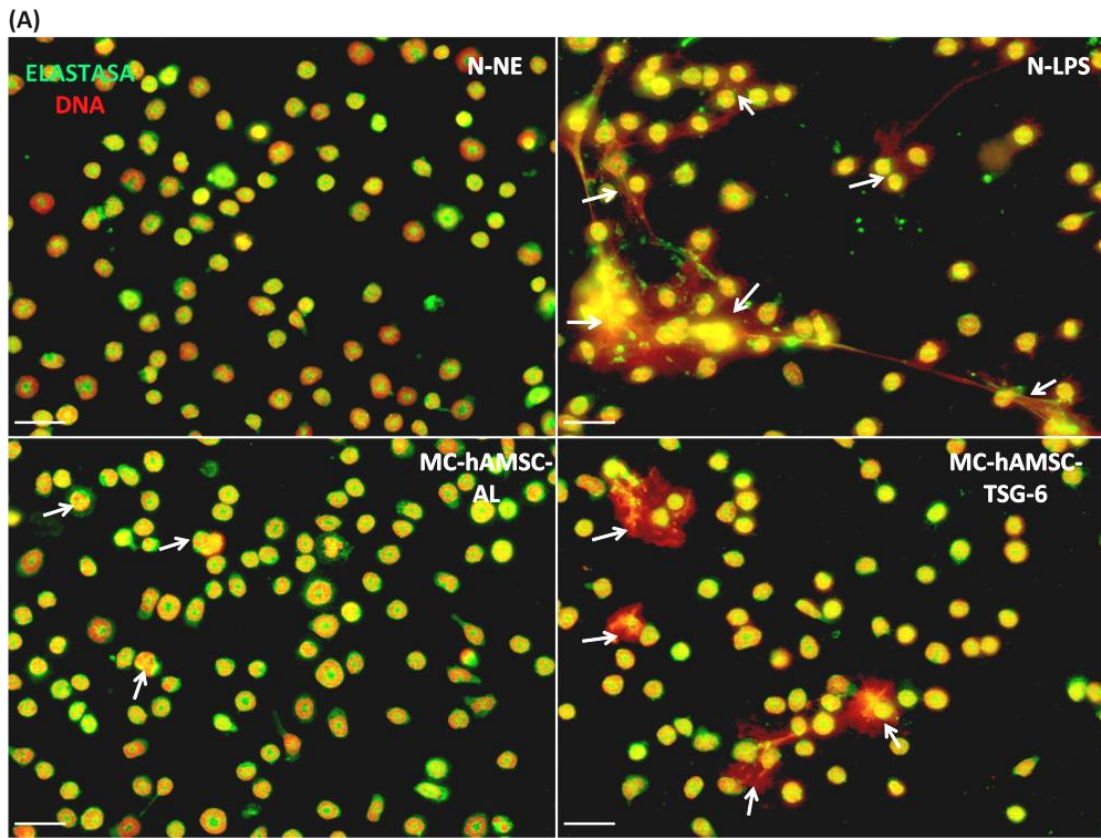
El silenciamiento de TSG-6 en las hAMSC recupera la capacidad de liberación de NET de los neutrófilos estimulados con LPS en presencia del MC de las hAMSC. Los neutrófilos de ratón purificados fueron estimulados con LPS para inducir la liberación de NET y cultivados junto con el medio condicionado de hAMSC que fueron previamente transfectadas con un siRNA-TSG-6 o con un siRNA-AL.

El análisis de las microfotografías mostró que existe la disminución en el área ocupada por NET liberadas por los neutrófilos observada en ensayos anteriormente descritos en la Figura 10, cuando los neutrófilos se exponen a los factores solubles presentes en el MC-hAMSC; de manera semejante al MC-hAMSC el medio condicionado de hAMSC tratadas con siRNA-AL (MC-hAMSC-AL) disminuyó el área ocupada por NET en comparación al área de la NET liberadas por N-LPS (flechas blancas) (Figura 13A, panel inferior izquierdo). En contraste, cuando los N-LPS se cultivaron con el medio condicionado de hAMSC tratadas con el siRNA-TSG-6 (MC-hAMSC-TSG-6) se observó un área ocupada por NET liberadas semejante a la observada en los N-LPS (flechas blancas) (Figura 13A, panel inferior derecho).

Para cada condición se evaluó el área ocupada por las NET liberadas con el programa Image J en cinco campos aleatorios. El análisis cuantitativo del área ocupada por las NET mostró la disminución de aproximadamente el 50% del área ocupada por las NET cuando los N-LPS son cultivados con MC-hAMSC-AL, con diferencia estadísticamente significativa ( $*p \leq 0.05$ ) en comparación a los N-LPS sin MC. Respecto a las células incubadas con el MC-hAMSC-TSG-6 se encontró una mayor área de NET liberadas (50%) estadísticamente significativa ( $*p \leq 0.05$ ) en comparación con el área de los neutrófilos incubados con MC-hAMSC-AL (35%) (Figura 13B). Los resultados anteriores sugieren la participación de TSG-6 en el mecanismo inmunosupresor de las hAMSC sobre la liberación de NET.

---

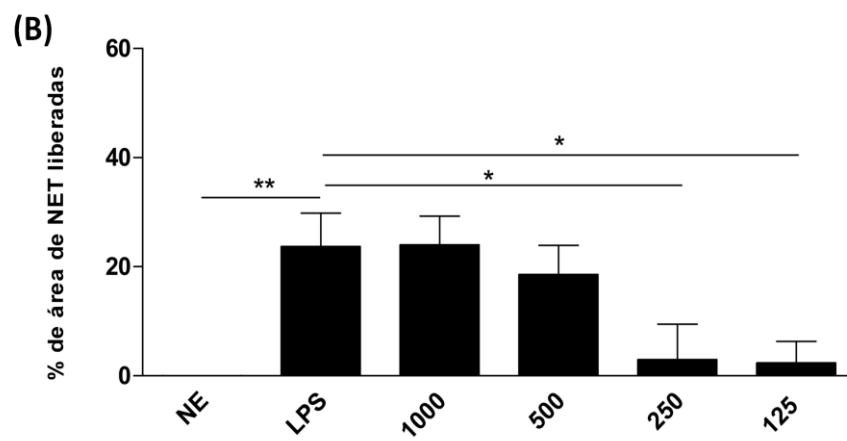
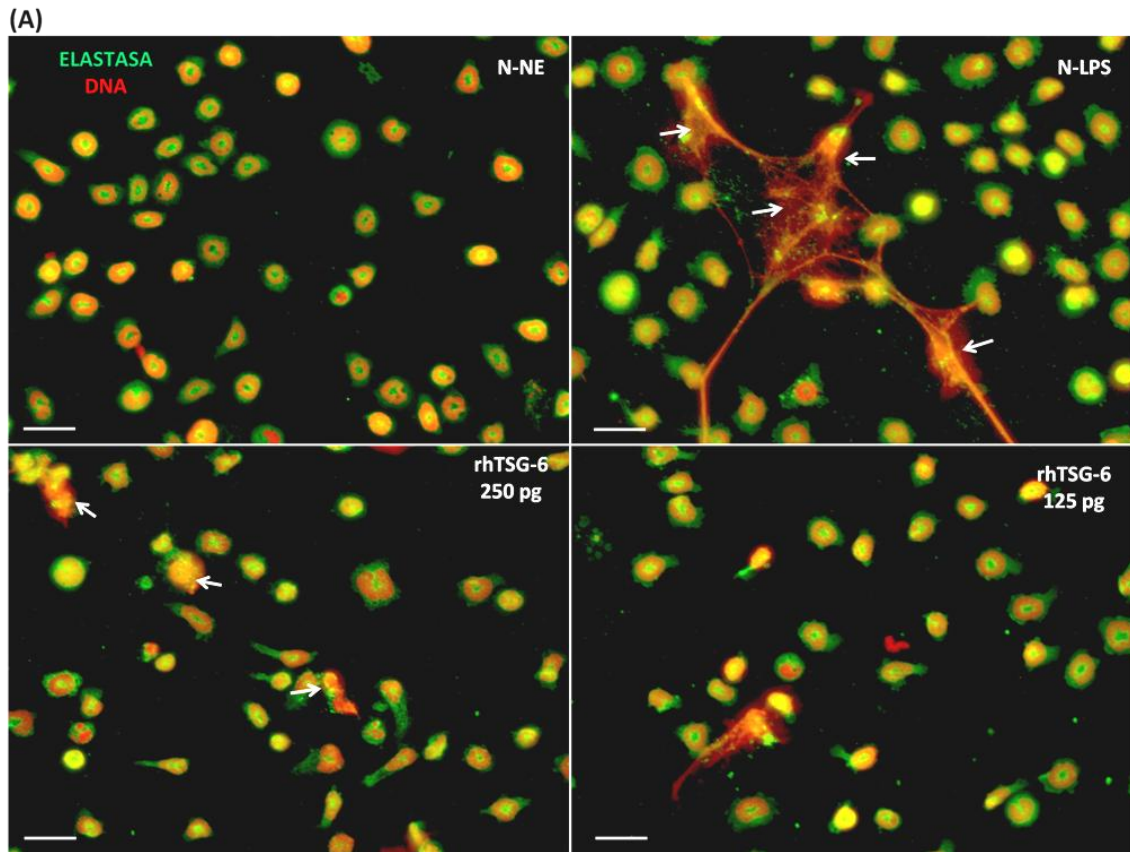
**Figura 13. El silenciamiento de la proteína TSG-6 en las hAMSC recupera la capacidad de liberación de NET en los neutrófilos de ratón.** Microfotografías de fluorescencia de neutrófilos murinos estimulados con LPS para la inducción de NETs con LPS (32  $\mu\text{g/ml}$ ), cultivados durante 90 minutos junto con el medio condicionado de hAMSC - AL o hAMSC-TSG-6. El MC de hAMSC-AL se usó para corroborar que el silenciamiento específico de TSG-6 no afecta el efecto inmunosupresor del MC de las hAMSC. Las NET se observan como estructuras en forma de red o nube compuestas por elastasa del neutrófilo y DNA teñido con yoduro de propidio (flechas). La barra de escala representa 20 $\mu\text{m}$  (A). Gráfico del porcentaje del área ocupada por las NET liberadas. El área ocupada por las NET se cuantificó utilizando el programa Image J en cinco campos aleatorios para cada condición evaluada. Los datos se expresan como la media del porcentaje de NET liberadas  $\pm$  EE (n = 3), \*\* p <0,001 [N-NE vs. N-LPS]; \* p <0,05 [N-LPS vs. MC-hAMSC, N-LPS vs. MC-hAMSC-AL, MC-hAMSC-AL vs. MC-hAMSC-TSG-6]; n.s. = no estadísticamente significativo [MC-hAMSC vs MC-hAMSC-AL](B).



Con el fin de determinar directamente el efecto de TSG-6 sobre la liberación de NET en neutrófilos estimulados con LPS, los neutrófilos se cultivaron con diferentes concentraciones de la proteína recombinante humana TSG-6. Interesantemente, se encontró que la incubación con las concentraciones 250 y 125 pg/ml de rhTSG-6 tienen un efecto inhibitorio sobre la liberación de NET (Figura 14A) con diferencias significativas en comparación con los N-LPS (Figura 14B), semejante al efecto inhibitorio encontrado con los diferentes MC de las hAMSC. Por lo tanto, los resultados sugieren que TSG-6 es parte de los factores presentes en el MC de las hAMSC que participan en el mecanismo de inhibición de la NET.

---

**Figura 14. TSG-6 recombinante humano disminuye la liberación de NET.** Microfotografías de fluorescencia de neutrófilos murinos estimulados con LPS para la inducción de NET con LPS (32 µg/ml) y cultivados durante 90 minutos con diferentes concentraciones de la proteína recombinante humana TSG-6 (rhTSG-6). Las NET se observan como estructuras en forma de red o nube compuestas por elastasa del neutrófilo y DNA teñido con yoduro de propidio (flechas). Estas imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Las barras de escala representan 20µm (A). Gráfico del porcentaje del área ocupada por las NET liberadas de neutrófilos estimulados con LPS incubados con rhTSG-6. El área ocupada por las NET se cuantificó utilizando el programa Image J en cinco campos aleatorios para cada condición evaluada. Los datos se expresan como la media del porcentaje de células con NET liberadas ± EE (n = 3). \*\*p< 0.001 [N-NE vs. N-LPS], \*p< 0.05 [N-LPS vs. rhTSG6 250 pg/ml; N-LPS vs. rhTSG6 125 pg/ml] (B).



### **12.8 Efecto del MC y TSG-6 sobre el estallido respiratorio y generación de especies reactivas del oxígeno**

El MC de las hAMSC logró disminuir la generación de ión superóxido y el silenciamiento de TSG-6 restauró la generación de superóxido en los neutrófilos estimulados. La formación y liberación de NET es un proceso que depende de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), por lo que se evaluó durante diferentes periodos de tiempo el efecto del MC-hAMSC-AL y MC-hAMSC-TSG-6 sobre la generación de ROS, en particular la generación del anión superóxido. El anión superóxido se cuantificó por medio del método de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT).

Después de 15 minutos del estímulo y cultivo de los neutrófilos con los diferentes MC, se observó una disminución estadísticamente significativa ( $*p \leq 0.05$ ) del porcentaje del anión superóxido en los neutrófilos en contacto con el MC-hAMSC-AL cuando se comparó con los neutrófilos solo con estímulo. El mismo efecto de disminución de superóxido respecto a los N-LPS fue encontrado cuando los neutrófilos estuvieron en contacto con el MC-hAMSC-TSG6 ( $*p \leq 0.05$ ); posiblemente este resultado se daba a la presencia de alguna otra molécula además de TSG-6 con efecto inmunosupresor presente en el MC de las hAMSC.

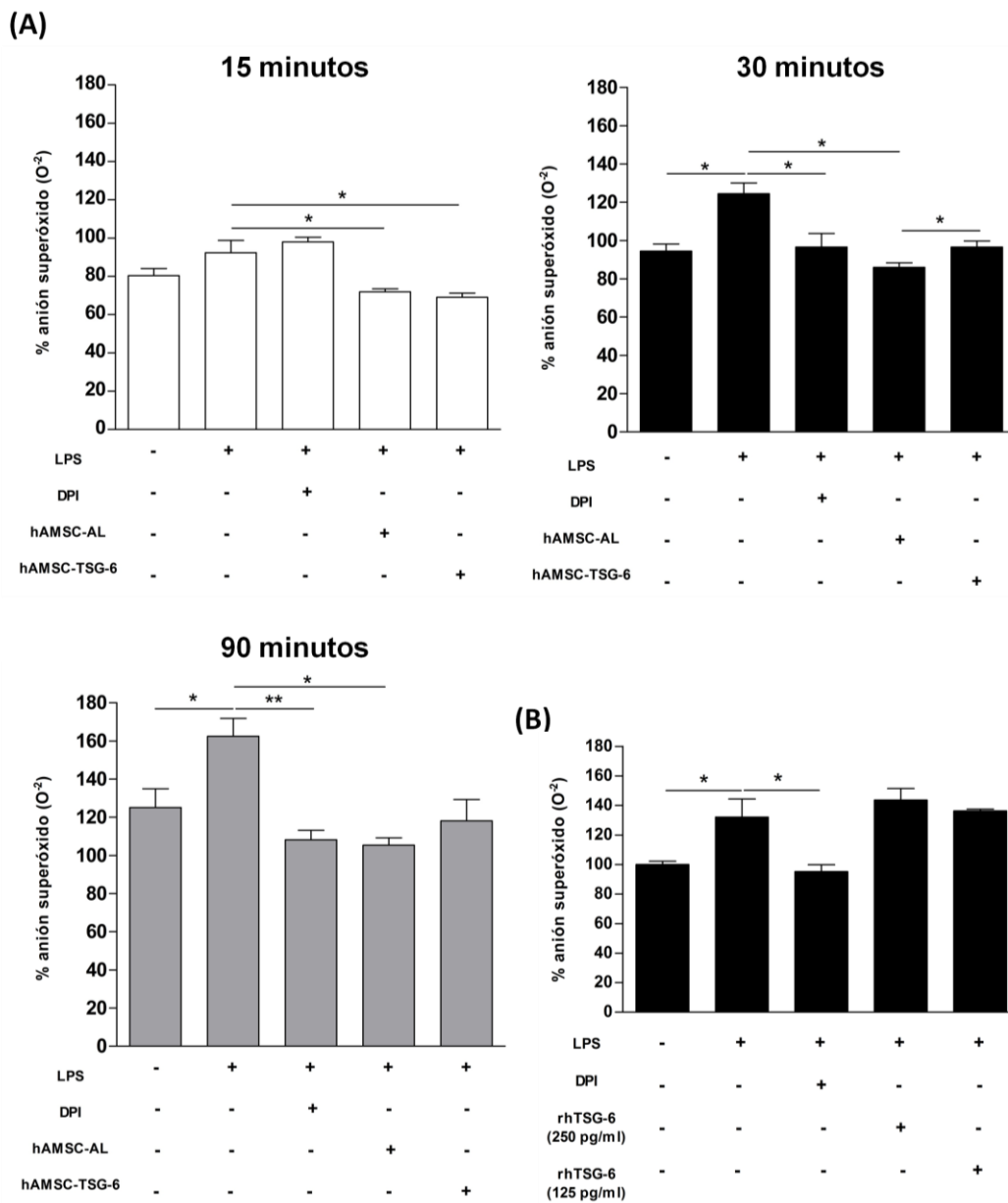
Por su parte, cuando se evaluó después de 30 minutos del contacto de los N-LPS con el MC-hAMSC-AL se encontró la disminución de la capacidad de los neutrófilos de generar anión superóxido estadísticamente significativa de más del 30% ( $*p \leq 0.05$ ) del porcentaje del anión superóxido, respecto al porcentaje de superóxido producido en los N-LPS. Esta disminución de superóxido es semejante a la encontrada en los neutrófilos que se cultivaron con el inhibidor específico del complejo NADPH oxidasa, Difenilenedonio (DPI, por sus siglas en inglés)<sup>123</sup>. En contaste con el tiempo de 15 minutos, después de 30 minutos de que los neutrófilos estimulados se cultivaron con MC-hAMSC-TSG-6, se encontró que los neutrófilos fueron capaces de producir 20% más anión superóxido respecto a los neutrófilos cultivados con MC-hAMSC-AL ( $*p \leq 0.05$ ).

Por su parte, en el tiempo de 90 minutos de cultivo de los neutrófilos y los MC se mantuvo la disminución del porcentaje del anión superóxido en los neutrófilos con MC-hAMSC-AL semejante a la inhibición observada con el inhibidor DPI, cuando se comparó con el porcentaje de superóxido producido en

los N-LPS (\* $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias sobre la producción de superóxido entre las células con MC-hAMSC-AL y MC-hAMSC-TSG-6. Por otra parte, se observó que la generación de superóxido en los N-LPS fue dependiente del tiempo en comparación a los N-NE (\* $p \leq 0.05$ ) (Figura 15A).

Para corroborar la directa participación de TSG-6 sobre la disminución de ROS como parte de los factores inmunosupresores del MC de las hAMSC, se realizó la incubación de N-LPS con diferentes concentraciones de la proteína TSG-6 recombinante humana (rhTSG-6). Las concentraciones de rhTSG-6 usadas para los ensayos fueron 250 pg/ml y 125 pg/ml, ya que corresponden a las concentraciones donde se encontró un efecto inhibitorio sobre la formación de NET en los anteriores ensayos. Se observó una disminución del porcentaje de superóxido en los neutrófilos cultivados con el inhibidor DPI comparados con el porcentaje producido por los N-LPS; sin embargo, no se encontró disminución en el porcentaje de superóxido en los neutrófilos que se cultivaron con las dos diferentes concentraciones de rhTSG-6 cuando se compararon con los N-LPS (Figura 15B). Posiblemente, TSG-6 presente en el MC de las hAMSC tiene una actividad conjunta sobre la inhibición de ROS con algún otro factor secretado en el MC.

Los resultados de los ensayos anteriores sugieren que la inhibición de NET debido al MC de las hAMSC es dependiente de la disminución de ROS; además que TSG-6 tiene una participación parcial en el proceso de inhibición de ROS.



**Figura 15. La disminución de la liberación de NET a través del MC y TSG-6 es dependiente de ROS.**

Gráficos del porcentaje del anión superóxido producido por neutrófilos estimulados con LPS y cultivados con el MC-hAMSC-AL o MC-hAMSC-TSG-6 durante 15, 30 y 90 minutos posteriores al estímulo (A). Gráfico de barras del porcentaje de producción de anión superóxido en neutrófilos de ratón estimulados con LPS y cultivados con rhTSG-6 (250 y 125 pg/ml) durante 30 minutos. Para ambos ensayos se determinó la concentración del anión superóxido por medio del método de NBT. Como control de la inhibición de la producción de anión superóxido se usó el inhibidor del complejo NADPH oxidasa Difenilenodonio (DPI). Los datos se expresan como el promedio del porcentaje de anión superóxido  $\pm$  EE, (n = 3); \* p $\leq$ 0.05; \*\*p  $\leq$ 0.01 (B).



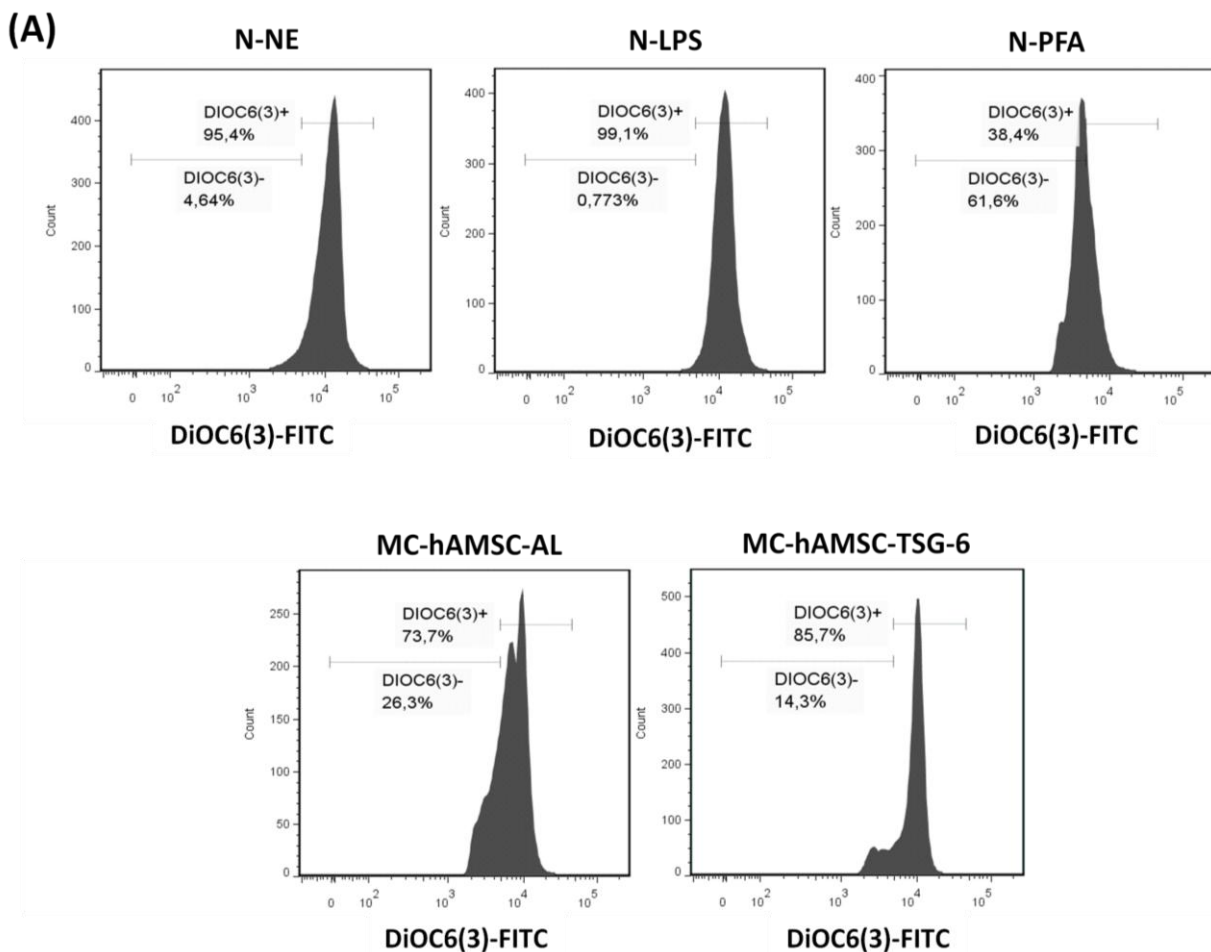
### **12.9 Efecto del MC y TSG-6 sobre el potencial de membrana mitocondrial**

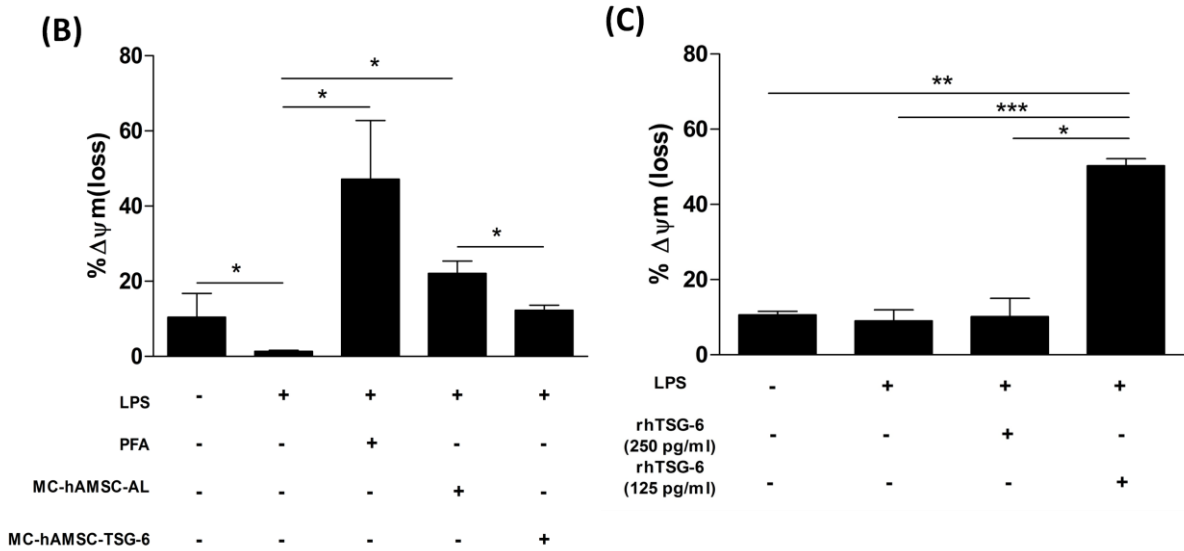
El complejo enzimático NADPH oxidasa encargado de la generación de ROS, tiene dos componentes anclados a la membrana mitocondrial, por lo que el adecuado funcionamiento mitocondrial es fundamental para la formación de ROS. El potencial de la membrana mitocondrial es un indicador del estado energético de las mitocondrias y su correcta función. Se evaluó la función mitocondrial a través de la medición del potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ), utilizando la sonda fluorescente DiOC6 (3). Para la medición del potencial de membrana, N-LPS se cultivaron con cada uno de los MC evaluados en los ensayos anteriores durante 15 minutos y se analizaron por citometría de flujo. Ya que la producción de ROS es un proceso posterior a la actividad mitocondrial; se evaluó el %  $\Delta\psi_m$  a los 15 minutos posteriores al estímulo de LPS, debido que a los 30 minutos de cultivo con LPS los neutrófilos mostraron cambios significativos entre las condiciones evaluadas anteriormente sobre su capacidad de producción de ROS. Los datos se representaron como el promedio del porcentaje de pérdida del potencial de membrana (%  $\Delta\psi_m$  loss)  $\pm$  EE.

Como se muestra el porcentaje de la población positiva para la marca de DiOC6(3) es mayor en los neutrófilos sin estímulo (96.4 %) y N-LPS (99.1%) ; sin embargo, se ve una disminución de la expresión de DiOC6(3) en los neutrófilos cultivados con el MC-hAMSC-AL (73.7 %) y en los neutrófilos fijados con PFA 4% (36.4%); en cambio, en los neutrófilos con MC-hAMSC-TSG-6 se encontró un mayor porcentaje de células positivas a DiOC6(3) (85.7 %), respecto al grupo con MC-hAMSC-AL (Figura 16A). Respecto al porcentaje de pérdida del potencial de membrana mitocondrial, se encontró que los neutrófilos expuestos a los factores solubles en el MC-hAMSC-AL presentan un % $\Delta\psi_m$  loss cercano al 20%, estadísticamente significativo (\* $p < 0.05$ ) cuando se comparó con los neutrófilos cultivados solo con LPS, donde el porcentaje de pérdida fue menor al 5%. Interesantemente, cuando los neutrófilos se incubaron con el MC-hAMSC-TSG-6 se encontró una reducción estadísticamente significativa (\* $p < 0.05$ ) del %  $\Delta\psi_m$  loss del 10% respecto a los neutrófilos con MC-hAMSC-AL. Como control positivo del %  $\Delta\psi_m$  loss, se usaron neutrófilos estimulados fijados con PFA 4%, donde se observó un porcentaje de  $\Delta\psi_m$  loss mayor del 50% respecto a los N-LPS (\* $p < 0.05$ ) (Figura 16B). Por lo anterior, se puede sugerir que TSG-6 secretado en el MC de las hAMSC afecta el potencial de membrana mitocondrial y tiene repercusión sobre la generación ROS en los neutrófilos de ratón.

Por otra parte, cuando los neutrófilos de ratón estimulados con LPS fueron cultivados junto con la proteína recombinante humana de TSG-6 se encontró un %  $\Delta\psi_m$  loss aproximado del 50% con una concentración de 125 pg/ml de rhTSG-6, resultado estadísticamente significativo respecto a N-NE (\*\* $p \leq 0.01$ ) y N-NLP (\*\*\*) $p \leq 0.001$ ); sin embargo, este mismo efecto no se observó con la concentración de 250 pg/ml.

Los resultados anteriores sugieren que la proteína TSG-6 secretada por las hAMSC y la proteína recombinante afectan el potencial de membrana mitocondrial y por lo tanto alteran las funciones mitocondriales, entre estas la generación de ROS.





**Figura 16. El mecanismo de inhibición de TSG-6 afecta el potencial de membrana mitocondrial de los neutrófilos de ratón.** Histogramas de la fluorescencia de la sonda DiOC6 (3) en los neutrófilos de ratón estimulados y cultivados con el MC-hAMSC-AL o MC-hAMSC-TSG-6 durante 15 minutos posteriores al estímulo. La población DiOC6 (3) fue considerada como el porcentaje de pérdida del potencial de membrana (% $\Delta\psi_m$  loss) (A). Gráfico del %  $\Delta\psi_m$  loss de los neutrófilos cultivados con el MC-hAMSC-AL o MC-hAMSC-TSG-6. Los valores se expresan como la media del porcentaje de pérdida del potencial de membrana (%  $\Delta\psi_m$  loss)  $\pm$  EE, (n=3); \* $p \leq 0.05$  [N-LPS vs PFA]; [N-NE vs. MC-hAMSC-AL]; [N-LPS vs. MC-hAMSC-AL]; [MC-hAMSC-AL vs. MC-hAMSC-TSG-6]. Como control del %  $\Delta\psi_m$  loss, neutrófilos se fijaron previo al estímulo y cultivo con PFA 4% (B). Gráfico del %  $\Delta\psi_m$  loss de neutrófilos estimulados y cultivados durante 15 minutos con rhTSG-6 (250 y 125 pg/ml). Los valores se expresan como la media del %  $\Delta\psi_m$  loss  $\pm$  EE, (n=3); \*\* $p \leq 0.01$  [N-NE vs. rhTSG-6 125pg]; \*\*\*  $p \leq 0.001$  [N-LPS vs. rhTSG-6 125 pg]; \*  $p \leq 0.05$  [rhTSG-6 vs. rhTSG-6 250 pg](C).

### 13. Discusión

Las células mesenquimales (MSC) son un grupo de células multipotentes que pueden ser obtenidas de diversos tejidos humanos adultos o embrionarios y que en los últimos años han generado interés en el campo de la investigación debido a sus múltiples funciones y usos en la terapia celular. Entre algunos de los tejidos empleados para el aislamiento de MSC se encuentra la membrana amniótica (MA). La membrana amniótica es una membrana avascular, translúcida y delgada que tiene como función brindar protección al feto durante el embarazo. La membrana amniótica es empleada en diversos campos de la medicina, en el tratamiento de quemaduras en la piel, en la reconstrucción de la superficie ocular<sup>124</sup> y como terapia antiinflamatoria e inmunomoduladora de la respuesta de fibroblastos y células de la respuesta inmune<sup>22</sup>. Uno de los principales componentes celulares de la MA son las células mesenquimales estromales. Se ha descrito que las células mesenquimales amnióticas humanas son células que poseen funciones supresoras sobre la respuesta inmune en procesos inflamatorios exacerbados. Debido que las MSC pueden ser aisladas de diversos tejidos, en 2006 la Sociedad Internacional de la Terapia Celular (ISCT) estableció los criterios mínimos de caracterización de las MSC. Entre los criterios se encuentran, la adhesión al plástico durante su cultivo *in vitro*, la generación de U-FCF, la expresión de los marcadores mesenquimales CD105, CD90, CD73, CD44, CD29 y la ausencia de marcadores hematopoyéticos CD45, CD19, CD34, CD11d, CD14 and CD79a; además de la capacidad de diferenciación hacia uno o más linajes celulares<sup>2</sup>.

En el presente trabajo fue posible el aislamiento de las células estromales de la MA. Las células aisladas se caracterizaron de acuerdo a los criterios de la ISCT, estas células fueron adherentes al plástico de las botellas de cultivo y presentaron una morfología fibroblastoide en forma de huso; además las células cumplieron con la capacidad de generar colonias, cumpliendo con los criterios de adherencia y clonogenicidad descritos para las MSC (Figura 6). Por otro lado las hAMSC aisladas expresaron los marcadores de origen embrionario y de pluripotencialidad OCT-4 y SSEA-4, junto con la capacidad de diferenciación hacia hepatocitos y condrocitos (Figura 7). Como se menciona en algunos reportes MSC aisladas de tejidos diferentes a la médula ósea, por ejemplo tejido adiposo, cordón umbilical e inclusive células de membrana amniótica tienen como característica la capacidad de diferenciación multilínea hacia adipocitos, condrocitos, osteoblastos, células musculares y neuronales, además de cardiomiocitos<sup>117,124,125</sup>, por lo anterior las hAMSC obtenidas cumplen con la propiedad de diferenciación multilínea descrita.

De manera similar a los criterios de la ISTC las hAMSC expresaron el patrón de marcadores del linaje mesenquimal designado para el grupo de las MSC, así como de carecer de la presencia de marcadores expresados por células de origen hematopoyético. Por todos los resultados anteriores, fue posible obtener del estroma de la membrana amniótica humana células que cumplen con los criterios mínimos de caracterización para ser consideradas del grupo de las MSC.

Como parte de las características y funciones de las MSC, se ha reportado que estas células son capaces de realizar funciones regenerativas, inmunomoduladoras e inmunosupresoras. Las MSC son capaces de ejercer sus funciones inmunomoduladoras e inmunosupresoras sobre una gran variedad de células del sistema inmune. Por ejemplo, existen reportes que mencionan que las MSC pueden interferir en la activación de las células dendríticas<sup>5,11</sup> e inhibir la expresión de moléculas asociadas con la presentación de antígenos y la activación de la respuesta inmune adaptativa como CD40, CD83, CD80, CD86 y HLA-A<sup>7</sup>. Así mismo, se ha visto la función de las MSC sobre la proliferación y función efectora de las células T y B<sup>8</sup>.

Las funciones de las MSC sobre las células de la respuesta inmune descritas anteriormente, han sido en su mayoría reportadas para las MSC obtenidas de medula ósea (BM-MS); sin embargo, se desconoce sobre la completa función inmunorreguladora que pueden ejercer las hAMSC. En particular, se ha descrito la participación de las hAMSC sobre la inhibición de la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como el TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-12 en macrófagos, así como promover el aumento de la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10<sup>126</sup>. La importancia del estudio de las propiedades inmunorreguladoras de las hAMSC es principalmente debido al hecho de que a diferencia de las BM-MS, las hAMSC se pueden aislar a partir de un tejido con mayor accesibilidad y con un rendimiento mayor sin requerir de un método invasivo<sup>23</sup>. Además de la facilidad de obtención de las hAMSC, se ha reportado que estas células poseen características inmunológicas que las hacen un buen candidato en la terapia celular debido que no expresan moléculas del MHC-II y presentan moléculas del HLA no clásicos, principalmente HLA-G y HLA-E, que tienen funciones inmunosupresoras y promueven la tolerancia inmunológica<sup>127,128</sup>.

Uno de los principales componentes celulares de la respuesta inmune innata son los neutrófilos, células capaces de realizar diversas funciones efectoras en defensa del hospedero. La liberación de trampas extracelulares del neutrófilo o NET es uno de los mecanismos efectores de los neutrófilos que ha tomado interés en los últimos años debido a su relación con el desarrollo de diversos procesos inflamatorios

crónicos y autoinmunes, como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, psoriasis y la formación de auto-anticuerpos ANCA que desarrollan pequeñas vasculitis además del mantenimiento de daño tisular. De manera similar, las NET se asocian con el desarrollo de sepsis, endometriosis, enfermedad pulmonar obstructiva y trombosis. Por lo anterior, se ha considerado a la liberación exacerbada y descontrolada de NET como un problema que contribuye con el aumento del fenómeno inflamatorio y la severidad clínica; es por estas razones, que en este trabajo se evaluó el efecto de los factores solubles que podrían estar secretando las hAMSC sobre la liberación de trampas extracelulares del neutrófilo.

Los neutrófilos son células polimorfonucleares consideradas la primera línea de defensa del sistema inmune que presentan un núcleo multilobulado y una gran cantidad de gránulos en su citoplasma. Sus gránulos contienen un amplio repertorio de enzimas como mieloperoxidasa, lisozima, captesina G, metaloproteasas, gelatinasa, colagenasa y elastasa, además de otras proteínas como péptidos antimicrobianos, receptoras para el complemento y la fracción Fc y componentes del complejo enzimático NADPH<sup>62</sup>. Además los neutrófilos expresan en su superficie una gran variedad de moléculas de adhesión como L-selectina, LFA-1 (CD11a-CD18) y MAC-1 (CD11b-CD18) principalmente<sup>129</sup>. Utilizando citometría de flujo se evaluó el porcentaje de la población de células polimorfonucleares aislada por selección negativa con inmunomagneto de una suspensión de médula ósea de ratón. Empleando los parámetros de tamaño (*Forward Scatter, FSC*) y complejidad o granularidad (*Side Scatter, SSC*) se encontró que el porcentaje de células granulares en la suspensión medular total fue aproximadamente del 38%; sin embargo, con el método de selección negativa fue posible enriquecer la población granular hasta un 96%. La población granular aislada de médula ósea fue positiva para la expresión de la enzima elastasa específica de los gránulos secundarios de los neutrófilos<sup>130</sup>, lo que confirmó el uso de una población pura de neutrófilos aislados de médula ósea de ratón para realizar los ensayos siguientes. La pureza y el enriquecimiento mayor al  $\geq 95\%$  de los neutrófilos aislados de médula ósea de ratón en nuestros resultados coincide con lo reportado en otros trabajos<sup>131,132</sup>.

El ambiente pro-inflamatorio generado por las citocinas y quimiocinas promueve en la superficie del neutrófilo el aumento de la expresión y afinidad de unión con sus respectivos ligandos de las distintas moléculas de adhesión que expresa, para permitir los procesos de migración y activación<sup>71</sup>. Sin embargo, la manipulación in vitro de los neutrófilos puede ser otro de los factores que generen una activación de estas células polimorfonucleares, causando posiblemente resultados difíciles de interpretar. Por lo anterior, es

que después de la selección negativa por inmunomagneto de los neutrófilos de ratón a partir de la médula ósea, se evaluó la expresión de la subunidad alfa de la molécula de adhesión MAC-1, conocida como CD11b. Los resultados mostraron que no existió aumento de la expresión de la proteína CD11b en los neutrófilos purificados, ya que se encontraron valores semejantes a la expresión basal de CD11b en la población granular de la suspensión de médula ósea completa. Cuando se comparó la expresión de CD11b respecto a una población de neutrófilos estimulada con LPS, se observó menor expresión en las células purificadas en comparación a las células activadas. Por lo anterior, las células polimorfonucleares aisladas de médula ósea de ratones no se encontraban en un estado activado debido al proceso de purificación.

La liberación de NET es un mecanismo efector descrito en 2004 en el trabajo de *Brinckman y cols*<sup>85</sup>; para que se lleve a cabo la liberación de las trampas extracelulares es necesaria la adhesión y activación de los neutrófilos. Existen reportes que indican que la generación y liberación de las NET se debe al reconocimiento de una gran variedad de moléculas, entre las que se encuentran ligandos específicos para receptores de reconocimiento de patrones, como zimozán, antígenos de *Listeria* y LPS<sup>86</sup>. De acuerdo a nuestros resultados y coincidiendo con lo reportado por *Brinckman*<sup>133</sup>, el cultivo con diferentes concentraciones de LPS indujo la liberación de estructuras en forma de red y nubes compuestas por DNA extracelular junto con proteínas de los gránulos citoplasmáticos alrededor de los neutrófilos de ratón estimulados. Respecto a nuestros resultados y sistema empleados, las mejores condiciones de inducción de NET fueron usando una concentración de 32 µg/ml de LPS y después de 90 minutos de estimulación (Figura 9); estas condiciones de trabajo coinciden con las descritas por Fuchs y Brinckman quienes reportaron que en el periodo de 15 minutos y hasta 4 horas posteriores al estímulo puede observarse el fenómeno de formación de NET y cada uno de los cambios morfológicos descritos durante la NETosis. Para corroborar que las redes liberadas se debían a NET y no eran causa de la ruptura de los neutrófilos debido a la manipulación, se realizó el marcaje para la proteína elastasa, uno de los principales componentes de las NET junto con la visualización con yoduro de propidio del DNA extracelular. Lo que se observó fue la presencia de estructuras en forma de red positivas para las marcas de elastasa y yoduro de propidio en los neutrófilos estimulados con LPS generando un empalme de las fluorescencias en color amarillo-anaranjado. Los anteriores resultados respecto a la forma y positividad de las marcas para la presencia de DNA y componentes de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos como la elastasa en las NET inducidas con LPS, es semejante a lo descrito por *Fuchs y cols*.<sup>87</sup>

En algunos ensayos se observó durante el análisis microscópico campos con la presencia de DNA y elastasa en las células sin estímulo sin observarse el empalme de las marcas como normalmente se observa en la NET; sin embargo, esto puede deberse a la manipulación *in vitro* de las células o debido que los neutrófilos son células con un tiempo de vida media corto.

Para evaluar el efecto de los factores solubles de las hAMSC se utilizó el sobrenadante de las hAMSC recolectado después de 24 h de cultivo, denominado medio condicionado (MC); así mismo se realizó el co cultivo de hAMSC con neutrófilos estimulados usando un sistema transwell para permitir solo el paso de factores solubles entre las hAMSC y los neutrófilos. Lo que se encontró después del cultivo de neutrófilos activados con LPS junto con el MC-hAMSC y con TW-hAMSC fue la disminución del área de NET liberadas, por lo que se planteó la hipótesis de que esta inhibición se debía al efecto de inmunosupresión de factores solubles secretados por las hAMSC. El efecto inhibitorio de los factores solubles de las hAMSC sobre las NET redujo el área de las trampas liberadas. Así mismo, se observaron cambios morfológicos en los neutrófilos cultivados con MC-hAMSC y con TW-hAMSC que indicaban el inicio de eventos tempranos del proceso de liberación de las NET como son la pérdida de los lóbulos nucleares, pérdida de la membrana nuclear y descondensación de la cromatina; sin embargo, el proceso de formación de NET no llegó a término hasta la liberación de las trampas. Se puede suponer que existen factores solubles secretados por las hAMSC y presentes en el MC capaces de inhibir la liberación de NET en un evento temprano de la formación de las mismas. La inhibición del proceso de formación de NET en etapas tempranas implicará una reducción de la exposición de estímulos inflamatorios y autoantígenos, reduciendo así el daño tisular y la exacerbación de los procesos inflamatorios<sup>134,135</sup>.

Por lo tanto, los factores de las hAMSC podrían estar interviniendo sobre la activación del neutrófilo y modulando funciones efectoras del neutrófilo. Los factores solubles liberados por las hAMSC podrían afectar el proceso de formación de NET a través de un mecanismo que evite la ruptura de la membrana citoplasmática y afectando la liberación del contenido citoplasmático o bien inhibiendo vías de activación y señalización de la glucólisis o formación de especies reactivas de oxígeno. Mecanismos descritos sobre la inhibición de NET involucran la función de la lactoferrina como una barrera que interviene sobre la ruptura de la membrana citoplasmática y evita la liberación de las NET<sup>136</sup>; otros mecanismos descritos de inhibición de las NET dependen de cambios sobre el pH del microambiente celular, lo que afecta la glucólisis y formación de especies reactivas del oxígeno, dos procesos altamente relacionados con la formación y



liberación de NET<sup>137</sup>. La inhibición de la formación de ROS directamente impide la formación de NET<sup>138</sup>; otro reporte indica que el principal requerimiento metabólico para la formación de NET es la glucólisis y la inhibición de esta vía impide la formación de NET<sup>139</sup>.

Entre algunos de los factores solubles secretados por las MSC que tienen un efecto inmunomodulador se encuentran la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), interleucina-10 (IL-10), indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO), factor beta de crecimiento transformante TGFβ y la proteína TSG-6<sup>13,140</sup>. La proteína TSG-6 se ha reportado que tiene diversas funciones en el remodelamiento de la matriz extracelular y como agente inmunosupresor<sup>48,141</sup>. Algunos reportes mencionan que diversos tipos celulares como los fibroblastos de piel y de riñón, condrocitos y células mononucleares de sangre periférica son capaces de expresar y secretar la proteína TSG-6 después de la activación con TNF-α, IL-1β<sup>142,143</sup>. En 2012, *Zhang y cols.* reportaron la presencia constitutiva y de la proteína TSG-6 en el tejido amniótico, particularmente en células epiteliales y estromales de membrana amniótica. En este trabajo se evaluó la expresión del gen y la proteína TSG-6; además se realizó la secuenciación del gen de TSG-6 en las hAMSC.

Los resultados sobre la expresión de TSG-6 en las hAMSC mostraron que las células mesenquimales amnióticas humanas expresan de manera constitutiva el gen de la proteína TSG-6. La identificación de la expresión del gen de TSG-6 se corroboró con la secuenciación del producto de RT-PCR. No existen reportes anteriores de la secuenciación del gen de TSG-6 en las hAMSC; lo que se encontró en éste trabajo fue una homología del 100% de la secuencia del transcrito de RT-PCR con la secuencia de la base de datos del NCBI. El análisis de la expresión de la proteína TSG-6 mostró la localización de esta proteína en el núcleo y citoplasma de las hAMSC. El patrón de distribución de la proteína se observó de forma vesicular en todas las células; lo que podría sugerir la secreción de la misma. Semejante a los resultados obtenidos en este trabajo, la expresión constitutiva de TSG-6 a nivel transcripcional y proteico se ha reportado en células mesenquimales proveniente de tejido adiposo y médula ósea<sup>144-146</sup>.

De manera similar a nuestros resultados, se ha reportado la distribución citoplasmática de la proteína TSG-6 en MSC de médula ósea cuya secreción es empleada por estas células mesenquimales como parte de su mecanismo antiinflamatorio<sup>144</sup>. La secreción de TSG-6 se ha descrito como parte de la función antiinflamatoria de células estromales de membrana amniótica y mesenquimales de médula ósea<sup>43,54</sup>; además a través de la liberación de TSG-6, las células mesenquimales aisladas de diferentes tejidos son

capaces de reducir el daño tisular inflamatorio agudo en diversos modelos<sup>57, 145,147</sup>; así mismo la secreción de TSG-6 es un mecanismo que permite a las MSC modular la respuesta inmune celular de células inflamatorias como microglia, macrófagos peritoneales y células dendríticas<sup>50,51,59</sup>. De acuerdo a nuestros resultados, la liberación de NET en los neutrófilos de ratón disminuyó debido al efecto de los factores solubles presentes en el medio condicionado de las hAMSC; además en resultados anteriores, encontramos la expresión constitutiva en el núcleo y citoplasma de la proteína TSG-6 en las hAMSC, por lo tanto esto sugiere que la proteína TSG-6 es uno de los factores solubles que participa en el mecanismo inhibitor del MC de las hAMSC sobre la liberación de NET.

El silenciamiento de la proteína TSG-6 en las hAMSC a través de un siRNA generó una reducción del nivel de expresión del transcrito y de la proteína en éstas células. Así mismo, la presencia de TSG-6 en el MC de las hAMSC se vió reducido hasta niveles indetectables por el método de ELISA usado. El silenciamiento de proteínas a través del empleo de siRNA es una técnica usada ampliamente para la búsqueda de genes o proteínas como nuevos blancos, así como para el estudio de moléculas implicadas en la modulación de la respuesta inflamatoria que puedan ser empleadas como terapias<sup>148-151</sup>. El silenciamiento de la proteína TSG-6 en este trabajo utilizando el sistema de siRNA mostró resultados semejantes a los mencionados en estudios donde emplearon células mesenquimales aisladas de otros tejidos, donde se encontró una disminución del transcrito para TSG-6<sup>59,152</sup>.

Una vez corroborado el silenciamiento de TSG-6 en las hAMSC, se evaluó el efecto de esta proteína sobre la liberación de NET. Se encontró que la capacidad de liberación de NET disminuye en los neutrófilos que estuvieron en contacto con el MC de las hAMSC tratadas con el siRNA aleatorio de forma similar a la observada en ensayos anteriores donde de cultivaron los neutrófilos con el MC de las hAMSC. Sin embargo, el efecto inhibitorio del MC de las hAMSC observado sobre la liberación de NET se vió afectado debido al silenciamiento de la proteína TSG-6 en las hAMSC. Los resultados anteriores sugieren que la proteína TSG-6 tiene una participación importante en el mecanismo inmunosupresor de las hAMSC sobre la liberación de NET; estos resultados concuerdan con los reportes que mencionan la participación de TSG-6 como parte de los mecanismos inhibitorios de las MSC, se ha reportado que a través de la secreción de TSG-6 las MSC aisladas de médula ósea disminuyen el daño pulmonar, promueven la reparación del epitelio corneal, aceleran la cicatrización de heridas y reducen la fibrosis en diversos modelos inflamatorios<sup>54,146,153,154</sup>.

Microscópicamente se observó un aumento de la liberación de NET en las células con MC hAMSC-siRNA-TSG-6 respecto a las células con el MC-hAMSC siRNA-AL, aunque en menor cantidad y tamaño comparadas con los neutrófilos solo con el estímulo de LPS. Lo anterior se puede deber a la presencia de otros factores inmunosupresores presentes en el MC de las hAMSC; y a pesar que parte de la disminución en la liberación de trampas se debe a la función de TSG-6 pudiera existir la función de otras moléculas junto con TSG-6 para la supresión de las NET. De acuerdo a *Domingo-González y cols.*<sup>155</sup> PGE2 es uno de los factores liberados por las células mesenquimales que interfieren con la liberación de NET, otro factor con función inmunosupresora es el factor transformante de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) que se tiene reportado disminuye la degranulación de los neutrófilos<sup>156</sup> y suprime la inflamación inducida por éstas células polimorfonucleares<sup>157</sup>. Por lo tanto, las moléculas anteriormente descritas junto con el factor TSG-6 podrían formar parte de los mecanismos inmunosupresores sobre los neutrófilos realizados por las hAMSC.

Lo que se conoce sobre el mecanismo de supresión de TSG-6 es que forma complejos con una proteína inhibidora llamada el inhibidor  $\alpha_1$ ; ésta proteína es cercana a las enzimas inhibidoras de proteasas de serina<sup>158</sup>. Hasta el momento se ha reportado que el inhibidor  $\alpha_1$  y el complejo TSG-6/ $\alpha_1$  tienen una función inhibidora sobre la actividad de las enzimas plasmina y elastasa<sup>159,160</sup>, por lo que, el posible mecanismo de acción de TSG-6 podría implicar la inhibición de la función enzimática de proteasas necesarias para la formación de NET. Respecto a lo anterior, reportes indican la participación de las enzimas mieloperoxidasa y elastasa durante la formación de las NET, particularmente sobre el proceso de descondensación de la cromatina<sup>95,97</sup>; por lo tanto si TSG-6 inhibe la función enzimática de la elastasa y mieloperoxidasa podría interferir con pasos esenciales en el proceso de liberación de trampas extracelulares como la generación de especies reactivas del oxígeno, para lo cual se evaluará la producción de anión superóxido a través del método de reducción del NBT. Sin embargo, un experimento complementario podría ser evaluar la actividad enzimática de la elastasa o mieloperoxidasa en los neutrófilos después de la exposición al MC y TSG-6 de las hAMSC.

El efecto inhibitorio sobre la generación de ROS por parte de TSG-6 en el MC de las hAMSC fue observado 30 minutos posteriores al estímulo de los neutrófilos; esto coincide con otro reporte, donde se describe que a partir de los 30 minutos posteriores a la estimulación se inicia el proceso de generación y liberación de NET<sup>87</sup>. Algunos reportes mencionan que la formación de especies reactivas del oxígeno es un proceso esencial implicado en la formación de NET<sup>94,161</sup>, en particular el mecanismo de liberación de NET

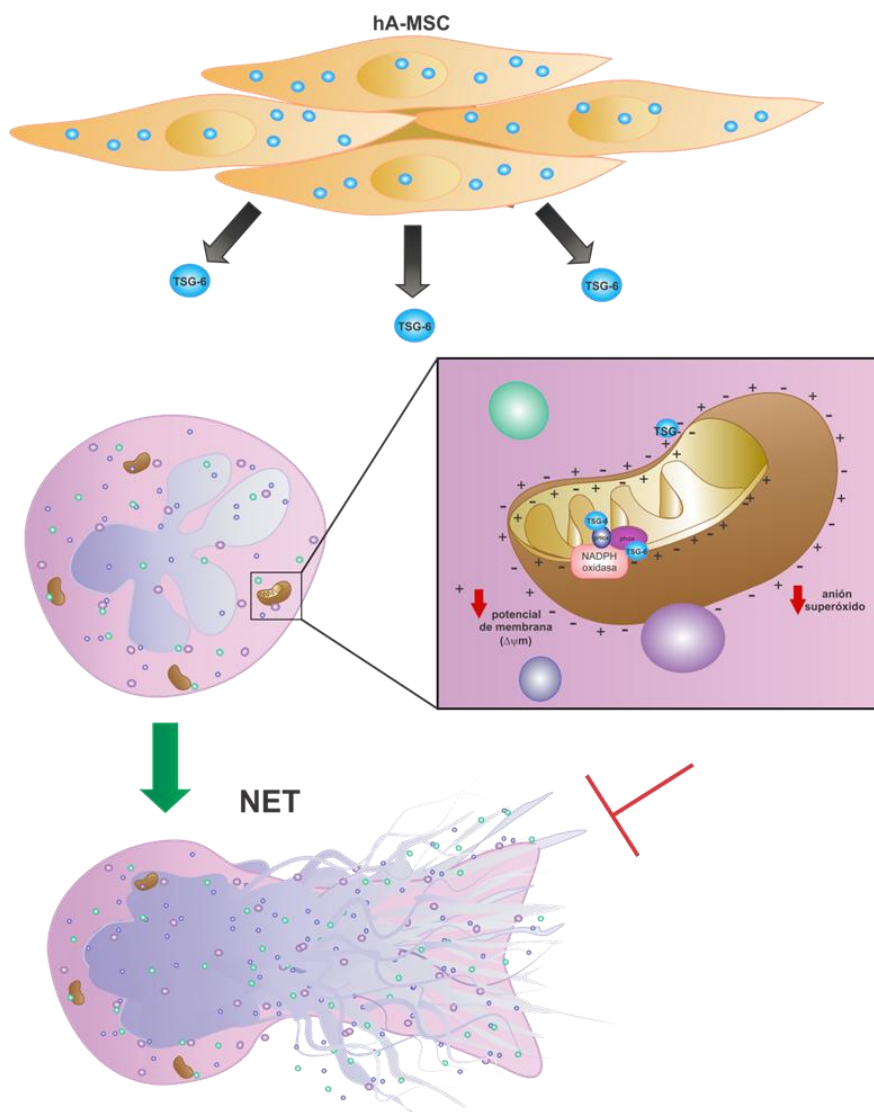
activado por TLR-4 es dependiente de la participación del anión superóxido<sup>162</sup>. Por lo tanto, en este estudio se evaluó el efecto del MC de las hAMSC sobre la capacidad de los neutrófilos de generar el anión superóxido. Después del cultivo de los neutrófilos estimulados junto con el MC de las hAMSC y el MC de hAMSC tratadas con un siRNA aleatorio, se encontró una disminución de la generación del anión superóxido respecto a los neutrófilos solo con estímulo; sin embargo, el efecto inhibitorio sobre la producción de anión superóxido se vio afectado cuando la proteína TSG-6 fue silenciada en las hAMSC.

Lo anterior sugiere un mecanismo inmunosupresor de TSG-6 dependiente de la inhibición ROS. En un modelo inflamatorio inducido con LPS, se menciona que la proteína TSG-6 es capaz de disminuir la actividad de la enzima mieloperoxidasa<sup>57</sup>. Por su parte *Khan y cols.* en 2015 reportaron<sup>163</sup> que las células mesenquimales aisladas de la gelatina de Wharton disminuyen la actividad del complejo enzimático NADPH oxidasa en neutrófilos humanos adultos y neonatales. La liberación de NET requiere la activación de cinasas de la vía Raf-MEK-ERK a través de un mecanismo dependiente de la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa<sup>164</sup>. De manera semejante un reporte menciona que TSG-6 es capaz de inhibir la vía de señalización de la cinasa JNK<sup>165</sup> y con esto ejercer un efecto antiinflamatorio. Por lo tanto, el mecanismo inmunosupresor de TSG-6 sobre la liberación de NET podría involucrar la inhibición de la vía de señalización de cinasas como Raf-MEK-ERK implicadas en la generación de NET; además de llevar a la reducción de la activación del complejo enzimático NADPH-oxidasa y generación de ROS.

La liberación de NET es un mecanismo que requiere de la autofagia y la generación de superóxido<sup>166</sup>, estos procesos son dependientes de la actividad mitocondrial. Por lo que, como parte del estudio del mecanismo inhibitorio de las hAMSC y TSG-6 sobre la liberación de las NET, se evaluó el efecto del MC de las hAMSC transfectadas o no con siRNA-TSG-6 y de la proteína recombinante TSG-6 sobre el potencial de membrana mitocondrial de los neutrófilos murinos. Los resultados obtenidos de estos ensayos indicaron un porcentaje mayor de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) en los neutrófilos que fueron cultivados con el MC de las hAMSC o con la proteína recombinante TSG-6. Este cambio en el potencial mitocondrial podría ser una de las causas de la menor capacidad de producción de anión superóxido y de la formación de NET en los neutrófilos tratados con el Mc de hAMSC o rhTSG-6. En cambio, los neutrófilos que fueron incubados en presencia del MC de hAMSC silenciadas para la expresión de TSG-6, presentaron un menor porcentaje de pérdida de  $\Delta\psi_m$ , junto con la capacidad recuperada para generar ROS.

Los resultados anteriores sugieren que el MC de las hAMSC afecta la función mitocondrial de forma dependiente de la presencia de TSG-6. Respecto a lo anterior, reportes mencionan que las funciones principales de la mitocondria es contribuir con la energía metabólica celular, participar en la respuesta de estrés celular y activamente contribuir con la cadena del transporte de electrones; la desregulación del potencial de membrana mitocondria contribuye a la alteración de la función mitocondrial <sup>167</sup>. La función mitocondrial participa en la regulación de la repuesta de células del sistema inmune <sup>168,169</sup> y tiene una importante contribución en la generación de ROS <sup>170</sup>. Por lo tanto y de acuerdo a nuestros resultados la alteración del potencial de membrana mitocondrial sugiere la afectación de la función mitocondrial y por lo tanto la inhibición de la generación de ROS.

14. Resumen Gráfico



**Representación gráfica del mecanismo inhibitorio de las hAMSC y TSG-6 sobre la formación de NET *in vitro*.** El factor soluble TSG-6 presente de manera constitutiva en las hAMSC es secretado en su medio condicionado. La presencia de TSG-6 en el medio condicionado de las hAMSC que se mantiene en contacto con los neutrófilos de ratón estimulados con lipopolisacárido disminuye la formación y liberación de NET. El mecanismo de inhibición de NET ocurre a través de un proceso dependiente de la disminución del potencial de membrana mitocondrial lo que causa la despolarización mitocondrial y afecta la capacidad de los neutrófilos de generar anión superóxido.

## 15. Conclusión

En conclusión, en nuestro estudio se encontró que las hAMSC liberan factores solubles con capacidad antiinflamatoria. Uno de estos factores es la proteína TSG-6 que, según nuestros resultados participa en la inhibición de la liberación de NET a través de un mecanismo que implica la modulación de la función mitocondrial y es dependiente de la inhibición de especies reactivas del oxígeno. Por lo tanto, estos datos sugieren que las hAMSC secretan factores que inhiben la respuesta inmune innata que podrían ser un candidato empleado como terapia inmunosupresora en enfermedades inflamatorias donde se encuentren implicadas las NET.

## 16. Perspectivas

A pesar que se pudo conocer parte del mecanismo inhibitorio de TSG-6 sobre la liberación de NET; futuros objetivos del presente trabajo se enfocarán en evaluar la participación de TSG-6 sobre la señalización de vías activadoras de cinasas como JNK o Raf-ERK-MEK. Así mismo, evaluar el efecto de TSG-6 en procesos involucrados en la actividad mitocondrial; dentro de los requerimientos para el funcionamiento mitocondrial se encuentra la movilización de calcio intracelular, por lo que parte de algunos objetivos futuros es la evaluación del efecto del MC de las hAMSC y la proteína TSG-6 sobre la movilización de calcio intracelular.

Así mismo, futuras perspectivas de este trabajo son el evaluar el efecto inhibitorio de TSG-6 y los factores de las hAMSC en un modelo *in vivo*, en particular se pretende evaluar el efecto inmunosupresor y antiinflamatorio en un modelo inflamatorio donde las NET tengan implicación patogénica. Una propuesta sobre este estudio es en el desarrollo de un modelo de uveítis, un proceso inflamatorio ocular de importancia clínica y en el que se tiene evidencia las NET están implicadas en su fisiopatología.

## 17. Bibliografía.

- 1 da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science* **119**, 2204-2213, doi:10.1242/jcs.02932 (2006).
- 2 Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317, doi:10.1080/14653240600855905 (2006).
- 3 Trento, C. & Dazzi, F. Mesenchymal stem cells and innate tolerance: biology and clinical applications. *Swiss medical weekly* **140**, w13121, doi:10.4414/smw.2010.13121 (2010).
- 4 Herrero, C. & Perez-Simon, J. A. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* **43**, 425-430 (2010).
- 5 Jiang, X. X. *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **105**, 4120-4126, doi:10.1182/blood-2004-02-0586 (2005).
- 6 Machado Cde, V., Telles, P. D. & Nascimento, I. L. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter* **35**, 62-67, doi:10.5581/1516-8484.20130017 (2013).
- 7 Krampera, M. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* **101**, 3722-3729, doi:10.1182/blood-2002-07-2104 (2003).
- 8 Najar, M. *et al.* Impact of different mesenchymal stromal cell types on T-cell activation, proliferation and migration. *International immunopharmacology* **15**, 693-702, doi:10.1016/j.intimp.2013.02.020 (2013).
- 9 Tabera, S. *et al.* The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica* **93**, 1301-1309, doi:10.3324/haematol.12857 (2008).
- 10 Garfias, Y., Nieves-Hernandez, J., Garcia-Mejia, M., Estrada-Reyes, C. & Jimenez-Martinez, M. C. Stem cells isolated from the human stromal limbus possess immunosuppressant properties. *Molecular vision* **18**, 2087-2095 (2012).
- 11 Liu, W. H. *et al.* Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS one* **8**, e55487, doi:10.1371/journal.pone.0055487 (2013).
- 12 Najar, M. *et al.* 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, doi:10.1016/j.cellimm.2010.06.006 (2010).
- 13 Stagg, J. & Galipeau, J. Mechanisms of immune modulation by mesenchymal stromal cells and clinical translation. *Current molecular medicine* **13**, 856-867 (2013).
- 14 Akiyama, K. *et al.* Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell stem cell* **10**, 544-555, doi:10.1016/j.stem.2012.03.007 (2012).
- 15 Schena, F. *et al.* Interferon-gamma-dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **62**, 2776-2786, doi:10.1002/art.27560 (2010).
- 16 Chen, X. *et al.* CD73 Pathway Contributes to the Immunosuppressive Ability of Mesenchymal Stem Cells in Intraocular Autoimmune Responses. *Stem cells and development* **25**, 337-346, doi:10.1089/scd.2015.0227 (2016).
- 17 Bourne, G. The foetal membranes. A review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function. *Postgraduate medical journal* **38**, 193-201 (1962).
- 18 Niknejad, H. *et al.* Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *European cells & materials* **15**, 88-99 (2008).
- 19 Manuelpillai, U., Moodley, Y., Borlongan, C. V. & Parolini, O. Amniotic membrane and amniotic cells: potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis? *Placenta* **32 Suppl 4**, S320-325, doi:10.1016/j.placenta.2011.04.010 (2011).
- 20 Chen, H. J., Pires, R. T. & Tseng, S. C. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *The British journal of ophthalmology* **84**, 826-833 (2000).
- 21 Chavez-Garcia, C. *et al.* Ophthalmic indications of amniotic membrane transplantation in Mexico: an eight years Amniotic Membrane Bank experience. *Cell and tissue banking* **17**, 261-268, doi:10.1007/s10561-015-9540-7 (2016).
- 22 Garfias, Y., Zaga-Clavellina, V., Vadillo-Ortega, F., Osorio, M. & Jimenez-Martinez, M. C. Amniotic membrane is an immunosuppressor of peripheral blood mononuclear cells. *Immunological investigations* **40**, 183-196, doi:10.3109/08820139.2010.532266 (2011).
- 23 Diaz-Prado, S. *et al.* Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative



- medicine. *Differentiation; research in biological diversity* **81**, 162-171, doi:10.1016/j.diff.2011.01.005 (2011).
- 24 Diaz-Prado, S. *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane. *Tissue engineering. Part C, Methods* **17**, 49-59, doi:10.1089/ten.TEC.2010.0136 (2011).
- 25 Kapranov, N. M. *et al.* Effect of Priming of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells with Interferon gamma on Their Immunomodulating Properties. *Biochemistry. Biokhimiia* **82**, 1158-1168, doi:10.1134/S000629791710008X (2017).
- 26 Parolini, O. *et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* **26**, 300-311, doi:10.1634/stemcells.2007-0594 (2008).
- 27 Kubo, K. *et al.* Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Liver Fibrosis in Rats. *Transplantation direct* **1**, e16, doi:10.1097/TXD.0000000000000525 (2015).
- 28 Onishi, R. *et al.* Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Severe Colitis in Rats. *Cell transplantation* **24**, 2601-2614, doi:10.3727/096368915X687570 (2015).
- 29 Kawakubo, K. *et al.* Effect of Fetal Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Rats With Acute and Chronic Pancreatitis. *Pancreas* **45**, 707-713, doi:10.1097/MPA.0000000000000541 (2016).
- 30 Zhou, H. L. *et al.* Transplantation of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells Promotes Functional Recovery in a Rat Model of Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurochemical research* **41**, 2708-2718, doi:10.1007/s11064-016-1987-9 (2016).
- 31 Shu, J. *et al.* Transplantation of human amnion mesenchymal cells attenuates the disease development in rats with collagen-induced arthritis. *Clinical and experimental rheumatology* **33**, 484-490 (2015).
- 32 Pianta, S. *et al.* Amniotic membrane mesenchymal cells-derived factors skew T cell polarization toward Treg and downregulate Th1 and Th17 cells subsets. *Stem cell reviews* **11**, 394-407, doi:10.1007/s12015-014-9558-4 (2015).
- 33 Meesuk, L., Tantrawatpan, C., Kheolamai, P. & Manochantr, S. The immunosuppressive capacity of human mesenchymal stromal cells derived from amnion and bone marrow. *Biochemistry and biophysics reports* **8**, 34-40, doi:10.1016/j.bbrep.2016.07.019 (2016).
- 34 Magatti, M. *et al.* Human amnion favours tissue repair by inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2 macrophage features. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, doi:10.1002/term.2193 (2016).
- 35 Magatti, M. *et al.* Human Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal and Epithelial Cells Exert Different Effects on Monocyte-Derived Dendritic Cell Differentiation and Function. *Cell transplantation* **24**, 1733-1752, doi:10.3727/096368914X684033 (2015).
- 36 Magatti, M., De Munari, S., Vertua, E. & Parolini, O. Amniotic membrane-derived cells inhibit proliferation of cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. *Journal of cellular and molecular medicine* **16**, 2208-2218, doi:10.1111/j.1582-4934.2012.01531.x (2012).
- 37 Lee, T. H., Wisniewski, H. G. & Vilcek, J. A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44. *The Journal of cell biology* **116**, 545-557 (1992).
- 38 Fujimoto, T., Savani, R. C., Watari, M., Day, A. J. & Strauss, J. F., 3rd. Induction of the hyaluronin acid-binding protein, tumor necrosis factor-stimulated gene-6, in cervical smooth muscle cells by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E(2). *The American journal of pathology* **160**, 1495-1502 (2002).
- 39 Fulop, C. *et al.* Coding sequence, exon-intron structure and chromosomal localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding cumulus cell-oocyte complexes. *Gene* **202**, 95-102 (1997).
- 40 Wisniewski, H. G. *et al.* TSG-6: a TNF-, IL-1-, and LPS-inducible secreted glycoprotein associated with arthritis. *J Immunol* **151**, 6593-6601 (1993).
- 41 Milner, C. M. & Day, A. J. TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation. *Journal of cell science* **116**, 1863-1873, doi:10.1242/jcs.00407 (2003).
- 42 Zhang, S., He, H., Day, A. J. & Tseng, S. C. Constitutive expression of inter-alpha-inhibitor (IalphaI) family proteins and tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) by human amniotic membrane epithelial and stromal cells supporting formation of the heavy chain-hyaluronan (HC-HA) complex. *The Journal of biological chemistry* **287**, 12433-12444, doi:10.1074/jbc.M112.342873 (2012).
- 43 Lesley, J. *et al.* TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. *The Journal of biological chemistry* **279**, 25745-25754, doi:10.1074/jbc.M313319200 (2004).
- 44 Milner, C. M., Higman, V. A. & Day, A. J. TSG-6: a pluripotent inflammatory mediator? *Biochemical Society transactions* **34**, 446-450, doi:10.1042/BST0340446 (2006).

- 45 Wisniewski, H. G. & Vilcek, J. TSG-6: an IL-1/TNF-inducible protein with anti-inflammatory activity. *Cytokine & growth factor reviews* **8**, 143-156 (1997).
- 46 Guo, P., Zhang, S. Z., He, H., Zhu, Y. T. & Tseng, S. C. TSG-6 controls transcription and activation of matrix metalloproteinase 1 in conjunctivochalasis. *Investigative ophthalmology & visual science* **53**, 1372-1380, doi:10.1167/iops.11-8738 (2012).
- 47 Dyer, D. P. *et al.* TSG-6 inhibits neutrophil migration via direct interaction with the chemokine CXCL8. *J Immunol* **192**, 2177-2185, doi:10.4049/jimmunol.1300194 (2014).
- 48 Getting, S. J. *et al.* The link module from human TSG-6 inhibits neutrophil migration in a hyaluronan- and inter-alpha -inhibitor-independent manner. *The Journal of biological chemistry* **277**, 51068-51076, doi:10.1074/jbc.M205121200 (2002).
- 49 Kota, D. J., Wiggins, L. L., Yoon, N. & Lee, R. H. TSG-6 produced by hMSCs delays the onset of autoimmune diabetes by suppressing Th1 development and enhancing tolerogenicity. *Diabetes* **62**, 2048-2058, doi:10.2337/db12-0931 (2013).
- 50 Kui, L., Chan, G. C. & Lee, P. P. TSG-6 Downregulates IFN-Alpha and TNF-Alpha Expression by Suppressing IRF7 Phosphorylation in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Mediators of inflammation* **2017**, 7462945, doi:10.1155/2017/7462945 (2017).
- 51 Oh, J. Y. *et al.* Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16875-16880, doi:10.1073/pnas.1012451107 (2010).
- 52 Wang, H., Chen, Z., Li, X. J., Ma, L. & Tang, Y. L. Anti-inflammatory cytokine TSG-6 inhibits hypertrophic scar formation in a rabbit ear model. *European journal of pharmacology* **751**, 42-49, doi:10.1016/j.ejphar.2015.01.040 (2015).
- 53 Xu, J., Zhen, J., Zhu, J. & Lin, Q. Tumor necrosis factor-alpha induced protein 6 attenuates acute lung injury following paraquat exposure. *Toxicology mechanisms and methods* **26**, 32-35, doi:10.3109/15376516.2015.1070223 (2016).
- 54 Wang, N. *et al.* Novel mechanism for mesenchymal stem cells in attenuating peritoneal adhesion: accumulating in the lung and secreting tumor necrosis factor alpha-stimulating gene-6. *Stem cell research & therapy* **3**, 51, doi:10.1186/scrt142 (2012).
- 55 Lee, R. H. *et al.* Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell* **5**, 54-63, doi:10.1016/j.stem.2009.05.003 (2009).
- 56 Wang, N. *et al.* Mesenchymal stem cells attenuate peritoneal injury through secretion of TSG-6. *PLoS one* **7**, e43768, doi:10.1371/journal.pone.0043768 (2012).
- 57 Danchuk, S. *et al.* Human multipotent stromal cells attenuate lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via secretion of tumor necrosis factor-alpha-induced protein 6. *Stem cell research & therapy* **2**, 27, doi:10.1186/scrt68 (2011).
- 58 Choi, H., Lee, R. H., Bazhanov, N., Oh, J. Y. & Prockop, D. J. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages. *Blood* **118**, 330-338, doi:10.1182/blood-2010-12-327353 (2011).
- 59 Liu, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses of BV2 microglial cells through TSG-6. *Journal of neuroinflammation* **11**, 135, doi:10.1186/1742-2094-11-135 (2014).
- 60 Summers, C. *et al.* Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology* **31**, 318-324, doi:10.1016/j.it.2010.05.006 (2010).
- 61 Brederoo, P. & van der Meulen, J. Development of the granule population in heterophil granulocytes from rat bone marrow. *Cell and tissue research* **228**, 433-449 (1983).
- 62 Borregaard, N., Sorensen, O. E. & Theilgaard-Monch, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in immunology* **28**, 340-345, doi:10.1016/j.it.2007.06.002 (2007).
- 63 Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657-670, doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011 (2010).
- 64 Mayadas, T. N., Cullere, X. & Lowell, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* **9**, 181-218, doi:10.1146/annurev-pathol-020712-164023 (2014).
- 65 Ekman, A. K. & Cardell, L. O. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology* **130**, 55-63, doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03212.x (2010).
- 66 Parker, L. C., Whyte, M. K., Dower, S. K. & Sabroe, I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol* **77**, 886-892, doi:10.1189/jlb.1104636 (2005).
- 67 Berthelot, F. *et al.* The effect of HMGB1, a damage-associated molecular pattern molecule, on polymorphonuclear neutrophil migration depends on its concentration. *Journal of innate immunity* **4**, 41-58, doi:10.1159/000328798 (2012).
- 68 Maugeri, N. *et al.* Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **12**, 2074-2088, doi:10.1111/jth.12710 (2014).

- 69 Xue, L. *et al.* Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* **133**, 1184-1194, doi:10.1016/j.jaci.2013.10.056 (2014).
- 70 Gerard, N. P. & Gerard, C. The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* **349**, 614-617, doi:10.1038/349614a0 (1991).
- 71 Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**, 159-175, doi:10.1038/nri3399 (2013).
- 72 Petri, B., Phillipson, M. & Kubes, P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol* **180**, 6439-6446 (2008).
- 73 Luo, B. H., Carman, C. V. & Springer, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology* **25**, 619-647, doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618 (2007).
- 74 Rigby, D. A., Ferguson, D. J., Johnson, L. A. & Jackson, D. G. Neutrophils rapidly transit inflamed lymphatic vessel endothelium via integrin-dependent proteolysis and lipoxin-induced junctional retraction. *Journal of leukocyte biology* **98**, 897-912, doi:10.1189/jlb.1H10415-149R (2015).
- 75 Yam-Puc, J. C., Garcia-Marin, L. & Sanchez-Torres, L. E. [Neutrophil extracellular traps (NET), consequence of a cellular suicide]. *Gac Med Mex* **148**, 68-75 (2012).
- 76 Carias, A. M. & Hope, T. J. Phagocytosis: cell biology view of antiviral function. *Current opinion in HIV and AIDS* **9**, 271-277, doi:10.1097/COH.0000000000000050 (2014).
- 77 Flannagan, R. S., Jaumouille, V. & Grinstein, S. The cell biology of phagocytosis. *Annual review of pathology* **7**, 61-98, doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132445 (2012).
- 78 Barker, J. H. *et al.* The role of complement opsonization in interactions between *F. tularensis* subsp. *novicida* and human neutrophils. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **11**, 762-769, doi:10.1016/j.micinf.2009.04.016 (2009).
- 79 Vida, A. *et al.* Fusion of the Fc part of human IgG1 to CD14 enhances its binding to gram-negative bacteria and mediates phagocytosis by Fc receptors of neutrophils. *Immunology letters* **146**, 31-39, doi:10.1016/j.imlet.2012.04.008 (2012).
- 80 Nordenfelt, P. & Tapper, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of leukocyte biology* **90**, 271-284, doi:10.1189/jlb.0810457 (2011).
- 81 Nunes, P., Demaurex, N. & Dinauer, M. C. Regulation of the NADPH oxidase and associated ion fluxes during phagocytosis. *Traffic* **14**, 1118-1131, doi:10.1111/tra.12115 (2013).
- 82 Rada, B. K., Geiszt, M., Kaldi, K., Timar, C. & Ligeti, E. Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. *Blood* **104**, 2947-2953, doi:10.1182/blood-2004-03-1005 (2004).
- 83 Roos, D., van Bruggen, R. & Meischl, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **5**, 1307-1315 (2003).
- 84 Schaefer, L. Complexity of danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns. *The Journal of biological chemistry*, doi:10.1074/jbc.R114.619304 (2014).
- 85 Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532-1535, doi:10.1126/science.1092385 (2004).
- 86 Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *The Journal of cell biology* **198**, 773-783, doi:10.1083/jcb.201203170 (2012).
- 87 Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* **176**, 231-241, doi:10.1083/jcb.200606027 (2007).
- 88 Guimaraes-Costa, A. B. *et al.* Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 6748-6753, doi:10.1073/pnas.0900226106 (2009).
- 89 Riyapa, D. *et al.* Neutrophil extracellular traps exhibit antibacterial activity against burkholderia pseudomallei and are influenced by bacterial and host factors. *Infect Immun* **80**, 3921-3929, doi:10.1128/IAI.00806-12 (2012).
- 90 Menten-Dedoyart, C. *et al.* Neutrophil extracellular traps entrap and kill *Borrelia burgdorferi* sensu stricto spirochetes and are not affected by Ixodes ricinus tick saliva. *J Immunol* **189**, 5393-5401, doi:10.4049/jimmunol.1103771 (2012).
- 91 Lu, T., Kobayashi, S. D., Quinn, M. T. & DeLeo, F. R. A NET Outcome. *Frontiers in immunology* **3**, 365, doi:10.3389/fimmu.2012.00365 (2012).
- 92 Clark, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine* **13**, 463-469, doi:10.1038/nm1565 (2007).
- 93 Holland, S. M. Chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am* **27**, 89-99, viii, doi:10.1016/j.hoc.2012.11.002 (2013).
- 94 Parker, H. & Winterbourn, C. C. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Frontiers in immunology* **3**, 424, doi:10.3389/fimmu.2012.00424 (2012).
- 95 Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of

- neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* **191**, 677-691, doi:10.1083/jcb.201006052 (2010).
- 96 Parker, H., Albrett, A. M., Kettle, A. J. & Winterbourn, C. C. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *Journal of leukocyte biology* **91**, 369-376, doi:10.1189/jlb.0711387 (2012).
- 97 Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A. & Papayannopoulos, V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell reports* **8**, 883-896, doi:10.1016/j.celrep.2014.06.044 (2014).
- 98 Nakashima, K. *et al.* Molecular characterization of peptidylarginine deiminase in HL-60 cells induced by retinoic acid and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3). *The Journal of biological chemistry* **274**, 27786-27792 (1999).
- 99 Wakefield, T. W. *et al.* Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **15**, 258-268 (1995).
- 100 von Bruhl, M. L. *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of experimental medicine* **209**, 819-835, doi:10.1084/jem.20112322 (2012).
- 101 Fuchs, T. A., Brill, A. & Wagner, D. D. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**, 1777-1783, doi:10.1161/ATVBAHA.111.242859 (2012).
- 102 Semeraro, F. *et al.* Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood* **118**, 1952-1961, doi:10.1182/blood-2011-03-343061 (2011).
- 103 Kalbitz, M. *et al.* Role of extracellular histones in the cardiomyopathy of sepsis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **29**, 2185-2193, doi:10.1096/fj.14-268730 (2015).
- 104 Ekaney, M. L. *et al.* Impact of plasma histones in human sepsis and their contribution to cellular injury and inflammation. *Crit Care* **18**, 543, doi:10.1186/s13054-014-0543-8 (2014).
- 105 Kambas, K. *et al.* Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis. *PLoS one* **7**, e45427, doi:10.1371/journal.pone.0045427 (2012).
- 106 Yang, S. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Promote Hypercoagulability in Patients With Sepsis. *Shock* **47**, 132-139, doi:10.1097/SHK.0000000000000741 (2017).
- 107 Czaikoski, P. G. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLoS one* **11**, e0148142, doi:10.1371/journal.pone.0148142 (2016).
- 108 Pruchniak, M. P., Kotula, I. & Manda-Handzlik, A. Neutrophil extracellular traps (NETs) impact upon autoimmune disorders. *Central-European journal of immunology* **40**, 217-224, doi:10.5114/ceji.2015.52836 (2015).
- 109 Yu, Y. & Su, K. Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of clinical & cellular immunology* **4**, doi:10.4172/2155-9899.1000139 (2013).
- 110 Fauzi, A. R. *et al.* Antibodies in systemic lupus antineutrophil cytoplasmic erythematosus: prevalence, disease activity correlations and organ system associations. *The Medical journal of Malaysia* **59**, 372-377 (2004).
- 111 Jarrot, P. A. & Kaplanski, G. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitis: An update. *Autoimmunity reviews* **15**, 704-713, doi:10.1016/j.autrev.2016.03.007 (2016).
- 112 Leffler, J. *et al.* Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol* **188**, 3522-3531, doi:10.4049/jimmunol.1102404 (2012).
- 113 Carmona-Rivera, C., Zhao, W., Yalavarthi, S. & Kaplan, M. J. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Annals of the rheumatic diseases* **74**, 1417-1424, doi:10.1136/annrheumdis-2013-204837 (2015).
- 114 Khandpur, R. *et al.* NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Science translational medicine* **5**, 178ra140, doi:10.1126/scitranslmed.3005580 (2013).
- 115 Lin, A. M. *et al.* Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol* **187**, 490-500, doi:10.4049/jimmunol.1100123 (2011).
- 116 Ganguly, D. *et al.* Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *The Journal of experimental medicine* **206**, 1983-1994, doi:10.1084/jem.20090480 (2009).
- 117 Tsuji, H. *et al.* Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circulation research* **106**, 1613-1623, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.205260 (2010).
- 118 Swamydas, M., Luo, Y., Dorf, M. E. & Lionakis, M. S. Isolation of Mouse Neutrophils. *Current protocols in*

- immunology* **110**, 3 20 21-23 20 15, doi:10.1002/0471142735.im0320s110 (2015).
- 119 Edwards, S. W. Cell signalling by integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils. *Trends in biochemical sciences* **20**, 362-367 (1995).
- 120 Ho, H. Y., Cheng, M. L., Wang, Y. H. & Chiu, D. T. Flow cytometry for assessment of the efficacy of siRNA. *Cytometry A* **69**, 1054-1061, doi:10.1002/cyto.a.20324 (2006).
- 121 Neumann, A. *et al.* The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *The Biochemical journal* **464**, 3-11, doi:10.1042/BJ20140778 (2014).
- 122 Rottenberg, H. & Wu, S. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochim Biophys Acta* **1404**, 393-404 (1998).
- 123 Li, Y. & Trush, M. A. Diphenyleiiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochemical and biophysical research communications* **253**, 295-299, doi:10.1006/bbrc.1998.9729 (1998).
- 124 Leite, C. *et al.* Differentiation of human umbilical cord matrix mesenchymal stem cells into neural-like progenitor cells and maturation into an oligodendroglial-like lineage. *PLoS one* **9**, e111059, doi:10.1371/journal.pone.0111059 (2014).
- 125 Lo Furno, D., Mannino, G., Cardile, V., Parenti, R. & Giuffrida, R. Potential Therapeutic Applications of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells and development*, doi:10.1089/scd.2016.0135 (2016).
- 126 Nemeth, K. *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine* **15**, 42-49, doi:10.1038/nm.1905 (2009).
- 127 Rebmann, V., da Silva Nardi, F., Wagner, B. & Horn, P. A. HLA-G as a tolerogenic molecule in transplantation and pregnancy. *Journal of immunology research* **2014**, 297073, doi:10.1155/2014/297073 (2014).
- 128 Ferreira, L. M., Meissner, T. B., Tilburgs, T. & Strominger, J. L. HLA-G: At the Interface of Maternal-Fetal Tolerance. *Trends in immunology* **38**, 272-286, doi:10.1016/j.it.2017.01.009 (2017).
- 129 Tonnesen, M. G. Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. *The Journal of investigative dermatology* **93**, 53S-58S (1989).
- 130 Rausch, P. G., Pryzwansky, K. B. & Spitznagel, J. K. Immunocytochemical identification of azurophilic and specific granule markers in the giant granules of Chediak-Higashi neutrophils. *The New England journal of medicine* **298**, 693-698, doi:10.1056/NEJM197803302981301 (1978).
- 131 Swamydas, M. & Lionakis, M. S. Isolation, purification and labeling of mouse bone marrow neutrophils for functional studies and adoptive transfer experiments. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e50586, doi:10.3791/50586 (2013).
- 132 Watt, S. M., Burgess, A. W., Metcalf, D. & Batty, F. L. Isolation of mouse bone marrow neutrophils by light scatter and autofluorescence. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **28**, 934-946, doi:10.1177/28.9.7410816 (1980).
- 133 Brinkmann, V., Laube, B., Abu Abed, U., Goosmann, C. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *Journal of visualized experiments : JoVE*, doi:10.3791/1724 (2010).
- 134 Kimura, H. *et al.* The effect and possible clinical efficacy of in vivo inhibition of neutrophil extracellular traps by blockade of PI3K-gamma on the pathogenesis of microscopic polyangiitis. *Modern rheumatology*, 1-12, doi:10.1080/14397595.2017.1367116 (2017).
- 135 Helms, J. *et al.* Thrombomodulin favors leukocyte microvesicle fibrinolytic activity, reduces NETosis and prevents septic shock-induced coagulopathy in rats. *Annals of intensive care* **7**, 118, doi:10.1186/s13613-017-0340-z (2017).
- 136 Okubo, K. *et al.* Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. *EBioMedicine* **10**, 204-215, doi:10.1016/j.ebiom.2016.07.012 (2016).
- 137 Behnen, M., Moller, S., Brozek, A., Klingner, M. & Laskay, T. Extracellular Acidification Inhibits the ROS-Dependent Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in immunology* **8**, 184, doi:10.3389/fimmu.2017.00184 (2017).
- 138 Ostafin, M., Pruchniak, M. P., Ciepiela, O., Reznick, A. Z. & Demkow, U. Different procedures of diphenyleiiodonium chloride addition affect neutrophil extracellular trap formation. *Analytical biochemistry* **509**, 60-66, doi:10.1016/j.ab.2016.05.003 (2016).
- 139 Rodriguez-Espinosa, O., Rojas-Espinosa, O., Moreno-Altamirano, M. M., Lopez-Villegas, E. O. & Sanchez-Garcia, F. J. Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. *Immunology* **145**, 213-224, doi:10.1111/imm.12437 (2015).
- 140 Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Bestard, O. & Grinyo, J. M. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Frontiers in immunology* **3**, 212, doi:10.3389/fimmu.2012.00212 (2012).
- 141 Fulop, C. *et al.* Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced

- protein-6 deficient mice. *Development* **130**, 2253-2261 (2003).
- 142 Lee, T. H., Lee, G. W., Ziff, E. B. & Vilcek, J. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. *Molecular and cellular biology* **10**, 1982-1988 (1990).
- 143 Mayer, W. E. *et al.* Isolation and characterization of lymphocyte-like cells from a lamprey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14350-14355, doi:10.1073/pnas.212527499 (2002).
- 144 Sala, E. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Reduce Colitis in Mice via Release of TSG6, Independently of Their Localization to the Intestine. *Gastroenterology* **149**, 163-176 e120, doi:10.1053/j.gastro.2015.03.013 (2015).
- 145 He, Z. *et al.* Intravenous hMSCs Ameliorate Acute Pancreatitis in Mice via Secretion of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Stimulated Gene/Protein 6. *Scientific reports* **6**, 38438, doi:10.1038/srep38438 (2016).
- 146 Qi, Y. *et al.* TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds. *The Journal of investigative dermatology* **134**, 526-537, doi:10.1038/jid.2013.328 (2014).
- 147 Song, W. J. *et al.* TSG-6 Secreted by Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates DSS-induced colitis by Inducing M2 Macrophage Polarization in Mice. *Scientific reports* **7**, 5187, doi:10.1038/s41598-017-04766-7 (2017).
- 148 Ahlemeyer, B., Vogt, J. F., Michel, V., Hahn-Kohlberger, P. & Baumgart-Vogt, E. Microporation is an efficient method for siRNA-induced knockdown of PEX5 in HepG2 cells: evaluation of the transfection efficiency, the PEX5 mRNA and protein levels and induction of peroxisomal deficiency. *Histochemistry and cell biology* **142**, 577-591, doi:10.1007/s00418-014-1254-6 (2014).
- 149 Chen, C. W., Yeh, M. K., Shiau, C. Y., Chiang, C. H. & Lu, D. W. Efficient downregulation of VEGF in retinal pigment epithelial cells by integrin ligand-labeled liposome-mediated siRNA delivery. *International journal of nanomedicine* **8**, 2613-2627, doi:10.2147/IJN.S39622 (2013).
- 150 Peng, W., Yu, Y., Li, T., Zhu, Y. & Chen, H. The effects of small interfering RNA-targeting tissue factor on an in vitro model of neovascularization. *Molecular vision* **19**, 1296-1303 (2013).
- 151 Pezzi, N. *et al.* Aire knockdown in medullary thymic epithelial cells affects Aire protein, deregulates cell adhesion genes and decreases thymocyte interaction. *Molecular immunology* **77**, 157-173, doi:10.1016/j.molimm.2016.08.003 (2016).
- 152 An, X. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Ameliorated Glucolipototoxicity in HUVECs through TSG-6. *International journal of molecular sciences* **17**, 483, doi:10.3390/ijms17040483 (2016).
- 153 Wang, S. *et al.* Tumor necrosis factor-inducible gene 6 promotes liver regeneration in mice with acute liver injury. *Stem cell research & therapy* **6**, 20, doi:10.1186/s13287-015-0019-z (2015).
- 154 Di, G. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Promote Diabetic Corneal Epithelial Wound Healing Through TSG-6-Dependent Stem Cell Activation and Macrophage Switch. *Investigative ophthalmology & visual science* **58**, 4344-4354, doi:10.1167/iov.17-21506 (2017).
- 155 Domingo-Gonzalez, R. *et al.* Inhibition of Neutrophil Extracellular Trap Formation after Stem Cell Transplant by Prostaglandin E2. *American journal of respiratory and critical care medicine* **193**, 186-197, doi:10.1164/rccm.201501-0161OC (2016).
- 156 Shen, L. *et al.* Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor- $\beta$ 1. *Clinical and experimental immunology* **149**, 155-161, doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03376.x (2007).
- 157 Steiger, S. & Harper, J. L. Neutrophil cannibalism triggers transforming growth factor  $\beta$ 1 production and self regulation of neutrophil inflammatory function in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in mice. *Arthritis and rheumatism* **65**, 815-823, doi:10.1002/art.37822 (2013).
- 158 Wisniewski, H. G., Burgess, W. H., Oppenheim, J. D. & Vilcek, J. TSG-6, an arthritis-associated hyaluronan binding protein, forms a stable complex with the serum protein inter- $\alpha$ -inhibitor. *Biochemistry* **33**, 7423-7429 (1994).
- 159 Lessig, J., Reibetanz, U., Schonberg, M. & Neundorff, I. Efficient inhibition of human leukocytic elastase by means of  $\alpha$ 1-antitrypsin/peptide complexes. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **83**, 461-471, doi:10.1002/cyto.a.22270 (2013).
- 160 Wisniewski, H. G. *et al.* TNF/IL-1-inducible protein TSG-6 potentiates plasmin inhibition by inter- $\alpha$ -inhibitor and exerts a strong anti-inflammatory effect in vivo. *J Immunol* **156**, 1609-1615 (1996).
- 161 Akong-Moore, K., Chow, O. A., von Kockritz-Blickwede, M. & Nizet, V. Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. *PloS one* **7**, e42984, doi:10.1371/journal.pone.0042984 (2012).
- 162 Al-Khafaji, A. B. *et al.* Superoxide induces Neutrophil Extracellular Trap Formation in a TLR-4 and NOX-dependent mechanism. *Mol Med* **22**, doi:10.2119/molmed.2016.00054 (2016).
- 163 Khan, I. *et al.* Effects of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on neonatal neutrophils. *Journal of inflammation research* **8**, 1-8, doi:10.2147/JIR.S71987 (2015).

- 164 Hakkim, A. *et al.* Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature chemical biology* **7**, 75-77, doi:10.1038/nchembio.496 (2011).
- 165 Liu, L. *et al.* TSG-6 secreted by human umbilical cord-MSCs attenuates severe burn-induced excessive inflammation via inhibiting activations of P38 and JNK signaling. *Scientific reports* **6**, 30121, doi:10.1038/srep30121 (2016).
- 166 Remijsen, Q. *et al.* Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell research* **21**, 290-304, doi:10.1038/cr.2010.150 (2011).
- 167 Milane, L., Trivedi, M., Singh, A., Talekar, M. & Amiji, M. Mitochondrial biology, targets, and drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **207**, 40-58, doi:10.1016/j.jconrel.2015.03.036 (2015).
- 168 Walker, M. A., Volpi, S., Sims, K. B., Walter, J. E. & Traggiai, E. Powering the immune system: mitochondria in immune function and deficiency. *Journal of immunology research* **2014**, 164309, doi:10.1155/2014/164309 (2014).
- 169 Cloonan, S. M. & Choi, A. M. Mitochondria: commanders of innate immunity and disease? *Current opinion in immunology* **24**, 32-40, doi:10.1016/j.coi.2011.11.001 (2012).
- 170 Song, S. B. *et al.* Modulation of Mitochondrial Membrane Potential and ROS Generation by Nicotinamide in a Manner Independent of SIRT1 and Mitophagy. *Molecules and cells* **40**, 503-514, doi:10.14348/molcells.2017.0081 (2017).

## 18. Apéndice. Materiales y reactivos

### ***Cultivo celular***

Medio águila modificado por Dulbecco – Mezcla nutritiva F12 (DMEM / F-12); Gibco (Paisley, UK)  
Solución salina balanceada de Hank (HSSB); Gibco (Paisley, UK)  
Medio esencial mínimo de transfección (OPTI-MEM); Gibco (Paisley, UK)  
Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640); Gibco (Paisley, UK)  
Suero Fetal Bovino (SFB); Calbiochem (San Diego, CA)  
Penicilina (10.000 UI / ml) / Estreptomicina (10 mg / ml) (PE); Gibco (Paisley, UK)  
Tripsina 10X; Gibco (Paisley, UK)  
Colagenasa II; Gibco (Paisley, UK)  
Dispasa II; Gibco (Paisley, UK)  
Solución balanceada de fosfatos (PBS, pH 7,2)  
Lipofectamina 2000; Invitrogen (Waltham, MA)  
Botellas de cultivo celular, placas de plástico de 24 pocillos y placas de plástico de 96 pocillos;  
Corning Inc (Corning, NY)

### ***Biología Molecular e Inmunofluorescencia***

Solución Tris- ácido acético- EDTA (TAE 1X)  
Triton 100X  
Didimetilsulfóxido (DMSO)  
Lipopolisacárido (LPS) de E. coli cepa OB111: B4; Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI).  
*p*-formaldehído (PFA 4%); Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI)  
poli-L-lisina; Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI)  
Nitroazul de Tetrazolio (NBT); Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI).  
Yoduro de propidio (PI); Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI)  
Azul tripano; Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI)  
Solución Cytofix/cytoperm; Becton Dickinson (San Diego, CA)  
Vectashield-4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI); Vector Laboratories (San Diego, CA)  
RNA pequeños de interferencia (siRNA) TSG-6 y control aleatorio; Santa Cruz (TX)  
TSG-6 humano recombinante (rhTSG-6); R&D systems (Minneapolis, MN ),  
Yoduro de 3,3'-dihexiloxacarococano (DiOC6 (3)); molecular probes (Eugene, OR)



### **Anticuerpos**

Los anticuerpos purificados: anti-elastasa, anti-albúmina, anti-colágeno II, anti-TSG-6, anti-SSEA-4 y anti-Oct-4 fueron adquiridos de Abcam (Cambridge, Inglaterra).

Los anticuerpos acoplados anti-CD44 conjugado con PerCPCy5.7, anti-CD34 conjugado con FITC, anti-CD29 conjugado con FITC, conjugado con APC anti-CD105, conjugado con PE-CD73 y anticuerpo anti-CD45 conjugado con PerCP-Cy5.5 fueron adquiridos de -Bioscience (San Diego, CA).

Los anticuerpos anti-conejo de cabra conjugados AlexaFluor-488 y AlexaFluor-594 se obtuvieron de LifeTechnologies (Eugene, OR).

### **Kits**

kit humano de TSG-6 ELISA; Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI).

Kit RNeasy y Omniscript; Qiagen (Hilden, Alemania).

kit de PCR KAPA2G Fast Ready Mix ; Kapa Biosystems (Boston, MA).

kit BigDye terminator ; Applied Biosystems( Foster City, CA)

Kit de aislamiento de neutrófilos de raton; Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)

### **Equipos**

Secuenciador DNA ABI 310; Applied Biosystems (Foster City, CA)

G-Box system and Gene Snap Software version 7.12.6; Syngene (London, UK)

Microscopio ApoTome II, Axiovision 2.0 software; Carl Zeiss (Jena, Germany)

Citometro FACS Verse ; Becton Dickinson (San Diego ,CA)

Citometro FACS calibur; Becton Dickinson (San Diego ,CA)

Espectrofotometro Multiskan Ascent ; Thermo Labsystems (PHL, USA)

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Human Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells inhibit Neutrophil Extracellular Traps through TSG-6

Fátima Sofía Magaña-Guerrero<sup>1</sup>, Alfredo Domínguez-López<sup>1</sup>, Pamela Martínez-Aboytes<sup>1</sup>, Beatriz Buentello-Volante<sup>1</sup> & Yonathan Garfias<sup>1,2</sup>

The mesenchymal stem cells obtained from human amniotic membrane (hAMSC) possess immunosuppressive functions through soluble factors such as prostanooids and proteins; thus, they have been proposed to ameliorate inflammatory processes. On the other hand, activated neutrophils are cells of the first line of immune defense that are able to release extracellular traps (NETs). NETs are formed of DNA and granular components; however, the excessive release of NETs is associated with the development of autoimmune and chronic inflammatory diseases. In this study, we identified that conditioned medium (CM) from hAMSC was able to diminish NETs release, as well as the production of reactive oxygen species (ROS) and the mitochondrial membrane potential from LPS-stimulated mouse bone marrow-derived neutrophils (BMN). Interestingly, NETs inhibition, ROS levels decrease and mitochondrial membrane potential loss were reverted when LPS-stimulated murine derived BMN were exposed to the CM from hAMSC transfected with TSG-6-siRNA. Finally, rhTSG6 was able to significantly diminish NETs release in BMN. These data suggest an inhibition mechanism of NETs ROS-dependent in which TSG-6 participates. Consequently, we propose the hAMSC use as a therapeutic candidate in the treatment of inflammatory diseases in which NETs are involved.

Mesenchymal Stem Cells (MSC) are multipotent non-hematopoietic cells, which were first isolated from bone marrow<sup>1,2</sup> and can be obtained from different adult and embryonic tissues such as liver, kidney, muscle, adipose and connective tissue, umbilical cord as well as term placenta<sup>3,4</sup>. In 2006, the International Society of Cell Therapy (ISCT) stated that the adhesion to plastic on *in vitro* culture, the ability to generate units-forming colony fibroblast (U-FCF), the expression of CD105, CD90, CD73, CD44, CD29 markers, the absence of hematopoietic markers CD45, CD19, CD34, CD11b, CD14 and CD79a expression as well as the potential of differentiation to one or more cell lineages are the minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells<sup>5</sup>. Cumulative evidence has demonstrated that the MSC possess immunomodulatory activities and are able to regulate a wide range of immune cells. MSC inhibit the activation and function of dendritic cells<sup>6,7</sup>, decrease proliferation and effector functions of B and T lymphocytes<sup>8–11</sup>, and induce immunoregulatory responses on macrophages<sup>12</sup>. It has extensively been studied that MSC secrete a myriad of factors that are in charge of the immunoregulatory effects; among them, the TNF- $\alpha$  stimulated gene/protein 6 (TSG-6) is proposed as a key molecule in diminishing acute inflammation in different disease models such as corneal injury, peritonitis induced by yeast zymosan, bleomycin-induced lung injury and in preventing acute allogeneic corneal rejection<sup>13</sup>. Additionally, induced-pluripotent stem cells (iPSC) are also capable of diminishing corneal inflammation in part by the expression of TSG-6<sup>14</sup>. The protein structure allows TSG-6 to interact with hyaluronic acid, chondroitin sulfate, inter-alpha-inhibitor (I $\alpha$ I), and is able to remodel extracellular matrix (ECM)<sup>15</sup>. TSG-6 is a 35-kDa protein that is secreted by a wide range of cell types in response to inflammatory mediators<sup>16</sup>. The gene expression of TSG-6 is tightly regulated and it is generally not constitutively expressed in adult mammalian tissues; however, there are exceptions to this, such as in human epidermis<sup>17</sup>, islets of the pancreas, adult central nervous system<sup>18</sup>, and

<sup>1</sup>Biología Celular y Tisular, Unidad de Investigación, Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana, Chimalpopoca 14, Ciudad de México, 06800, Mexico. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad de México, 04510, Mexico. Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.G. (email: [yogarfias@institutodeoftalmologia.org](mailto:yogarfias@institutodeoftalmologia.org))

the human amniotic membrane<sup>19</sup>. It has been described that TSG-6 secreted from bone marrow MSC possesses anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms in a murine traumatic brain injury<sup>20</sup>. More recently, it has been demonstrated the direct effect of secreted TSG-6 from human bone marrow mesenchymal stem cells by inhibiting the immune response through p38 and MEK mitogen-activated protein kinase pathway<sup>21</sup>.

Human amniotic membrane (hAM) is the inner layer of the placenta, which is in contact with the amniotic fluid and the fetus. The hAM consists of an epithelial layer, which is formed by cubical cells and an inner mesodermal tissue. It has been shown that hAM mesoderm is able to suppress the adaptive and innate immune responses<sup>22–24</sup>. In this context, there are cells that can be obtained from the hAM mesoderm; these are the human amniotic mesenchymal stromal cells (hAMSC). Similarly to MSC, hAMSC are able to differentiate into cells from each of the three germ layers and express pluripotency-associated stem cells markers<sup>25</sup>. Increasing evidence has demonstrated that hAMSC have immunosuppressive activities, inhibiting the innate and the adaptive immune systems. The hAMSC and their conditioned medium (CM) have the ability to inhibit T cells, reduce the expression of markers associated with Th1 and Th17 cell population, promote regulatory T cells and reduce the cytotoxicity of NK cells<sup>26–28</sup>. Also, hAMSC and their CM affect the differentiation of dendritic cells<sup>29</sup>. Moreover, hAMSC have the ability to participate in tissue repair inhibiting fibrosis and promoting epithelialization. It has recently been shown that CM from hAMSC improved tissue regeneration in wound-healing models inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2-macrophages phenotype and their functions<sup>30</sup>. Furthermore, there are studies demonstrating that CM from AM-MSc have anti-inflammatory<sup>31</sup>, anti-neoplastic<sup>32</sup> and immunomodulatory properties<sup>33</sup>. Therefore, there are soluble factors synthesized and secreted by hAMSC that are responsible in part of such activities. For example, prostaglandin E2 synthesized and secreted by hAMSC inhibit T cell proliferation<sup>34</sup>. Interestingly, TSG-6 presence has been evidenced in amniotic tissue as well as in cultured hAMSC<sup>19</sup>. However, as far as we know, the effect of hAMSC or their CM on the innate immune system, specifically on neutrophils, has not been sufficiently studied.

Neutrophils are cells that act as the first line of defense of the immune system<sup>35</sup>. Neutrophils activation has many consequences such as production of reactive oxygen species (ROS), lytic enzymes and antimicrobial peptides; also, they phagocytose and form and release neutrophil extracellular traps (NETs)<sup>36</sup>. NETs are structures made by DNA fibers and granular proteins like myeloperoxidase and elastase, antimicrobial peptides and citrullinated histones<sup>37,38</sup>. Though, it has been proposed that the formation of NETs is an immune mechanism to capture and eliminate pathogens and delimit the sites of inflammation<sup>39,40</sup>, there are still controversies on the effect of NETs release in health and disease phenomena. For example, NETs formation is beneficial in resolving the inflammatory reaction in gouty arthritis degrading IL-1 $\beta$  and IL-6 via serine proteases attached to NETs<sup>41</sup>; in contrast, NETs aggregation worsens the clinical symptoms in chronic pancreatitis inflammation through IL-17A, which is also contained in NETs<sup>42</sup>. Moreover, uncontrolled release of these traps and the exposure from their components has been associated to the development of some autoimmune diseases such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Rheumatoid Arthritis (RA)<sup>43,44</sup>. Additionally, endometriosis and chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis have been associated to NETs formation<sup>45,46</sup>.

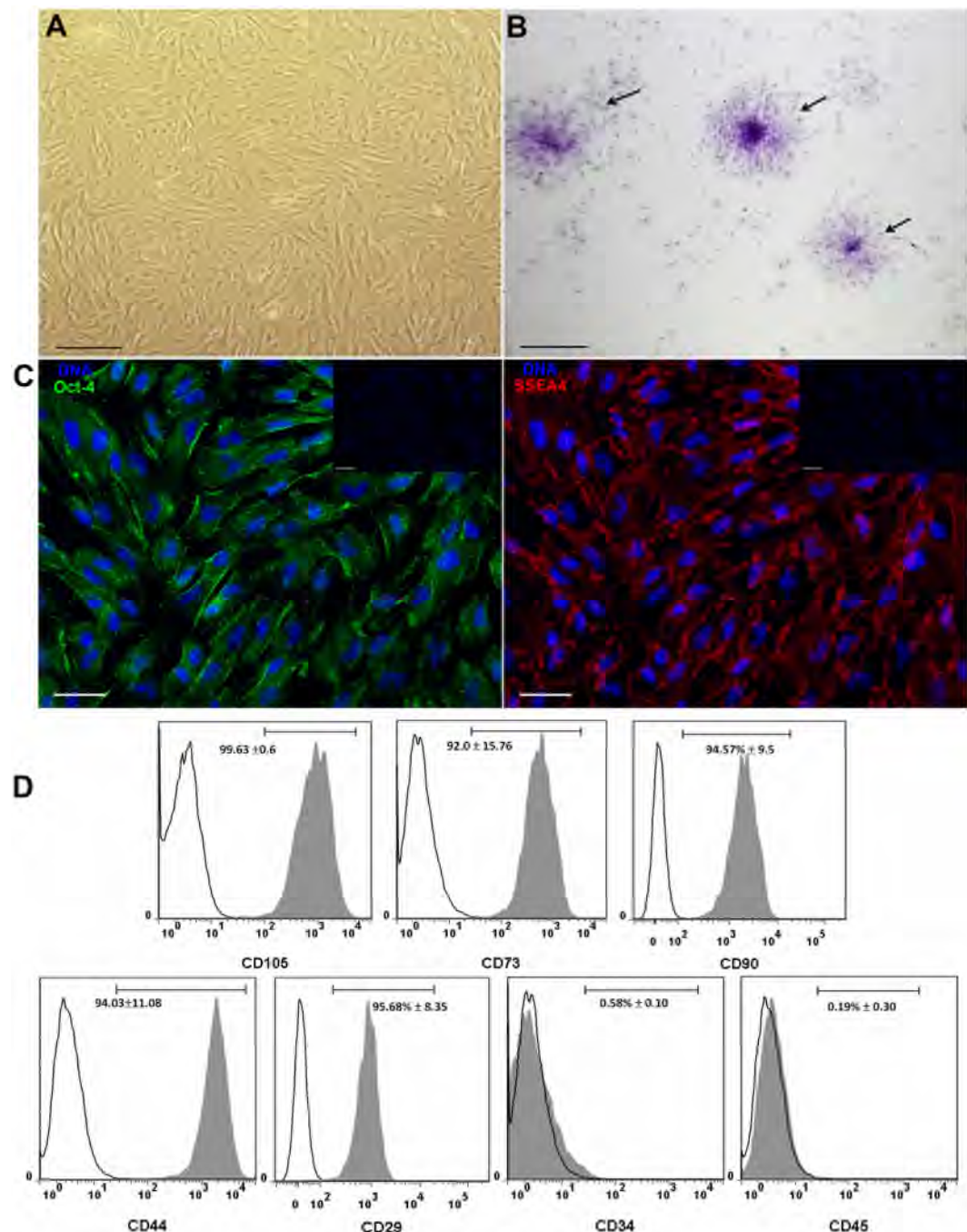
Despite therapies with hAMSC or their CM have been used to ameliorate acute and chronic inflammatory diseases, the precise mechanisms by which these cells or soluble factors exert their function is yet poorly understood. The aim of this study was to describe the role of TSG-6 produced by hAMSC on NETs release.

## Results

**Characterization of human Amniotic Mesenchymal Stem Cells.** The cells obtained from the amnion were cultured in plastic flasks. And, according to the criteria proposed by the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells<sup>47</sup>, these cells attached to plastic adopted a fibroblastoid shape (Fig. 1A, upper-left panel); they made colony-forming units as observed with the crystal violet staining (Fig. 1B, upper-right panel). In addition to this, cells expressed embryonic/pluripotent stem cell markers such as Oct-4 and SSEA-4 proteins; both Oct-4 and SSEA-4 strongly stained the cytoplasm (Fig. 1C, lower-panel). When cell surface antigens from mesenchymal lineage were analyzed by flow cytometry, the cells expressed the MSC markers as follows: CD29: 95.68%  $\pm$  8.35; CD44: 94.03  $\pm$  11.08; CD73: 92.0  $\pm$  15.76; CD90: 94.57%  $\pm$  9.5; CD105: 99.63  $\pm$  0.6, these results are expressed as mean  $\pm$  SE; in contrast to these markers, the cells were negative (<1%) to CD45 and CD34 staining (Fig. 1D). In order to determine the ability of these cells to differentiate among other tissue lineages, they were cultured in the presence of two differentiation media for 3 weeks and immunofluorescence assays were performed. When the cells were cultured in the presence of the hepatogenic medium, the cells were positive to albumin and were able to synthesize glycogen, evaluated with PAS staining. On the other hand, in the presence of the chondrogenic medium, the cells were positive to collagen-II and were able to synthesize glycosaminoglycans evidenced with the alcian blue staining. Though, stem cells features were present in these cells (Fig. 2A and B).

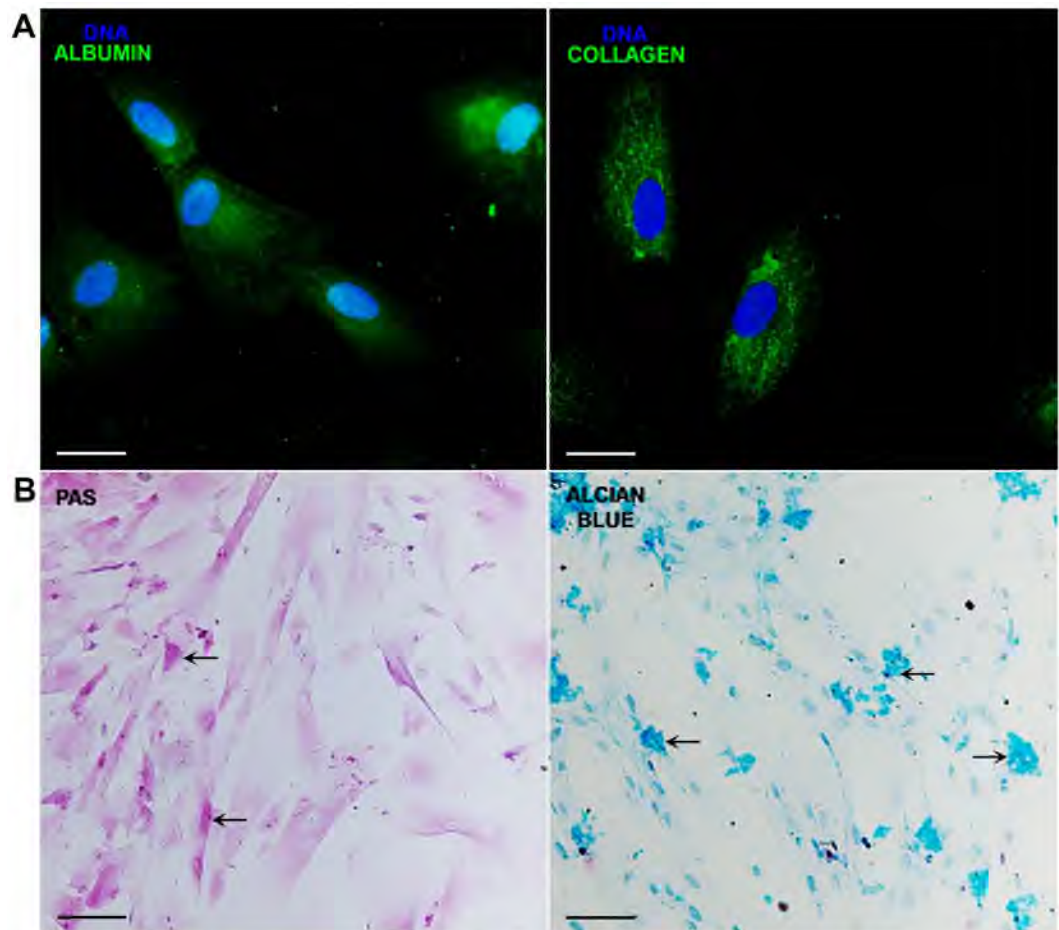
**Conditioned medium from hAMSC inhibits NETs formation.** Mouse bone marrow isolated neutrophils were adhered to poly-L-lysine charged slides for 20 min. And afterwards, the medium was changed to either fresh medium without FBS or fresh CM derived from hAMSC as described in materials and methods, and the cells were exposed or not to LPS. The bone marrow murine neutrophils without stimulus released NETs in a basal manner; however, and as expected, LPS significantly increased (\*\*p < 0.001) NETs release. Interestingly, there was a significant (\*p < 0.05) inhibition of NETs release when the LPS-stimulated bone marrow murine neutrophils were exposed to fresh CM derived from hAMSC in comparison with that of NETs release by murine neutrophils exposed to LPS (Fig. 3).

**Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells constitutively express TSG-6.** As previously mentioned, TSG-6 is an immunosuppressive molecule constitutively expressed in epidermis, pancreas, adult central nervous system and interestingly amniotic membrane. Cumulative evidence shows that the primary function of



**Figure 1.** Cells obtained from human amniotic membrane mesoderm displayed mesenchymal stromal cells characteristics. Phase-contrast micrograph of hAMSC adhered to a polystyrene cell culture plate at 3<sup>rd</sup> passage showing fibroblast morphology; the photograph was taken at 40x of magnification, scale bar 100  $\mu$ m (A). The cells were cultured for ten days and stained with crystal violet, and a direct light micrograph was performed in order to identify the UFC (arrows); the photograph was magnified at 35x in a stereoscopic microscope, scale bar 100  $\mu$ m (B). Fluorescence micrographs of hAMSC stained with pluripotent embryonic markers OCT-4 (left panel), and SSEA-4 (right panel). DAPI was used to identify their nuclei in both panels; scale bars represent 20  $\mu$ m (C). hAMSC cells from 4<sup>th</sup> passage were trypsinized and stained with antibodies against the indicated cell surface antigens and analyzed by flow cytometry. As shown, cells were positive to (>90%) CD106, CD73, CD90, CD44 and CD29; in contrast, they were negative to the expression of CD34 and CD45 hematopoietic-cells markers, inner numbers represent the mean  $\pm$  SD (D). These are representative images from three different independent assays.

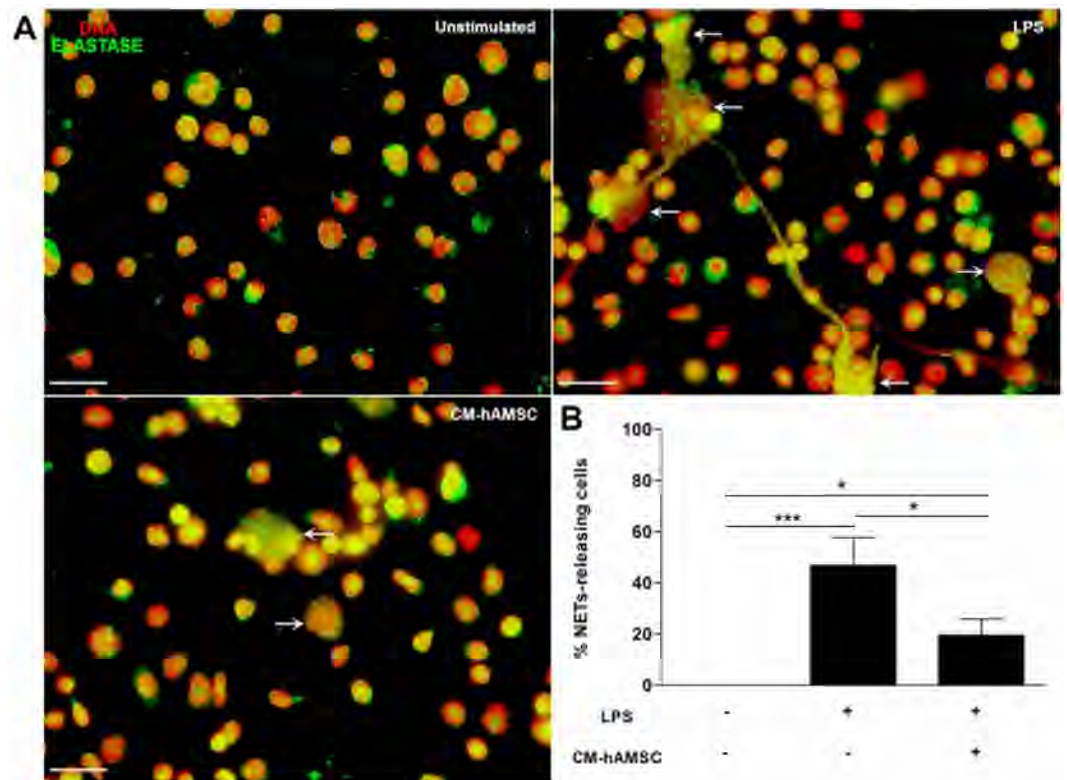
TSG-6 is to protect the tissue from the damaging of inflammation and that many of the anti-inflammatory activities of MSC are mediated by TSG-6<sup>20,21,48</sup>. To corroborate that hAMSC have the ability to constitutively produce TSG-6, the cells were FBS-starved for 12 h before RNA extraction. After PCR reaction, the amplicon was resolved



**Figure 2.** The hAMSC were able to transdifferentiate into hepatocyte-like and chondrocyte-like cells. hAMSC were cultured with medium either for hepatocytes or chondrocytes differentiation for 3 weeks, and immunostained for albumin or collagen, respectively. The differentiation was corroborated with a PAS and alcian blue stains for hepatocyte-like and chondrocyte-like cells, respectively. Fluorescence micrographs of hAMSC differentiated into hepatocyte-like cells expressing albumin (upper-left panel), and chondrocyte-like cells showing positivity to collagen-II (upper-right panel). Their nuclei were identified with DAPI. Scale bars represent 20  $\mu\text{m}$  (A). Direct-light micrographs of hepatocytes-like cells producing glycogen demonstrated by PAS stain in their cytoplasm (lower-left panel), and of chondrocyte-like cells synthesizing proteoglycans and glycosaminoglycans stained with alcian blue (lower-right panel) (B). Scale bars represent 100  $\mu\text{m}$ . These are representative images from three independent assays.

in 1.5% agarose gel, stained with ethidium iodide and observed in a transilluminator. The amplicon size was 178 pb as expected. In order to corroborate that the amplicon corresponded to *tsg-6*, automated DNA sequencing was performed, the nucleotide sequence of *tsg-6* amplicon disclosed a 100% homology with the wild type human *tsg-6* sequence. On the other hand, protein presence was determined by means of immunofluorescence. The TSG-6 protein was observed in the nucleus as well as in the cytoplasm; interestingly, the TSG-6 protein presented a diffuse distribution with a vesicular-like pattern in the nucleus as well as in the cytoplasm (Fig. 4).

**TSG-6 from hAMSC inhibits NETs formation.** In order to identify the role of TSG-6 in NETs formation, gene knockdown of TSG-6 was performed on hAMSC using a specific siRNA. Cells transfected with siRNA specific to TSG-6 significantly ( $*p < 0.05$ ) reduced the expression of its transcript compared to that of the scrambled control siRNA transfected cells that showed no differences among the non-transfected cells; similarly, TSG-6 siRNA transfection inhibited significantly ( $*p < 0.05$ ) the TSG-6 protein presence in comparison to that of the scrambled control siRNA and non-transfected cells. Finally, and in order to confirm TSG-6 inhibition affected its presence in the CM, ELISA was performed and undetectable levels of TSG-6 were found (Fig. 4). Once the hAMSC cells were transfected with TSG-6 and scrambled siRNA, their respective supernatants were used for the following assays. Mouse bone marrow neutrophils stimulated or not with LPS were exposed to different conditioned media: hAMSC-conditioned medium (CM-hAMSC), conditioned medium from hAMSC transfected with TSG-6-siRNA (CM-hAMSC-TSG-6), or conditioned medium from hAMSC transfected with scrambled siRNA (CM-hAMSC-scrambled). After adhering the murine neutrophils to poly-L-lysine charged slides for 20 min, the cells were stimulated or not with LPS and exposed to the different conditioned media (afore

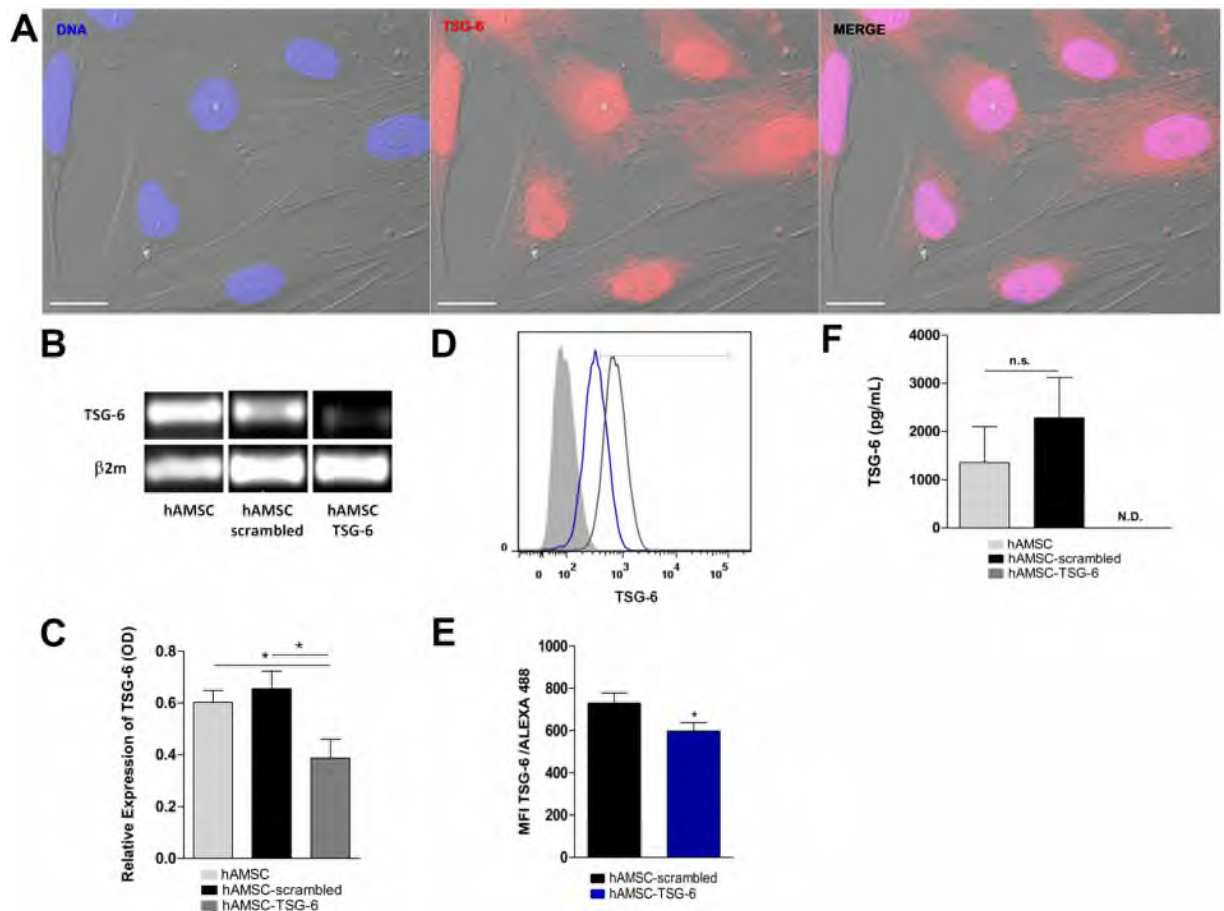


**Figure 3.** The soluble factors from hAMSC decrease the release of NETs. Murine neutrophils isolated from bone marrow were stimulated with LPS to induce the release of NETs and were incubated with CM from hAMSC. Fluorescence micrographs of unstimulated neutrophils (upper-left panel), LPS-stimulated neutrophils (upper-right panel, LPS) and LPS-neutrophils cultured with the CM from hAMSC (lower-left panel, CM-hAMSC). LPS-stimulated neutrophils liberated extracellular traps formed by elastase and DNA (white arrows). The neutrophils in contact with the soluble factors from hAMSC (CM-hAMSC) decrease the liberation of NETs. Scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ . These are representative images from three independent assays (A). Graphic represents the percentage of NETs releasing cells. The area of NETs was quantified with the Image J program from five random fields in each condition. Bars represent the mean percentage of NETs releasing cells  $\pm$  SD (n = 3), \* $p < 0.05$  (LPS vs. CM-hAMSC; unstimulated vs. CM-hAMSC); \*\*\* $p < 0.001$  (unstimulated vs. LPS) (B).

mentioned) for additional 90 min. The cells were fixed and NETs quantification was performed. Murine bone marrow isolated neutrophils cultured in the presence of CM of non-transfected hAMSC released low levels of NETs when exposed to LPS in comparison those with the LPS-stimulated neutrophils in the presence of fresh medium (\* $p < 0.05$ ). Interestingly, when neutrophils were exposed to LPS in the presence of CM-hAMSC-TSG-6 there was a significant (\* $p < 0.05$ ) increase of NETs levels in comparison with that of the NETs levels released by murine neutrophils-LPS stimulated in the presence of CM of hAMSC-scrambled as well as with the CM derived from non-transfected hAMSC (\* $p < 0.05$ ). Contrariwise, there was no difference between the NETs levels of the neutrophils exposed to LPS in the presence of CM-hAMSC-TSG-6 and the NETs levels of the LPS-exposed neutrophils without CM (Fig. 5).

**rhTSG-6 reduces NETS formation.** In order to directly determine the effect of TSG-6 on NETs release by LPS-stimulated mouse bone marrow neutrophils, different doses of rhTSG-6 were used; interestingly, 250 and 125 pg/ml of rhTSG-6 showed a decrease with significant differences (\* $p < 0.05$ ) in comparison to those cells stimulated with LPS and cultured with medium without rhTSG-6 (Fig. 6).

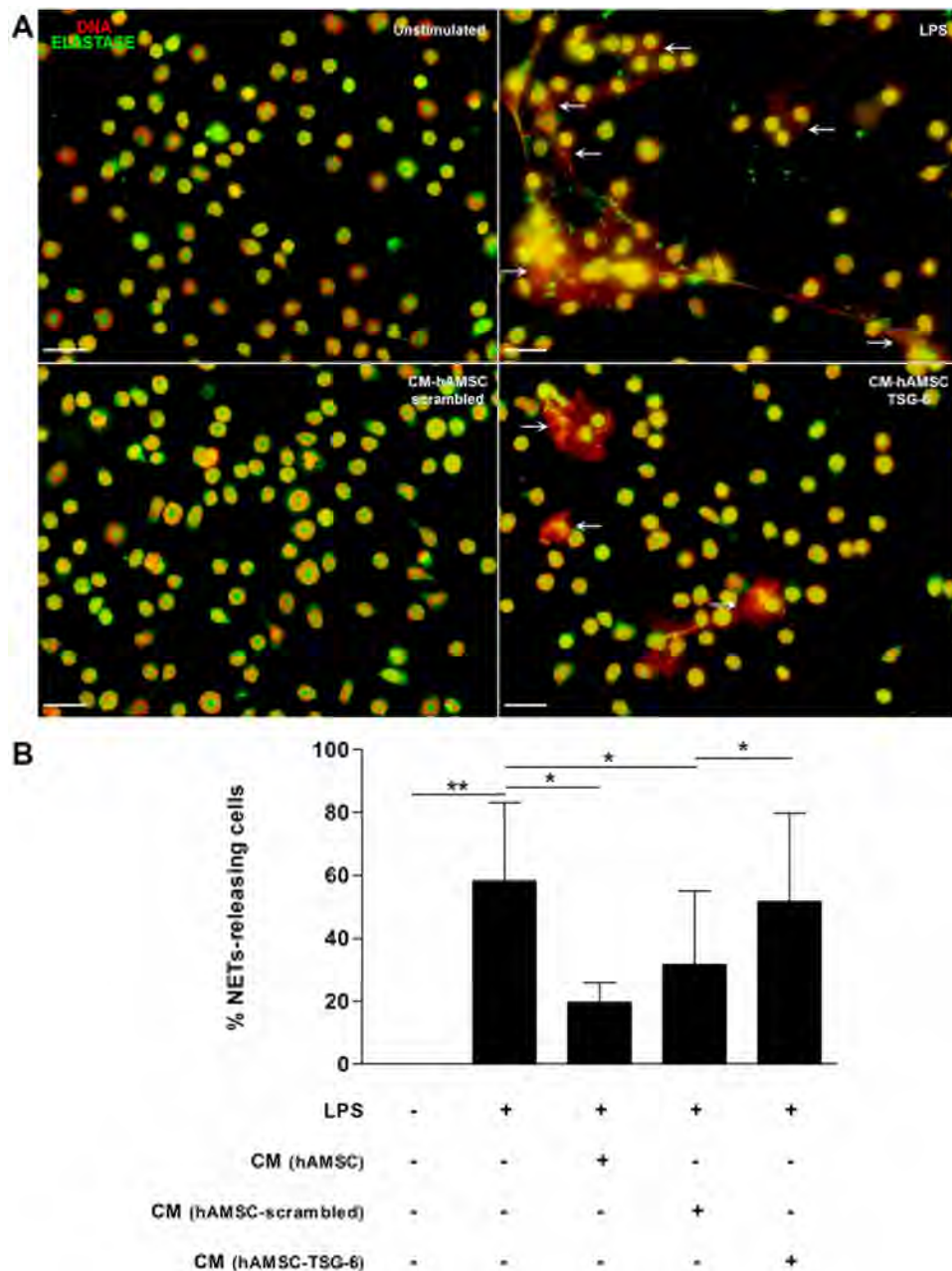
**NETs inhibition through TSG-6 is ROS dependent.** The inhibition of the oxidase NADPH complex significantly reduces NETs release<sup>49</sup>. In order to determine whether the inhibition of NETs by CM of hAMSC was associated with a reduction on the activity of oxidase NAPDH, NBT assays were performed. Bone marrow isolated neutrophils in the presence of fresh medium without stimulus showed a basal activity, which was considered as the 100% of the ROS production. As expected, the levels of ROS production significantly (\* $p < 0.05$ ) increased 30% from the basal ROS production when the cells were cultured in the presence of fresh medium with LPS. Interestingly, the CM-hAMSC-scrambled significantly (\* $p < 0.05$ ) inhibited up to 25% of the ROS production by LPS-stimulated murine bone marrow neutrophils in comparison to that of the ROS production from LPS-stimulated neutrophils only with fresh medium; this inhibition on ROS production was similar to that of the LPS-stimulated neutrophils ROS production using the NADPH inhibitor Diphenyleneiodonium (DPI)<sup>50</sup>. When



**Figure 4.** TNF-alpha Stimulated-Gene 6 protein (TSG-6) is expressed constitutively on hAMSC and is silenced by siRNA-TSG6 hAMSC were immunostained for TSG-6 together with DAPI for nuclei. Fluorescence micrograph of hAMSC stained for TSG-6 (middle-panel), the morphology of hAMSC was visualized with Differential Interference Contrast (DIC) microscopy. The merge immunostaining is shown in the image (right-panel). As shown in the panels, the TSG-6 protein is found in the nucleus and cytoplasm. Scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ . These images are representative from three independent experiments (A). The total RNA was extracted and PCR assays were performed on non-transfected hAMSC (hAMSC) and transfected cells with siRNA scrambled (hAMSC-scrambled) or siRNA TSG-6 (hAMSC-TSG-6). Image of PCR products on 1.5% agarose gel was revealed with ethidium bromide. The siRNA-scrambled was used to confirm the specific silencing of TSG-6. The expression of *tsg6* gene decreased on hAMSC-TSG-6 with respect to hAMSC-scrambled and hAMSC (B). Densitometry analyses were performed and data were normalized using  $\beta 2\text{m}$  as housekeeping. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3), \* $p < 0.05$  (hAMSC vs. hAMSC-TSG-6; hAMSC-scrambled vs. hAMSC-TSG-6). Similar (n.s. = not statistically significant) *tsg-6* product level was found between hAMSC and hAMSC-scrambled (C). The transfected cells were immunostained for TSG-6 and the expression of the protein was analyzed by flow cytometry. Histogram in black represents the mean fluorescence intensity (MFI) of hAMSC-scrambled; histogram in blue represents the MFI of hAMSC-TSG-6 and gray histogram represents cells without staining (D). A decreased in the expression of TSG-6 was observed on hAMSC after silencing with siRNA TSG-6 respect to hAMSC-scrambled. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3), \* $p < 0.05$  (hAMSC-scrambled vs. hAMSC-TSG-6) (E). The concentration of TSG-6 protein was analyzed in the CM of siRNA-transfected hAMSC by ELISA. Similar (n.s. = not statistically significant) TSG-6 levels were detectable in the CM of hAMSC and hAMSC-scrambled; however, undetectable levels (N.D.) of TSG-6 was shown in hAMSC-TSG-6. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3) (F).

the LPS-stimulated neutrophils were exposed to the CM-hAMSC-TSG-6, they significantly (\* $p < 0.05$ ) increased the ROS production respect with the cells cultured with the CM-hAMSC-scrambled (Fig. 7).

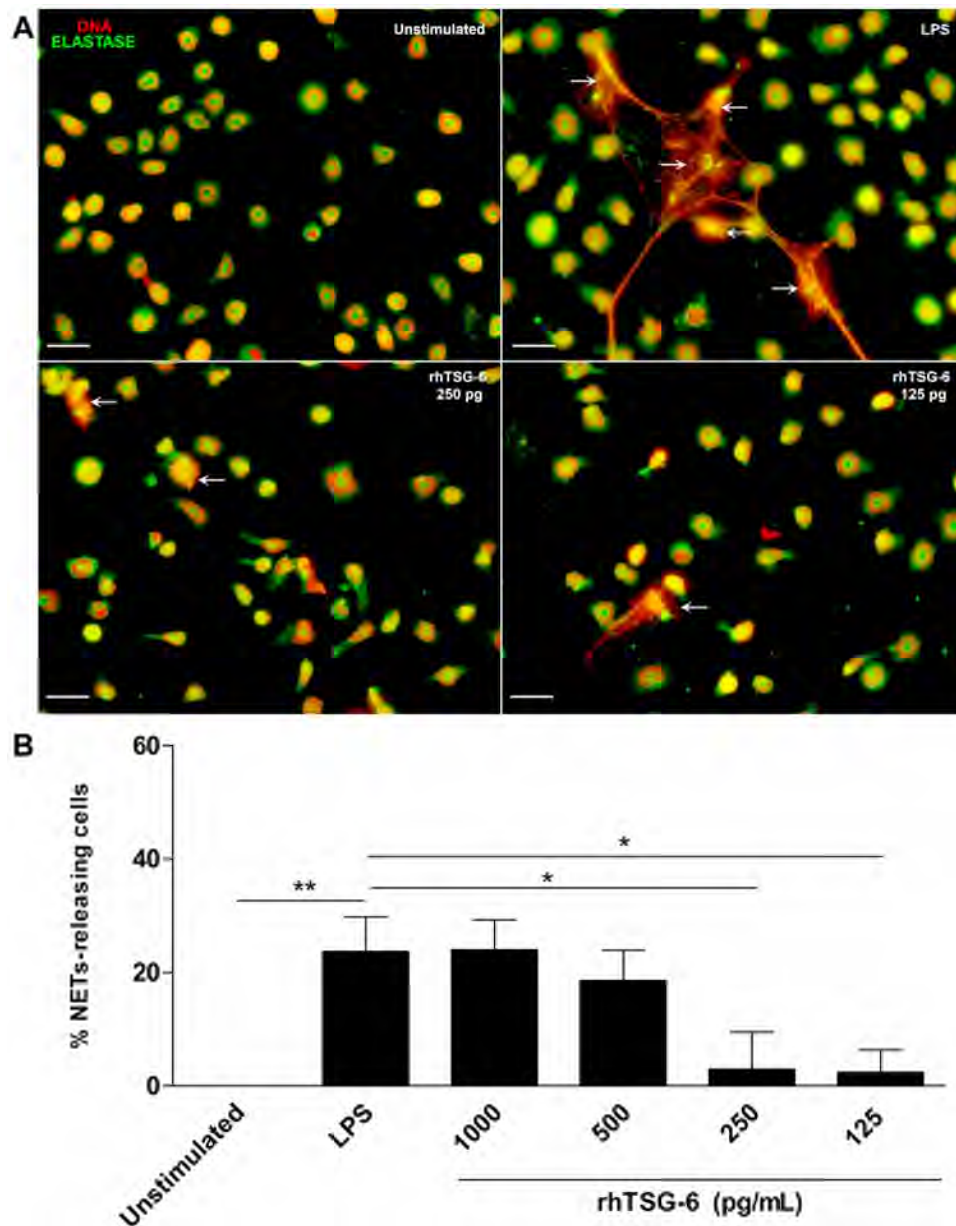
**Neutrophils mitochondrial membrane potential  $\Delta\psi_m$  loss is affected by TSG-6.** The mitochondrial membrane potential is an indicator for the energetic state of mitochondria and their correct function. The proper mitochondrial functioning is associated to the maintenance of the metabolic activity and the electron transport that permits the production and release of ATP<sup>51</sup>. Neutrophils require significant energy expenditure for the development of the various effector mechanisms they perform. It has been reported that alterations in mitochondrial function cause a decrease in the membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ), affecting the metabolic activity and



**Figure 5.** The conditioned medium (CM) from hAMSC decreases the release of NETs via TSG-6. Murine neutrophils were stimulated with LPS for NETs induction and incubated with the CM from hAMSC-scrambled or hAMSC-TSG-6. The siRNA-scrambled was used to corroborate that the specific silencing of TSG-6, did not affect the immunosuppressive effect of CM from hAMSC. After incubation, cells were stained for neutrophil elastase and the DNA was visualized with propidium iodide. Fluorescence micrographs of unstimulated neutrophils (upper-left panel), LPS-stimulated neutrophils (upper-right panel, LPS) and LPS-neutrophils cultured with the CM from hAMSC-scrambled (lower-left panel, CM-hAMSC-scrambled) or hAMSC-TSG-6 (lower-right panel, CM-hAMSC-TSG-6). The CM-hAMSC-scrambled decreases the release of NETs in the murine neutrophils (lower-left panel) respect the NETs in the LPS-stimulated neutrophils, while the CM-hAMSC-TSG-6 recovers the release of NETs in the neutrophils (lower-right panel). Scale bar represents 20 $\mu$ m (A). Graphic represents the percentage of NETs releasing cells. The area of NETs was quantified with the Image J program from five random fields in each condition. Bars represent the mean percentage of NETs releasing cells  $\pm$  SD (n = 3), \*\*p < 0.01 (unstimulated vs. LPS); \*p < 0.05 (LPS vs. CM-hAMSC; LPS vs. CM-hAMSC-scrambled; CM-hAMSC-scrambled vs. CM-hAMSC-TSG-6); n.s. = not statistically significant (CM-hAMSC vs. CM-hAMSC-scrambled) (B).

causing a decrease in the amount of ATP, with the consequent low production capacity of ROS. The alteration of the mitochondrial processes results in an altered phagocytic capacity and chemotaxis of the neutrophils<sup>52,53</sup>. When bone marrow isolated neutrophils were exposed to LPS, there was a slight increase of the  $\Delta\psi_m$  loss.



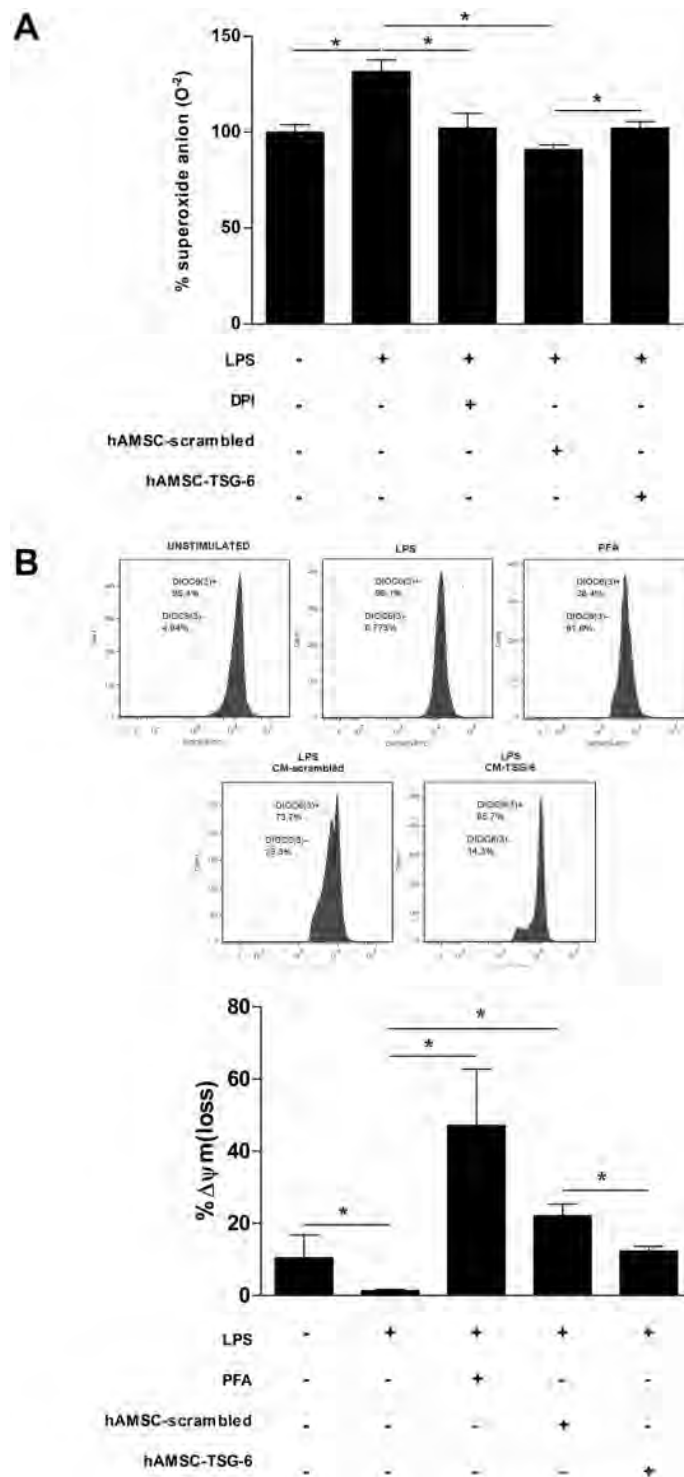


**Figure 6.** Recombinant human TSG-6 decreases the release of NETs. Murine neutrophils were stimulated with LPS for NETs induction and incubated with serial dilutions of rhTSG-6. After incubation, cells were stained for neutrophil elastase and the DNA was visualized with propidium iodide. These data are representative of three independent experiments (A). Graphic of the percentage of NETs releasing cells from LPS-stimulated neutrophils incubated with different doses of rhTSG-6. The rhTSG-6 decreases the release in a dose-dependent manner. The area of NETs was quantified with the Image J program from five random fields in each condition. Bars represent the mean percentage of NETs releasing cells  $\pm$  SD ( $n = 3$ ), \*\* $p < 0.01$  (unstimulated vs. LPS), \* $p < 0.05$  (LPS vs. rhTSG6 250 pg/ml; LPS vs. rhTSG6 125 pg/ml) (B).

However, there was an increase of the  $\Delta\psi_m$  loss in a similar way of *p*-formaldehyde treated LPS-stimulated neutrophils used as a positive control of the  $\Delta\psi_m$  loss, when the LPS-stimulated neutrophils were exposed to the CM of the hAMSC-scrambled. This loss of the  $\Delta\psi_m$  was significantly (\* $p < 0.05$ ) reduced when the LPS-stimulated neutrophils were incubated with the CM-hAMSC-TSG-6 (Fig. 7).

## Discussion

In the present study, the cells obtained from the mesoderm of human amnion (hAMSC) showed stem cells characteristics according to the ISCT and their CM inhibited LPS-stimulated murine bone marrow neutrophils NETs release. NETs release inhibition was reverted when the LPS-stimulated murine neutrophils were exposed to CM from TSG-6-silenced hAMSC. Similarly, CM from hAMSC were able to decrease the production of ROS in LPS-stimulated murine neutrophils, and this inhibition was regressed when the LPS-stimulated neutrophils were



**Figure 7.** The decrease of NETs release through TSG-6 is ROS dependent. Murine neutrophils were stimulated with LPS and incubated with the CM-hAMSC-scrambled or CM-hAMSC-TSG-6 during 30 min. The siRNA-scrambled was used to corroborate that the specific silencing of TSG-6, did not affect the immunosuppressive effect of CM from hAMSC. The ROS production was determined with the NBT reduction assay. Data are expressed as the percentage of superoxide anion production. Graphic of percentage of superoxide anion production in LPS-stimulated neutrophils cultured with the CM-hAMSC-scrambled or CM-hAMSC-TSG-6. Bars represent the mean percentage of superoxide anion  $\pm$  SD ( $n = 3$ ), \* $p < 0.05$  (unstimulated vs. LPS; LPS vs. DPI; LPS vs. CM-hAMSC-scrambled; CM-hAMSC-scrambled vs. CM-hAMSC-TSG-6). DPI (Diphenyleneiodonium) an inhibitor of NADPH complex was used as inhibitor of ROS and superoxide anion production (A). The mitochondrial membrane potential was measured with the fluorescent dye DiOC6(3) and analyzed by flow cytometry. Data are expressed as the percentage of  $\Delta\psi_m$  loss. Graphic of the percentage of  $\Delta\psi_m$  loss of LPS-stimulated neutrophils cultured with the CM-hAMSC-scrambled or CM-hAMSC-TSG-6.

The percentage of  $\Delta\psi_m$  loss of LPS-stimulated neutrophils cultured with the CM-hAMSC-scrambled increased with respect to LPS-stimulated neutrophils only with fresh medium or cultured in the presence of CM-hAMSC-TSG-6. *p*-formaldehyde (PFA) treated LPS-stimulated neutrophils were used as a positive control of the  $\Delta\psi_m$  loss. Bars represent the mean percentage of  $\Delta\psi_m$  loss  $\pm$  SD ( $n = 3$ ), \* $p < 0.05$  (unstimulated vs. LPS; LPS vs. PFA; LPS vs. CM-hAMSC-scrambled; CM-hAMSC-scrambled vs. CM-hAMSC-TSG-6 (B)).

cultured in the presence of TSG-6 silenced hAMSC. Furthermore, CM of hAMSC augmented the LPS-stimulated  $\Delta\psi_m$  loss, and the CM from TSG-6-silenced hAMSC reverted this augmentation. Finally, NETs release was inhibited in the presence of rhTSG-6 in a dose dependent manner in order to corroborate the direct effect of TSG-6 on the immune innate response.

The NETs release is an effector function from neutrophils described more than 10 years ago<sup>36</sup>; at that time, the main function attributed of these traps were their antimicrobial activity. However, it has currently been shown that excessive or uncontrolled NETs release is associated with multiple autoimmune and chronic inflammatory diseases. The generation of inflammation on NETs release is associated to its high content of degrading enzymes and oxidizing agents causing tissue damage. Identifying new mechanisms to reduce NETs release is essential to diminish this proinflammatory pathway. Recently, the use of mesenchymal cells as a therapy to ameliorate inflammatory processes has been increasing<sup>13</sup>. The cells we isolated from human amniotic membrane (hAMSC) presented mesenchymal stromal cells features according to the ISCT. hAMSC were positive (>90%) to the expression of defined cell surface markers such as CD90, CD29, CD73, CD105 and CD44, while negative to the expression of both hematopoietic markers CD34 and CD45; these results are in accordance to those previously reported<sup>47</sup>. Other features such as the expression of early stem cells markers e.g. SSEA-4 and Oct-4, colony forming units and hepatic, and chondroblasts differentiation support that these are stem cells<sup>54</sup>. The rationale for using CM in the present study is due to the fact that MSC are able to synthesize and secrete anti-inflammatory molecules. When NETs release was diminished in LPS-stimulated bone marrow neutrophils cultured in the presence of CM from hAMSC, we hypothesized that soluble molecules were in part responsible of such anti-inflammatory effect. As stated before, TSG-6 has been proposed as a key molecule in diminishing acute inflammation by MSC<sup>20,21,48</sup>. According with the results presented by Zhang *et al.*, we found that hAMSC constitutively express TSG-6 at both transcriptional and protein levels<sup>19</sup>; however, in the present study, *tsg-6* amplicon identity was corroborated by automatic DNA sequencing which had 100% homology to the human *tsg-6*-gen. In order to determine the effect of TSG-6 protein in NETs release, knockdown of *tsg-6* by siRNA was performed. Although the results of the siRNA knock-down of TSG-6 is only partial, shown by means of RT-PCR and flow cytometry, there were undetectable levels of TSG-6 measured by ELISA, suggesting the absence of TSG-6 protein in the CM. Interestingly, the LPS-stimulated neutrophils reverted the inhibition of the release of NETs when were cultured in the presence of hAMSC silenced to TSG-6 expression, suggesting that TSG-6 is, in part, responsible for NETs release inhibition. In a more direct manner, NETs release was also significantly diminished when the LPS-stimulated neutrophils were cultured in the presence of rhTSG-6 compared to that of LPS-stimulated neutrophils without rhTSG-6. Unexpectedly, NETs release inhibition was only achieved at low concentrations of rhTSG-6, while higher rhTSG-6 concentrations failed to reduce NETs formation, in this context, it has been reported that rhTSG-6 tends to self-aggregate which could explain this effect in our model<sup>55</sup>.

The TSG-6 protein forms complexes with inter-alpha-inhibitor (I $\alpha$ I) and these complexes formation inhibits the enzymatic activity of elastase; in this context, the enzymatic activity of elastase and myeloperoxidase is essential for NETs release<sup>56-58</sup>. The role of TSG-6 in inhibiting NETs release down regulating the enzymatic activities of elastase and myeloperoxidase in our model cannot be ruled out.

Activation of NADPH oxidase and consequently, ROS generation, are essential mechanisms for NETs formation and release<sup>59,60</sup>. Therefore, we determined ROS production in LPS-stimulated neutrophils in the presence of CM from hAMSC transfected either with siRNA to TSG-6 or scrambled siRNA to in turn determine the effect of TSG-6 on ROS production; we found a decrease in superoxide anion concentration in the LPS-stimulated neutrophils that were cultured in the presence of the CM from scrambled-hAMSC. Meanwhile, this decrease was recovered when the LPS-stimulated neutrophils were incubated in the presence of CM from hAMSC-TSG-6. Diphenyleneiodonium (DPI) was used as a positive control for NADPH oxidase inhibition, suggesting that TSG-6 from hAMSC is participating in the activation of this central enzyme on NETs generation. These results are in accordance to those reported by Khan, *et al.*, who described that MSC derived from Wharton's jelly were able to decrease the NADPH oxidase gene expression in adult and neonatal neutrophils<sup>61</sup>.

With respect to the effect of TSG-6 on the mitochondrial function, we found modifications in the mitochondrial potential with an increase in the percentage in the  $\Delta\psi_m$  in the neutrophils cultured with the CM-hAMSC-scrambled. This change in the mitochondrial potential could be a cause for a less production of superoxide anion found in the previous results. Whereas, when the neutrophils were incubated in the presence of CM from hAMSC with TSG-6 silenced, we observed a decrease in the percentage of  $\Delta\psi_m$  on the cells, together with the recovered capacity to generate ROS. These results suggest that the CM of hAMSC could affect the mitochondrial function in a TSG-6-dependent form. Our findings agree with what Hu J. *et al.* reported, that bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) are able to attenuate interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation by the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling and the mitochondrial pathway on lumbar disc cells<sup>62</sup>.

In conclusion, our study revealed that, the hAMSC releases several soluble factors with anti-inflammatory capacity. One of these factors is the TSG-6 protein, which, according to our results, participates in the inhibition of the release of NET by a mechanism that involves the modulation of mitochondrial function and is ROS-dependent inhibition. However, the events that are carried out in this mechanism of inhibition are still unknown; so, further studies are needed.

## Materials and Methods

**Reagents.** Trypsin 10X; Collagenase II; Fetal Bovine Serum (FBS); Dispase II; Phosphate Buffer Solution (PBS, pH 7.2), Opti-MEM Reduced Serum Medium, Penicillin (10,000 IU/ml)/Streptomycin (10 mg/ml) (PS), Lipofectamine 2000 were obtained from Invitrogen (Waltham, MA). Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture/F-12 (DMEM/F-12), Trypan blue, *p*-formaldehyde, poly-*L*-lysine, Triton 100X, dimethylsulfoxide (DMSO), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium-1640; Lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* strain *OB111:B4*; Nitroblue Tetrazolium (NBT), Propidium iodide (PI), human TSG-6 ELISA kit, were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was obtained from Promega (Madison, WI). PerCPCy5.7-conjugated anti-CD44, PE-conjugated anti-CD34, FITC-conjugated anti-CD29, APC-conjugated anti-CD105, PE-conjugated-CD73 and PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD45 were obtained from e-Bioscience (San Diego, CA). Purified antibodies: anti-elastase, anti-albumin, anti-collagen II, anti-TSG-6, anti-SSEA-4 and anti-Oct-4 were purchased from Abcam (Cambridge, England). AlexaFluor-488 and AlexaFluor-594 conjugated goat anti-rabbit antibodies were obtained from LifeTechnologies (Eugene, OR). Bovine Serum Albumin (BSA) was obtained from Calbiochem (San Diego, CA). Cell culture flasks, 24 wells plastic plates and 96-wells plastic plates were purchased from Corning Inc (Corning, NY). RNeasy and Omniscript kits were obtained from Qiagen (Hilden, Germany). Vectashield- 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was purchased from (Vector Laboratories (San Diego, CA); Neutrophils Isolation Kit mouse was obtained from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Small interfering RNA (siRNA) TSG-6 and the scrambled control siRNA (Santa Cruz, TX). KAPA2G Fast Ready Mix PCR Kit was purchased from KapaBiosystems (Boston, MA). Recombinant human TSG-6 (rhTSG-6) was purchased from R&D systems (Minneapolis, MN). 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide (DiOC6(3)) from molecular probes (Eugene, OR).

**Ethical Statements.** All the methods and experimental protocols were carried out in accordance to the Ethical Review Board (ERB) from the Institute of Ophthalmology Conde de Valenciana. The protocol was approved by the ERB from the Institute of Ophthalmology Conde de Valenciana. The informed consent was obtained from women who voluntary donated their placentas.

**Isolation of Human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells (hAMSC).** Human term placentas were processed immediately after delivery. The informed consent was obtained from women who voluntary donated their placentas. Following the similar the criteria for donation reported by Chávez-García, *et al.*, a total of five (18–37 years old) donors were included in this study<sup>63</sup>.

The amnion was separated mechanically from the chorion, which was discarded, while the amnion was rinsed with PBS. Afterwards, the amnion was cut on small pieces and incubated with 0.25% trypsin/EDTA (0.05%) for 10 min at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> with gentle shaking. The pieces of amnion were rinsed with PBS and the amniotic epithelium was removed by enzymatic digestion using 0.25% trypsin/EDTA (0.05%) during 40 min with gentle shaking every 10 min; then, the fragments of amnion were chopped and digested with 0.75 mg/ml of collagenase II during 90 min at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with gentle shaking every 10 min. After passing the suspension on a nylon mesh, the cells were centrifuged at 800 x *g* for 5 min at 10 °C. The supernatant was discarded and the human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSC) were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 20% of FBS and 1% of penicillin/streptomycin. The medium was replaced every other day. Passages 2–4 of hAMSC were used to perform all the experimental procedures, unless otherwise stated. The hAMSC cell characterization and histological stains were performed in all the cells obtained from all the donors. Transcript identification and immunofluorescence for TSG-6 was performed in three different donors. For the CM preparation, cells from three different donors were used, and replicates from each donor were performed, unless otherwise stated.

**Characterization of hAMSC.** In accordance with the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells<sup>47</sup>, we used the minimal criteria for defining hAMSC: (1) Adherence to plastic and formation of fibroblast colony-forming unit; (2) Identification of a specific pattern of cell surface antigen expression; and, (3) Differentiation towards one or more lineages. **Colony-forming unit assay:** in order to perform this assay, the hAMSC were seeded at two cells per cm<sup>2</sup> and cultured for ten days in a plastic cell culture bottle. After this period, cells were stained with 0.5% crystal violet in methanol for 5 min and rinsed with deionized water. Colonies formed were considered when > 2 mm in diameter. **Phenotypic characterization of hAMSC identifying cell surface antigens expression by flow cytometry:** briefly, cells were detached from the plastic cell culture bottles using 0.25% trypsin/EDTA (0.05%) for 5 min at 37 °C, complete medium (DMEM/F12, supplemented with 10% FBS and 1% of PS) was added to avoid the trypsin enzymatic reaction; cells were rinsed twice with PBS. Cells were incubated with different fluorochrome-conjugated antibodies for 30 min in the darkness. After incubation time, cells were rinsed twice with PBS and 1 × 10<sup>4</sup> cells were acquired in a FACS Verse flow cytometer (BD, San Diego, CA); the analyses were performed using FlowJo 7.6 software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA). Identification of early markers of differentiation was performed by means of immunofluorescence with antibodies to SSEA-4 and Oct-4 as described below. **In vitro differentiation assays of hAMSC:** hAMSC (2 × 10<sup>3</sup>) were cultured on poly-*L*-lysine charged slides on a 24-plastic-wells plate with complete medium. At day three, the medium was replaced with differentiation medium and cells were maintained for at least three weeks; the differentiation medium was replaced every other day. All differentiation media were composed of DMEM/F12 supplemented with 10% FBS and 1% PS with the specific differentiation factors: for chondrogenesis (6.25 μg/ml insulin, 10 μg/L rhTGF-β1, 300 nmol/L ascorbic acid) and for hepatogenesis (100 nmol/L dexamethasone and 100 nmol/L insulin)<sup>64</sup>. After differentiation assays, and in order to corroborate the cell lineage differentiation, immunofluorescence assays and specific histological stains were performed as indicated below.

**Histological stains.** In order to corroborate the differentiation capacity of hAMSC to chondrocytes, alcian blue staining was performed to determine the glycosaminoglycans. To corroborate the hepatic differentiation, Periodic Acid-Schiff staining (PAS) was performed to identify glycogen, glycoproteins and glycolipids.

**Immunofluorescence assays.** All immunofluorescence assays were performed as follows with modifications depending on each experiment: the cells on poly-L-lysine-coated glass cover slips were fixed with 4% *p*-formaldehyde for 10 min at 4 °C and incubated with blocking buffer (5% BSA, 0.1% Triton 100X and 0.1 M PBS) for 2 h at room temperature (RT). Subsequently, the purified primary antibody was added and incubated overnight at 4 °C; the excess of antibody was rinsed once with PBS-0.05% tween (PBS-T). Afterwards, the samples were incubated 2 h either with AlexaFluor-594-conjugated or AlexaFluor-488 goat anti-rabbit antibodies at RT. And finally, the specimens were rinsed twice with PBS-T and mounted with Vectashield-DAPI. The images were acquired with an ApoTome II microscope, and analyzed using Axiovision 2.0 software (Carl Zeiss, Jena, Germany).

**Preparation of conditioned medium (CM).** The hAMSC either with or without siRNA treatment (see below), were plated in 6-well plates at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells in a final volume of 2 ml per well of DMEM-F12 supplemented medium. Twenty-four hours after the hAMSC were adhered the supernatant was replaced with fresh DMEM-F12 supplemented medium or DMEM-F12 alone in the case of the siRNA transfection (see below). The cells were cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After this culture time the medium was collected and was considered as conditioned medium (CM). All the conditioned media were used for the assays fresh, immediately after collection. For the NET-inhibition experiments the neutrophils were incubated with CM at 100% together with the LPS-stimulus.

**Identification of transcript and protein of TSG-6 on hAMSC.** Expression and presence of TSG-6 were performed by RT-PCR and immunofluorescence, respectively. In order to determine whether hAMSC constitutively expressed *tsg-6*, **RT-PCR assays** were performed using  $1.5 \times 10^5$  hAMSC. Total RNA was obtained using the RNeasy Mini Kit following the manufacturer's instructions. Retrotranscription assays were performed using 100 ng of total RNA with the Omniscript kit according to the manufacturer's instructions. The PCR assays were performed with the KAPA2G Fast Ready Mix PCR Kit in accordance with the manufacturer's instructions using the following primers: *tsg-6* forward: 5'-GTCTGTGCTGCTGGATGGAT-3', *tsg-6* reverse: 5'-TAAAGACGCCACCACACTCC-3';  $\beta 2 m$  forward: 5'-CACCCCCACTGAAAAAGATG-3',  $\beta 2 m$  reverse: 5'-ATATTAAAAAGCAAGCAAGCA-3'. The PCR products were visualized in 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide, the images were captured and digitalized using G-Box system and Gene Snap Software version 7.12.6 (Syngene, London, UK). The mRNA expression was calculated by densitometry analysis after normalization with respect to the housekeeping beta-2 microglobulin ( $\beta 2 m$ ). On the other hand, to determine the presence of TSG-6 protein, **immunofluorescence assays** were performed as follows: hAMSC ( $3 \times 10^3$ ) were seeded on poly-L-lysine-coated glass cover slips in a 24-flat wells plate. After attachment to the cover slips, cells were fixed, blocked and immunofluorescence assays using anti-TSG6 as the primary antibody were performed as described before. **Automated DNA sequencing:** *tsg-6* products amplified by RT-PCR were directly sequenced to confirm the identity of the amplicon. Nucleotide sequence was achieved using the BigDye terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) of fluorescently labeled terminators and analyzing the samples in an ABI 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Sequences were compared to the published human wild type *tsg-6* gene (Ensemble transcript ID number ENSG00000123610).

**Transfection of hAMSC with TSG-6 siRNA.** In order to knockdown the expression of *tsg-6*, hAMSC were transfected with *tsg-6* siRNA. Cells were seeded at a density of  $1.5 \times 10^5$  on a 6-wells plate with complete culture medium. The complete medium was replaced with medium without FBS and antibiotics 16 h before transfection. The transfection was performed in the presence of Opti-MEM and Lipofectamine 2000. The siRNA of *tsg-6* and the scrambled control siRNA (Santa Cruz, TX, USA; sc-39819; sc-37007, respectively) were diluted with Opti-MEM at a concentration of 20 pM, according to the manufacturer's instructions and mixed with Lipofectamine 2000 to form the liposomes for 20 min at RT. The liposomes were added to hAMSC with 1 ml of Opti-MEM, and cells were incubated for 6 h. After transfection, the medium was replaced with 2 ml of complete fresh medium for an additional period time of 24 h. The cells were cultured at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. At the end of the culture, the supernatants were obtained and immediately used as CM. To confirm knockdown of *tsg-6*, transcript and protein presence were assessed by means of RT-PCR and flow cytometry, as described before<sup>65</sup>.

**Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay to TSG-6.** TSG-6 protein levels in the conditioned media from non-transfected hAMSC (CM), scrambled-control siRNA-transfected hAMSC (hAMSC-scrambled) and from TSG-6-transfected hAMSC (hAMS-TSG-6) were determined by ELISA. Twenty-four hours after hAMSC transfection with their respective siRNAs, the CM were collected and analyzed by ELISA using the human TSG-6 ELISA kit according the manufacturer's instructions.

**Isolation of bone marrow murine neutrophils.** Bone marrow cells were obtained from 6–8 week-old BALB/c male mice as previously reported with modifications<sup>66</sup>. Briefly, tibias and femurs were obtained and dissected after mice euthanasia. The bone marrow cells were flushed with murine neutrophils buffer (1% glucose and 0.5% BSA in Hank's Balanced Salt Solution) using a syringe with 27-G needle. The pooled bone marrow was suspended by gentle pipetting followed by filtration thorough a 100- $\mu$ m-nylon cell strainer to remove cell clumps and bone particles. The suspension was centrifuged at 300x *g* for 10 min at 10 °C. The neutrophils were purified with a Neutrophils Isolation Kit according to the manufacturer's instructions. Neutrophils viability was performed using the trypan blue exclusion method and the cell purity was corroborated determining CD11b and elastase by flow cytometry as described above.

**NETs induction and quantitation.** NETs induction and quantification were performed as previously described with modifications<sup>67</sup>. Briefly, mouse neutrophils ( $4 \times 10^4$ ) were seeded on 13 mm poly-*L*-lysine charged glass coverslips in 24-well-plates in RPMI. The plates were incubated for 20 min at 37 °C to allow adhesion of the cells, and subsequently, the cells were exposed or not to LPS; afterwards, cells were incubated for 90 min. LPS concentration was standardized as well as the time in which optimal NETs formation was observed without any NETs degradation (32 µg/ml and 90 min, respectively). After the final incubation, cells were fixed with *p*-formaldehyde for 10 min at RT. The coverslips with the cells were rinsed with PBS and incubated with blocking buffer 2 h at RT. The samples were incubated overnight at 4 °C with purified rabbit anti-elastase antibody (1:100); then they were rinsed twice with PBS-T and incubated with AlexaFluor 488-conjugated secondary antibody (1:500) for 2 h at RT. Finally, the specimens were rinsed twice with PBS-T and mounted with propidium iodide (PI)(25 µg/ml). Images were acquired with an ApoTome II microscope and recorded using the Axiovision 2.0 software (Carl Zeiss, Jena, Germany). For each condition, five randomly selected images were acquired and used for quantification of NET releasing cells. Times of exposition on each channel were kept constant. The images files were loaded as separate image stacks for each channel in Image J software. To quantify the traps, the brightness and contrast was first adjusted to every image to visualize each NET (composed of extracellular elastase and PI). Then binary images were generated and the threshold was subtracted. Subsequently automatic particle analysis was set to 20 pixels minimum size. The summarized result was considered as the area occupied by each liberated NET. The summarized result was considered the area occupied by the NET released. Data were expressed as percentages of NET-releasing cells in relation to the cells without LPS, as previously was reported<sup>68</sup>.

**Inhibition of NETs with rhTSG-6.** Mouse neutrophils were stimulated for NETs induction and  $4 \times 10^4$  mouse neutrophils were seeded on 13 mm poly-*L*-lysine charged glass coverslips in 24-well-plates in RPMI; the plates were incubated for 20 min at 37 °C to allow adhesion of the cells. After the cell adhesion, serial dilutions of rhTSG6 were added to the neutrophils. The dilutions of rhTSG-6 were made from a stock solution of 1000 pg/ml using a dilution factor of 1:2, until at final concentration of 125 pg/ml. Then the cells were incubated for 90 min at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Subsequently, after finishing the period of incubation, the neutrophils were fixed, blocked and analyzed by immunofluorescence, as described before.

**Nitroblue Tetrazolium (NBT) assay.** The NBT reduction assay is used to quantify reactive oxygen species like superoxide anion. A product of the reduction of NBT is the generation of blue-black formazan precipitates inside the cells. A stock solution of 10 mg diluted in 1 ml of deionized water was prepared immediately before use and was kept at 4 °C on the darkness; then a work solution of 0.3% of NBT was prepared. Similar to NET induction, mouse neutrophils ( $2 \times 10^5$ ) were seeded on 13 mm poly-*L*-lysine charged glass coverslips in 24-well-plates in RPMI; the plates were incubated for 20 min at 37 °C to allow adhesion of the cells; subsequently, the cells were exposed or not to LPS in the presence or not of the different the conditioned media; afterwards, the work solution of NBT was added to the cells obtaining a final concentration of 0.1% of NBT then the cells were incubated for 30 min at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Subsequently, after finishing the period of incubation, the supernatants of each condition were removed and the cells were fixed with methanol for 5 min at RT. Afterwards, the fixed cells were rinsed again with 70% methanol and were air-dried in the darkness. Finally, the precipitates of formazan were solubilized in 260 µl containing 120 µl of 2 M KOH and 140 µl of DMSO. After homogenization, the suspension of each well was loaded into a well of 96-wells-plate to be read on a spectrophotometer (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems, PHL, USA) at 630 nm. The O<sup>2-</sup> was determined as nanomoles (nM) of reduced NBT (NBTr) per well, considering an extinction factor of 0.1 OD at 630 nm representing 1.9 nM O<sup>2-</sup><sup>69</sup>. The O<sup>2-</sup> production generated by the neutrophils without stimulus in fresh medium was considered the 100% of ROS production.

**Measurement of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ).** The measurement of the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) indicates the functions of the mitochondria such as reactive oxygen species production among others. The inhibition of the  $\Delta\psi_m$  is related to the decrease of the fluorescence of the lipophilic cationic probe DiOC6(3) in the cell. This assay was performed in suspension as follows: murine neutrophils ( $2 \times 10^5$ ) were exposed to different stimuli during 15 min at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. When incubation was finished, 30 nM of DiOC6(3) was added and the cells were incubated for additional 15 min at RT in the darkness. The excess of DiOC6(3) was rinsed with PBS and the cells were acquired immediately by flow cytometer<sup>70</sup>. The data are expressed as the percent of the  $\Delta\psi_m$  loss (% $\Delta\psi_m$  loss).

**Statistical analysis.** Data were collected and non-parametric Mann-Whitney *U* tests were performed, considering \**p* < 0.05 as statistically significant using the Prism 5 GraphPad software (La Jolla, California, USA).

## References

- Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–147 (1999).
- Friedenstein, A. J., Piatetzky, S. II & Petrakova, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* **16**, 381–390 (1966).
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* **119**, 2204–2213 (2006).
- In 't Anker, P. S. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* **22**, 1338–1345 (2004).
- Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
- Machado Cde, V., Telles, P. D. & Nascimento, I. L. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter* **35**, 62–67 (2013).
- Jiang, X. X. *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **105**, 4120–4126 (2005).

8. Krampera, M. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* **101**, 3722–3729 (2003).
9. Najar, M. *et al.* Impact of different mesenchymal stromal cell types on T-cell activation, proliferation and migration. *Int Immunopharmacol* **15**, 693–702 (2013).
10. Tabera, S. *et al.* The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica* **93**, 1301–1309 (2008).
11. Garfias, Y., Nieves-Hernandez, J., Garcia-Mejia, M., Estrada-Reyes, C. & Jimenez-Martinez, M. C. Stem cells isolated from the human stromal limbus possess immunosuppressant properties. *Mol Vis* **18**, 2087–2095 (2012).
12. Liu, W. H. *et al.* Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS One* **8**, e55487 (2013).
13. Prockop, D. J. Inflammation, fibrosis, and modulation of the process by mesenchymal stem/stromal cells. *Matrix Biol* **51**, 7–13 (2016).
14. Yun, Y. I. *et al.* Comparison of the anti-inflammatory effects of induced pluripotent stem cell-derived and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in a murine model of corneal injury. *Cytherapy* **19**, 28–35 (2017).
15. Girish, K. S. & Kemparaju, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci* **80**, 1921–1943 (2007).
16. Lee, T. H., Wisniewski, H. G. & Vilcek, J. A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44. *J Cell Biol* **116**, 545–557 (1992).
17. Tan, K. T., McGrouther, D. A., Day, A. J., Milner, C. M. & Bayat, A. Characterization of hyaluronan and TSG-6 in skin scarring: differential distribution in keloid scars, normal scars and unscarred skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **25**, 317–327 (2011).
18. Coulson-Thomas, V. J. *et al.* Tumor Necrosis Factor-stimulated Gene-6 (TSG-6) Is Constitutively Expressed in Adult Central Nervous System (CNS) and Associated with Astrocyte-mediated Glial Scar Formation following Spinal Cord Injury. *J Biol Chem* **291**, 19939–19952 (2016).
19. Zhang, S., He, H., Day, A. J. & Tseng, S. C. Constitutive expression of inter-alpha-inhibitor (IalphaI) family proteins and tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) by human amniotic membrane epithelial and stromal cells supporting formation of the heavy chain-hyaluronan (HC-HA) complex. *J Biol Chem* **287**, 12433–12444 (2012).
20. Zhang, R. *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* **10**, 106 (2013).
21. Um, S., Kim, H. Y., Lee, J. H., Song, I. S. & Seo, B. M. TSG-6 secreted by mesenchymal stem cells suppresses immune reactions influenced by BMP-2 through p38 and MEK mitogen-activated protein kinase pathway. *Cell Tissue Res* **368**, 551–561 (2017).
22. Dominguez-Lopez, A., Bautista-de Lucio, V. M., Serafin-Lopez, J., Robles-Sanchez, E. & Garfias, Y. Amniotic membrane modulates innate immune response inhibiting PRRs expression and NF-kappaB nuclear translocation on limbal myofibroblasts. *Exp Eye Res* **127**, 215–223 (2014).
23. Garfias, Y., Zaga-Clavellina, V., Vadillo-Ortega, F., Osorio, M. & Jimenez-Martinez, M. C. Amniotic membrane is an immunosuppressor of peripheral blood mononuclear cells. *Immunol Invest* **40**, 183–196 (2011).
24. Solomon, A. *et al.* Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* **85**, 444–449 (2001).
25. Manuepillai, U., Moodley, Y., Borlongan, C. V. & Parolini, O. Amniotic membrane and amniotic cells: potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis? *Placenta* **32**(Suppl 4), S320–325 (2011).
26. Li, J. *et al.* Human Amnion-Derived Stem Cells Have Immunosuppressive Properties on NK Cells and Monocytes. *Cell Transplant* **24**, 2065–2076 (2015).
27. Pianta, S. *et al.* Amniotic membrane mesenchymal cells-derived factors skew T cell polarization toward Treg and downregulate Th1 and Th17 cells subsets. *Stem Cell Rev* **11**, 394–407 (2015).
28. Wolbank, S. *et al.* Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng* **13**, 1173–1183 (2007).
29. Magatti, M. *et al.* Amniotic mesenchymal tissue cells inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes. *Cell Transplant* **18**, 899–914 (2009).
30. Magatti, M. *et al.* Human amnion favours tissue repair by inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2 macrophage features. *J Tissue Eng Regen Med* (2016).
31. Ono, M. *et al.* Effects of human amnion-derived mesenchymal stromal cell transplantation in rats with radiation proctitis. *Cytherapy* **17**, 1545–1559 (2015).
32. Rolfo, A., Giuffrida, D., Giuffrida, M. C., Todros, T. & Calogero, A. E. New perspectives for prostate cancer treatment: *in vitro* inhibition of LNCaP and PC3 cell proliferation by amnion-derived mesenchymal stromal cells conditioned media. *Aging Male* **17**, 94–101 (2014).
33. Yan, K. *et al.* Nitric oxide-mediated immunosuppressive effect of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells on the viability and migration of microglia. *Brain Res* **1590**, 1–9 (2014).
34. Rossi, D., Pianta, S., Magatti, M., Sedlmayr, P. & Parolini, O. Characterization of the conditioned medium from amniotic membrane cells: prostaglandins as key effectors of its immunomodulatory activity. *PLoS One* **7**, e46956 (2012).
35. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **11**, 519–531 (2011).
36. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).
37. Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* **176**, 231–241 (2007).
38. Urban, C. F. *et al.* Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **5**, e1000639 (2009).
39. Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* **8**, 668–676 (2006).
40. Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* **198**, 773–783 (2012).
41. Schauer, C. *et al.* Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med* **20**, 511–517 (2014).
42. Leppkes, M. *et al.* Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. *Nat Commun* **7**, 10973 (2016).
43. Khandpur, R. *et al.* NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* **5**, 178ra140 (2013).
44. Leffler, J. *et al.* Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol* **188**, 3522–3531 (2012).
45. Pedersen, F. *et al.* Neutrophil extracellular trap formation and extracellular DNA in sputum of stable COPD patients. *Respir Med* **109**, 1360–1362 (2015).
46. Berkes, E., Oehmke, F., Tinneberg, H. R., Preissner, K. T. & Saffarzadeh, M. Association of neutrophil extracellular traps with endometriosis-related chronic inflammation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **183**, 193–200 (2014).
47. Parolini, O. *et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* **26**, 300–311 (2008).

48. Coulson-Thomas, V. J., Coulson-Thomas, Y. M., Gesteira, T. F. & Kao, W. W. Extrinsic and Intrinsic Mechanisms by Which Mesenchymal Stem Cells Suppress the Immune System. *Ocul Surf* **14**, 121–134 (2016).
49. Dabrowska, D., Jablonska, E., Garley, M., Ratajczak-Wrona, W. & Iwaniuk, A. New Aspects of the Biology of Neutrophil Extracellular Traps. *Scand J Immunol*, (2016).
50. Li, Y. & Trush, M. A. Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 295–299 (1998).
51. Brand, M. D., Chien, L. F., Ainscow, E. K., Rolfe, D. F. & Porter, R. K. The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim Biophys Acta* **1187**, 132–139 (1994).
52. Kuwabara, W. M., Curi, R. & Alba-Loureiro, T. C. Autophagy Is Impaired in Neutrophils from Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Front Immunol* **8**, 24 (2017).
53. Bao, Y. *et al.* mTOR and differential activation of mitochondria orchestrate neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* **210**, 1153–1164 (2015).
54. Resca, E. *et al.* Enrichment in c-Kit improved differentiation potential of amniotic membrane progenitor/stem cells. *Placenta* **36**, 18–26 (2015).
55. Kim, D. K. *et al.* Scalable Production of a Multifunctional Protein (TSG-6) That Aggregates with Itself and the CHO Cells That Synthesize It. *PLoS One* **11**, e0147553 (2016).
56. Lessig, J., Reibetanz, U., Schonberg, M. & Neundorff, I. Efficient inhibition of human leukocytic elastase by means of alpha-1-antitrypsin/peptide complexes. *Cytometry A* **83**, 461–471 (2013).
57. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* **191**, 677–691 (2010).
58. Wisniewski, H. G. *et al.* TNF/IL-1-inducible protein TSG-6 potentiates plasmin inhibition by inter-alpha-inhibitor and exerts a strong anti-inflammatory effect *in vivo*. *J Immunol* **156**, 1609–1615 (1996).
59. Nishinaka, Y., Arai, T., Adachi, S., Takaori-Kondo, A. & Yamashita, K. Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. *Biochem Biophys Res Commun* **413**, 75–79 (2011).
60. Remijsen, Q. *et al.* Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res* **21**, 290–304 (2011).
61. Khan, I. *et al.* Effects of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on neonatal neutrophils. *J Inflamm Res* **8**, 1–8 (2015).
62. Hu, J. *et al.* BMSC paracrine activity attenuates interleukin-1beta-induced inflammation and apoptosis in rat AF cells via inhibiting relative NF-kappaB signaling and the mitochondrial pathway. *Am J Transl Res* **9**, 79–89 (2017).
63. Chavez-Garcia, C. *et al.* Ophthalmic indications of amniotic membrane transplantation in Mexico: an eight years Amniotic Membrane Bank experience. *Cell Tissue Bank* **17**, 261–268 (2016).
64. Tsuji, H. *et al.* Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circ Res* **106**, 1613–1623 (2010).
65. Ho, H. Y., Cheng, M. L., Wang, Y. H. & Chiu, D. T. Flow cytometry for assessment of the efficacy of siRNA. *Cytometry A* **69**, 1054–1061 (2006).
66. Siemsen, D. W. *et al.* Neutrophil isolation from nonhuman species. *Methods Mol Biol* **1124**, 19–37 (2014).
67. Brinkmann, V., Goosmann, C., Kuhn, L. I. & Zychlinsky, A. Automatic quantification of *in vitro* NET formation. *Front Immunol* **3**, 413 (2012).
68. Neumann, A. *et al.* The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *Biochem J* **464**, 3–11 (2014).
69. Sanchez-Salgado, J. L. *et al.* Characterization of a lectin from the crayfish *Cherax quadricarinatus* hemolymph and its effect on hemocytes. *Fish Shellfish Immunol* **39**, 450–457 (2014).
70. Rottenberg, H. & Wu, S. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochim Biophys Acta* **1404**, 393–404 (1998).

## Acknowledgements

This work was supported by CONACYT Ciencia Básica 167438, CONACYT-SALUD 273349; PAPIIT-DGAPA-UNAM: IN215617. Fátima Sofía Magaña Guerrero is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 406452 from CONACYT. Authors want to thank Mrs. Josefina Bolado, Head of the Scientific Paper Translation Department, from División de Investigación at Facultad de Medicina, UNAM, for editing the English-language version of this manuscript.

## Author Contributions

F.S.M.-G. carried out the research with A.D.-L., P.M.-A. and B.B.-V. The manuscript was written by Y.G. and F.S.M.-G. with the assistance from A.D.-L. Y.G. and F.S.M.-G. conceived the idea.

## Additional Information

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017