



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

BIOMEDICINA

CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE TEJIDOS DENTALES: ANÁLISIS *IN VITRO* DE SUS PROPIEDADES INMUNOSUPRESORAS SOBRE CÉLULAS T.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

P R E S E N T A

MARIA DEL PILAR DE LA ROSA RUIZ

TUTOR: DRA. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

COMITÉ TUTOR: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

DRA. SARA DEL CARMEN CABALLERO CHACÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, JUNIO DE 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE TEJIDOS DENTALES: ANÁLISIS *IN VITRO* DE SUS PROPIEDADES INMUNOSUPRESORAS SOBRE CÉLULAS T.

AGRADECIMIENTOS



Al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, por el apoyo académico que me brindaron.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por otorgar el apoyo con el número de becario 309198.



Al Instituto Mexicano del Seguro Social, en especial al Centro Médico SXXI. Un agradecimiento especial al recinto que me vió nacer, desarrollarme profesionalmente y que me apoyó con mi número de becaria: 99097563. Un lugar mágico que me inspiró a través de mis padres, quienes ofrecieron su amor y dedicación a su vocación a lo largo de su vida y más aún durante el terremoto de 1985.



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Células Troncales Mesenquimales en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, UIMEO del Hospital de Oncología.

AGRADECIMIENTOS

- Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal por todo el apoyo recibido durante este tiempo
- Al Doctor Juan José Montesinos Montesinos por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y así poder participar con una parte de su línea de investigación.
- A la Doctor Héctor Mayani Viveros por ser el líder de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas.
- A los miembros del Comité Tutor, integrado por las doctoras Gladis Fragoso González y Sara del Carmen Caballero Chacón.
- A los miembros del jurado, los doctores: Gabriela Bárcenas Morales, Higinio Arzate y Santiago René Anzaldúa Arce.
- A la Doctora Eugenia Flores Figueroa por su constante apoyo dedicación para que este proyecto tuviera éxito.
- A las Doctoras Marta Castro Manrreza y Karina Chávez por su apoyo para la realización de determinación de citocinas y PGE₂
- A mi querida Marti, por todo su apoyo, paciencia y gran amistad.
- Al químico Carlos Montoya por su apoyo en laboratorio.
- Al Maestro en Ciencias Víctor Adrián Cortés Morales por su apoyo constante para la realización de este proyecto y su gran amistad.
- A la Maestra en Ciencias Jessica Prieto ya la Doctora Lourdes Arriaga Pizano quienes me apoyaron enormemente con la técnica de citometría de flujo.
- A mi querida amiga Sandra Civit Gual por su apoyo en la revisión del escrito.
- A los integrantes de mi querido laboratorio de Células Troncales Mesenquimales, con quienes hice una increíble amistad, Adrián, Ixel, Gaby, Erika, Keyra, Lucerito, Nacho y Damián Camacho.
- A todos los integrantes de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico XXI con quienes pude compartir momentos muy bellos, en especial a Bere, Alicia, Dafne, Paty, Mariana, Julieta, Roberto e Ileana.

DEDICATORIAS PERSONALES

- A mi esposo Jorge Alejandro Aranda Ramírez, por amarme, comprenderme, y apoyarme siempre en cada proyecto.
- A mi hijo Iker Alejandro, por haber llegado en esta etapa tan maravillosa de mi vida y por acompañarme dentro y fuera de mí al laboratorio, seminarios, clases y largas noches de estudio.
- A mi madre ya que este gran trabajo se realizó gracias a su incondicional apoyo.
- A mi hermano Francisco, que como siempre a la distancia me daba palabras de aliento y ejemplo de superación.
- A mis amigas del alma: Bettsy Mendoza Dueñas, Sandra Civit Gual y Vanessa Cassani, quienes siempre han estado presentes y han compartido su vida con la mía.
- A mis perros Batería Felicidad, Frida y Bell

“El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad”.

-V́ctor Hugo

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES.....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	21
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CÉLULA TRONCAL	4
FIGURA 2. CÉLULAS TRONCALES DURANTE EL DESARROLLO PRENATAL EN MAMÍFEROS	5
FIGURA 3. MESENGÉNESIS.....	7
FIGURA 4. PROPIEDADES INMUNOSUPRESORAS DE LAS MSCS..	14
FIGURA 5. AISLAMIENTO DE CÉLULAS TRONCALES DT-MSCS	16
FIGURA 6. ENCÍA O TEJIDO GINGIVAL Y SUS DIFERENTES REGIONES ANATÓMICAS.....	17
FIGURA 7. OBTENCIÓN DE DT-MSCS POR TÉCNICA DE EXPLANTE.....	23
FIGURA 8. SISTEMA DE ENRIQUECIMIENTO DE LAS CÉLULAS CD3 ⁺	27
FIGURA 9. DISEÑO EXPERIMENTAL	29
FIGURA 10. ESTRATEGIA DE ANÁLISIS FACS - PROLIFERACIÓN.....	30
FIGURA 11. ESTRATEGIA DE ANÁLISIS FACS - MOLÉCULAS INMUNORREGULADORAS	31
FIGURA 12. INMUNOENSAYO CON PERLAS MAGNÉTICAS	33
FIGURA 13. CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN DE MSCS	35
FIGURA 14. MORFOLOGÍA Y CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN BM-MSCS Y DT-MSCS	36
FIGURA 15. INMUNOFENOTIPO DE MSCS	38
FIGURA 16. PUREZA DE CÉLULAS T CD3 ⁺ Y CO-CULTIVOS DE MSCS/LTNOCITOS T.....	38
FIGURA 17. BM-MSCS Y DT-MSCS DISMINUYEN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS T.....	40
FIGURA 18. INCREMENTO DE CTLA-4 Y DE PD-L1	42
FIGURA 19. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MOLÉCULAS INMUNOSUPRESORAS	45
FIGURA 20. DT-MSCS INDUCEN LA GENERACIÓN DE TREGS	47

ABREVIATURAS

- ✿ **MSCs:** Células Troncales Mesenquimales.
- ✿ **DT-MSCs:** Células Troncales Mesenquimales de Tejidos Dentales.
- ✿ **BM-MSCs:** Células Troncales Mesenquimales de Médula Ósea.
- ✿ **PD-MSCs:** Células Troncales Mesenquimales de Pulpa Dental.
- ✿ **TG-MSCs:** Células Troncales Mesenquimales de Tejido Gingival.
- ✿ **LP-MSCs:** Células Troncales Mesenquimales de Ligamento Periodontal.
- ✿ **PBMCs:** Peripheral blood mononuclear cells
- ✿ **LT/Tcell :** Linfocito T/célula T.
- ✿ **CD3:** Complejo proteico mediador de transducción de señales por el TCR
- ✿ **TCR:** Receptor de linfocitos T
- ✿ **CD4:** Proteína accesoria de la interacción entre el TCR y correceptor de MHC-II en linfocitos T cooperadores.
- ✿ **CD8:** Correceptor de molécula MHC-I en linfocitos T citotóxicos.
- ✿ **PD-L1:** Ligando 1 de muerte programada.
- ✿ **CTLA-4:** Linfocito T Citotóxico.
- ✿ **Foxp3:** Factor de transcripción forkhead box P3.
- ✿ **PGE2:** Prostaglandina E₂.
- ✿ **IL-4:** Interleucina 4.
- ✿ **IL-10:** Interleucina 10.
- ✿ **TGF- β :** Factor de crecimiento β transformante.
- ✿ **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa.
- ✿ **IFN- γ :** Interferón gamma
- ✿ **IDO:** Indolamina-2,3-dioxigenasa.
- ✿ **ISCT:** Sociedad Internacional de Terapia Celular.
- ✿ **NFkB:** Factor de Transcripción NFkB.
- ✿ **GVHD:** Enfermedad Injerto contra huésped (por sus siglas en inglés)
- ✿ **FITC:** Isotiocianato de fluoresceína, fluoróforo de citometría de flujo.
- ✿ **PE:** Ficoeritrina, fluoróforo de citometría de flujo.
- ✿ **APC:** Alofocianina, fluoróforo de citometría de flujo.
- ✿ **FACS:** Citometría de Flujo.
- ✿ **SFB:** Suero Fetal Bovino.
- ✿ **Dynabeads:** Perlas inmunomagnéticas.
- ✿ **CFSE:** 5(6)-carboxifluoresceína succinimidil éster, marcador de división celular.
- ✿ **HLA-ABC:** Antígeno leucocitario humano, proteína perteneciente a MHC-I.
- ✿ **HLA-DR:** Antígeno leucocitario humano, proteína perteneciente a MHC-II.

RESUMEN

Las células troncales/estromales mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs por las siglas en inglés de *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*) tienen propiedades inmunorreguladoras y han sido utilizadas como reguladores inmunes para el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped (EICH, o GVHD por las siglas en inglés de *Graft-Versus-Host-Disease*). Las células troncales mesenquimales de tejidos dentales (DT-MSCs por las siglas en inglés de *Dental Tissues Stem Cells*) constituyen una alternativa atractiva para BM-MSCs por su potencial para aplicaciones clínicas porque estas tienen mayor accesibilidad y fácil preparación. El objetivo de este estudio *in vitro* fue comparar MSCs de pulpa dental (DP-MSCs por las siglas en inglés de *Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells*), tejido gingival (G-MSCs por las siglas en inglés de *Gingival Tissue Mesenchymal Stem Cells*) y ligamento periodontal (PDL-MSCs por las siglas en inglés de *Periodontal Ligament Mesenchymal Stem Cells*) en términos de sus propiedades inmunosupresoras sobre una población de células linfoides enriquecida en linfocitos T CD3⁺ para determinar cuál población de MSCs podría ser la más apropiada para aplicaciones inmunorreguladoras *in vivo*. Las BM-MSCs fueron incluidas como el estándar de oro. Los resultados del presente estudio demuestran que MSCs de DP, G y PDL mostraron propiedades inmunorreguladoras similares a las observadas en BM, en términos de proliferación celular, inhibición de ambas poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados. Esta reducción de proliferación en los cultivos celulares correlacionó con la producción de interferón gamma (IFN- γ) y de factor de necrosis tumoral (TNF- α por las siglas en inglés de *Tumor necrosis factor alpha*), además de la sobre regulación del ligando 1 de muerte programada (PD-L1 por las siglas en inglés de *Programmed Death-ligand 1*) en MSCs y del Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico (CTLA-4 por las siglas en inglés de *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) en linfocitos T; el incremento de la producción de interleucina-4 y prostaglandina E₂. Es importante destacar, que se observaron diferencias en la producción de citocinas y moléculas secretadas que podrían participar en la inmunosupresión de linfocitos T en co-cultivos en presencia de DT-MSCs comparadas con BM-MSCs. Es importante mencionar, que MSCs de las cuatro fuentes favorecieron la generación de subpoblaciones de linfocitos T con fenotipo regulador CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ y CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺. Los resultados del presente estudio indican que, además de las BM-MSCs, las MSCs de cualquier fuente dental analizada podrían ser candidatas confiables para futuras aplicaciones terapéuticas en procesos de inmunorregulación.

Palabras clave: Tejido gingival; pulpa dental, ligamento periodontal, inmunorregulación, células troncales estromales mesenquimales; linfocitos T.

ABSTRACT

Bone marrow-mesenchymal stem/stromal cells (BM-MSCs) have immunoregulatory properties and have been used as immune regulators for the treatment of graft-versus-host disease (GVHD). Human dental tissue-mesenchymal stem cells (DT-MSCs) constitute an attractive alternative to BM-MSCs for potential clinical applications because of its accessibility and easy preparation. The aim of this *in vitro* study was to compare MSCs from dental pulp (DP-MSCs), gingival tissue (G-MSCs) and periodontal ligament (PDL-MSCs) in terms of their immunosuppressive properties against lymphoid cell populations enriched for CD3⁺ T cells to determine which MSCs would be the most appropriate for *in vivo* immunoregulatory applications. BM-MSCs were included as the gold standard. Our results demonstrated that MSCs from DP, G and PDL showed immunoregulatory properties similar to those from BM, in terms of cellular proliferation inhibition of both CD4⁺ and CD8⁺ activated T-cells. This reduced proliferation in cell cocultures correlated with the production of INF- γ and TNF- α and upregulation of programmed death ligand 1 (PD-L1) in MSCs and cytotoxic T-cell-associated Ag-4 (CTLA-4) in T cells and increased interleukin-10 and prostaglandin E₂ production. Interestingly, we observed differences in the production of cytokines and surface and secreted molecules that may participate in T-cell immunosuppression in cocultures in the presence of DT-MSCs compared with BM-MSCs. Importantly, MSCs from four sources favored the generation of T-cell subsets displaying a regulatory phenotype CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺. Our results indicate that in addition to BMMSCs, MSCs from any dental sources analyzed in this study might be candidates for future therapeutic applications in immunoregulation processes.

Keywords: gingival tissue; dental pulp; periodontal ligament; immunoregulation; mesenchymal stem/stromal cells; T cells.

INTRODUCCIÓN

Las células troncales están presentes a todo lo largo de la escala filogenética animal, organizando y dirigiendo el desarrollo y la regeneración de tejidos y órganos. Durante los últimos veinte años, las células troncales se han convertido en el centro de atención en la biología y la medicina. Por un lado, su estudio ha ayudado a entender procesos biológicos fundamentales, como la diferenciación celular y la regeneración tisular; por otro lado, su versatilidad funcional, tanto *in vivo* como *in vitro*, y la capacidad de ser cultivadas y manipuladas *ex vivo*, han constituido las bases para el desarrollo de la terapia celular y la medicina regenerativa [1].

¿Qué son las células troncales?

La definición de célula troncal debe hacerse de acuerdo con criterios funcionales, ya que estas células no poseen características morfológicas individuales que puedan distinguirlas del resto de las células del tejido al que pertenecen. De acuerdo con esto, las células troncales se han definido como células inmaduras, no diferenciadas, con una alta capacidad de autorrenovación y que pueden diferenciarse en uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo (Figura 1) [1]. La autorrenovación se refiere al proceso de división celular el cual resulta en dos células hijas y por lo menos una de ellas conserva casi la totalidad de las características biológicas de la célula original, produciendo una nueva célula troncal. En algunos casos ambas células resultantes son células troncales, en otros, sólo una de las dos conserva estas propiedades, mientras que la otra pierde la capacidad de autorreplicación [1].

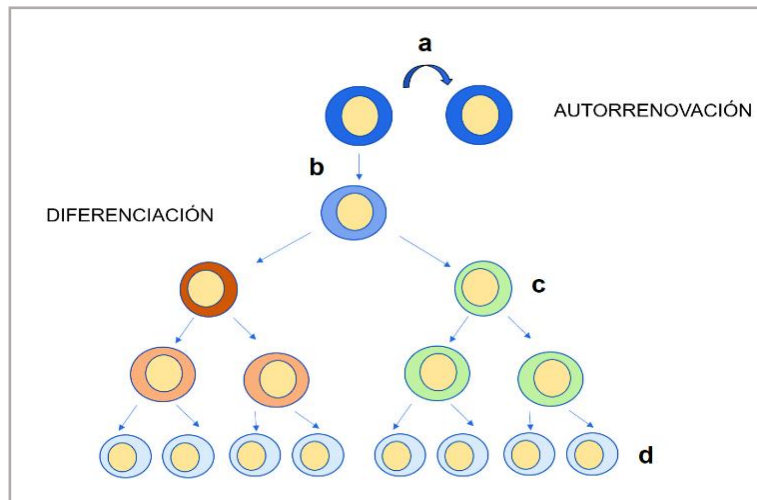


Figura 1. Célula troncal. Las células troncales son células inmaduras, no diferenciadas, que tienen la capacidad de autorreplicarse (a) y de diferenciarse (b), dando origen a uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo (d). Entre las células troncales y las células maduras existen poblaciones de células transitorias (c) que permiten la amplificación del número de células.

Células troncales durante el desarrollo

A lo largo del desarrollo de los mamíferos se generan diversos tipos de células troncales (Figura 2); la primera célula troncal es el cigoto (huevo fertilizado), la cual es una célula troncal totipotencial, capaz de producir al embrión y a las estructuras extraembrionarias (amnios, alantoides y saco vitelino). Hasta el estadio de mórula la cual está conformada por 8 células, cada una es idéntica a las otras; es decir, todas son células troncales totipotenciales, lo que deja ver la capacidad de autorreplicación del cigoto. Conforme progresa el desarrollo, el embrión alcanza el estadio de blastocisto, en el que cada una de las células que forma parte de la masa celular interna es capaz de formar células de cualquier tejido del organismo, de ahí que se les considere células troncales pluripotenciales [1]. Sin embargo, dichas células troncales embrionarias (ESC por las siglas en inglés de *Embryonic Stem Cells*) son incapaces de dar origen a las estructuras extraembrionarias. A partir de las ESC se producen diferentes células troncales somáticas, incluyendo aquellas que dan origen al sistema nervioso central, periférico, sangre, hígado, páncreas, etc. Dichas células troncales son consideradas como multipotenciales, ya que pueden generar diversos linajes celulares dentro de un mismo tejido. Por ejemplo, en la médula ósea existen dos tipos de células troncales multipotenciales somáticas; las células troncales hematopoyéticas (HSC por las siglas en inglés de *Hematopoietic Stem Cells*) y las células troncales mesenquimales (MSCs por las siglas en inglés de *Mesenchymal Stem Cells*). Por otro lado, las ESC también producen un tipo diferente de células troncales no somáticas; las células

troncales germinales [1]. Así a partir de las células troncales, pueden generarse todas las células del organismo, las cuales alcanzan un estado de diferenciación funcional completo, que puede visualizarse como una etapa terminal e irreversible que antecede a una posterior en donde mueren mediante apoptosis u otros mecanismos. Por lo tanto, la importancia de las células troncales radica en compensar la pérdida celular en los diferentes tejidos, debido a la fisiología normal o por alguna lesión (Figura 2) [2].

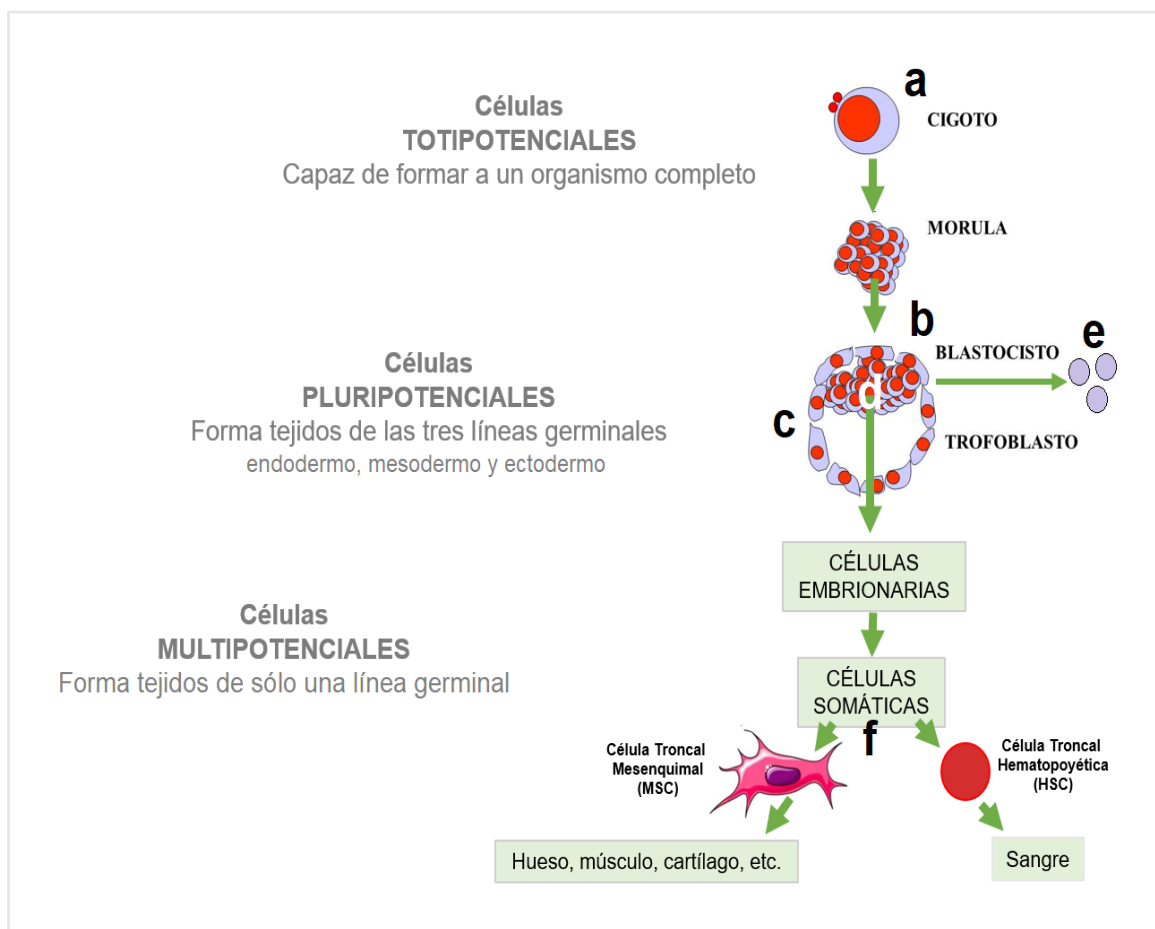


Figura 2. Células troncales durante el desarrollo prenatal en mamíferos. El cigoto (a) es una célula troncal totipotencial (da origen al embrión y a las estructuras extraembrionarias). Al autorreplicarse, genera varias células idénticas a ella (b), las cuales constituyen el estadio de mórula. En el estadio de blastocisto (c), las células de la masa celular interna (d) corresponden a células troncales embrionarias pluripotenciales (pueden formar células de cualquier tejido embrionario). Dichas células troncales embrionarias dan lugar a células troncales de la línea germinal (e), o bien, a células troncales somáticas (f) de las tres capas embrionarias: Ectodermo (ej. Piel y cerebro), endodermo (ej. Hígado y páncreas) y mesodermo (ej. Sangre y hueso, cartílago o músculo) (Modificado de Mayani 2011 [1]).

Células troncales mesenquimales

Las células troncales mesenquimales (MSCs) representan a una población heterogénea de células progenitoras de origen mesodérmico con capacidad de autorrenovación y multipotencialidad [2]. Pueden producir distintas células especializadas como osteoblastos, condrocitos, adipocitos y fibroblastos [3]. Fueron primero identificadas en la médula ósea, posteriormente, se expandió su descubrimiento en todo el organismo. Se ha demostrado la presencia de MSCs en músculo, tejido adiposo, pulpa dental, tejido gingival [4], ligamento periodontal [5], placenta, periostio, gelatina de Wharton, pulmón, hígado, bazo, etc.; [1, 2]. Estas se encuentran en muy bajas cantidades conformando el nicho o microambiente del tejido conectivo; su rol principal es mantener la homeostasis y la reparación de tejidos a lo largo de la vida de un organismo [6]. Además, las MSCs secretan un amplio rango de mediadores químicos solubles o factores tróficos que les permite interactuar con diversos tipos de células [3].

Detección y caracterización de las MSCs

Los primeros indicios de la existencia de MSCs fueron descritos por Friedenstein *et al.* (1970), en donde se demostró que el potencial osteogénico de la médula ósea era una característica de un subgrupo específico de células que conformaban el nicho de este tejido [7]. Más tarde observaron que esta población de células se adhería al plástico de las cajas de cultivo y formaban agrupaciones celulares o colonias a partir de una sola célula, es decir, eran clonogénicas; demostraron que tenían morfología fibroblastoide, no eran fagocíticas y daban origen a células del estroma medular (adipocitos, osteoblastos y fibroblastos estromales). A estas células individuales se les nombró unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F por las siglas en inglés de *precursors colony forming unit fibroblasts*). En los años ochenta Owen *et al.*, proponen el concepto célula troncal estromal -a partir de la cual derivan las células del tejido conjuntivo- y un modelo el cual describe tres compartimentos: célula troncal, célula progenitora y célula madura [2]. A principios de los noventa, Caplan llamó a esta célula "célula troncal mesenquimal", la cual posee la capacidad de formar células hacia múltiples fenotipos mesenquimales como tejido adiposo, tendón, ligamento, músculo y hueso; a este proceso lo llamó "mesengénesis" [8] (Figura 3). La determinación de multipotencialidad a dichas células se realizó cuando Pittenger *et al.* (1999), observaron la formación trilineaje (diferenciación adipogénica,

osteogénica y condrogénica) de BM-MSCs. Investigaciones más recientes *in vitro*, realizadas con MSCs derivadas de cordón umbilical, han reportado clonas con capacidad de autorrenovación y diferenciación hacia cinco linajes (miogénico, adipogénico, condrogénico, osteogénico y fibroblastos) (Figura 3) [2].

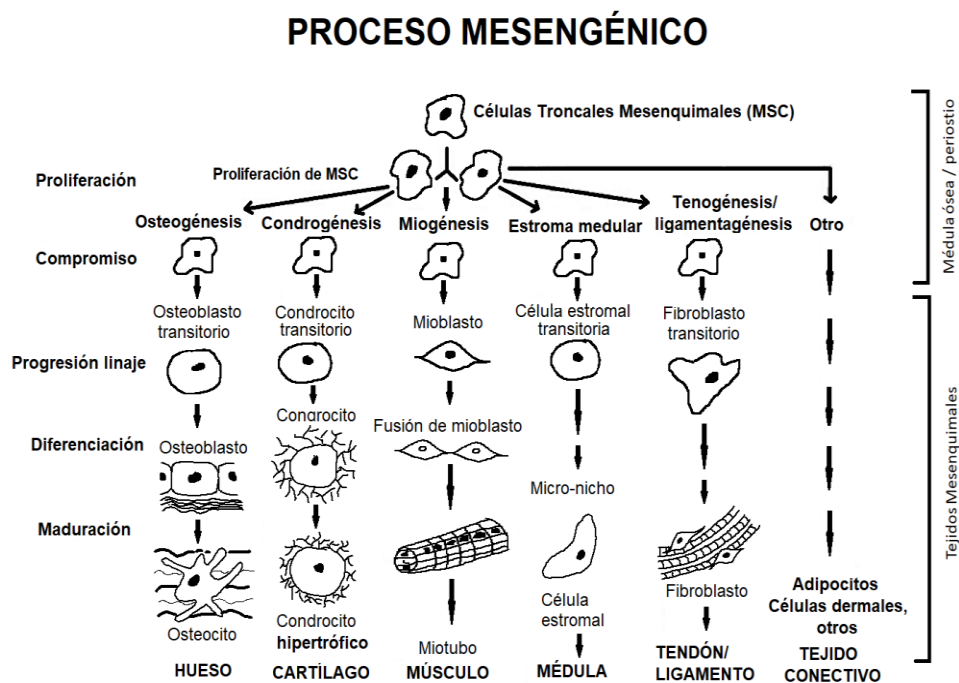


Figura 3. Mesengénesis. La mesengénesis es el proceso propuesto para explicar la formación de tejido mesenquimal como hueso, cartílago, tejido adiposo, músculo y tendón a partir de una población de MSCs, en donde se involucran mecanismos biológicos de proliferación, compromiso, diferenciación y formación de células maduras (Modificado de Caplan, 1994 [8]).

Debido a que no se ha identificado una molécula específica para las MSCs que permita obtenerlas de manera selectiva, en el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISTC por las siglas en inglés de *International Society Cell Therapy*), propuso a la comunidad científica adoptar medidas estándares para la identificación de MSCs [9, 10]. Así la ISTC propone tres criterios: primero, las células deben ser adherentes al plástico, segundo deben expresar los antígenos CD105, CD90, CD73 y deben ser negativas para la expresión de antígenos hematopoyéticos CD45, CD34, CD14, CD11B, CD79, CD19 y receptor de superficie de la molécula clase II codificado por el complejo antígeno leucocitario humano HLA-DR (por las siglas en inglés de *human leukocyte antigen*); y tercero, deben ser capaces de diferenciación trilineaje [2].

Propiedades inmunomoduladoras de las células troncales mesenquimales (MSCs)

Las MSCs poseen propiedades inmunorreguladoras que las hacen especiales candidatos para terapia celular, debido a que son capaces de remodelar tejidos bajo mecanismos antiinflamatorios mediante contacto celular y de secreción de factores tróficos y citocinas [11, 12]. El uso de MSCs en medicina regenerativa es importante debido a que, al no expresar las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, ni moléculas coestimuladoras y tener baja expresión del MHC clase I, haría que no sean rechazadas por individuos de la misma especie, es posible utilizarlas no sólo de manera autóloga, sino también, eventualmente alogénica [3].

Numerosos estudios han descrito las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs, observando principalmente la modificación de la proliferación y funciones de las poblaciones celulares del sistema inmune innato y adaptativo *in vitro* e *in vivo* [3]. Estas propiedades contribuyen al mantenimiento de la homeostasis inmune. Estudios demuestran que las MSCs, en condiciones determinadas, no siempre ejercen función inmunosupresora, sino que incrementan la respuesta inmune, esto se demuestra en condiciones de baja inflamación o cuando el nivel de citocinas inflamatorias es insuficiente para la estimulación de MSCs. Algunos autores proponen que las MSCs pudieran tener dos fenotipos: proinflamatorio o antiinflamatorio y cada población podría tener características únicas y diferir en su secreción de citocinas, capacidad de diferenciación, las vías de señalización y secreción de algunas moléculas como el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), prostaglandina E₂ (PGE₂) o Indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO)[3].

Efectos inmunomoduladores de las MSCs sobre las células del sistema inmune

Actualmente, las BM-MSCs ya han sido empleadas en ensayos clínicos para la prevención y tratamiento de padecimientos del sistema inmunológico, sin embargo, aún no se conocen con exactitud los mecanismos utilizados por estas células para inducir inmunosupresión, por ello es necesario realizar más estudios encaminados a contribuir al conocimiento biológico de las MSCs. A continuación, se revisará el efecto de las MSCs sobre algunas células del sistema inmune.

Células dendríticas y macrófagos

Estas células son fundamentales para la presentación de antígeno a los LT vírgenes. Las células dendríticas (DC por las siglas en inglés de *Dendritic Cells*) y macrófagos, ambas células presentadoras de antígenos (APC por las siglas en inglés de *antigen presenting cell*) pueden activar a los LT o también inducir tolerancia dependiendo de su maduración, subtipo, moléculas que expresen en superficie y su propio mecanismo metabólico. Las MSCs ejercen un fuerte efecto inhibitorio de células dendríticas sobre su diferenciación, maduración, expresión de moléculas de superficie de interacción con LT, como las moléculas MHC II o moléculas de coestimulación como CD80 y en la inhibición o consumo de metabolitos utilizados por las DC (como PGE₂, IDO o IL-6), afectando sus capacidades de activación del LT, secreción de citocinas, disminuyendo la producción de radicales libres de oxígeno, metaloproteasas, citocinas como IL-12, IFN- γ , entre otras moléculas secretadas [13, 14]. Las MSCs inducen una polarización en macrófagos de tipo M2 (antiinflamatorios) y este paso podría estar mediado en parte por algunos metabolitos como el lactato, producidos por MSCs, lo cual se convierte en un blanco terapéutico potencial [3].

Células Natural Killer

Las células asesinas naturales (NK por las siglas en inglés de *Natural Killer*) son células importantes para la inmunidad innata, participando en la defensa del organismo contra infecciones y cáncer. Su función efectora está regulada por sus receptores de superficie y por la secreción de citocinas, tales como IFN- γ , IL-10, IL-12, TNF- β y GM-CSF, además poseen actividad citotóxica tanto espontánea y dependiente de anticuerpos. Su acción es potenciada por otras células como los macrófagos, DC y LT. Por una parte, las NK cumplen una función de reclutamiento de MSCs, a través de la secreción de moléculas como la quimiocina RANTES CCL5 o NAP-2 (proteína activadora de neutrófilos tipo 2) también llamada CXCL7 que interactúa con su ligando el receptor para quimiocina CXCR2 en las MSCs [15]. Cuando se activan las NK en presencia de MSCs, la interacción puede inhibir la producción de IFN- γ , la proliferación mediada por IL-2 e IL-15, además de la actividad citotóxica de las NK, disminuyendo la expresión de receptores de activación. Las MSCs producen mediadores, entre otros: PGE₂, TGF- β y HLA-G5 (fracción soluble del HLA estimulada por IL-10) que regulan (suprime) la función de las células NK en cultivo, lo cual regula también los procesos inflamatorios y propicia los procesos de reparación tisular [13, 16].

Linfocitos B

Las interacciones entre MSCs y linfocitos B (LB) son un tema menormente estudiado. A pesar de que los LB nacen, maduran y actúan ya maduras principalmente en la médula ósea, donde existe gran población de células troncales, el efecto entre ellas no es bien conocido. La actividad inmunomoduladora de las MSC sobre estas células, aparentemente, depende de factores solubles y de contacto celular mediado por la señal negativa que induce la molécula de muerte programada 1 (PD-1 por las siglas en inglés de *programmed death-1 receptor* o CD279) y su ligando de muerte programada (PD-L1 por las siglas en inglés de *programmed death-1 ligands* o B7-H1; CD274), reduciendo así su proliferación, tal como sucede con LT. También puede modificar la expresión de receptores para quimiocinas como CXCR4, CXCR5, y CCR7. La interacción MSCs y LB es compleja, depende de los diferentes tipos de LB y primordialmente de factores paracrinos en el microambiente [17]. El efecto inhibitorio de MSCs sobre LB depende, además, de la inhibición de MSCs sobre otras líneas celulares como LT, células dendríticas y macrófagos y sus metabolitos secretados [17].

Linfocitos T (LT CD3+)

Una vez activados los LT (CD4⁺ y CD8⁺) inician su proceso de proliferación y diferenciación, el cual estará modulado por una gran variedad de mecanismos y moléculas presentes durante el *priming* (inicio de activación de un LT *naïve*). Se ha demostrado que las MSCs ejercen un rol modulador de la población de linfocitos T [18]. De manera particular se ha demostrado que las MSCs disminuyen la proliferación *in vitro* de linfocitos T, tanto CD4⁺ como CD8⁺, activados con aloantígenos o mitógenos como la fitohemaglutinina (PHA por las siglas en inglés de *phytohaemagglutinin*) o a través de la estimulación fisiológica del receptor de linfocitos T (TCR por las siglas en inglés de *T-cell receptor*) por medio de anti-CD3/CD28. La actividad exacerbada de los LT es uno de los principales mecanismos en las patologías inmunológicas tales como la enfermedad injerto contra hospedero (GVHD por las siglas en inglés de *graft-versus-host disease*) [19] y debido a ello se han postulado a las MSCs como células potenciales para aplicación clínica [20]. Estudios previos han establecido que es necesario el contacto directo entre MSCs y linfocitos T CD3⁺ para inhibir la proliferación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ [21]. Con relación a ello se ha evidenciado la expresión en MSCs de algunas moléculas inmunosupresoras como PD-L1 y el antígeno leucocitario humano G1 (HLA-G1 por las siglas en inglés de *histocompatibility antigen class I*) [22, 23].

Vía de señalización PD-1/PD-L1

Se ha reportado la participación de la vía PD-1/PD-L1 en la inmunosupresión mediada por MSCs. PD-L1 y su receptor PD-1 constituyen una vía de co-inhibición en los linfocitos T. Esta vía participa en el desarrollo de tolerancia y la terminación de la respuesta inmune para evitar el daño de los tejidos. La vía PD-1/PD-L1 ejerce una función inhibitoria crítica cuando hay estimulación persistente del antígeno, como ocurre durante el encuentro con antígenos propios (autoantígenos), una infección crónica o en neoplasias. Esta vía previene la autoinmunidad y contribuye directamente al microambiente inmunosupresor presente en neoplasias, todo ello mediante la regulación de LT [24]. Mediante el uso de anticuerpos se ha demostrado la participación de PD-L1 en la inmunosupresión mediada por MSCs [25].

Aunque actualmente existen resultados contradictorios sobre el efecto de MSCs en la regulación de LT y sobre la secreción de citocinas por los LT activados, se ha demostrado que estos resultados (regulación-activación) dependen del tipo de población, microambiente circundante y del estadio de activación en el que se evalúa esta población, llegándose a extrapolar a las MSCs (como en la polarización del macrófago en M_1 vs M_2) en fenotipo MSC_1 (proinflamatorio) y fenotipo MSC_2 (antiinflamatorio) y esta polarización, en gran medida, depende de las moléculas que interactúen con sus respectivos ligandos, como la polarización que puede generar la interacción de un receptor tipo toll (TLR por las siglas en inglés de *Toll-like receptors*) con su respectivo patrón molecular asociado a patógeno (PAMP por las siglas en inglés de *pattern recognition receptors*) [3]. Después de la activación, las células Th0 ($CD4^+$) se pueden diferenciar en Th1, Th2, Th17 o LT reguladores (Tregs), entre las principales derivaciones. Generalmente, las MSCs modulan esta diferenciación para generar una respuesta antiinflamatoria y de reparación tisular. Es así como se bloquea la inducción Th1, a través de la inhibición de la secreción de IFN- γ y en las poblaciones Th2 se incrementa la secreción de IL-4. Además, las MSCs inhiben la producción de citocinas proinflamatorias como IL-17, IL-22, IFN- γ , TNF- α y la diferenciación de los LT a Th17, inducen la secreción de IL-10, la activación del factor de transcripción Foxp3 y la diferenciación hacia Tregs, así como la producción de moléculas inmunorreguladoras y factores tróficos para que se lleve a cabo la reparación tisular [26].

Factores solubles de las MSCs implicados en las propiedades inmunorreguladoras

Se ha evidenciado que las MSCs son capaces de secretar moléculas inmunosupresoras que participan en los mecanismos de inmunosupresión [12, 27, 28].

TGFβ-1 y factor de crecimiento de hepatocitos

El TGF-β1 y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF por las siglas en inglés de *Hepatocyte growth factor*) son expresadas por las MSCs y se cree que actúan en conjunto. El TGFβ-1 está implicado en la generación de Treg fenotipo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ y reduce la proliferación de los linfocitos y NK. El HGF secretado por MSCs cumple funciones inmunorreguladores al favorecer la polarización M₂ a través de MAP quinasas [29]. Estos factores de crecimiento son cruciales en los mecanismos inmunorreguladores de cualquier origen [3].

Indolamina-2,3-dioxigenasa

La Indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO por las siglas en inglés de *Indoleamine 2,3-dioxygenase*) es una enzima que cataliza la conversión del aminoácido triptófano a quinurenina el cual regula la proliferación de LT. Las MSCs no producen IDO espontáneamente, pero sí cuando son estimuladas por IFN-γ o por ligandos de TLR-3 y TLR-4. La producción de IDO no es el único mecanismo de inhibición de LT por MSCs, pero es indispensable para la inhibición de LT inducida por IFN-γ [3]. La inhibición de LT forma parte de los mecanismos inhibidores de inflamación para dar continuidad a los mecanismos reparadores tisulares [3].

Interleucina-10

Esta citocina está involucrada en la inmunosupresión inducida por MSCs ya que la expresan de forma constitutiva. Además, se ha demostrado que en el sobrenadante de co-cultivos con MSCs y LT activados hay un incremento de esta molécula. [30]. La IL-10 está involucrada en la generación de Tregs es capaz de estimular la expresión y secreción del antígeno leucocitario humano G5 (HLA-G5 por las siglas en inglés de *Human Leukocyte Antigen G5*), otra molécula involucrada en la inmunosupresión por las MSCs [20].

Prostaglandina E₂ (PGE₂)

Las MSCs producen PGE₂, metabolito lipídico y está demostrado que disminuye la proliferación de LT, estimula la secreción de IL-4 e IL-10 y promueve los LT CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, es decir, la inducción a Tregs. En interacción con MSCs también reduce la diferenciación de monocitos a CD, la proliferación y la citotoxicidad de las NK activadas por IL-12. Además, la PGE₂ producida por MSCs mantiene la autorrenovación de las MSCs. Así mismo, el

contacto célula-célula de MSCs inhibe la producción de PGE₂, inhibiendo su capacidad inmunorreguladora, equilibrando por lo tanto el sistema en un mecanismo similar a una retroalimentación negativa [3].

HLA-G5

Esta molécula soluble es inducida por IL-10 y a su vez, promueve la secreción de IL-10; para ello es necesario el contacto célula-célula entre MSCs y LT. La interacción entre ambas resulta en un ambiente inmunosupresor potenciado por la generación de Treg [3].

Galectinas

Son proteínas que intervienen en la inmunomodulación de diversas formas, las MSCs expresan galectina-3, molécula que regula la proliferación y adhesión de los LT. Así mismo, se ha demostrado la participación de la galectina-1 y galectina-9, donde la elevada expresión de estos ligandos en las MSCs en un medio de inflamación reduce la proliferación de LT [3].

Regulación de las propiedades inmunosupresoras de MSCs

Se ha demostrado que las MSCs deben ser activadas para que lleven a cabo la inmunosupresión de forma eficiente. Diversas evidencias, indican que dicha activación requiere de la presencia de citocinas proinflamatorias derivadas de LT, macrófagos y células NK, lo cual indica que se establecen mecanismos de regulación bidireccionales entre las MSCs y las células del sistema inmune. En este proceso, se hace necesaria la participación de citocinas como INF- γ , TNF- α , IL-1 α e IL-1 β [20] (Figura 4).

La importancia de un ambiente inflamatorio en la capacidad inmunosupresora de las MSCs se ha evidenciado en estudios *in vitro* e *in vivo*. En los primeros se ha observado que la exposición de las MSCs a INF- γ induce la expresión de IDO [31] y PD-L1 [32], e incrementa la secreción de PGE₂ [33]. Estas moléculas participan en la inmunosupresión mediada por las MSCs. Así mismo, la importancia de altas concentraciones de INF- γ en la inmunosupresión de las MSCs, también se ha demostrado en estudios *in vivo* realizados en modelos murino, en los cuales el efecto benéfico de MSCs para el tratamiento de GVHD, se refleja en disminución significativa de la reducción de mortalidad. Efectos similares se observan en ensayos clínicos en pacientes humanos con GVHD en etapa aguda, a los

cuales les son administradas MSCs, resultando mejoría significativa en relación con la inmunomodulación, la migración y el homing. [34].

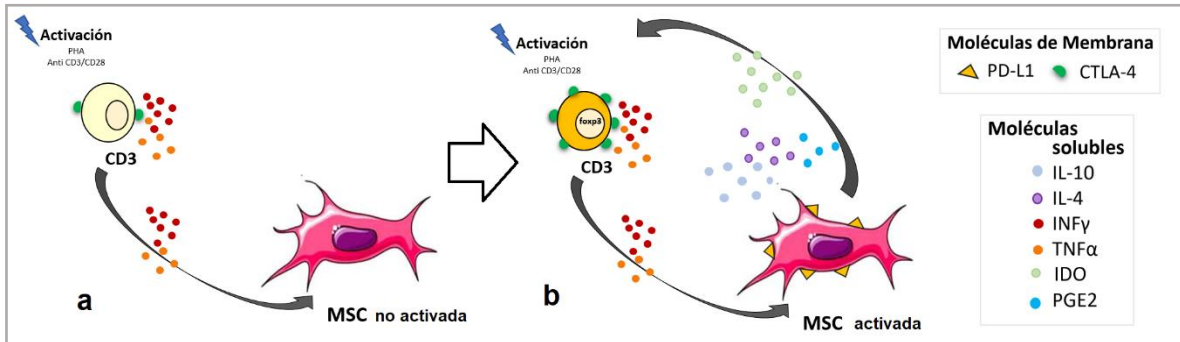


Figura 4. Propiedades inmunosupresoras de las MSCs. Las BM-MSCs regulan la función de diferentes componentes celulares del sistema inmune, en este dibujo se representa la interacción directa de las MSCs con linfocitos T activados (anti CD3/CD28 o PHA). **(a)** MSCs no activadas y **(b)** MSCs activadas por citocinas proinflamatorias. El efecto inmunosupresor puede darse a través de contacto celular y/o mediante la secreción de factores tróficos. Entre los primeros se ha involucrado a PD-L1, HLA-G1, ICAM-1, VCAM-1 por parte de MSCs y CTLA-4 en LT. Mientras que, en los factores secretados se han identificado TGF β , IL-10, IDO, IL-4, PGE $_2$, y HLA-G5.

ANTECEDENTES

Fuentes alternas a la médula ósea para la obtención de células troncales mesenquimales

La BM es la fuente más estudiada de MSCs [35] y de hecho BM-MSCs han sido utilizadas en protocolos clínicos de terapia celular para reducir signología de GVHD [19, 36]. Sin embargo, BM presenta algunas desventajas como la dificultad para encontrar donadores además que la obtención de muestra es un procedimiento invasivo, doloroso y costoso [10]. Nuestro grupo de investigación reportó que las MSCs provenientes de sangre de cordón umbilical (UCB-MSCs) son una fuente alternativa a BM-MSCs dado que ambas presentaron similar capacidad de inmunosupresión sobre LT, sin embargo, en ese mismo estudio se observó una menor disponibilidad de MSCs (por cada de 8'000,000 de PBMCs hay una UCB-MSCs) en las muestras provenientes de UCB con respecto a las de BM (por cada 35,000 PBMCs hay 1 BM-MSCs) [20] y debido a ello, a pesar de ser una fuente accesible, se tendrían que procesar un número elevado de muestras de sangre de cordón para obtener en algunas de ellas. Por lo anterior, es importante aislar MSCs de fuentes igualmente accesibles, pero con mayor disponibilidad celular [20].

Sin embargo, a la fecha no se sabe si las MSCs de tejidos dentales tienen el mismo potencial inmunosupresor que las BM-MSCs y más aún es de importancia determinar cuál de ellas podría ser la mejor fuente para su uso en protocolos de terapia celular inmunosupresora.

Células troncales mesenquimales provenientes de tejidos dentales

El descubrimiento de las células troncales de tejidos dentales (DT-MSCs) durante los años 2000s, ha promovido el interés de la investigación, no solo en la caracterización de este tipo de células troncales, sino también en sus aplicaciones en la medicina regenerativa.

Las DT-MSCs son una nueva población de células troncales mesenquimales, las cuales son altamente proliferativas y tienen la capacidad de autorrenovación y diferenciación a multi-linaje. A lo largo de los avances en la investigación en ingeniería de tejidos, estas DT-MSCs han sido probadas para regenerar varios tejidos dentales y orales como la pulpa dental,

dentina, cemento, ligamento periodontal, tejido gingival o hueso [37, 38]. Adicionalmente, DT-MSCs tienen alta capacidad de angiogénesis y neurogénesis.

Dado que los odontólogos pueden acceder fácilmente a los tejidos orales, las DT-MSCs pueden obtenerse de manera factible a partir de estos tejidos y pueden ser una fuente potencial para diversas aplicaciones terapéuticas basadas en células troncales. Las DT-MSCs también pueden reprogramarse en células pluripotenciales inducidas (iPSC) las cuales poseen una amplia gama de aplicaciones biomédicas [38].

Existen al menos seis tipos de DT-MSCs en los tejidos dentales, las cuales ya han sido aisladas y caracterizadas. Las primeras DT-MSCs del mesodermo que fueron aisladas, fueron las provenientes de la pulpa dental (DP-MSCs)[38]. Subsecuentemente fueron aisladas de tejido decidual exfoliado (SHED por las siglas en inglés de *human exfoliated deciduous teeth*), tejido gingival (G-MSCs) y del ligamento periodontal (PDL-MSCs) (Figura 5)[39].

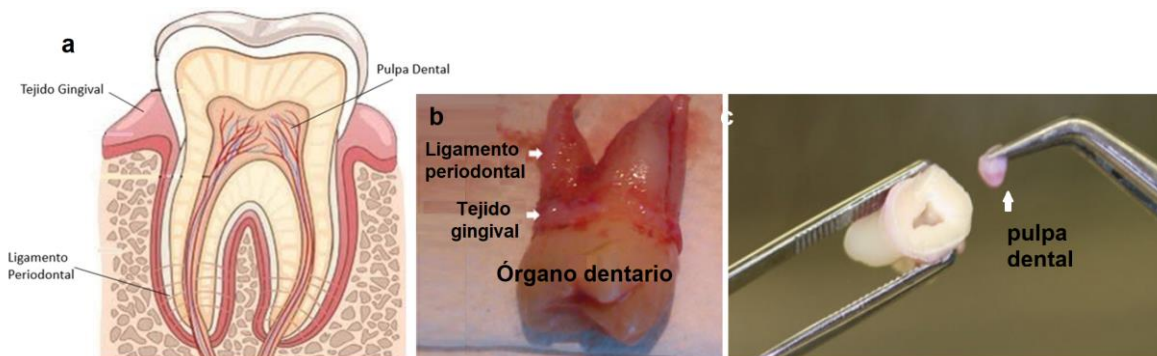


Figura 5. Aislamiento de Células Troncales Mesenquimales de Tejidos Dentales (DT-MSCs). (a) Esquema del órgano dentario, (b) Ligamento periodontal y tejido gingival y (c) pulpa dental.

En vista de que los odontólogos pueden acceder fácilmente a los tejidos orales, las DT-MSCs pueden obtenerse de manera factible a partir de esos tejidos y potencialmente ser una buena fuente para diversas aplicaciones terapéuticas basadas en células troncales. Las DT-MSCs también pueden reprogramarse en células madre pluripotentes inducidas (iPSC por las siglas en inglés de *Induced pluripotent stem cells*) que poseen una amplia gama de aplicaciones biomédicas (Figura 5).

Células troncales mesenquimales de pulpa dental

La pulpa dental está conformada por tejido conjuntivo laxo altamente vascularizado e innervado, es primordial en la formación del diente durante la odontogénesis y además es

un tejido básico para el mantenimiento, defensa y vitalidad dentaria en la vida postnatal. En el tejido pulpar se encuentran diversos tipos celulares, como los odontoblastos que forman dentina, fibroblasto que sintetizan la matriz extracelular de la pulpa, células inmunológicas y células troncales mesenquimales (DP-MSCs)[40]. Estas células tienen un origen ectomesenquimal, constituyendo una verdadera reserva celular, poseen capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos o fibroblastos según el estímulo que actúe sobre ellas [41].

Recientes estudios han demostrado que DP-MSCs tienen la capacidad de disminuir la proliferación de linfocitos T *in vitro*, vías TGF- β , PD-1 y ligando de Fas. Además, se ha demostrado en modelos de colitis experimental *in vivo* que tienen la propiedad de reducir la respuesta inflamatoria [42].

Células troncales mesenquimales de tejido gingival

El tejido gingival o encía se encuentra recubriendo los procesos alveolares y adhiriéndose fuertemente a los dientes, es una dependencia de la mucosa bucal y que, junto con la membrana de Nashmyth, cumple la función específica de brindar protección a la inserción dentaria del periodonto de protección (Figura 6). Estas células tienen un origen ectomesenquimal ([43-45]).

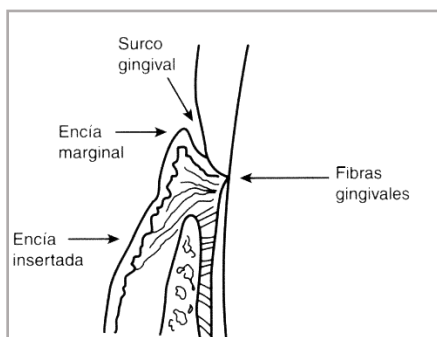


Figura 6. Esquemización de la encía o tejido gingival y sus diferentes regiones anatómicas. Surco gingival, encía marginal, encía insertada y fibras gingivales [45].

El tejido gingival tiene una única capacidad de curación. Tiene la capacidad de soportar agentes térmicos, químicos, mecánicos y agresión bacteriana, el tejido gingival es capaz de regenerar su auto integridad por medio de redes de colágeno. Por lo tanto, la encía es un tejido privilegiado con alto potencial regenerativo similar al embrión. Muchos

estudios han tratado de explicar esta propiedad y se debe principalmente a la presencia de fibroblastos y G-MSCs [43]. Recientes estudios han demostrado que G-MSCs tienen la capacidad de disminuir la proliferación de linfocitos T *in vitro*, vías TGF- β , HGF,IDO y PGE₂ esto en co-cultivos con PBMCs activadas con PHA [44].

Células troncales mesenquimales de ligamento periodontal

El diente u órgano dentario se aloja en la cavidad que presenta procesos alveolares de los huesos maxilares, en los que se implantan debido a la existencia de una anfiartrosis (articulación con movimiento limitado), de ella participan dos superficies articulares: hueso (representado por la cortical ósea) y diente (por medio del cemento) y entre ambos se dispone el ligamento periodontal o también llamado periodonto, estas células tienen un origen ectomesenquimal [45].

El ligamento periodontal es un tejido conectivo fibroso, compuesto de fibras, células y sustancia intercelular rica en colágeno, alto contenido proteico y polisacáridos. Tiene como funciones: 1) suspender el diente en su alvéolo óseo; 2) suministrar nutrientes al alvéolo y al cemento; 3) proteger los órganos dentarios; y 4) mantener la homeostasis de los dientes en su alvéolo por medio de la regeneración continua. Esta regeneración del ligamento periodontal (LPD) como un mecanismo fisiológico continuo, dio lugar a la teoría de que este tejido podía contener una subpoblación de células progenitoras. En el 2004, Seo y colaboradores publicaron que era posible que el LPD humano contuviera una población de células troncales postnatales multipotenciales (PDL-MSCs), con capacidad clonogénica, con alto índice de proliferación y con capacidad de regenerar tejido periodontal [46]. Las PDL-MSCs se encuentran confinadas a nichos en el ligamento periodontal siendo ellas las encargadas de la regeneración del tejido después de lesiones leves jugando un papel importante en la reparación periodontal [46]. También han podido ser utilizadas para dar origen a complejos raíz-periodonto según estudios recientes [47].

De igual manera se ha demostrado que las G-MSCs tienen la capacidad de disminuir la proliferación de linfocitos T *in vitro*, vías TGF- β , IL-10, ciclooxigenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico. Y se ha determinado en modelos de colitis experimental *in vivo* que tienen la propiedad de aminorar la respuesta inflamatoria [42].

Tomando en cuenta lo anterior, en este estudio se pretende contribuir al conocimiento de las propiedades inmunosupresoras de las DT-MSCs sobre linfocitos T CD3⁺ y para ello se realizó un estudio comparativo de las MSCs de las cuatro fuentes con relación a su potencial para inhibir la proliferación de LT CD3⁺ y la expresión de moléculas

inmunosupresoras tanto de membrana como secretadas. También analizamos la capacidad de las MSCs para generar Tregs en co-cultivo. A nuestro conocimiento, este es el primer estudio que compara las propiedades inmunosupresoras de las MSCs de las cuatro fuentes para determinar cuál de ellas podría ser la más apropiada para aplicaciones de terapia celular inmunorreguladora.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células troncales mesenquimales provenientes de médula ósea (BM-MSCs) poseen propiedades inmunorreguladoras demostradas en modelos *in vitro* e *in vivo* [11]. Sin embargo, estas tienen ciertas desventajas como menor disponibilidad, dificultad de obtención y riesgo para el donador. Actualmente existen pocos estudios que demuestran las propiedades inmunorreguladoras de las células troncales mesenquimales de tejidos dentales (DT-MSCs) y mucho menos, se ha descrito el potencial inmunorregulador de las MSCs de fuentes dentales como pulpa dental, ligamento periodontal y tejido gingival de manera comparativa, ello para determinar cuál de estas presenta el mayor potencial con fines de aplicación en terapia celular.

HIPÓTESIS

Las MSCs de tejidos dentales producen moléculas con funciones inmunosupresoras sobre linfocitos T e inducen la generación de poblaciones T reguladoras de manera similar a las de médula ósea.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la capacidad inmunorreguladora *in vitro* de células troncales mesenquimales (MSCs) provenientes de tejidos dentales sobre células T.

Objetivos Específicos

- a)** Realizar la caracterización biológica y funcional (morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación) de las MSCs provenientes de médula ósea, pulpa dental, tejido gingival y ligamento periodontal.

Para demostrar la capacidad inmunosupresora de las MSCs de tejidos dentales se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- b)** Evaluar el efecto de las MSCs sobre la proliferación de linfocitos T CD3+.
- c)** Determinar la expresión de moléculas inmunosupresoras de membrana CTLA-4 en linfocitos T y PD-L1 en MSCs
- d)** Determinar el efecto de las MSCs sobre la secreción de citocinas INF- γ , TNF- α , IL4 e IL-10 en co-cultivos.
- e)** Cuantificar la concentración de PGE₂ en los co-cultivos de MSCs con linfocitos T activados.
- f)** Evaluar la capacidad de las MSCs para inducir la formación de linfocitos T reguladores en los co-cultivos de MSCs con linfocitos T activados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras biológicas

Las muestras de BM-MSCs fueron obtenidas de donadores adultos voluntarios hematológicamente sanos de acuerdo con los lineamientos del Hospital de Traumatología y Ortopedia del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (n=5) registrados bajo el protocolo 1411. Las muestras de DP-MSCs (n=5), G-MSCs (n=5) y PDL-MSCs (n=5) fueron obtenidas por explante de pacientes adultos que acudieron a exodoncia de terceros molares a la Clínica de Cirugía Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPEI) de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los pacientes fueron informados del estudio para su consentimiento y donación de los órganos dentarios extraídos y el protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología (CIE/1110/2017).

Aislamiento y cultivo de BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs y PDL-MSCs

Aislamiento de MSCs de médula ósea

A partir de punción y aspirado de médula ósea en la región de la cresta iliaca se obtuvieron las muestras y se colocaron en tubos de 50 mL (Corning, New York, NY) con 15 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, ThermoFisher, Waltham, MA USA) adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB), posteriormente fueron lavadas con una solución buffer fosfatada (PBS, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) y con la suspensión celular se realizó un gradiente de densidad con Ficoll-Paque Plus, densidad 1.077 + 0.001 g/mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala Sweden). Las células se centrifugaron durante 30 minutos a 300 gravedades, la interfase se lavó con PBS 3% SFB EDTA 1 mM, el botón de PBMCs fue resuspendido en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* bajo en glucosa (lg-DMEM) suplementado con 15% de SFB. El número total de células nucleadas y viabilidad determinó mediante conteo con solución de Turck y azul tripano (ThermoFisher, USA), respectivamente. De 5 a 10×10^6 de PBMCs fueron sembradas en una caja Petri de 100 mm

(Corning), las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y después de 4 días se realizó un lavado con PBS para eluir las células no adherentes realizando dos cambios de medio por semana. Cuando los cultivos alcanzaron un 80-90% de confluencia, las células fueron cosechadas para su resiembra y criopreservación.

Aislamiento de MSCs de tejidos dentales

Posterior a la cirugía de exodoncia de terceros molares, se disecaron el ligamento periodontal que se encontraba revistiendo las raíces del órgano dentario y el tejido gingival (mucosa oral) el cual estaba adherido firmemente al periostio; finalmente se seccionó transversalmente el órgano dentario con disco de diamante para exponer la cavidad pulpar y así extraer la pulpa dental. Los tres tejidos de manera aislada se disgregaron mecánicamente y se colocaron en una placa de 6 pozos (Corning), embebidos sobre 1 mL de medio de cultivo *alfa-Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (α -MEM) suplementado con 10% de SFB, 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina, 100 μ g/mL de gentamicina (GIBCO BRL, Carlsbad, CA, USA) y se mantuvieron de 2 a 5 semanas, reemplazando el medio de cultivo cada tercer día. Al alcanzar una confluencia del 80% las células se cosecharon incubándolas en tripsina-EDTA 0.02% (GIBCO, BRL) por 5 minutos a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂, posteriormente se contabilizaron las MSCs de cada tejido en cámara de Neubauer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) con tinción de viabilidad (azul tripano), finalmente se congelaron 1×10^6 MSCs de cada tejido en crioviales de 2mL (Corning) embebidas en medio de congelación adicionado con 10% dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich) y se criopreservaron en nitrógeno líquido para su posterior utilización (Figura 7).

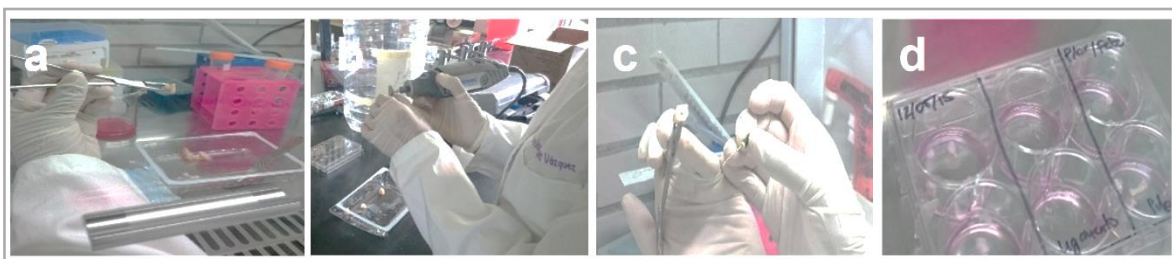


Figura 7. Procedimiento para la obtención de DT-MSCs por técnica de explante. (a) Órgano dentario, (b) Segmentación transversal del órgano dentario, (c) Obtención de pulpa dental y (d) Técnica de explantes.

Cultivo de Células Troncales Mesenquimales

Para realizar los experimentos de caracterización biológica de inmunofenotipo y diferenciación; así como para los ensayos de inmunorregulación, se utilizaron BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs y PDL-MSCs correspondientes a la tercera o cuarta resiembra; las cuales se cultivaron en medio de cultivo para MSCs: Ig-DMEM suplementado con 10% SFB, 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina y 100 µg/mL gentamicina; las células fueron sembradas a una densidad de $0.2 \times 10^6 / \text{cm}^2$ en cajas Petri P-100 a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂. El medio fue reemplazado cada 72 horas. Al alcanzar 80-90% de confluencia, las células fueron cosechadas y resembradas a una densidad de 0.01×10^6 células/cm² en cajas P-35 (Corning) para su análisis de caracterización incluyendo análisis morfológico, perfiles de expresión de moléculas de superficie y diferenciación adipogénica y osteogénica; para ensayos de diferenciación condrogénica se cultivaron 3×10^5 células en tubo cónico de 15 mL embebidas en Ig-DMEM. En los ensayos de inmunorregulación: proliferación, expresión de moléculas de superficie, factores solubles y linfocitos T reguladores, las MSCs de las diferentes fuentes fueron sembradas sobre placas de 24 pozos a una densidad de 1.5×10^5 .

Caracterización de las Células Troncales Mesenquimales

- ✿ **Análisis morfológico:** Para identificar diferencias morfológicas entre BM-MSCs y DT-MSCs se resembraron 0.3×10^5 células/cm² en cajas P-35 (Corning) y al alcanzar 40% de confluencia fueron lavadas y teñidas con el colorante metacromático azul de toluidina (Sigma-Aldrich), el cual identifica estructuras basófilas ricas en proteoglicanos presentes en la matriz extracelular. Posteriormente fueron evaluadas con microscopio de contraste de fases; dicho análisis se realizó en cinco muestras de manera independiente correspondientes a 5 pacientes diferentes (n=5).
- ✿ **Cinética de proliferación:** Para determinar la cinética de proliferación de BM-MSCs y DT-MSCs, se realizaron cultivos con 1×10^3 los cuales se mantuvieron de 1 a 6 días en placas de 24 pozos (Corning) y posteriormente se cosecharon por medio de tripsinización (como se mencionó en el capítulo de Aislamiento de MSCs de tejidos dentales). Cada día fueron cosechadas las MSCs de un pozo y contabilizadas con

hemocitómetro; dicho análisis se realizó en cinco muestras de manera independiente correspondientes a 5 pacientes diferentes (n=5).

✿ **Inmunofenotipo:** Para la determinación del inmunofenotipo, se realizaron cultivos celulares de BM-MSCs y DT-MSCs en cajas P-100 (Corning), las cuales, al alcanzar el 80% de confluencia fueron cosechadas por medio de tripsinización (como se mencionó en el capítulo de Aislamiento de MSCs de tejidos dentales) y fueron contabilizadas con hemocitómetro.

Para la determinación de la expresión de las proteínas CD73, CD90 y CD45 se utilizaron anticuerpos monoclonales para células humanas acopladas a los fluorocromos FITC, PE o APC (BD Biosciences, San Diego, CA, USA); para la determinación de la expresión de las proteínas CD45 CD105, CD13, CD14 se utilizaron anticuerpos monoclonales para células humanas acopladas a los fluorocromos HLA-ABC, HLA-DR, CD31 (Buckingham, UK), y para la determinación de la expresión de la proteína CD34 se utilizó el anticuerpo monoclonal para células humanas acoplado al fluorocromo APC (invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Posteriormente se realizó la tinción de citometría de flujo a partir de 100,000 MSCs, la cual consiste en incubar con dichos anticuerpos monoclonales conjugados durante 30 minutos en oscuridad a 4°C, posteriormente lavar las células a 1500 rpm durante 5 minutos con PBS 1X EDTA para posteriormente analizar la expresión de las proteínas relacionadas con el inmunofenotipo. Fueron capturadas 10,000 eventos por muestra en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) y los datos fueron analizados con el software FlowJo 10 con el cual se determinó el porcentaje de células positivas a cada marcador.

✿ **Capacidad de diferenciación:**

Adipogénica: Para la diferenciación adipogénica se sembraron 0.8×10^5 MSCs de cada fuente en cajas Petri 35mm (Corning) suspendidas en medio de cultivo para MSCs, al alcanzar 60% de confluencia fueron inducidas con medio MesenCult Adipogenic Differentiation Kit (StemCells Technologies, Vancouver, Canada) y se mantuvieron en incubación por 21 días a 37°C efectuando dos cambios de medio por semana. Para evidenciar adipocitos y vacuolas lipídicas se realizó la tinción de rojo oleoso (Sigma-Aldrich) la técnica consiste brevemente en fijar las células con formalina, agregar el colorante rojo oleoso.

Finalmente, se evaluó la presencia de vacuolas lipídicas con microscopio de contraste de fases; dicho análisis se realizó en cinco muestras de manera independiente correspondientes a 5 pacientes diferentes (n=5).

Osteogénica: Para la diferenciación osteogénica se sembraron 0.8×10^5 MSCs de cada fuente en cajas Petri 35mm (*Corning*) suspendidas en medio de cultivo para MSCs, al alcanzar 60% de confluencia fueron inducidas con medio osteogénico StemPro (*StemCells Technologies, Vancouver, Canada*) y se mantuvieron en incubación por 21 días a 37°C efectuando dos cambios de medio por semana. Posteriormente se detectó la actividad de la fosfatasa alcalina por medio del kit comercial SIGMA FAST. BCIP/NBT (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium*) (*Sigma-Aldrich*), la cual se demuestra con el depósito de colorante azul-púrpura en la membrana del osteoblasto diferenciado.

Finalmente, se evaluó con microscopio de contraste de fases; dicho análisis se realizó en cinco muestras de manera independiente correspondientes a 5 pacientes diferentes (n=5).

Condrogénica: Para la diferenciación condrogénica se sembraron 3×10^5 MSCs de cada fuente en tubos de 15mL suspendidas en medio de cultivo para MSCs y fueron centrifugadas a 900 rpm y resuspendidas en medio condrogénico (*Cambrex Bio Science, Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA*) suplementado con 10ng/mL de TGF- β (*Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, USA*), se mantuvieron en incubación por 28 a 37°C días efectuando dos cambios de medio por semana. Las micromasas resultantes fueron fijadas, deshidratadas, incluidas en parafina y cortadas a 4 μ m en micrótopo. Posteriormente se realizó una tinción azul alciano (*Sigma-Aldrich*), colorante básico que se une a los grupos ácidos de los mucopolisacáridos dando un color azul.

Finalmente, se evaluó con microscopio de contraste de fases; dicho análisis se realizó en cinco muestras de manera independiente correspondientes a 5 pacientes diferentes (n=5).

Obtención de linfocitos T CD3⁺

Para aislar a la población CD3⁺, se obtuvieron PBMCs de donadores sanos a partir de sangre periférica mediante la técnica de separación celular por gradiente de densidad (*Ficoll-Paque Plus, density 1.077 + 0.001 g/mL; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden*); posteriormente la población CD3⁺ se aisló mediante inmunoselección magnética positiva con microperlas, las cuales están acopladas a un anticuerpo monoclonal anti-CD3, isotipo IgG2a ratón y reconocen al epítipo localizado en la cadena Épsilon del CD3 (*kit comercial MicroBeadsCD3 Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany*), una vez marcadas las células CD3⁺ son vertidas dentro de una columna MACS MS (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany*), la cual es colocada en un campo magnético, posteriormente las células no marcadas con las perlas se eluyen y finalmente se retira el campo magnético el cual permite que nuestra alícuota final contenga únicamente a las células CD3⁺. A este método se le denomina enriquecimiento de CD3⁺ el cual por medio de citometría de flujo se comprobó que un 97% de la población marcada con las perlas inmunomagnéticas corresponden a una población CD3⁺. Estos linfocitos CD3⁺ fueron incubados en medio RPMI-1640 suplementado con 10% SFB, 2mM L-glutamina, 100UI/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina y 100µg/mL gentamicina (*GIBCO BRL*) y posteriormente se agregaron a los cultivos con monocapas de MSCs. (Figura 8).

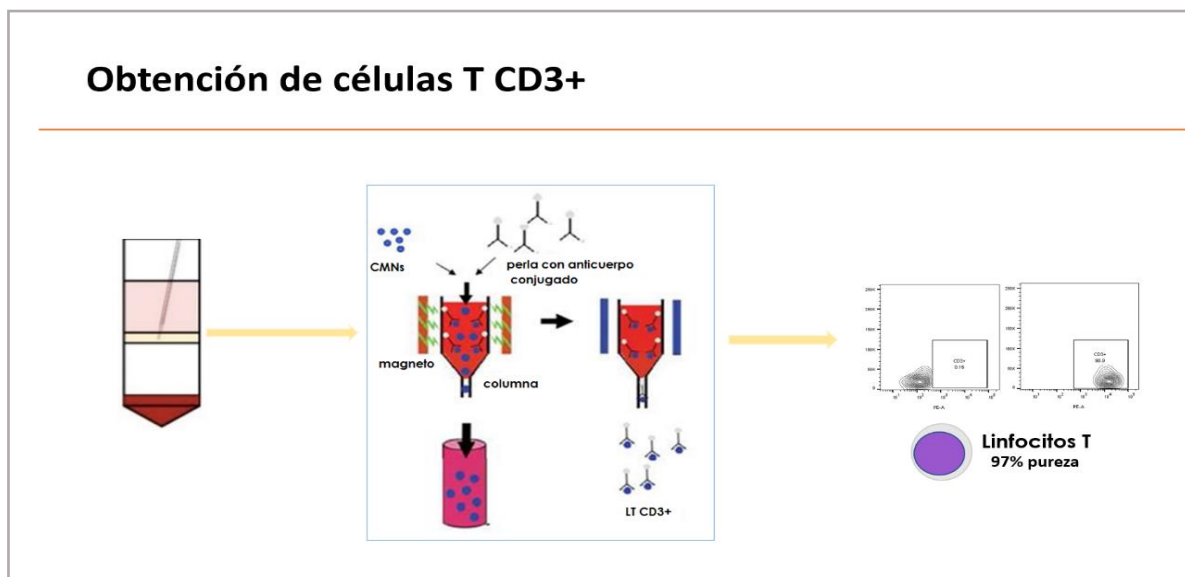


Figura 8. Sistema de enriquecimiento de las células CD3⁺. A partir de sangre periférica se obtienen células T CD3⁺ con una pureza de $\geq 97\%$ por medio de separación con MicroBeads CD3 humanas y columnas MACS MS (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany*).

Activación de linfocitos T CD3⁺

Los linfocitos T CD3⁺ fueron activados en medio de co-cultivo (Ig-DMEM 50%/RPMI 50%) suplementado con 10% SFB, 2mM L-glutamina, 100UI/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina y 100µg/mL gentamicina (*GIBCO BRL*) con perlas anti-CD3/CD28 (*Invitrogen, California, CA, USA*), estas perlas están acopladas a anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28; estos dos anticuerpos proporcionan señales primarias y coestimuladoras, optimizadas para una eficiente activación y expansión de células T. Se utilizó una proporción 1:1 (25µl *Dynabeads*/1x10⁶ linfocitos T CD3⁺), los cuales fueron agregados a la monocapa de las diferentes fuentes de MSCs (esta técnica se describe en la siguiente sección "Co-cultivos de MSCs/Linfocitos CD3⁺"). Para el ensayo de proliferación, los CD3⁺ activados fueron teñidos previamente con 5-6 -carboxifluoresceína succinimidil éster (*CFSE, Thermo Fisher Scientific*).

Co-cultivos de MSCs/Linfocitos CD3⁺

El sistema de co-cultivo se llevó a cabo en placas de 24 pozos (*Corning*), en donde 24 horas antes se sembraron 1.5x10⁵ BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs y PDL-MSC de manera independiente: después de esto, se agregaron los CD3⁺ previamente activados a una relación 1:1 y se mantuvieron los cultivos durante 4 a 5 días.

En todos los ensayos para la evaluación de la capacidad inmunosupresora: proliferación, expresión de citocinas y moléculas de superficie; los linfocitos CD3⁺ activados en ausencia de MSCs fueron utilizados como control positivo de la activación. Las moléculas de superficie y factores tróficos observados en los cultivos de MSCs en ausencia de linfocitos T CD3⁺ fueron utilizados como control de expresión basal. Todos los cultivos fueron mantenidos y evaluados a los 4-5 días por citometría de flujo (Figura 9).

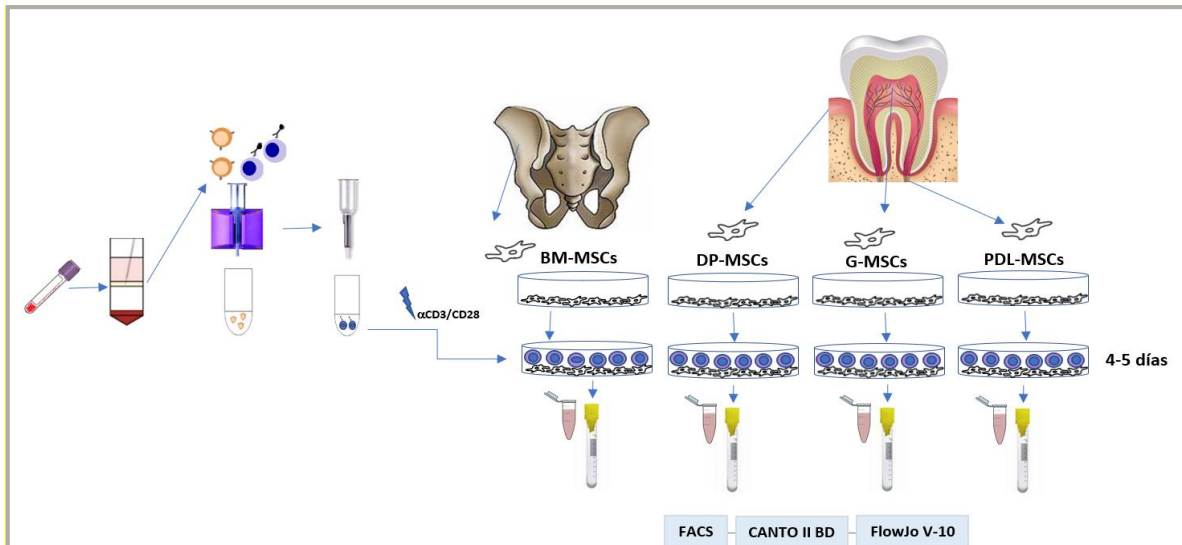


Figura 9. Diseño experimental el cual consiste en un sistema de co-cultivo de linfocitos T y MSCs. Sobre las monocapas de BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs y PDL-MSCs se agregaron CD3⁺ aislados mediante inmunoselección positiva, éstos se activaron con perlas anti-CD3/CD28 y se mantuvo el co-cultivo durante 4-5 días; posteriormente se analizaron los ensayos de proliferación (CD3⁺ marcados con CFSE), expresión de moléculas de membrana, generación de Tregs y secreción de factores solubles en ambas poblaciones por citometría de flujo. Las citocinas y PGE₂ fueron determinadas a partir de los sobrenadantes de estos cultivos y analizadas por citometría de flujo y ELISA respectivamente.

Ensayo de proliferación

Después de 4-5 días de co-cultivo, se cosecharon los linfocitos T por pipeteo y se efectuó una tinción de citometría, la cual consiste en lavar las células con solución salina fisiológica (PISA) y bloquear al receptor de la fracción cristalizante/constante (Fc), (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), posteriormente se resuspendieron en 100 µL de PBS 1 mM EDTA 3% de SFB y se incubaron a 4°C con los respectivos anticuerpos/fluorocromos por 20 minutos, en este caso anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 conjugados en PE (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA); posteriormente, las células fueron lavadas con 1 mL de buffer de citometría (PBS 1 mM EDTA al 3% de SFB). Las células se analizaron en un equipo FACS Canto II Flow Cytometer (BD Biosciences), donde se capturaron 10,000 eventos por muestra. Los datos se analizaron con el software FlowJo.10 (Ashland, OR, USA); los linfocitos CD3⁺ activados en ausencia de MSCs se usaron como control positivo, además, fueron considerados como 100% de proliferación y estos niveles fueron normalizados a este control. Finalmente, el promedio de la intensidad media de fluorescencia fue normalizado utilizando 1 como control para cada experimento (Figura 10).

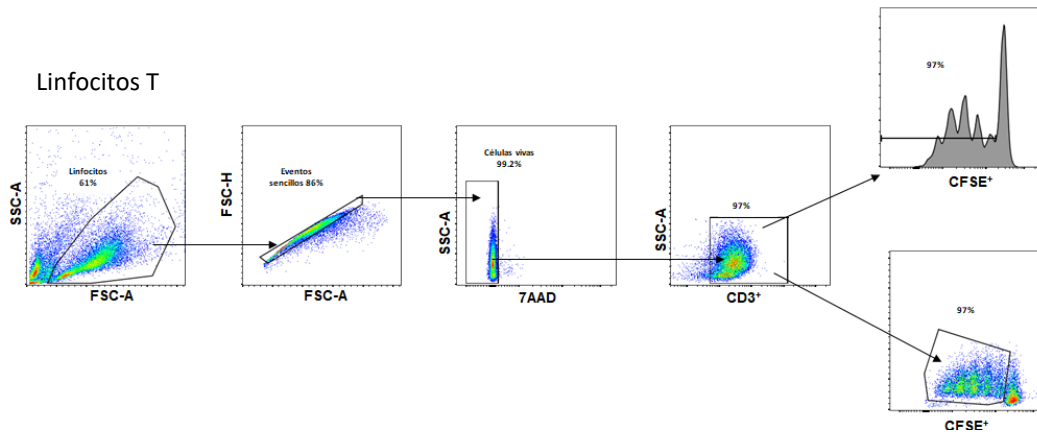


Figura 10. Estrategia de análisis para el ensayo de proliferación, los datos obtenidos por citometría de flujo. Al analizar células T CD3⁺ por este método, se identificaron las subpoblaciones de interés CD4⁺ y CD8⁺ teñidas con CFSE (éster de succinimidil-carboxifluoresceína) a partir de células negativas al marcador de no viabilidad 7AAD.

Expresión de moléculas inmunorreguladoras

Después de 4-5 días de co-cultivo, se cosecharon las células y se les realizó la tinción de citometría descrita en la sección titulada: Ensayo de proliferación. En este caso las células fueron fijadas con FACS Lysing Solution (BD Biosciences), para así evaluar la expresión de moléculas en superficie CD4, CD25 y CTLA-4 con anticuerpos monoclonales conjugados en FITC, PE o APC (BD Biosciences); así como la evaluación del factor de transcripción Foxp3 intracelular por medio del anticuerpo monoclonal conjugado en APC (eBioscience, San Diego, CA, USA) sobre la población CD3⁺. Así mismo, se determinó la expresión de PD-L1 con el anticuerpo conjugado monoclonal con PE (BD Biosciences) expresado en las MSCs, previamente identificadas con el anticuerpo monoclonal anti-CD90 conjugado en APC. Las células se analizaron en un citómetro FACS Canto II (BD, Biosciences), donde se capturaron 10,000 eventos por muestra. Los datos se analizaron con software FlowJo.10. (Figura 11).

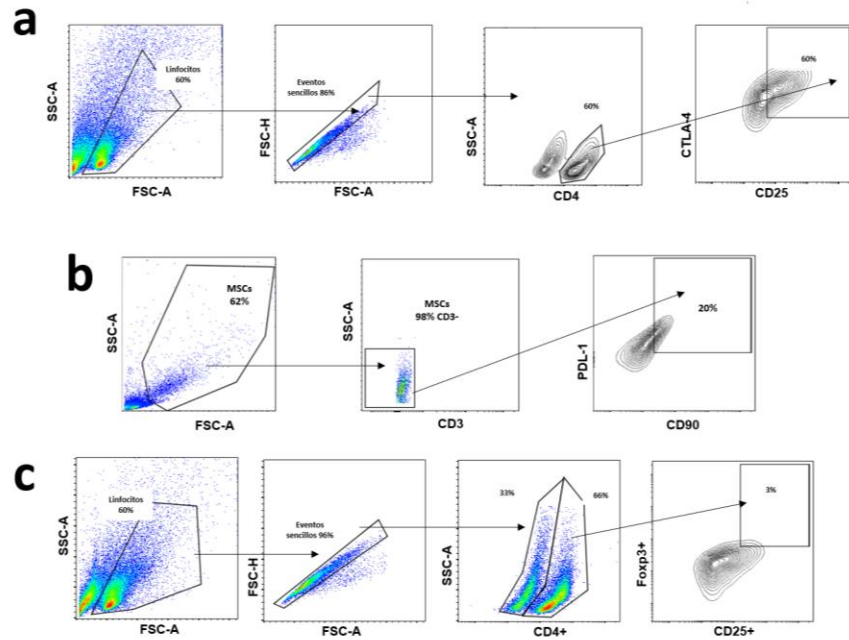


Figura 11. Estrategia de análisis para el ensayo de moléculas inmunorreguladoras, datos obtenidos por citometría de flujo. (a) Al analizar células T CD3⁺ por este método, se identificaron las subpoblaciones de interés CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺. **(b)** Al analizar células troncales mesenquimales (MSCs) por este método, se identificó el porcentaje de estas que presentan el marcador PD-L1. La estrategia se realizó identificando la población CD3⁻CD90⁺PD-L1⁺. **(c)** Estrategia de análisis para localizar el porcentaje de la población CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

Análisis cuantitativo de moléculas solubles

Citocinas

Para la cuantificación de la concentración de citocinas IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ secretadas, se obtuvieron sobrenadantes a los 4-5 días de los co-cultivos de las diversas condiciones experimentales: BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs y PDL-MSCs con linfocitos CD3⁺ activados; incluyendo CD3⁺ no activados, MSCs en ausencia de CD3⁺ se utilizaron como control negativo y los CD3⁺ activadas en ausencia de MSCs se utilizaron como control positivo; los sobrenadantes estuvieron almacenados a -80°C hasta su uso.

Para este objetivo se utilizó la técnica de Inmunoensayo multiparamétrico con perlas (CBA, por las siglas en inglés de *Cytometric Bead Array*, *Biosciences Direct*), la particularidad de esta técnica consiste en que se puede cuantificar múltiples citocinas en una misma muestra, por lo cual, se considera un inmunoensayo multiparamétrico cuantitativo. Esta metodología permite la captura de analitos solubles con perlas de tamaño conocido y fluorescentes, que hacen posible el análisis de detección utilizando citometría de flujo.

Cada perla de captura del kit comercial *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine* se encontraba conjugada a un anticuerpo específico, por otro lado, el reactivo de detección era una mezcla de ficoeritrina conjugada a anticuerpo (PE, por las siglas en inglés de *phycoerythrin*), la cual proporcionó una señal fluorescente en proporción a la cantidad de citocina acoplada.

De manera general, las perlas de captura y el agente de detección fueron incubados con la muestra problema (sobrenadante), estas perlas contenían a las citocinas reconocidas, de esta manera se realizan complejos de sándwich formados por: perlas de captura + analito + agente de detección. Estos complejos se midieron utilizando el citómetro de flujo para detectar las partículas fluorescentes características tanto de las perlas como al agente de detección.

En este ensayo, se tenían siete poblaciones de perlas con distintas intensidades de fluorescencia las cuales estaban recubiertas con los anticuerpos de captura específicos para IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ ; estas siete poblaciones de perlas fueron mezcladas para formar el arreglo de perlas, con el cual fue posible detectar en el canal rojo del citómetro de flujo. La intensidad de fluorescencia de cada complejo de sándwich reveló la concentración para cada citocina. Finalmente, después de adquirir las muestras en el citómetro de flujo (FACS Canto II *BD, Biosciences*) se utilizó el software LegendPlex v7.1 (*San Diego, CA, USA*), para generar los resultados en formato de gráficas y tablas (Figura 12).

Principio de Inmunoensayo con perlas

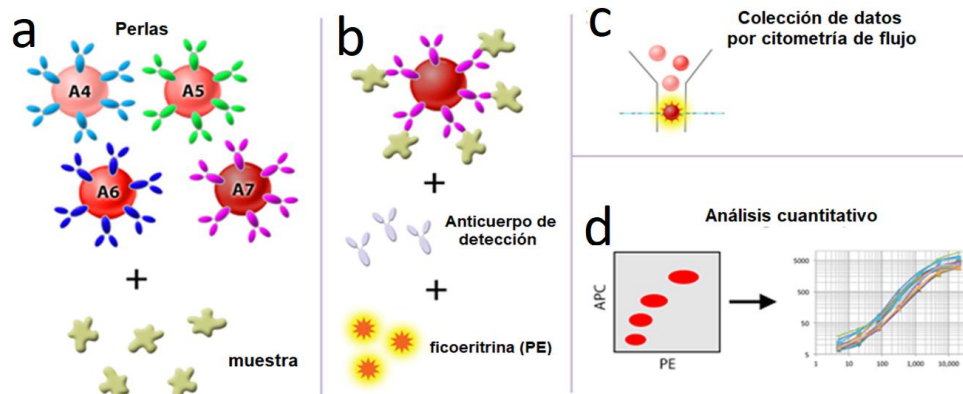


Figura 12. Inmunoensayo basado en microperlas el cual utiliza los mismos principios básicos del ELISA tipo sándwich. a) Distintas poblaciones de perlas y diferentes niveles de fluorescencia de PE, lo que permite ser distinguidas claramente entre sí. Cada conjunto de microesferas se conjuga con un anticuerpo específico en la superficie y sirve como la perla de captura para este analito en particular. Cuando un panel seleccionado de perlas de captura se mezcla entre sí y se incuba con una muestra desconocida que contiene los analitos de interés, cada uno estará unido a su perla de captura específica. **b)** Después del lavado, se añaden anticuerpos de detección y cada uno se unirá a su analito específico fusionado con las perlas de captura, formando así sándwiches perla de captura-analito-anticuerpo de detección. Posteriormente se añade PE que se unirá a los anticuerpos de detección, proporcionando intensidades de señal fluorescente en proporción a la cantidad de analito unido. **c)** Para cada población de microperlas, la intensidad de la señal de fluorescencia de la PE se cuantifica usando un citómetro de flujo. **d)** La concentración de un analito en particular se determina comparándolo con una curva estándar conocida usando el software de análisis de datos LEGENDplex [51].

Prostaglandina E₂

Para la cuantificación de la concentración de Prostaglandina E₂ (PGE₂) secretada, se obtuvieron sobrenadantes a los 4-5 días de los co-cultivos de las diversas condiciones experimentales: BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs y PDL-MSCs con linfocitos CD3⁺ activados y las MSCs en ausencia de CD3⁺ se utilizaron como control. Los sobrenadantes estuvieron almacenados a -80°C hasta su uso.

Para este objetivo se utilizó la técnica Inmunoabsorbente ligado a enzimas por competencia (ELISA por las siglas en inglés de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Invitrogen*), el cual, detecta y cuantifica el nivel de PGE₂ en muestras biológicas, en este caso en sobrenadante. Este ensayo está basado en la competencia entre la prostaglandina PGE₂ y el trazador PGE₂-fosfatasa alcalina (AP por las siglas en inglés de *alkaline phosphatase*) para una cantidad limitada de anticuerpos monoclonales específicos de PGE₂. Debido a la competencia entre PGE₂ en la muestra y el trazador de PGE₂-AP, la señal obtenida con el ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de

PGE₂ en cada muestra. La técnica se realizó sobre una placa de 96 pozos la cual ya tenía acoplada PGE₂ y el procedimiento consistió brevemente en: preparar una curva estándar de PGE₂ mediante diluciones seriales de 0.3 a 4.0 ng/mL. En la placa de 96 pozos se agrega el buffer tris 1x, se agregaron 50 µL los estándares y 100 µL de las muestras, las cuales se cuantificaron por duplicado, se agregaron 50 µL del trazador PGE₂-AP, se agregaron 50 µL del anticuerpo monoclonal humano de PGE₂ excepto en los pozos correspondientes al blanco, posteriormente se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente con agitación por dos horas, se realizaron 5 lavados con el buffer de lavado para eliminar lo no adherente, se agregaron 200 µL de solución con pNPP* en cada pozo, se agregaron 5 µL de AP y se incubaron por 90 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se analizó la placa en un equipo para ELISA (DYNATEC MR5000) a 412nm.

* 4-Nitrofenilofosfato sal disódica (PNPP por las siglas en inglés de *p-Nitrophenyl Phosphate, Disodium Salt*) es un sustrato ampliamente utilizado para detectar AP en aplicaciones de ELISA. Cuando reaccionan AP y PNPP, se forma un producto de reacción soluble en agua de color amarillo.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de un factor, seguido por la prueba Tukey de comparación múltiple para determinar diferencia significativa en la respuesta de proliferación (CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺), así como en los cambios en la expresión de CD4⁺CTLA-4⁺, Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺) y en producción de interleucinas por efecto de las diferentes fuentes de MSCs. Adicionalmente, para determinar si las condiciones de co-cultivo establecen cambio de expresión en PD-L1⁺ y PGE₂ con respecto al grupo control, se utilizó ANOVA de dos factores seguido por la prueba de Tukey para comparaciones múltiples utilizando prueba de hipótesis estadística. Todos los análisis y gráficos se realizaron en Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). El valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

RESULTADOS

1. Las MSCs de tejidos dentales muestran morfología, proliferación, capacidad de diferenciación e inmunofenotipo similar a las MSCs de médula ósea.

Se realizaron experimentos individuales de BM-MSCs (n=5), DP-MSCs (n=5), G-MSCs (n=5) y PDL-MSCs (n=5) para determinar su cinética proliferación (Figura 13), morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica (Figura 14).

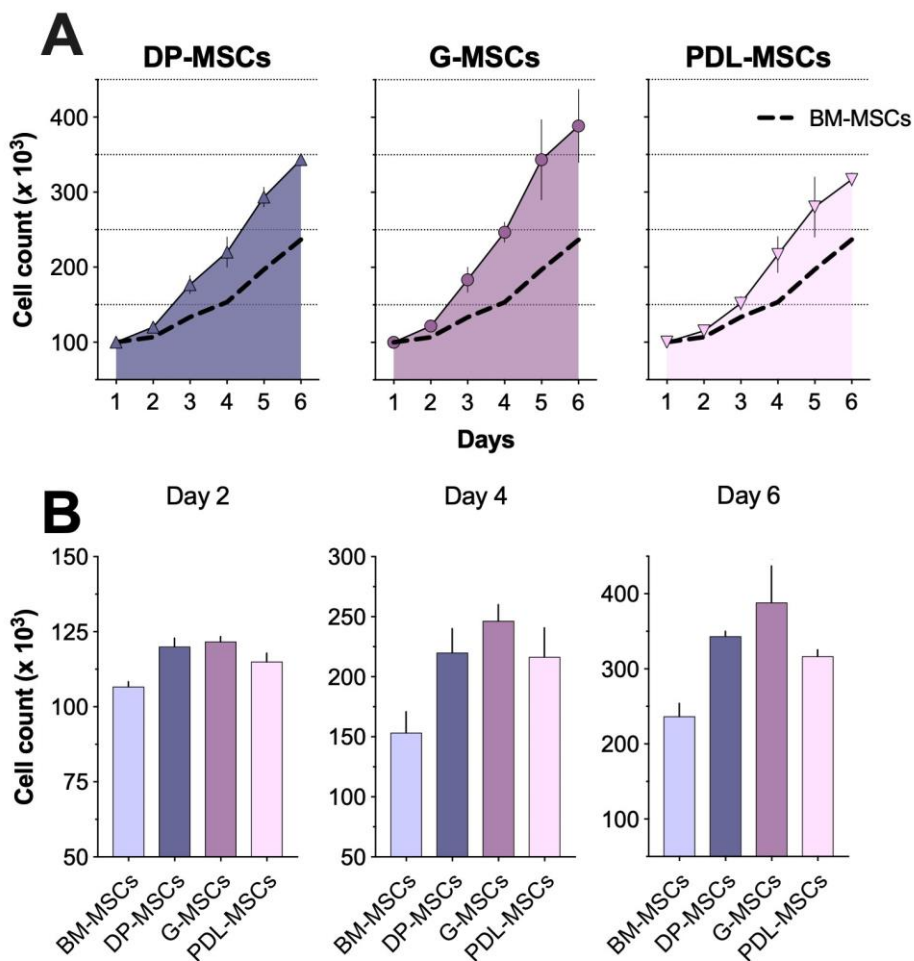


Figura 13. Cinética de proliferación de MSCs provenientes de médula ósea y tejidos dentales. Se sembraron 1×10^3 por pozo de cada una de las fuentes. Las MSCs fueron cosechadas diariamente de los pozos y contabilizadas. a) Los símbolos representan la media \pm SEM de cinco experimentos independientes (n=5) de cada fuente indicada. b) Comparación entre las diferentes fuentes en los días 2, 4 y 6. Los datos se muestran como la media \pm SEM del número de células.

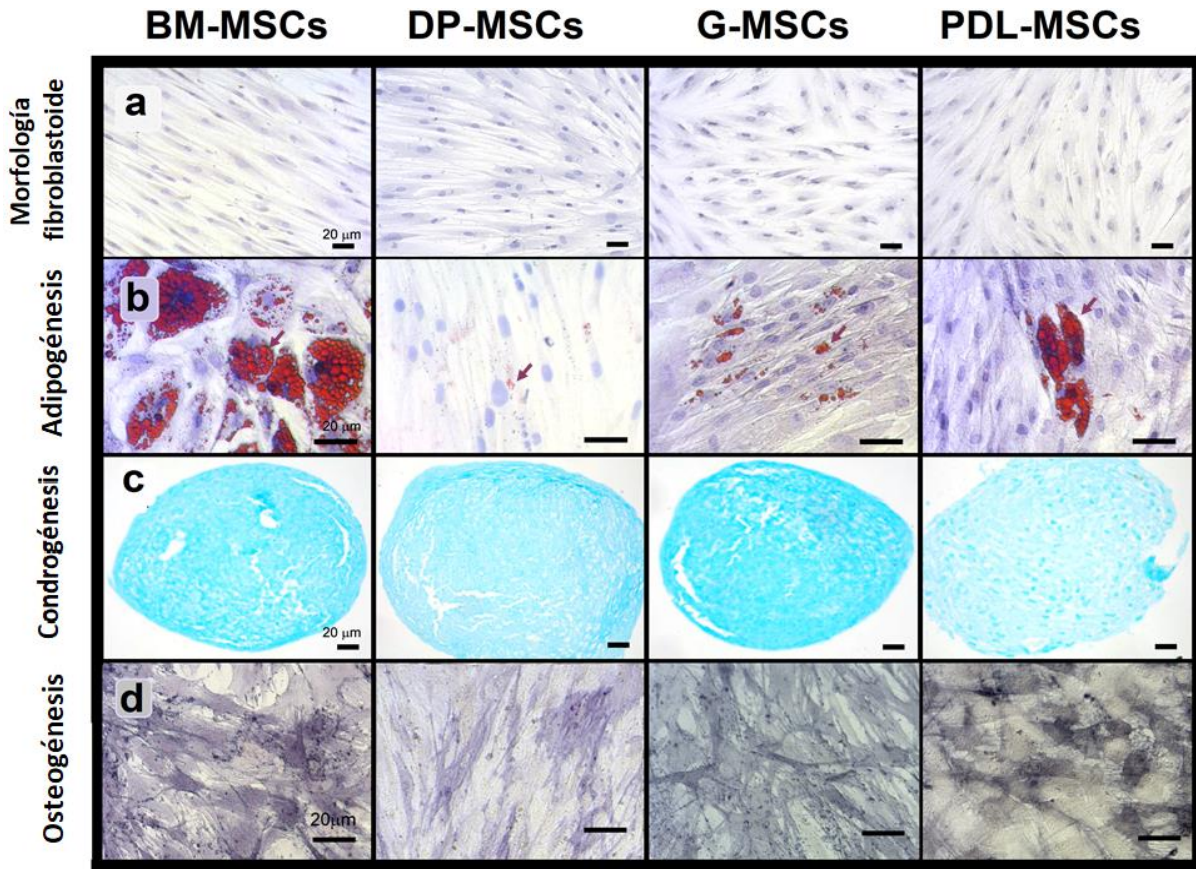


Figura 14. Morfología y capacidad de diferenciación de MSCs provenientes de médula ósea (BM-MSCs) y tejidos dentales (DT-MSCs). MSCs de las cuatro fuentes (BM, n=5; DP, n=5; G, n=5; PDL, n=5). **(a)** Células de morfología fibroblastoide adherentes, observadas en cultivos de las fuentes indicadas (teñidas con azul de toluidina). **(b)** Diferenciación adipogénica (rojo oleoso) a los 21 días de cultivo. **(c)** Diferenciación condrogénica (cultivo celular en micromasa teñido con Azul Alciano) a los 28 días de cultivo y **(d)** Diferenciación osteogénica (expresión de fosfatasa alcalina) a los 21 días de cultivo. Se muestra un experimento representativo y barra de escala indica 20µm.

Respecto a la cinética de proliferación, se observa una mayor tendencia en DT-MSCs con respecto a BM-MSCs; sin embargo, no se identificó diferencia significativa entre estas (Figura 13).

De igual manera, BM-MSCs y DT-MSCs expresaron altos niveles para los marcadores de superficie característicos de MSCs CD105, CD90 y CD73, así como lo establece la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) [35]. De manera interesante, se observó una alta expresión del marcador CD13, como lo hemos publicado previamente para MSCs de otras fuentes [35]. Además, DT-MSCs expresaron niveles moderados de HLA-ABC, fueron negativas para HLA-DR y no expresaron marcadores hematopoyéticos como CD34, CD45 and CD14 o marcadores endoteliales como CD31 (Figura 15). Las MSCs de las cuatro fuentes mostraron morfología fibroblastoide y capacidad de diferenciación a linaje

adipogénico, condrogénico y osteogénico. Sin embargo, en las DP-MSCs no se observaron adipocitos; únicamente células fibroblásticas con puntos positivos para Rojo Oleoso en el citoplasma (Figura 14).

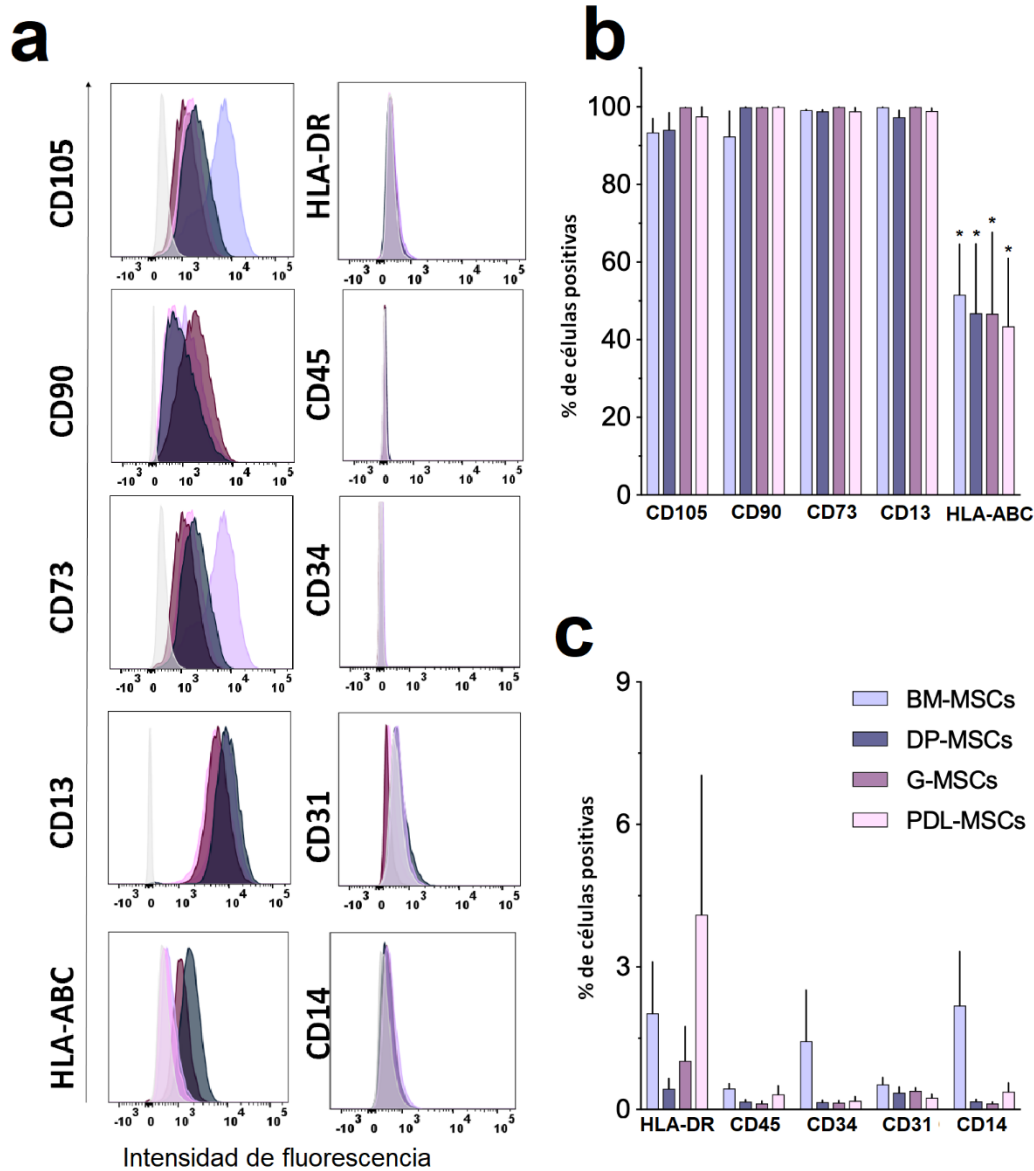


Figura 15. Expresión de marcadores celulares en células troncales mesenquimales de tejidos dentales (DT-MSCs). (a) Histogramas representativos de un experimento (histograma gris: control de isotipo). (b) Los cultivos de DT-MSCs muestran una alta expresión para marcadores de superficie característicos de MSCs (CD105, CD73, CD90 y CD13); moderada expresión para el antígeno leucocitario humano (HLA)-ABC y (c) expresión negativa para marcadores hematopoyéticos (CD45, CD34 y CD14), marcadores endoteliales (CD31) y HLA-DR; médula ósea (BM)-MSCs (n=5), pulpa dental (DP)-MSCs (n=5), tejido gingival (G)-MSCs (n=5) y ligamento periodontal (PDL)-MSCs (n=5). Los resultados representan la media \pm SD de los porcentajes (%) de células positivas para un antígeno particular. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada con CD105, CD73 y CD13.

2. La proliferación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ es inhibida por BM-MSCs y DT-MSCs.

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado la importancia de evaluar la capacidad inmunosupresora de las BM-MSCs sobre poblaciones enriquecidas de células T CD3⁺ en co-cultivos con contacto celular entre ambas poblaciones [50]. Debido a ello, se analizó el efecto de DT-MSCs sobre poblaciones enriquecidas en células T CD3⁺ mediante co-cultivos permitiendo el contacto celular entre ellos. Para esto se aislaron CD3⁺ (pureza ± 97%) y se activaron con anti CD3/CD28 en presencia o ausencia de BM-MSCs, PD-MSCs, G-MSCs o PDL-MSCs (Figura 16).

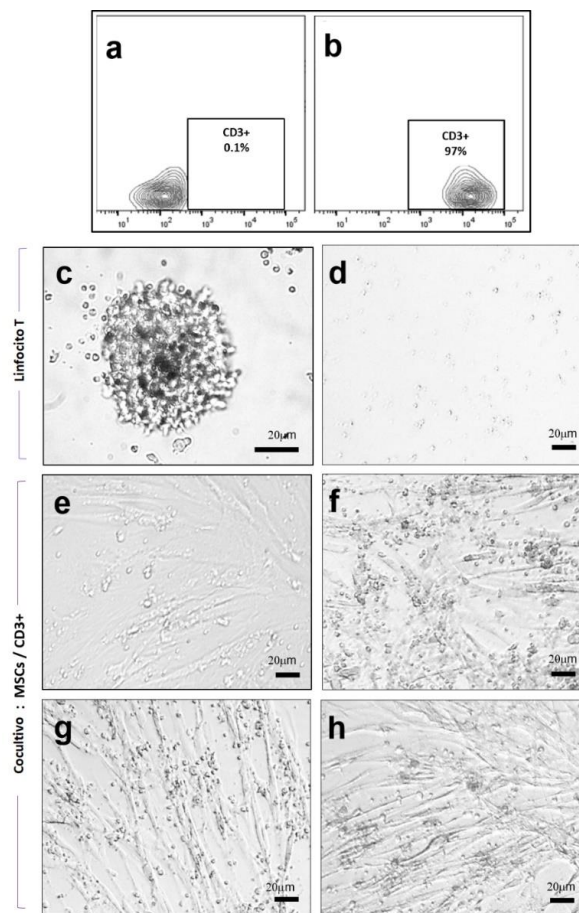


Figura 16. Pureza de células T CD3⁺ y co-cultivos de MSCs/Linfocitos T CD3. (a) Dot plot representativo del porcentaje de células positivas CD3⁺. (b) Dot plot representativo de la pureza (≥97%) de células T CD3⁺ obtenidas de una suspensión por separación con MicroBrads CD3 humanas y columnas MACS MS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Co-cultivos representativos y controles. (c) Células T CD3⁺ activados con anti-CD3/CD28 en ausencia de MSCs (control). (d) Células CD3⁺ no activadas en ausencia de MSCs (control). (e) Co-cultivo de BM-MSCs/ Células CD3⁺ activadas. (f) Co-cultivo de DP-MSCs/ Células CD3⁺ activadas. (g) Co-cultivo de G-MSCs/ Células CD3⁺ activadas. (h) Co-cultivo de PDL-MSCs/ Células CD3⁺ activadas. Barra de escala indica 20 μm.

Los niveles de proliferación resultantes en la condición de cultivo de linfocitos CD3⁺ activados se consideraron 100% de activación y los niveles de proliferación resultantes de los co-cultivos de MSCs con CD3⁺ activados se normalizaron a este control.

Como se observa en la (Figura 17a,b), BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs, y PDL-MSCs reducen la proliferación de células T CD3⁺ ($83.39\% \pm 12.54\%$, $80.05 \pm 10.42\%$, $83.93 \pm 7.74\%$, y $77.5\% \pm 16.91$, respectivamente; $p < 0.05$), células T CD4⁺ ($77.75\% \pm 16.17\%$, $78.11\% \pm 10.52\%$, $78.88\% \pm 9.25\%$, y $74.79\% \pm 16.76\%$, respectivamente; $p < 0.05$) y células T CD8⁺ ($80.25\% \pm 14.46\%$, $75.25\% \pm 10.63$, $77.84\% \pm 10.23\%$, y $70.50\% \pm 16.02\%$, respectivamente; $p < 0.05$). Estos resultados sugieren que BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs, y PDL-MSCs tienen una capacidad similar para inhibir la proliferación de células T (Figura 17d).

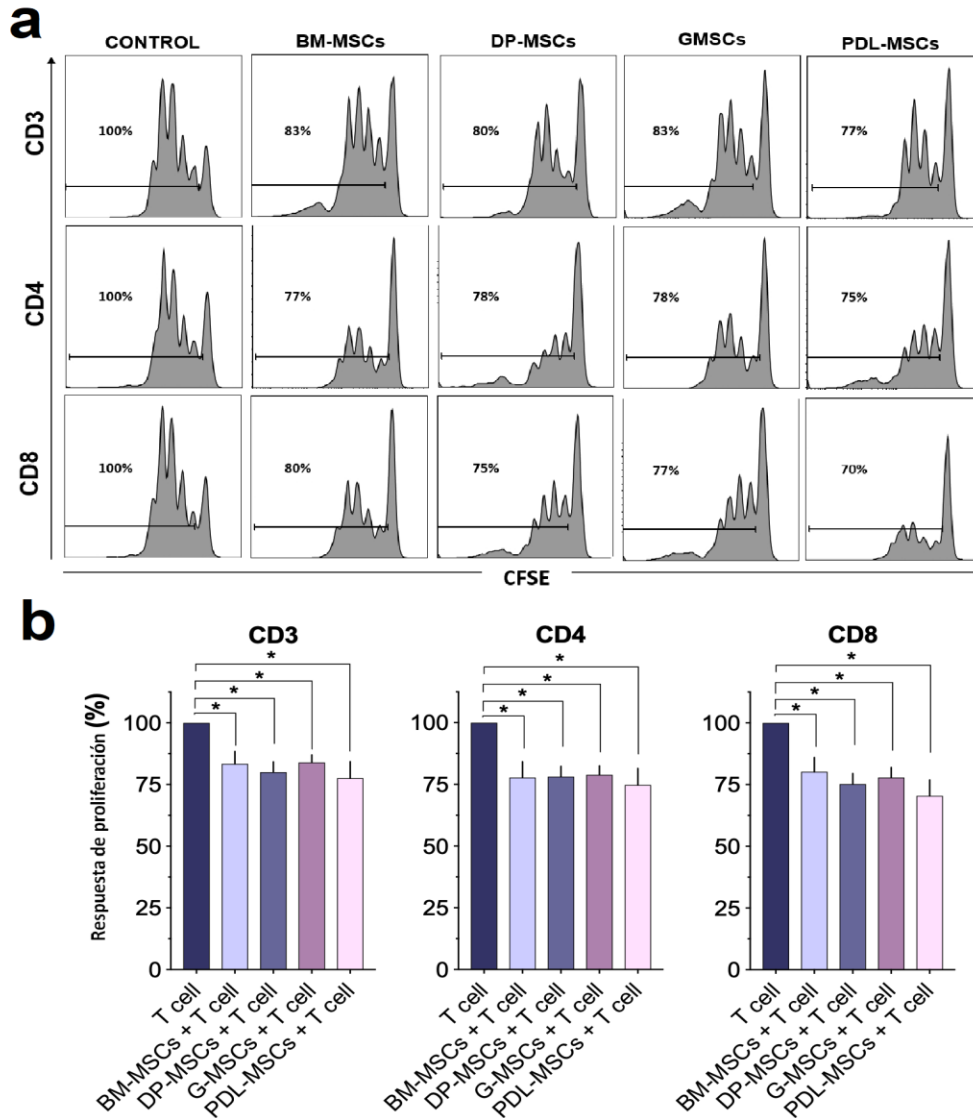


Figura 17. BM-MSCs y DT-MSCs disminuyen de manera similar la proliferación de células T. Las células CD3⁺ fueron activadas con anti-CD3/CD28 y co-cultivadas en presencia de BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs o PDL-MSCs a una relación de 1:1 de MSCs:CD3⁺. El porcentaje de proliferación de células CD3⁺ activados en ausencia de MSCs, se consideró como el control positivo (100% de proliferación; n=5). El porcentaje de incorporación de CFSE (éster de succinimidil-carboxifluoresceína) fue determinado en las poblaciones CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ a los 4 días de cultivo. **(a)** Histogramas representativos de un experimento. **(b)** Los datos se muestran como la media ± SEM del porcentaje de proliferación (n=5, experimento individual). *Diferencia estadísticamente significativa con p<0.05.

3. Incremento de moléculas inmunosupresoras CTLA-4 y PD-L1.

Estudios previos han demostrado que en un sistema de co-cultivo de CD3⁺ con BM-MSCs se observa un incremento de la expresión de CTLA-4 sobre linfocitos T CD4⁺ favoreciendo la inmunosupresión [27]. Con este antecedente se decidió analizar la expresión de CTLA-4 en

CD4⁺ después de 4-5 días de co-cultivo con DT-MSCs para determinar si esta molécula participa en la disminución de la proliferación observada en los LT. Se realizaron co-cultivos con BM-MSCs como controles, determinando el porcentaje de células CD4⁺ CTLA-4 y las veces de incremento de la intensidad media de fluorescencia (MFI por las siglas en inglés de *mean fluorescence intensity*), la cual determina la expresión de CTLA-4 en un LT CD3⁺CD4⁺ (Figura 18a-c).

En los co-cultivos de BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs y PDL-MSCs se observó un incremento significativo del porcentaje de células CD4⁺CTLA-4⁺ (61% ± 22, 70% ± 9.73, 85% ± 8.04 y 68% ± 7.12, respectivamente) con respecto al obtenido con el control (11% ± 2.63; $p < 0.05$.) (Figura 18a y b). No hubo diferencias significativas en las veces de incremento entre los co-cultivos de MSCs de las distintas fuentes (Figura 18b).

Por otra parte, de manera similar, observamos un incremento significativo en la intensidad media de fluorescencia de CTLA-4⁺ en LT cocultivados con BM, PD, G y PDL (2.93-, 2.80-, 3.02- y 2.85-veces de incremento respectivamente; $p < 0.05$), sin diferencias entre LT cocultivados con MSCs de las diferentes fuentes (Figura 18c). Estos resultados sugieren que la presencia de DT-MSCs similarmente a BM-MSCs, promueven el incremento de la expresión de CTLA-4⁺ en células T y que esta molécula puede contribuir a la reducción de la proliferación de dichas células T en co-cultivos.

Con respecto a la participación de la molécula PD-L1 en la inmunosupresión, estudios previos determinaron que PD-L1 se expresa en la superficie de las BM-MSCs y que a través del contacto directo con LT puede repercutir en la disminución de su proliferación *in vitro* [27]. Debido a ello, se decidió evaluar la expresión de PD-L1 en DP-MSCs, G-MSCs y PDL-MSCs y comparar su expresión con BM-MSCs *in vitro* (Fig. 18d-f). El porcentaje de células CD3⁺CD90⁺PD-L1⁺ y las veces de incremento de la intensidad media de fluorescencia de PD-L1⁺ en MSCs cultivadas en ausencia de LT fueron considerados como expresión basal. Los resultados mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$) en la expresión basal de PD-L1⁺ en las DP-MSCs (CD3⁺CD90⁺PD-L1⁺; 40% ± 5.3) en comparación con las MSCs de las otras fuentes (BM: 8.1% ± 6.02; G: 5.4% ± 1.5; PDL: 16.9 ± 16.3). La presencia de LT activados en los co-cultivos incrementa significativamente ($p < 0.05$) el porcentaje de PD-L1⁺ en las MSCs de todas las fuentes: BM (32.7% ± 14.9), DP (53.5% ± 8.7), G (33.6% ± 14.6) y PDL (36.9% ± 16.13) (Figura 18d y e). Aunque se observó una tendencia en el aumento del porcentaje en la expresión de PD-L1 en DP-MSCs, no hubo diferencias significativas con respecto a MSCs de las otras fuentes.

Así mismo, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) de PD-L1 observado en las veces de incremento de la intensidad media de fluorescencia en los co-cultivos con DT-MSCs: DP (1.82-fold), G (1.32-fold) y PDL (1.50-fold) y no así con BM (1.03-fold) (Figura 18f).

De manera interesante la diferencia en el incremento en la expresión de PD-L1 en DP-MSCs fue significativa ($p < 0.05$) con respecto a las demás fuentes. Estos resultados evidencian una mayor expresión de PD-L1 en las MSCs provenientes de DP con respecto a aquellas provenientes de BM, G y PDL, lo cual podría sugerir diferencias en los mecanismos de inmunosupresión de LT por parte de las DP-MSCs con respecto a las otras fuentes.

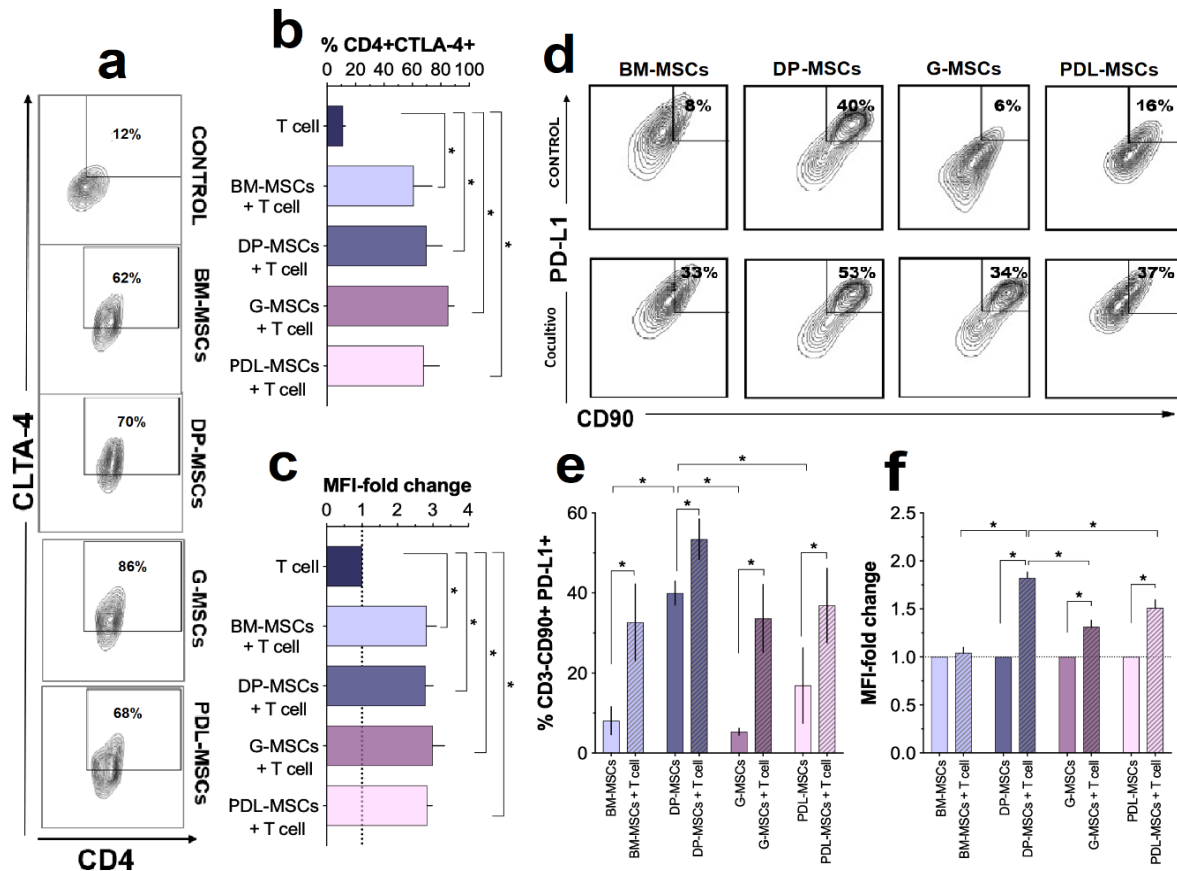


Figura 18. Incremento de la expresión de CTLA-4 en LT CD4⁺ y de PD-L1 en MSCs. Linfocitos T CD3⁺ fueron activados con Anti-CD3/CD28 y co-cultivados en presencia de BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs o PDL-MSCs. La expresión de CTLA-4 en células CD3⁺CD4⁺ cultivadas en ausencia de MSCs fue considerada como la expresión basal. El porcentaje de células CD3⁺CD4⁺CTLA-4⁺ y las veces de incremento de CTLA-4, fueron determinados en la población CD4⁺ después de 4-5 días de cultivo ($n=5$). **(a)** Dot plots representativos de un experimento de la población CD3⁺CD4⁺CTLA-4⁺. **(b)** Los datos se muestran como la media \pm SEM del porcentaje de CD4⁺CTLA-4⁺. **(c)** las veces de incremento de CTLA-4⁺.

El valor de la expresión de PD-L1 en MSCs cultivadas en ausencia de LT CD3⁺ activados, fue considerado como basal. El porcentaje de PD-L1⁺ y las veces de incremento de PD-L1⁺ fueron determinados en la población CD3-CD90⁺ después de 4-5 días de cultivo ($n=5$). **(d)** Dot plots representativos de un experimento de la población CD3-CD90⁺PD-L1⁺. **(e)** Los datos se muestran como la media \pm SEM del porcentaje de CD3-CD90⁺PD-L1⁺ y **(f)** las veces de incremento de PD-L1 en la población CD3-CD90⁺PD-L1⁺. *Indican diferencia estadísticamente significativa con $p < 0.05$.

4. Secreción de Citocinas y PGE₂ en co-cultivos de MSCs

Estudios previos han demostrado la importancia de la presencia de INF- γ y TNF- α [11] para la inducción de propiedades inmunosupresoras de las BM-*MSCs*. Con relación a la disminución de la proliferación observada, podría estar relacionada con la presencia de citocinas inmunosupresoras tipo-Th2 como IL-4 e IL-10 [11]. Con base en lo anterior, se evaluó la presencia de citocinas que podrían estar involucradas en la activación de la respuesta inmunosupresora de las *MSCs* (INF- γ y TNF- α) y en la disminución de la proliferación de LT (IL-4 e IL-10). La concentración de citocinas detectadas en el medio condicionado de células T activadas y cultivadas en ausencia de *MSCs*, fue considerada como control. Se detectaron concentraciones de TNF- α e INF- γ en todos los medios condicionados de los co-cultivos con *MSCs* (Figura 19a). Sin embargo, únicamente en aquellos provenientes de DP-*MSCs* y G-*MSC* se observaron disminuciones significativas para TNF- α (15.53 pg/mL \pm 1.88 y 14.55 pg/mL \pm 0.35, respectivamente; $p < 0.05$) en comparación con el control (42.60 pg/mL \pm 14.56).

Por otra parte, en los niveles de INF- γ se observó una tendencia a incrementar la concentración de esta citocina en los co-cultivos de tejidos dentales, sin embargo, no fue estadísticamente significativa (Figura 19a). En contraste, se observaron altas concentraciones de IL-10 ($p < 0.05$) en los medios condicionados provenientes de co-cultivos con DP-*MSCs* (17.37 pg/mL \pm 3.99), G-*MSCs* (12.65 pg/mL \pm 2.99) y PDL-*MSCs* (16.09 pg/mL \pm 3.07), comparadas con aquellas de BM-*MSCs* (7.54 pg/mL \pm 0.12) y control (7.35 pg/mL \pm 0.18) (Figura 19a). De manera interesante y contrario a lo observado para IL-10, se detectó una mayor concentración de IL-4 ($p < 0.05$) en co-cultivos con BM-*MSCs* (57.95 pg/mL \pm 24.26) en comparación con aquellos con DP-*MSCs* (23.74 pg/mL \pm 7.57), G-*MSC* (22.75 pg/mL \pm 4.44) y PDL-*MSCs* (43.75 pg/mL \pm 7) (Figura 19a); estos resultados sugieren que la presencia de TNF- α e INF- γ inducen de manera diferencial la secreción de citocinas inmunosupresoras en DT-*MSCs* en comparación con BM-*MSCs*, siendo IL-4 preferentemente producida en los co-cultivos en presencia de estas últimas, mientras que IL-10 se estaría produciendo preferencialmente en aquellos con DT-*MSCs*, lo cual se podría relacionar con mecanismos distintos de inmunosupresión mediada por citocinas entre ambos tipos de *MSCs*.

De igual manera, la PGE₂ es una molécula que participa en la inhibición de la proliferación de LT, estimula la secreción de IL-4 e IL-10 y promueve la diferenciación hacia Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ [52]. Se ha demostrado que BM-*MSCs* secretan PGE₂ en respuesta al estímulo de INF- γ [14] y dado que detectamos la presencia de INF- γ en todos los co-cultivos, decidimos evaluar la concentración de PGE₂ en el sobrenadante de las *MSCs* cultivadas en ausencia y presencia de LT activados. La concentración de PGE₂ detectada

en el medio condicionado de MSCs cultivadas en ausencia de LT activados, fue considerada como la expresión basal de esta molécula. Observamos que la secreción basal de PGE₂ por parte de DT-MSCs (DP-MSCs: 9.77 ± 2.79 ng/mL, G-MSCs: 9.71 ± 2.22 ng/mL, y PDL-MSCs: 6.89 ± 1.55 ng/mL) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) a la secretada por BM-MSCs (0.34 ± 0.31 ng/mL); (Figura 19b). Sin embargo, en presencia de LT activados, las BM-MSCs aumentaron de manera significativa ($p < 0.05$) la secreción de PGE₂ (11.55 ng/mL \pm 1.29), no obstante este valor fue similar al observado en las DT-MSCs bajo condiciones similares (DP-MSCs: 12.39 ± 2.99 ng/mL, G-MSCs: 12.12 ± 1.49 ng/mL, y PDL-MSCs: 12.66 ± 2.44 ng/mL), (Figura 19b). Estos resultados indican diferencias en la secreción basal de PGE₂ entre las BM-MSCs y DT-MSCs; sin embargo, en presencia de LT activados, esta secreción se incrementa en BM-MSCs y alcanza valores similares a DT-MSCs, lo cual indica que esta molécula podría estar involucrada en la inhibición de la proliferación de LT activados en los co-cultivos.

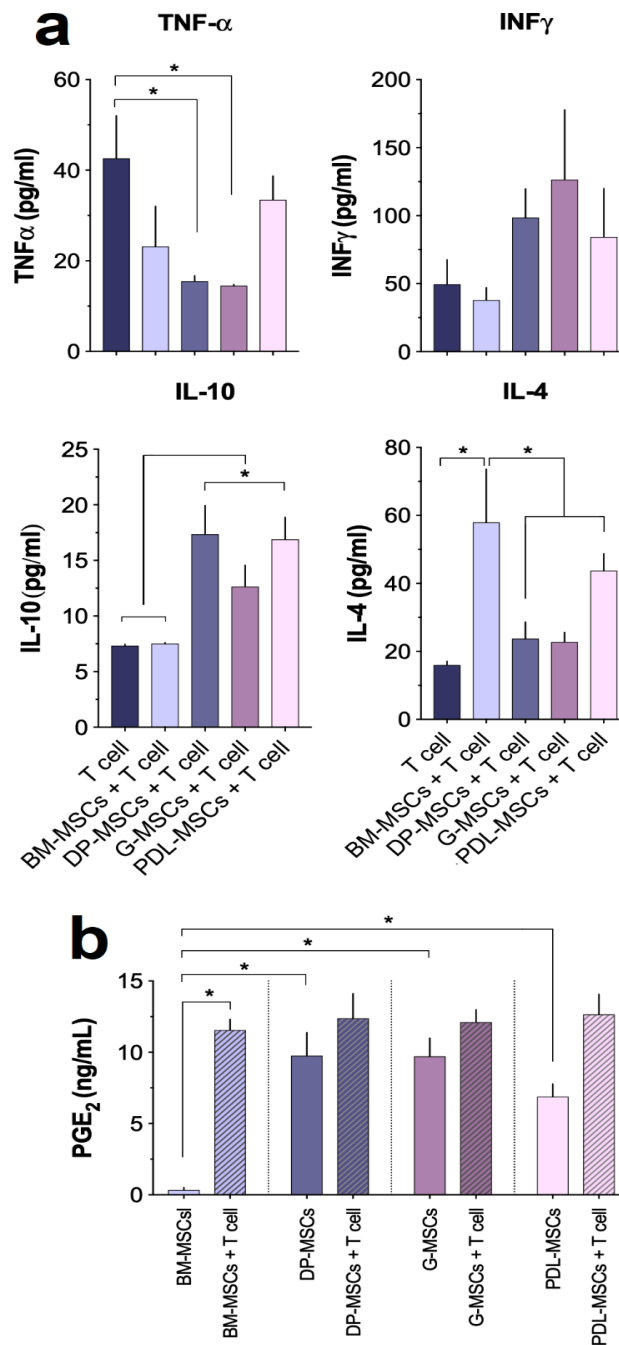


Figura 19. Expresión diferencial de moléculas inmunosupresoras en co-cultivos con BM-MSCs y DP-MSCs. LT CD3⁺ activados con Anti-CD3/CD28 y cultivadas en presencia o ausencia de BM-MSCs o DP-MSCs o G-MSCs o PDL-MSCs. Después de 4-5 días de co-cultivo se colectó y se determinó en el medio condicionado la presencia de TNF- α , INF- γ , IL-10 e IL-4 mediante Cytometric Bead Array y en el caso de PGE₂ por ELISA. **(a)** La concentración de citocinas detectada en el medio condicionado de LT CD3⁺ en ausencia de MSCs, fue considerado como expresión basal TNF- α , INF- γ , IL-10 e IL-4. **(b)** mientras que para PGE₂ fueron las concentraciones detectadas en el medio condicionado de MSCs cultivadas en ausencia de LT CD3⁺. *Indican diferencia estadísticamente significativa con p<0.05.

5. MSCs de tejidos dentales inducen similarmente la generación de células T reguladoras

Diversos estudios han demostrado que moléculas como IL-10, IL-4 y PGE₂ están involucradas en la inducción de diferenciación a poblaciones de células T reguladoras [28, 53, 54]. Así mismo, estudios anteriores demostraron que el aumento en los niveles de estos mediadores en co-cultivos de BM-MSCs, los cuales están relacionados con la inhibición de la proliferación de LT CD4⁺ y CD8⁺ y el incremento de la frecuencia de CD4⁺CTLA-4⁺, por tal motivo, se decidió evaluar si estos hallazgos están relacionados con la generación de Tregs CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ y/o CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Figura 20a-c). Para ello se obtuvieron las poblaciones de LT de los co-cultivos y se determinó el porcentaje y las veces de incremento de la intensidad media de fluorescencia de Foxp3⁺ y/o células CTLA-4⁺ dentro de la fracción CD4⁺CD25⁺, los LT activados en ausencia de MSCs se consideraron como control. Los resultados demuestran que la presencia de MSCs de todas las fuentes incrementan de manera significativa ($p < 0.05$) el porcentaje de la población CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (BM-MSCs: 4.13% \pm 1.22; DP-MSCs: 4.64% \pm 1.30; G-MSCs: 3.77% \pm 0.81 y PDL-MSCs: 3.33% \pm 1.25) con respecto al control (0.54% \pm 0.37) (Figura 20a y b). (Figura 20a y b).

Resultados similares se apreciaron con las cuatro fuentes de MSCs respecto a la generación de la población de células reguladoras CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺, dado que su presencia incrementa de manera significativa ($p < 0.05$) observado en porcentaje y las veces de incremento de la intensidad media de fluorescencia de esta población (BM-MSCs: 32.30% \pm 7.03; DP-MSCs: 31% \pm 5.71, G-MSCs: 35.33% \pm 10.87 y PDL-MSCs: 28.55% \pm 7.3) con respecto al control (3.23% \pm 0.8); (Figura 20c).

Estos resultados indican que DT-MSCs y BM-MSCs, tienen capacidad similar para generar poblaciones con fenotipos reguladores y que dichas poblaciones pueden estar involucradas en la disminución de la proliferación de LT.

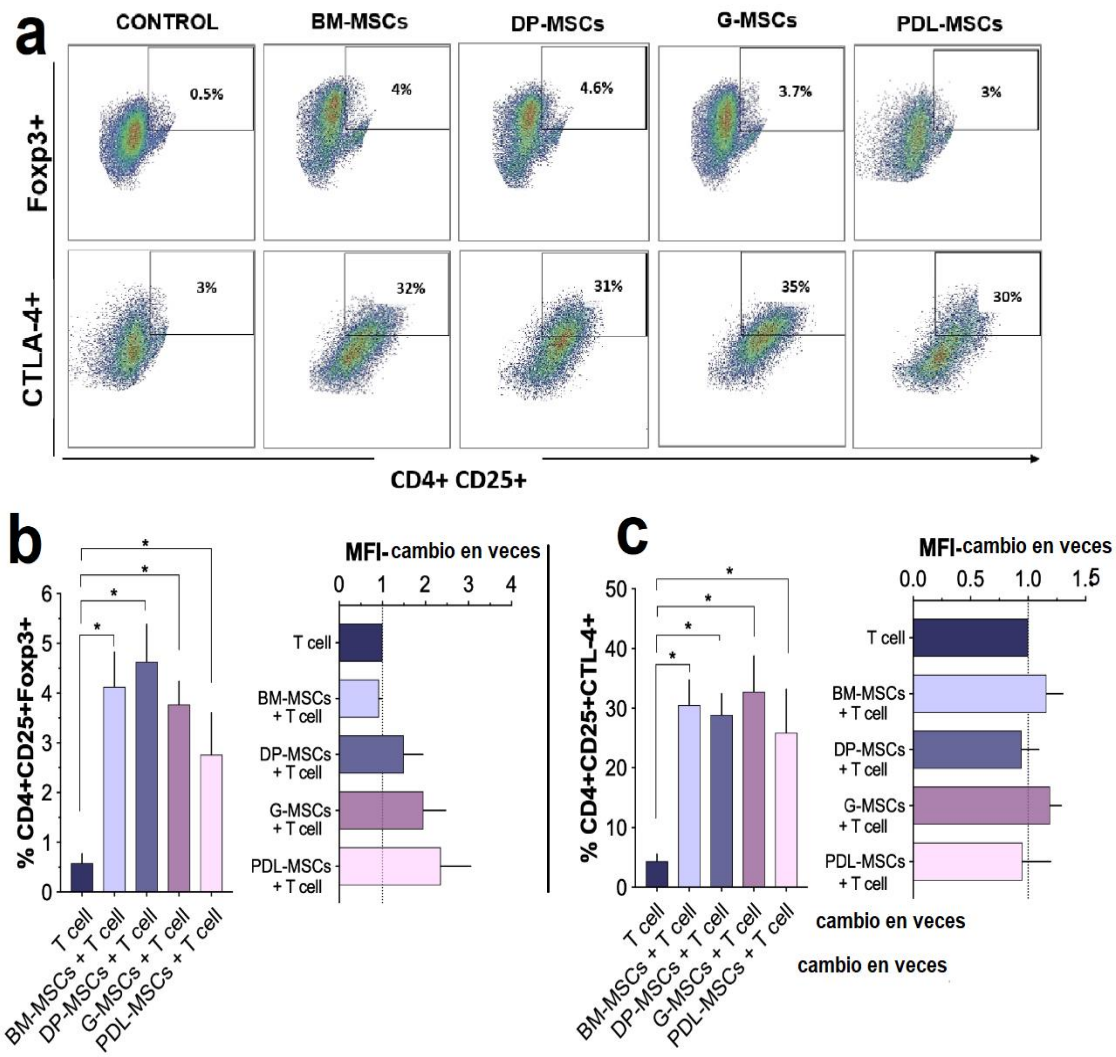


Figura 20. MSCs de tejidos dentales inducen de manera similar la generaci3n de subpoblaciones de fenotipo regulador. LT CD3⁺ activados con anti-CD3/CD28 fueron cocultivados en ausencia y presencia de BM-MSCs o DP-MSCs o G-MSCs o PDL-MSCs, (n=5). La media porcentual de c3lulas Fcpx3⁺ y CTLA-4⁺, junto con las veces de incremento de la intensidad media de fluorescencia de Fcpx3⁺ y CTLA-4⁺, fueron determinados en la poblaci3n CD4⁺CD25⁺ despu3s de 4-5 d3as de cultivo. Las poblaciones CD4⁺CD25⁺Fcpx3⁺ y CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ determinadas a partir de los cultivos en ausencia de MSCs fueron considerados como control. **(a)** Dot plots representativos de un experimento. **(b)** Los datos se muestran como la media \pm SEM del porcentaje de CD4⁺CD25⁺Fcpx3⁺ y las veces de incremento de la intensidad media de fluorescencia de Fcpx3⁺ en la poblaci3n CD4⁺CD25⁺. **(c)** Los datos se muestran como la media \pm SEM del porcentaje de CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ y las veces de incremento de la intensidad media de fluorescencia de CTLA-4⁺ en la poblaci3n CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺. *Indican diferencia estad3sticamente significativa con p<0.05.

DISCUSIÓN

Actualmente las BM-MSCs debido a su capacidad inmunorreguladora han sido utilizadas como tratamiento en GVHD, una patología en donde los LT del donador son las principales células efectoras que participan en la respuesta inmune en contra de los tejidos del huésped [55]. Las BM-MSCs son las más utilizadas en protocolos clínicos, sin embargo, presentan la desventaja de ser obtenidas mediante procedimientos invasivos [10]. Por su parte, se ha evidenciado la presencia de MSCs en tejidos dentales [56, 57], las cuales se pueden obtener a través de técnicas de aislamiento mínimamente invasivas e incluso con una adecuada capacidad proliferativa para su expansión [58]. Distintos grupos de investigación han hecho estudios *in vitro* con MSCs provenientes de diferentes fuentes de tejidos dentales y han reportado efectos inmunosupresores en aquellas obtenidas de DP [59], G [60] y PDL [61], sin embargo, los mecanismos por los cuales ejercen estas funciones no se han establecido claramente y a la fecha no hay un estudio que bajo idénticas condiciones de cultivo compare las propiedades biológicas de las MSCs de dichas fuentes y determine cuál de ellas es la de mayor capacidad inmunorreguladora y que mecanismos están asociados en ello y más aún, si comparten propiedades inmunorreguladoras a las BM-MSCs para determinar si pueden ser consideradas como fuentes alternativas de MSCs para su uso en protocolos clínicos.

En este estudio evidenciamos que BM-MSC, DP-MSCs, G-MSCs y PDL-MSCs cumplieron con los criterios establecidos por la ISCT [35] con respecto a morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica [62, 63], sin embargo, observamos un potencial de diferenciación adipogénico disminuido en PD-MSCs en comparación con las otras fuentes, dada la detección de pequeñas vacuolas dentro del citoplasma de células con morfología fibroblastoide, lo cual coincide con lo que previamente reportamos para MSCs de Cérvix [64]. De hecho, también se ha reportado que algunas fuentes de MSCs como SCU y tejido adiposo presentan diferenciación adipogénica disminuida o nula [50, 65].

Estudios previos han establecido efectos inmunorreguladores de las BM-MSCs *in vitro* en sistemas de co-cultivo con células mononucleares totales de sangre periférica [66] o en reacción mixta de linfocitos [66, 67], de hecho este mismo sistema se ha empleado con MSCs provenientes de DP [59], G [60] y PDL [61], sin embargo, pocos estudios han analizado dicho efecto sobre una población enriquecida de LT CD3⁺ [68, 69], lo cual es importante en el contexto de GVHD, dado que esta población efectora es la de mayor trascendencia en esta enfermedad [55]. Para evaluar ello, analizamos el efecto inmunosupresor de DT-MSCs

sobre una población enriquecida de LT CD3⁺. Observamos que DT-MSCs fueron capaces de disminuir la proliferación de LT CD3⁺ activados con anti-CD3/CD28; resultados similares fueron obtenidos previamente por nuestro grupo con BM-MSCs [21]. Cuando fueron examinadas si las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ son igualmente afectadas por DT-MSCs, se encontró que todas reducen significativamente la proliferación de ambas. Estos resultados son consistentes con investigaciones previas, en las cuales se ha observado que PD-MSCs, G-MSCs y PDL-MSCs tienen capacidades inmunosupresoras sobre PBMC activadas con PHA [59-61]. G-MSCs son las células de tejidos dentales más estudiadas principalmente por sus efectos en la regeneración de tejidos en cirugía maxilofacial [57] y han demostrado disminuir la proliferación de células T en modelos *in vitro* e *in vivo*, además de incrementar la población de Tregs en articulación, bazo y sangre periférica, así como disminuir la población Th17 y la producción de citocinas proinflamatorias [70]. Así mismo, se sabe que PD-MSCs [59], G-MSCs [68] y PDL-MSCs [61] son capaces de disminuir la proliferación de células T vía TGF- β *in vitro* [59] y por inducción de apoptosis vía (FasL)/Fas *in vivo* [71], así como también en el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) (Gu et al, 2016). Los resultados del presente trabajo demuestran por primera vez que, bajo condiciones de cultivo idénticas, BM-MSC, PD-MSCs, G-MSCs y PDL-MSCs tienen el mismo potencial para inmunosuprimir linfocitos T CD3⁺ activados con anti-CD3/CD28.

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que las BM-MSCs tienen capacidad inmunorreguladora sobre células T, mediante el contacto celular directo entre ambas poblaciones a través de la participación de moléculas de membrana [21], sin embargo, este aspecto se desconoce para el caso de DT-MSCs. Debido a ello evaluamos algunas moléculas de membrana involucradas en el mecanismo de regulación inmune tanto en DT-MSCs como en linfocitos T CD3⁺. En este sentido, se sabe que la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en MSCs, favorecen la disminución de la proliferación en esplenocitos activados con anticuerpos anti-CD3 [72] y además, ambas moléculas de adhesión tienen la capacidad de inducir la expresión de CTLA-4, relacionado con la acción inmunosupresora y a su vez con la inhibición de la proliferación de linfocitos T [73, 74]. Los resultados del presente estudio evidenciaron que después de 4-5 días de cultivo, se incrementa significativamente la expresión de CTLA-4 en LT de co-cultivos con MSCs de las cuatro fuentes y esto coincide con la disminución de la proliferación de LT, sugiriéndose la participación de poblaciones de Tregs CTLA-4⁺ para ejercer este proceso inhibitorio. Dichas observaciones son consistentes con investigaciones previas, en las cuales se ha observado que BM-MSCs, UCB-MSCs y PL-MSCs tienen capacidades inmunosupresoras mediante el incremento de CTLA-4 en co-cultivos con LT CD3⁺ [21, 75].

Asimismo, la disminución de la proliferación de LT en co-cultivos con MSCs, puede estar relacionada con la expresión de la molécula PD-L1, la cual está involucrada en la inmunosupresión mediada por MSCs a través del mecanismo dependiente de contacto celular [23], de hecho la vía de señalización PD-L1/PD-1 se considera un "immune checkpoint" en terapia para inflamación y cáncer [76]. Actualmente sólo se ha reportado presencia de PD-L1 en PD-MSCs [77] y esto podría estar relacionado a que los tejidos dentales se encuentran expuestos a reto inmunológico constante, por lo cual los mecanismos de tolerancia se encuentran aumentados, como en el caso de la periodontitis, patología oral más frecuente causada por infecciones bacterianas, la cual se ha sugerido puede resolverse por efecto de PD-L1 regulando negativamente la inflamación y manteniendo de esta forma al tejido periodontal bajo constante tolerancia inmunológica [77].

Por otro lado, se sabe que PD-L1 reprime la maduración de Th17 y favorece la diferenciación a Tregs CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ [78]. Este es uno de los principales mecanismos por el cual las MSCs se consideran no inmunogénicas y establecen la razón de la terapéutica en enfermedades inmunomediadas GVHD, encefalomielititis autoinmune, enfermedad de esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn y cirrosis, entre otras [79, 80]. Nuestros resultados demuestran que bajo las condiciones de co-cultivo estudiadas, las MSCs de las cuatro fuentes incrementaron de manera significativa los niveles de expresión de PD-L1 con respecto a su estado basal. Resultados similares se han observado en BM-MSCs, UCB-MSCs y PL-MSCs [21] y gelatina de Wharton [81]. Cabe destacar que DP-MSCs presentan constitutivamente mayores niveles de PD-L1 con respecto a las demás fuentes e incluso mayor expresión de moléculas posterior al co-cultivo con células T activadas, lo cual es algo interesante que estamos estudiando y que podría estar relacionado con una firma genética diferente a las otras MSCs evaluadas. Así, en este estudio se observa por primera vez que bajo las mismas condiciones de co-cultivo, BM-MSC, DP-MSCs, G-MSCs y PDL-MSCs tienen potencial de aumentar la expresión membranar de PD-L1, así como de CTLA-4 sobre células T CD3⁺ activadas con anti-CD3/CD28 y ambos mecanismos participar en la disminución de la proliferación observada en estos últimos.

Se ha demostrado que IFN γ and TNF- α estimulan la síntesis de moléculas comoIDO, PGE₂ y PD-L1 en MSCs [23] y con ello favorecen el efecto inmunosupresor de estas células (Polchert et al, 2008). Debido a ello decidimos analizar la expresión de ambas citocinas en los sobrenadantes de los co-cultivos de cada una de las fuentes de MSCs. Estudios previos sugieren que IFN γ and TNF- α estimulan la secreción de IDO en MSCs de placenta [82] y de diente decidual exfoliado (SHED, por las siglas en inglés de *Human Exfoliated Deciduous*

Teeth) [83]. Esta enzima depleta el triptófano catalizando su degradación a lo largo de la vía de degradación de kynurenina (KYN) y tanto la reducción de la concentración local de triptófano como la generación de metabolitos de KYN contribuyen a los efectos inmunoreguladores deIDO. La expresión deIDO en células presentadoras de antígeno (APCs), se ha sugerido para inducir la secreción de IL-10 por Tregs [84] y consecuentemente esto promueve la inhibición de la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺[83].

Ciertos estudios sugieren que un estímulo inflamatorio, a través de IFN γ , TNF- α , CoX-2 eIDO, es un requisito previo para que las MSCs presenten propiedades inmunosupresoras [85]. Nuestros resultados mostraron la presencia de IFN- γ y TNF- α en los co-cultivos y como se ha descrito en otros estudios con BM, UCB, PL, AT y Wharton's jelly, se observó que aún a pesar de una baja producción de IFN- γ y TNF- α , las concentraciones detectadas son suficientes para estimular la capacidad inmunosupresora en las MSCs y así ejercer inhibición de la proliferación de LT [23, 86].

De igual manera la disminución de la proliferación de LT observada en los co-cultivos podría estar relacionada con la presencia de citocinas inmunosupresoras. Se ha observado que la activación de LT en presencia de BM-MSCs induce la secreción de citocinas antiinflamatorias Th2 (IL-4 e IL-10). Además, TNF- α en combinación con IFN- γ incrementa la inmunosupresión mediada por MSCs al favorecer la secreción de otras moléculas inmunosupresoras como PGE₂ [87]. Por lo cual, debido al patrón observado de producción de IFN- γ y TNF- α en los sobrenadantes de los co-cultivos, decidimos analizar también la presencia de IL-10, IL-4 y PGE₂. Nuestros resultados demostraron que hay un incremento significativo en la expresión de IL-4 en BM-MSCs en comparación con DT-MSCs, esto sugiere que las MSCs de tejidos dentales podrían no tener la capacidad de generar una respuesta tipo Th2. El incremento en IL-4 se ha reportado favorece la diferenciación a Tregs [88]. Por su parte y contrario a los niveles detectados de IL-4, observamos aumento significativo en la producción de IL-10 en los co-cultivos de DT-MSCs en comparación con aquellos de BM; dichas observaciones son consistentes con investigaciones previas, en las cuales se ha determinado que AT-MSCs tienen capacidades inmunosupresoras mediante el incremento de IL-10 *in vitro* e *in vivo* en un modelo murino de artritis inducida por colágeno [89].

Estudios realizados en co-cultivos de BM-MSCs con MLR de cerdos también demostraron que PGE₂ es capaz de estimular la secreción de IL-10 e IFN- γ lo cual favorece la diferenciación a Tregs [90]. Mediante el uso de anticuerpos, se ha determinado que IL-10 es producida por las MSCs y es importante para ejercer efectos inmunosupresores sobre LT e inducir su diferenciación a Tregs [27]. De igual manera, se ha demostrado que la PGE₂ estimula la secreción de IL-10 e IL-4 lo que favorece la disminución de la proliferación de LT, así como la inducción a células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. El efecto inmunomodulador de las MSCs

sobre respuestas alógenas se ha descrito en parte por la ciclooxigenasa-2 (COX-2) derivada de PGE₂. La biosíntesis de PGE₂ por MSCs no es sólo constitutiva, sino también inducida bajo estímulos inflamatorios [11, 21]. Estos resultados demostraron que las DT-MSCs expresaron constitutivamente concentraciones significativamente mayores de PGE₂ en comparación con BM-MSCs, sin embargo, en co-cultivo con LT activados se observaron concentraciones similares en las cuatro fuentes analizadas. Los tejidos dentales tienen un perfil inmune asociado a membranas mucosas a diferencia de BM y esto podría estar relacionado con la diferencia en la producción basal de PGE₂ por parte de DT-MSCs en comparación con BM-MSCs, de hecho, se ha descrito que PGE₂ es necesaria para que G-MSCs ejerza su función inmunosupresora mediante la vía de señalización prostaglandina E₂-EP₃ [91]. Debido a la variabilidad en el patrón de expresión de moléculas solubles identificadas en los sobrenadantes de co-cultivos de MSCs con CD3⁺ activados con anti-CD3/CD28, se puede hipotetizar que las BM-MSCs y DT-MSCs sometidos a idénticas condiciones de cultivo ejercen su efecto inmunosupresor por diferentes mecanismos y esto podría estar determinado por el origen histológico del cual provienen.

Debido a que observamos altas concentraciones de IL-10 y PGE₂ en los co-cultivos, así como secreción de IFN γ y debido a que se ha demostrado que dichas moléculas favorecen la generación de Tregs [88], decidimos detectar la presencia de Tregs en nuestros co-cultivos. Las Tregs son caracterizadas por sus propiedades supresoras y anérgicas; las dos poblaciones más relevantes de Tregs son CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ y CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ [90], por lo cual se decidió identificarlas. Nuestros resultados indican un incremento significativo en ambas poblaciones en comparación con los niveles detectados en la subpoblación de LT sin activar. Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos para DP-MSCs en co-cultivos con CD4⁺ en donde se observa un aumento en la población CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en dichos co-cultivos [92]. Este es el primer estudio que demuestra que MSCs de DP, G y PDL inducen de manera similar la generación de poblaciones Tregs *in vitro* bajo estas condiciones de co-cultivo. Se sabe que el tejido periodontal tiene Tr1-Like T Cells, un tipo de Treg descrita recientemente patrullando tejido periférico [28]. De igual manera se ha reportado que la presencia de PDL-MSCs y G-MSCs en co-cultivos con PBMCs activados incrementa la población CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ y suprimen las poblaciones de linfocitos T efectores, Th1/Th2/Th17 [93]. Contradictoriamente, se ha reportado, que G-MSCs *in vitro* no son capaces de generar Tregs, sin embargo, posterior a su aplicación en el modelo de GVHD, se detectaron altos niveles de expresión de Foxp3, así mismo, se identificó una reducción en los niveles de citocinas proinflamatorias IL-17 e IFN- γ , así como un incremento en los niveles de IL-2, cuyo papel es importante para la diferenciación de linfocitos T reguladores inducidos (iTregs), lo cual sustenta la función supresora de CD4 iTregs

bajo condiciones inflamatorias [28]. Recientes estudios muestran que la expresión de CD39 en Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cataliza la generación secuencial de adenosina por degradación de ATP/ADP extracelular a AMP y la conversión de 5'-AMP a adenosina por CD73 [94, 95]. Estos eventos permiten una marcada reducción en la proliferación y secreción de citocinas proinflamatorias por parte de las células T. De manera interesante se ha demostrado que G-MSCs no sólo expresa CD39, sino que también incrementa la frecuencia de Tregs con fenotipo CD39⁺Foxp3⁺, lo cual soporta la generación de adenosina y promueve la inmunosupresión por las células T *in vitro* y también en el modelo de GVHD aguda [96]. A la fecha en nuestro laboratorio estamos estudiando la generación de diferentes subpoblaciones de Tregs a partir de las distintas fuentes de tejidos dentales.

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que demuestra que bajo las mismas condiciones de cultivo las MSCs provenientes de DP, G y PDL presentan la misma capacidad *in vitro* para disminuir la proliferación de población enriquecida de células CD3⁺ y dicha capacidad es similar a la observada con aquellas MSCs de BM. Además, demostraron tener diferencias en la producción de citocinas y moléculas secretadas y de membrana que pueden participar en la inmunosupresión de LT en los co-cultivos en presencia de MSCs de tejidos dentales con respecto a las de BM, sin embargo, es importante mencionar que las cuatro fuentes estudiadas presentan la misma capacidad de inducir la generación de las poblaciones de Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ y CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺.

Con el conocimiento de estos resultados, se propone que además de BM-MSCs, las DT-MSCs podrían ser candidatos confiables para futuras aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades inmunológicas como GVHD, rechazo de injerto o enfermedades autoinmunes.

REFERENCIAS

1. Mayani H., e.a., *Células troncales y medicina regenerativa*. 2011, Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
2. Montesinos, J., *Células Troncales, biología y aplicaciones en biomedina*. 2017, México: Universidad Nacional Autónoma de México - Porrúa.
3. Ceron, W., Lozada-Requena, and V. Kiomi *Células tronco mesenquimales: definiciones, cultivo y aplicaciones potenciales*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 2016. 33(4).
4. Górski B., *Gingiva as a new and the most accessible source of mesenchymal stem cells from the oral cavity to be used in regenerative therapies*. 2016. 70: p. 858-871.
5. Wada N, M.D., Shi S, Bartold PM, Gronthos SJL., *Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells*. *Cell Physio*, 2009. 219(3): p. 667-676.
6. Pagano, S., et al., *Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb*. *Stem Cells*, 2000. 18(4).
7. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. *Cell Tissue Kinet*, 1970. 3(4): p. 393-403.
8. Caplan A., *The mesengenic process*. *Clin Plast Surg.*, 1994 21(3).
9. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*, 2006. 8(4): p. 315-7 DOI: 10.1080/14653240600855905.
10. Caplan, A.I., *Why are MSCs therapeutic? New data: new insight*. *J Pathol*, 2009. 217(2): p. 318-24 DOI: 10.1002/path.2469.
11. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. *Blood*, 2005. 105(4): p. 1815-22 DOI: 10.1182/blood-2004-04-1559.
12. Meisel, R., et al., *Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation*. *Blood*, 2004. 103(12): p. 4619-21 DOI: 10.1182/blood-2003-11-3909.
13. JM, Đ., T. SZ, and Č. MJ, *Cross-Talk Between Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Dendritic Cells*. *Curr Stem Cell Res Ther.*, 2016. 11(1): p. 51-65.
14. R, R., *Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle*. *Transplantation* 2007;. 83: p. 71-76.

15. Almeida CR, C.H., Vasconcelos DP, Barbosa MA., *Stem Cell Reports* 2016;6:466-73. , 2016 6: p. 466-73.
16. Selmani ZI, N.A., Zidi I, et al., *Stem Cells* 2008. 26: p. 212-22.
17. Fan L, H.C., Chen J, Cen P, Wang J, Li L., *Interaction between Mesenchymal Stem Cells and B-Cells. . Int J Mol Sci. , 2016. 5(17): p. 5.*
18. Fayyad-Kazan H, F.W., Badran B, Lagneaux L, Najjar M., *The immunomodulatory properties of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are defined according to multiple immunobiological criteria. Inflamm Res* 2016. 65: p. 501-10.
19. Kuzmina, L.A., et al., *Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. Stem Cells Int, 2012. 2012: p. 968213 DOI: 10.1155/2012/968213.*
20. Castro-Manreza M., *Evaluación de la capacidad inmunosupresora de células troncales mesenquimales humanas derivadas de médula ósea, sangre de cordón umbilical y placenta. Tesis Doctorado, 2014.*
21. Castro-Manreza, M.E., et al., *Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells. Stem Cells Dev, 2014. 23(11): p. 1217-32 DOI: 10.1089/scd.2013.0363.*
22. Augello, A., et al., *Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. Eur J Immunol, 2005. 35(5): p. 1482-90 DOI: 10.1002/eji.200425405.*
23. Sheng, H., et al., *A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. Cell Res, 2008. 18(8): p. 846-57 DOI: 10.1038/cr.2008.80.*
24. Francisco LM, Sage P., Sharpe AH., *The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. Immunol Rev., 2010. 236: p. 219-42.*
25. Tipnis S, V.C., Majumdar AS., *Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. Immunol Cell Biol. , 2010. 88: p. 795-806.*
26. Ma S, X.N., Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y., *Immunobiology of mesenchymal stem cells. Cell Death Differ* 2014;. 21: p.:216–25.
27. Ryan, J.M., et al., *Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. Clin Exp Immunol, 2007. 149(2): p. 353-63 DOI: 10.1111/j.1365-2249.2007.03422.x.*
28. Selmani, Z., et al., *Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. Stem Cells, 2008. 26(1): p. 212-22 DOI: 10.1634/stemcells.2007-0554.*

29. Yagi H, S.-G.A., Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al., Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing. . *Cell Transplant* 2010. 19: p.:667–679.
30. Giuliani M, F.M., Vernochet A, Ketroussi F, Clay D, Azzarone B, Lataillade JJ, Durrbach A., Long-lasting inhibitory effects of fetal liver mesenchymal stem cells on T-lymphocyte proliferation. *PLoS One.* , 2011. 6(5).
31. Ren, H., et al., Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord, Dental Pulp, and Menstrual Blood as Sources for Cell Therapy. *Stem Cells Int*, 2016. 2016: p. 3516574 DOI: 10.1155/2016/3516574.
32. Augello, A., et al., Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*, 2005. 35(5): p. 1482-90 DOI: 10.1002/eji.200425405.
33. W., C., *Células Troncales e Inmunomodulación. Bases de la Inmunología Clínica. Ed. Sociedad Peruana de Inmunología.* . 2013.
34. Ringdén O, U.M., Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K., Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation.* 27(81): p. 1390-7.
35. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. 8(4): p. 315-7 DOI: 10.1080/14653240600855905.
36. Philippe, B., et al., Culture and Use of Mesenchymal Stromal Cells in Phase I and II Clinical Trials. *Stem Cells Int*, 2010. DOI: 10.4061/2010/503593.
37. Hakan Orbay, M.T., Hiroshi Mizuno, *Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose and Other Tissues: Basic Biological Properties and Clinical Applications.* *Stem Cells Int.* , 2012. 2012.
38. M, A.-H. and H. GT, *Dental Mesenchymal Stem Cells: Dental Pulp Stem Cells, Periodontal Ligament Stem Cells, Apical Papilla Stem Cells, and Primary Teeth Stem Cells—Isolation, Characterization, and Expansion for Tissue Engineering.* *Methods Mol Biol.* , 2019. 1922: p. 59-76.
39. BM, S., et al., Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* , 2004 10(364): p. 149-55.
40. Rojas MF, S.F., Vasquez GM y Matus JP., *Inmunocaracterización In Situ de Células Madres Mesenquimales de pulpa dental en terceros molares y revisión narrativa de protocolos de cultivo y diferenciación.*, 2018. Universidad del Desarrollo.
41. al., C.B.C.e., *Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano.* *International Journal of Morphology*, 2013. Universidad de los Andes, Chile.
42. Yao Liu, e.a., PD-1 is required to maintain stem cell properties in human dental. *Cell Death & Differentiation.*

43. Fournier, B.P.J., Multipotent Progenitor Cells in Gingival Connective Tissue. *Tissue Engineering* 2010. 16(9).
44. Junjun Liu, e.a., Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 2014.
45. Corona Z AA, e.a., *Manual Teórico de Anatomía Bucodental*. 2013, Universidad Autónoma de Nayarit: Unidad Académica de Odontología.
46. Trejo CG, e.a., Aislamiento de células mesenquimales del ligamento periodontal de premolares extraídos. Método simplificado. *Revista Odontológica Mexicana*, 2017. 21(1).
47. Cea-Sanhueza M, S.-S.G., Oral mesenchymal stem cells: State of the art in dentistry. *Avances de Odontología*, 2016. 32(2).
48. Yongchun Gu, S.S., Transplantation of gingiva-derived mesenchymal stem cells ameliorates collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.*, 2016. 18(262).
49. Górski B., Gingiva as a new and the most accessible source of mesenchymal stem cells from the oral cavity to be used in regenerative therapies. *Postepy Hig Med Dosw.*, 2016. 17(70): p. 858-71. DOI: 10.5604/17322693.1214383.
50. Montesinos, J.J., et al., Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy*, 2009. 11(2): p. 163-76 DOI: 10.1080/14653240802582075.
51. LEGENDplex, <https://www.biolegend.com/legendplex>. 2018, BioLegend.
52. Kalinski, P., Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*, 2012. 188(1): p. 21-8 DOI: 10.4049/jimmunol.1101029.
53. English, K., et al., Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*, 2009. 156(1): p. 149-60 DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.03874.x.
54. Kampan, N.C., et al., Interleukin 6 Present in Inflammatory Ascites from Advanced Epithelial Ovarian Cancer Patients Promotes Tumor Necrosis Factor Receptor 2-Expressing Regulatory T Cells. *Front Immunol*, 2017. 8: p. 1482 DOI: 10.3389/fimmu.2017.01482.
55. Plock, J.A., et al., Adipose- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Prolong Graft Survival in Vascularized Composite Allotransplantation. *Transplantation*, 2015. 99(9): p. 1765-73 DOI: 10.1097/TP.0000000000000731.
56. Fawzy El-Sayed, K.M. and C.E. Dorfer, Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: A Unique Tissue Engineering Gem. *Stem Cells Int*, 2016. 2016: p. 7154327 DOI: 10.1155/2016/7154327.
57. Fournier, B.P., et al., Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Eng Part A*, 2010. 16(9): p. 2891-9 DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0796.





58. Gronthos, S., et al., Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(25): p. 13625-30 DOI: 10.1073/pnas.240309797.
59. Ding, G., J. Niu, and Y. Liu, Dental pulp stem cells suppress the proliferation of lymphocytes via transforming growth factor-beta1. *Hum Cell*, 2015. 28(2): p. 81-90 DOI: 10.1007/s13577-014-0106-y.
60. Zhang, Q., et al., Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol*, 2009. 183(12): p. 7787-98 DOI: 10.4049/jimmunol.0902318.
61. Wada, N., et al., Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Physiol*, 2009. 219(3): p. 667-76 DOI: 10.1002/jcp.21710.
62. Tomic, S., et al., Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells Dev*, 2011. 20(4): p. 695-708 DOI: 10.1089/scd.2010.0145.
63. Vasandan, A.B., et al., Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament. *J Cell Mol Med*, 2014. 18(2): p. 344-54 DOI: 10.1111/jcmm.12192.
64. Montesinos, J.J., et al., In vitro evidence of the presence of mesenchymal stromal cells in cervical cancer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity. *Stem Cells Dev*, 2013. 22(18): p. 2508-19 DOI: 10.1089/scd.2013.0084.
65. Sibov, T.T., et al., Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. *Cytotechnology*, 2012. 64(5): p. 511-21 DOI: 10.1007/s10616-012-9428-3.
66. Le Blanc, K., et al., Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol*, 2004. 60(3): p. 307-15 DOI: 10.1111/j.0300-9475.2004.01483.x.
67. Di Nicola, M., et al., Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002. 99(10): p. 3838-43 DOI: 10.1182/blood.v99.10.3838.
68. Pierdomenico, L., et al., Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*, 2005. 80(6): p. 836-42 DOI: 10.1097/01.tp.0000173794.72151.88.
69. Yildirim, S., et al., The Comparison of the Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Dental Follicles. *Stem Cells Int*, 2016. 2016: p. 4682875 DOI: 10.1155/2016/4682875.
70. Gu, Y. and S. Shi, Transplantation of gingiva-derived mesenchymal stem cells ameliorates collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2016. 18(1): p. 262 DOI: 10.1186/s13075-016-1160-5.
71. Zhao, Y., et al., Fas ligand regulates the immunomodulatory properties of dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 2012. 91(10): p. 948-54 DOI: 10.1177/0022034512458690.

72. Ren, G., et al., *Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression*. *J Immunol*, 2010. 184(5): p. 2321-8 DOI: 10.4049/jimmunol.0902023.
73. Delasos, L., et al., *A Case of Immunotherapy-Induced Colitis Complicated by Perforation and Treated with Infliximab Postoperatively*. *Case Rep Oncol Med*, 2019. 2019: p. 9069354 DOI: 10.1155/2019/9069354.
74. Wing, K., T. Yamaguchi, and S. Sakaguchi, *Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation*. *Trends Immunol*, 2011. 32(9): p. 428-33 DOI: 10.1016/j.it.2011.06.002.
75. Gaber, T., et al., *CTLA-4 Mediates Inhibitory Function of Mesenchymal Stem/Stromal Cells*. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(8) DOI: 10.3390/ijms19082312.
76. Pinchuk, I.V. and D.W. Powell, *Immunosuppression by Intestinal Stromal Cells*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. 1060: p. 115-129 DOI: 10.1007/978-3-319-78127-3_7.
77. Yuan, W., et al., *[Programmed death ligand 1 negatively regulates inflammatory response of chronic periodontitis]*. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2015. 33(4): p. 366-9.
78. Luz-Crawford, P., et al., *Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway*. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. e45272 DOI: 10.1371/journal.pone.0045272.
79. Cao, W., et al., *Mesenchymal stem cells and adaptive immune responses*. *Immunol Lett*, 2015. 168(2): p. 147-53 DOI: 10.1016/j.imlet.2015.06.003.
80. Singer, N.G. and A.I. Caplan, *Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation*. *Annu Rev Pathol*, 2011. 6: p. 457-78 DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130230.
81. Tipnis, S., C. Viswanathan, and A.S. Majumdar, *Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO*. *Immunol Cell Biol*, 2010. 88(8): p. 795-806 DOI: 10.1038/icb.2010.47.
82. Chang, C.J., et al., *Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma*. *Stem Cells*, 2006. 24(11): p. 2466-77 DOI: 10.1634/stemcells.2006-0071.
83. Alipour, R., et al., *Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Dispensable for The Immunomodulatory Function of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth*. *Cell J*, 2017. 18(4): p. 597-608.
84. Stone, T.W. and L.G. Darlington, *Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. 1(8): p. 609-20 DOI: 10.1038/nrd870.
85. Deuse, T., et al., *Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells*. *Cell Transplant*, 2011. 20(5): p. 655-67 DOI: 10.3727/096368910X536473.
86. Luan, X., et al., *Human placenta-derived mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation and support the culture expansion of cord blood CD34(+) cells: a comparison with human*

- bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell*, 2013. 45(1): p. 32-8 DOI: 10.1016/j.tice.2012.09.002.
87. Castro-Manreza, Human Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells and Development*, 2014. 23(11).
88. Nojehdehi, S., et al., Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on experimental type-1 autoimmune diabetes. *J Cell Biochem*, 2018. 119(11): p. 9433-9443 DOI: 10.1002/jcb.27260.
89. Garimella, M.G., et al., Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Prevent Systemic Bone Loss in Collagen-Induced Arthritis. *J Immunol*, 2015. 195(11): p. 5136-48 DOI: 10.4049/jimmunol.1500332.
90. Hsu, W.T., et al., Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10+IFN-gamma+CD4+ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. *J Immunol*, 2013. 190(5): p. 2372-80 DOI: 10.4049/jimmunol.1202996.
91. Li, P., Y. Zhao, and L. Ge, Therapeutic effects of human gingiva-derived mesenchymal stromal cells on murine contact hypersensitivity via prostaglandin E2-EP3 signaling. *Stem Cell Res Ther*, 2016. 7(1): p. 103 DOI: 10.1186/s13287-016-0361-9.
92. Hong, J.W., et al., Immune Tolerance of Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells Mediated by CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) Regulatory T-Cells and Induced by TGF-beta1 and IL-10. *Yonsei Med J*, 2017. 58(5): p. 1031-1039 DOI: 10.3349/ymj.2017.58.5.1031.
93. Ng, J., et al., Immunomodulatory Properties of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Cells. *J Cell Biochem*, 2016. 117(12): p. 2844-2853 DOI: 10.1002/jcb.25596.
94. Naamani, O., C. Chaimovitz, and A. Douvdevani, Pharmacological preconditioning with adenosine A(1) receptor agonist suppresses cellular immune response by an A(2A) receptor dependent mechanism. *Int Immunopharmacol*, 2014. 20(1): p. 205-12 DOI: 10.1016/j.intimp.2014.02.011.
95. Ohta, A. and M. Sitkovsky, Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Front Immunol*, 2014. 5: p. 304 DOI: 10.3389/fimmu.2014.00304.
96. Ni, X., et al., Reduction in murine acute GVHD severity by human gingival tissue-derived mesenchymal stem cells via the CD39 pathways. *Cell Death Dis*, 2019. 10(1): p. 13 DOI: 10.1038/s41419-018-1273-7.

Article

Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Dental Tissues: A Comparative In Vitro Evaluation of Their Immunoregulatory Properties Against T cells

María del Pilar De la Rosa-Ruiz ^{1,2}, Marco Antonio Álvarez-Pérez ³,
Víctor Adrián Cortés-Morales ¹, Alberto Monroy-García ⁴, Héctor Mayani ⁵ ,
Gladis Fragoso-González ⁶, Sara Caballero-Chacón ⁷ , Daniel Diaz ⁸ ,
Fernando Candanedo-González ⁹ and Juan José Montesinos ^{1,*} 

¹ Mesenchymal Stem Cells Laboratory, Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center (IMSS), POST 06720 Mexico City, Mexico; tzotzilmvz@gmail.com (M.d.P.D.I.R.-R.); v.adrian.cortes@gmail.com (V.A.C.-M.)

² Posgraduate in Production Sciences and Animal Health, National Autonomous University of Mexico (UNAM), 04510 Mexico City, Mexico

³ Tissue Bioengineering Laboratory, Division of Graduate Studies and Research of the Faculty of Dentistry, National Autonomous University of Mexico (UNAM), 04510 Mexico City, Mexico; malvap6@gmail.com

⁴ Immunology and Cancer Laboratory; Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center (IMSS), 06720 Mexico City, Mexico; albertomon@yahoo.com

⁵ Hematopoietic Stem Cells Laboratory, Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center (IMSS), 06720 Mexico City, Mexico; hmayaniv@prodigy.net.mx

⁶ Institute of Biomedical Research, Immunology Department, National Autonomous University of Mexico (UNAM), 04510 Mexico City, Mexico; gladis@unam.mx

⁷ Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM), 04510 Mexico City, Mexico; saracachas@hotmail.com

⁸ Faculty of Veterinary Medicine, Autonomous University of Sinaloa, Culiacan Rosales, 80246 Sinaloa, Mexico; ddiaz@ciencias.unam.mx

⁹ Department of Pathology, High Specialty Medical Unit (UMAE), National Medical Center (IMSS), 06720 Mexico City, Mexico; fa_candanedo@yahoo.com.mx

* Correspondence: montesinosster@gmail.com; Tel.: +1(+52)-5523156025

Received: 10 October 2019; Accepted: 20 November 2019; Published: 22 November 2019



Abstract: Bone marrow mesenchymal stem/stromal cells (BM-MSCs) have immunoregulatory properties and have been used as immune regulators for the treatment of graft-versus-host disease (GVHD). Human dental tissue mesenchymal stem cells (DT-MSCs) constitute an attractive alternative to BM-MSCs for potential clinical applications because of their accessibility and easy preparation. The aim of this in vitro study was to compare MSCs from dental pulp (DP-MSCs), gingival tissue (G-MSCs), and periodontal ligament (PDL-MSCs) in terms of their immunosuppressive properties against lymphoid cell populations enriched for CD3⁺ T cells to determine which MSCs would be the most appropriate for in vivo immunoregulatory applications. BM-MSCs were included as the gold standard. Our results demonstrated, in vitro, that MSCs from DP, G, and PDL showed immunoregulatory properties similar to those from BM, in terms of the cellular proliferation inhibition of both CD4⁺- and CD8⁺-activated T-cells. This reduced proliferation in cell co-cultures correlated with the production of interferon- γ and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and the upregulation of programmed death ligand 1 (PD-L1) in MSCs and cytotoxic T-cell-associated Ag-4 (CTLA-4) in T-cells and increased interleukin-10 and prostaglandin E₂ production. Interestingly, we observed differences in the production of cytokines and surface and secreted molecules that may participate in T-cell immunosuppression in co-cultures in the presence of DT-MSCs compared with BM-MSCs. Importantly, MSCs from four sources favored the generation of T-cell subsets displaying the regulatory phenotypes CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺. Our results in vitro indicate that, in addition to

BM-MSCs, MSCs from all of the dental sources analyzed in this study might be candidates for future therapeutic applications.

Keywords: gingival tissue; dental pulp; periodontal ligament; immunoregulation; mesenchymal stem/stromal cells; T cells

1. Introduction

Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) represent a heterogeneous population of progenitor cells capable of self-renewal and multipotentiality [1–3]. MSCs have immunoregulatory properties, making them special candidates for cell therapy, as they can reshape tissue under anti-inflammatory mechanisms through cell contact and growth factor and cytokine secretion [4,5]. In particular, MSCs have been shown to immunosuppress both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, which is important because they are effector cells in immunological diseases such as graft-versus-host disease (GVHD) [6]; therefore, MSCs have been proposed as potential cells for clinical application.

Bone marrow (BM) is the most studied source of MSCs [7], and BM-MSCs have been used in clinical cell therapy protocols to reduce signs of GVHD [6–8]. However, BM has some disadvantages, such as the process of finding donors and obtaining samples involving an invasive, painful, and expensive procedure [9]. The umbilical cord, as a discarded tissue at birth, represents an appropriate source of MSCs because its phenotype is similar to other sources, as well as because of the relatively high cell yields [10]. Similarly, adipose tissue is a stable source of MSCs as a result of its less invasive procedures, high yield, and lack of ethical issues [11]. Taking advantage of these benefits, it is important to mention that both sources have been applied in clinical protocols [10,12]. Our research team reported that umbilical cord blood (UCB) MSCs are an alternative to BM-MSCs because both have a similar capacity for T-cell immunosuppression; however, in that same study, UCB-MSCs were obtained at a low rate [13]; therefore, despite being an accessible source, a large number of samples would have to be processed to obtain a usable amount of MSCs. It is important to isolate MSCs from equally accessible sources but to obtain the MSCs at a high rate. In adults, MSCs have been found in dental tissues (DT-MSCs), such as dental pulp (DP-MSCs) [3], gingival tissue (G-MSCs) [14,15], and periodontal ligament (PDL-MSCs) [16]; it has been established that these sources are easily accessible and that MSCs can be obtained through minimally invasive isolation techniques that do not put the donor at risk, can be isolated in an autologous manner, and can be obtained at a high rate [15–17]. However, to date, we do not know if DT-MSCs have the same immunosuppressive potential as BM-MSCs; it is even more important to determine which MSCs provide the best immunosuppressive cell therapy.

Previous *in vitro* studies have established that direct contact between MSCs and CD3⁺ T-cells is necessary to inhibit the proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes [18]. In this regard, the expression of some immunosuppressive molecules in MSCs, such as the programmed death ligand (PD-L1) and the human leukocyte antigen G-1 (HLA-G1), has been demonstrated [19,20]. However, it has also been shown MSCs can secrete immunosuppressive molecules such as interleukins 4 and 10 (IL-4 and IL-10), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), and prostaglandin E₂ (PGE₂) [5,21,22], which participate in immunosuppressive mechanisms.

It has also been reported that MSCs promote the *in vitro* generation of T regulatory cells (Tregs) with the CD4⁺CD25⁺ forkhead box P3 (Foxp3⁺) or CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ phenotype [23,24]; on the contrary, it has also been shown that BM-MSCs do not induce the expression of the transcription factor Foxp3⁺ [25]. These contradictory findings could derive from the T-cell population used and the absence or presence of cell contact with BM-MSCs [26]. In this way, MSCs exert their immunoregulatory properties under a proinflammatory stimulus with cytokines, such as TNF α and interferon (IFN) γ [4,27], thus decreasing T-cell proliferation and inducing Treg differentiation, which is related with the expression of surface molecules and soluble mediators by MSCs.

Considering the above, the present *in vitro* study aims to contribute to the knowledge of the immunosuppressive properties of BM-, DP-, G-, and PDL-MSCs on CD3⁺ T-cells; for this purpose, we conducted a comparative study of MSCs derived from the four cell sources in relation to their potential to inhibit the proliferation of CD3⁺ T-cells and the expression of both surface and secreted immunosuppressive molecules. We also analyzed the capacity of MSCs to generate Tregs in co-culture. To our knowledge, this is the first *in vitro* study comparing the immunosuppressive properties of MSCs derived from these four cell sources to determine which one could be the most appropriate for immunoregulatory therapy.

2. Materials and Methods

2.1. Obtaining Biological Samples

BM-MSC samples (n = 5) were obtained from hematologically healthy adult volunteer donors according to the guidelines of the Traumatology and Orthopedics Hospital of the Mexican Social Security Institute (IMSS—its acronym in Spanish) registered under protocol 1411. Samples of DP-MSCs (n = 5), G-MSCs (n = 5), and PDL-MSCs (n = 5) were obtained by an explant tissue culture system from adult patients who underwent third molar extraction at the Maxillofacial Surgery Clinic of the Division of Postgraduate Studies and Research (DEPeI—its acronym in Spanish) at the School of Dentistry of the National Autonomous University of Mexico. Patients were informed about the study prior to obtaining their consent and donation of extracted dental organs, and the protocol was approved by the Research and Ethics Committee of the School of Dentistry (CIE/1110/2017). CD3⁺ T-cells were obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy adult donors.

2.2. Isolation and Culture of BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs, and PDL-MSCs

2.2.1. Isolation and Culture of BM-MSCs

Samples were obtained from BM aspirates from the iliac crest and placed in a 50 mL tube (Corning, New York, NY USA) with 15 mL of Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 culture medium (ThermoFisher, Waltham, MA USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and then washed with phosphate-buffered solution (PBS, ThermoFisher, Waltham, MA, USA). A density gradient was prepared with Ficoll-Paque Plus, density 1.077 + 0.001 g/mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). The cells were centrifuged at 300× g for 30 min, and the interface was washed with PBS containing 3% FBS and 1 mM EDTA. The mononuclear cell (MNC) pellet was resuspended in low-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (lg-DMEM) supplemented with 15% FBS. The total number of nucleated cells and their viability were determined by counting with Turck's solution and trypan blue (ThermoFisher), respectively. From 5 to 10 × 10⁶ MNCs were seeded in a 100 mm Petri dish (Corning) and incubated at 37 °C with 5% CO₂. After four days, a PBS wash was performed to remove non-adherent cells, changing the medium twice per week. When the cultures reached 80%–90% confluence, the cells were harvested for reseeding and cryopreservation. The MSCs of passages 3 and 4 were used for the experiments.

2.2.2. Isolation and Culture of MSCs from a Dental Tissue Explant Tissue Culture System

After the third molar exodontia, the periodontal ligament covering the roots of the dental organ and the gingival tissue (oral mucosa) were dissected, which was firmly adhered to the periosteum; lastly, the tooth was sectioned with a diamond disk to expose the pulp cavity and thus extract the dental pulp. The three tissues were separately mechanically disintegrated and placed in a six-well plate (Corning), embedded in 1 mL of alpha-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (αMEM) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 100 µg/mL gentamicin (GIBCO BRL, Carlsbad, CA, USA), where they were kept for 2 to 5 weeks, replacing the culture medium every third day. Upon reaching a confluence of 80%, the cells were harvested

by incubating them in trypsin-0.02% EDTA (GIBCO, BRL) at 37 °C with 5% CO₂ for 5 min; later, MSCs from each tissue were counted in a Neubauer chamber (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) with viability staining (trypan blue). Lastly, 1×10^6 MSCs from each tissue were frozen-embedded in freezing medium containing 10% dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich) and cryopreserved in 2 mL microtubes (Corning) in liquid nitrogen for later use. The MSCs of passages 3 and 4 were used for the experiments.

2.3. Characterization of Mesenchymal Stem Cells

2.3.1. Immunophenotype

The immunophenotypic characterization of BM-MSCs and DT-MSCs was performed according to previously described protocols. Monoclonal antibodies conjugated to FITC, PE, or APC against CD73, CD90, and CD45 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), CD105, CD13, and CD14 (Buckingham, UK), and human leukocyte antigen (HLA)-ABC, HLA-DR, CD31, and CD34 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were used as described in the Flow Cytometry Analysis section.

2.3.2. Morphological Analysis

To identify morphological differences between BM-MSCs and DT-MSCs, 0.3×10^5 cells/cm² were reseeded in P-35 boxes (Corning); upon reaching 40% confluence, the cells were stained with toluidine blue (Sigma-Aldrich) and evaluated using phase-contrast microscopy (n = 5).

2.3.3. Differentiation Capacity: Adipogenic

For adipogenic differentiation, 0.8×10^5 cells suspended in low-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ThermoFisher-Gibco) containing 10% FBS were seeded in 35 mm Petri dishes (Corning). When 60% confluence was reached, the cells were induced with MesenCult Adipogenic Differentiation Kit medium (StemCells Technologies, Vancouver, Canada) and incubated for 21 days, changing the medium twice per week. To visualize adipocytes and lipid vacuoles, cytochemical staining was performed with Oil Red O (Sigma-Aldrich).

2.3.4. Osteogenic

For osteogenic differentiation, 0.8×10^5 cells suspended in Ig-DMEM (ThermoFisher-Gibco) supplemented with 10% FBS were seeded in 35 mm Petri dishes (Corning). When 60% confluence was reached, induction was initiated with StemPro osteogenic medium (Gibco, Carlsbad, California, CA, USA), and the cells were incubated for 21 days, changing the medium twice per week. Finally, alkaline phosphatase activity was detected using SIGMA FAST™ BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium) (Sigma-Aldrich).

2.3.5. Chondrogenic

For osteogenic differentiation, 3×10^5 cells suspended in Ig-DMEM (ThermoFisher-Gibco) at 10% FBS were placed in 15 mL tubes and centrifuged at 900 rpm to obtain a cell pellet to which chondrogenic medium (Cambrex Bio Science, Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA) supplemented with 10 ng/mL transforming growth factor beta (TGF-β) (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, USA) was added. The cell pellet was incubated for 28 days, changing the medium twice per week. The resulting cell micromasses were fixed, dehydrated, and embedded in paraffin, after which 4 μm thick sections were obtained with a microtome. Subsequently, cytochemical staining was performed with Alcian Blue (Sigma-Aldrich).

2.4. Obtaining CD3⁺ T-cells

To isolate CD3⁺ cells, PBMCs were obtained from healthy donors using a density gradient (Ficoll-Paque Plus, density 1.077 + 0.001 g/mL; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden); CD3⁺ cells were isolated from this population by positive magnetic selection using CD3 MicroBeads and MACS MS columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the Supplementary Materials. The purity of the CD3⁺ population was 97%, as determined by flow cytometry. CD3⁺ cells were incubated in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 100 µg/mL gentamicin (GIBCO BRL) for 24 h.

2.5. Activation of CD3⁺ T-cells

CD3⁺ T-cells were activated in co-culture medium 50% Ig-DMEM/50% RPMI supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 100 µg/mL gentamicin (GIBCO BRL) with Dynabeads anti-CD3/CD28 T-cell expander (Invitrogen, California, CA, USA) at a 1:1 ratio (25 µL of Dynabeads/1 × 10⁶ CD3⁺ T-cells), which was added to the monolayer of MSCs from different sources (this technique is described Section 2.6.). The cultures were maintained and evaluated after four days by flow cytometry. For the proliferation assay, activated CD3⁺ cells were stained with 5(6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, Thermo Fisher Scientific).

2.6. Co-culture of MSCs/CD3⁺ T-cells

The co-culture system consisted of adding αCD3/CD28-activated T-cells to a single layer of MSCs at a ratio of one MSC to one T-cell. Cultures in 24-well plates (Corning) with activated CD3⁺ T-cells were used as the control. Then, 1.5 × 10⁵ activated CD3⁺ T-cells were added to a monolayer of 1.5 × 10⁵ BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs, or PDL-MSCs; antibody-coupled beads were present during the entire culture time. In the proliferation and cytokine and surface molecule expression assays, CD3⁺ T-cells activated in the absence of MSCs were used as a positive control. MSCs cultured in the absence of CD3⁺ T-cells were used as the basal expression control for surface and secreted molecules. Cultures were maintained and evaluated after four days by flow cytometry.

2.7. Proliferation Assay

After four days of co-culture, the cells were harvested and flow cytometry was performed, which consisted of washing the cells with physiological saline solution (PSS), blocking the cells with Fc Blocking Reagent Human (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), resuspending the cells in 100 µL of PBS containing 1 mM EDTA and 3% FBS and incubating the cells at 4 °C with antibodies (CD3, CD4, and CD8 conjugated to PE (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) for 20 min; then, the cells were washed with 1 mL of cytometry buffer (PBS containing 1 mM EDTA and 3% FBS). The cells were analyzed in a FACS Canto II Flow Cytometer (BD Biosciences), where 10,000 events were captured per sample. The data were analyzed with FlowJo 10 software (Ashland, OR, USA), and the average fluorescence intensities were normalized using 1 as the control for each experiment. CD3⁺ T-cells activated in the absence of MSCs were used as the positive control and were considered as 100% proliferation. The proliferation levels observed in co-cultures were normalized to this control. FlowJo 10 software was used for the analysis.

2.8. Expression of Immunoregulatory Molecules

After four days of co-culture, the cells were harvested and the flow cytometry method described above was performed; in this case, the cells were fixed with FACS Lysing Solution (BD Biosciences) to evaluate the expression of CD4⁺, CD25⁺, and CTLA-4⁺ surface molecules on CD3⁺ T-cells with monoclonal antibodies conjugated to FITC, PE, or APC (BD Biosciences) and intracellular Foxp3 expression in CD3⁺ T-cells with an antibody conjugated to APC (eBioscience, San Diego, CA, USA). The expression of PD-L1 (antibody conjugated to PE; BD Biosciences) on MSCs labeled with CD90

antibodies conjugated to APC was also determined. The cells were analyzed in a FACS Canto II Flow Cytometer (BD Biosciences), where 10,000 events were captured per sample. The data were analyzed with FlowJo 10 software, and the average fluorescence intensities were normalized using one as the control for each experiment.

2.9. Quantitative Analysis of Soluble Molecules

2.9.1. Cytokines

To determine cytokine levels, a cytometric bead array (CBA) was used. This technique uses beads conjugated to specific antibodies against various molecules, allowing the simultaneous determination of seven cytokines in a single sample of cell co-culture supernatant. Its main value is the ability to combine the fast and simultaneous reading of several complex parameters in an objective and accurate manner. To determine the concentration of secreted cytokines, supernatants were obtained four days after co-culture using the various conditions, including non-activated CD3⁺ T-cells. MSCs in the absence of CD3⁺ were used as the negative control, and CD3⁺ activated T-cells in the absence of MSCs were used as the positive control. Supernatants were stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Cytokine analysis was performed using a Cytometric Bead Array kit (BD Biosciences) according to the supplier's instructions. Thus, 10 μL of capture beads that recognized each cytokine (TNF α , IFN γ , IL-10, and IL-4) was mixed; this mixture was incubated at room temperature and protected from light for 30 min. A standard curve was developed by preparing serial dilutions of each secreted molecule (0–500 pg/mL). Later, 50 μL of each supernatant or point of the standard curve was mixed with 50 μL of capture beads; this mixture was incubated at room temperature and protected from light for 3 h. Then, a wash was performed with 1 mL of wash buffer, and the pellet was resuspended in 300 μL of the same buffer. The samples were analyzed on a FACS Canto II Flow Cytometer (BD Biosciences) and analyzed with LegendPlex v7.1 software (San Diego, CA, USA).

2.9.2. Prostaglandin E₂

The concentration of PGE₂ was determined by enzyme-linked immunosorbent assay with an ELISA kit for human PGE₂ (Invitrogen) according to the supplier's instructions. The supernatant of MSCs cultured in the absence of activated CD3⁺ T-cells was used as the control. A standard PGE₂ curve was prepared using serial dilutions of 0.3 to 4.0 ng/mL, subsequently adding 100 μL of the samples or of each point of the curve to microplate wells; each sample was measured in duplicate. To each well, previously coated with goat anti-mouse polyclonal antibody, 50 μL of alkaline phosphatase-labeled PGE₂ and 50 μL of mouse monoclonal anti-PGE₂ antibody were added, except for the blank wells. The plate was incubated at room temperature with stirring for 2 h; then, the wells were washed to remove non-adhered cells. The alkaline phosphatase substrate (para-nitrophenyl phosphate, pNPP) was then added, and the plate was incubated for 1 h. The plate was read on an ELISA plate reader (DYNATEC MR5000) at 412 nm.

2.10. Statistical Analysis

For the statistical analysis, one-way ANOVA was used, followed by Tukey's multiple comparisons test to determine significant differences in the proliferation response (CD3, CD4, and CD8) and changes in the expression of CD4⁺CTLA-4⁺, Tregs (CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺, and CD4⁺, CD25⁺, CTLA-4⁺) and in the production of interleukins and factors in different cultures with MSCs from different sources. To determine if the co-culture conditions caused changes in PD-L1⁺ and PGE₂ expression compared with the control group, we used a two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test with statistical hypothesis testing. All analyses and graphs were performed in Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A *p*-value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. MSCs from Dental Tissues Show Immunophenotypes and Differentiation Capacities Similar to Those from Bone Marrow

Individual experiments were performed with BM-MSCs ($n = 5$), DP-MSCs ($n = 5$), G-MSCs ($n = 5$) and PDL-MSCs ($n = 5$) to determine their immunophenotype, morphology, and differentiation capacity—adipogenic, osteogenic, and chondrogenic (Figures 1 and 2). Similarly to BM-MSCs, DT-MSCs expressed high levels of surface markers characteristic of MSCs—CD105, CD90, and CD73—as established by the International Society for Cellular Therapy (ISCT) [7]. Interestingly, high CD13 expression was observed, as we have previously reported for MSCs derived from other sources [13, 28]. Additionally, DT-MSCs expressed moderate levels of HLA-ABC, were negative for HLA-DR expression and did not express hematopoietic markers, such as CD34, CD45, and CD14 or endothelial markers such as CD31 (Figure 1). In turn, all MSCs derived from the four cell sources showed fibroblastoid morphology and differentiation capacity toward adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. However, in DP-MSCs, we did not observe cells with adipocytic morphology (Figure 2b); only fibroblastic cells with Oil Red O-positive foci in the cytoplasm were detected.

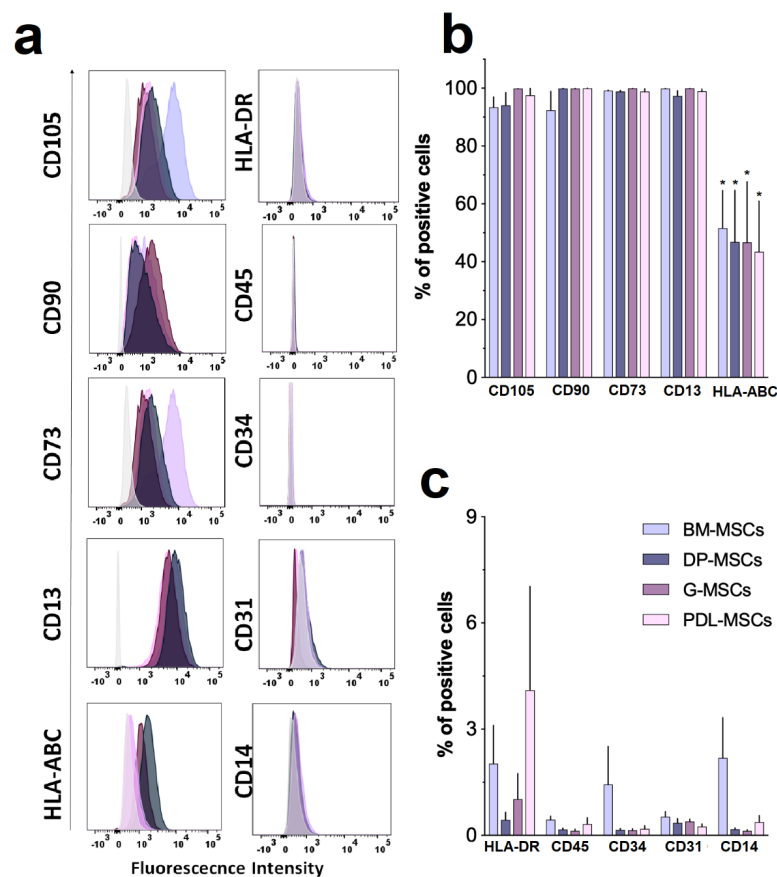


Figure 1. The expression of cell markers in dental tissue–mesenchymal stem cells (DT-MSCs) was determined by flow cytometry. (a) Representative histograms for one experiment (gray histogram: isotype control), (b) DT-MSC cultures show a high expression of surface markers characteristic of MSCs (CD105, CD73, CD90, and CD13), moderate expression of human leukocyte antigen (HLA)-ABC, and (c) negative expression for hematopoietic markers (CD45, CD34, and CD14), endothelial markers (CD31) and HLA-DR; bone marrow (BM)-MSCs ($n = 5$), dental pulp (DP)-MSCs ($n = 5$), gingival tissue (G)-MSCs ($n = 5$), and periodontal ligament (PDL)-MSCs ($n = 5$). The results represent the mean \pm SD and correspond to the percentage (%) of cells positive for each particular antigen. *Significant difference ($p < 0.05$) compared with CD105, CD73, CD90, and CD13.

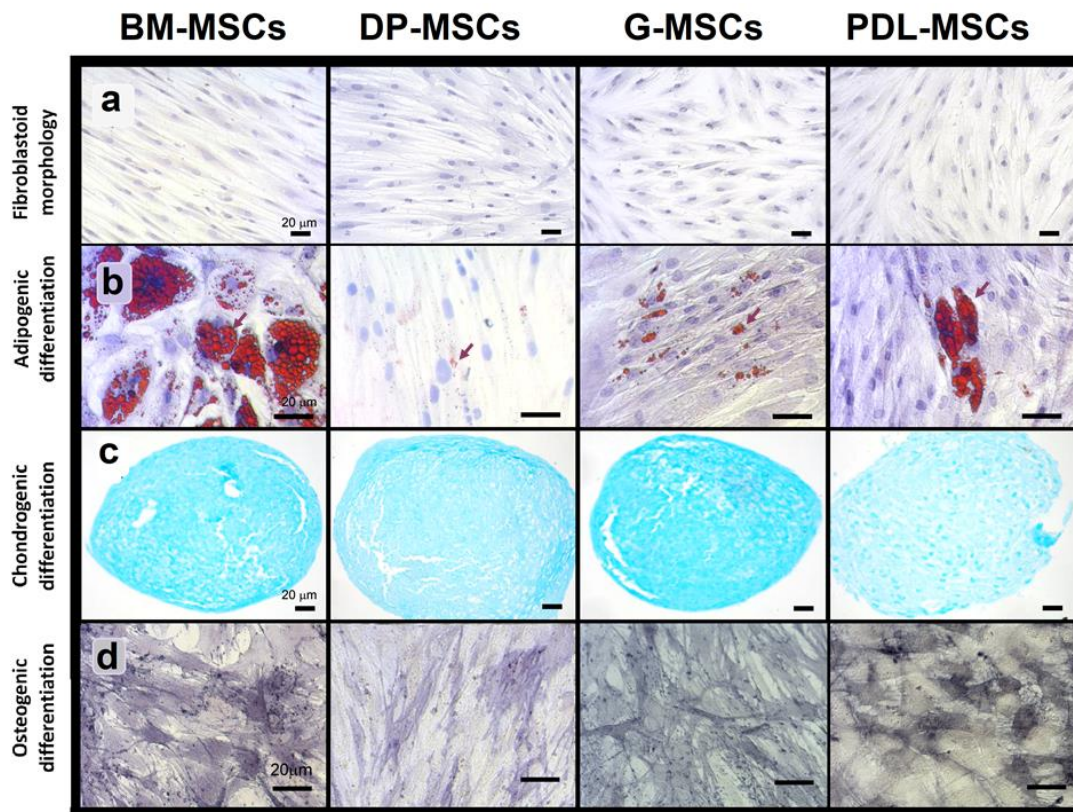


Figure 2. Morphology and differentiation capacity of mesenchymal stromal cells (MSCs) from bone marrow (BM), dental pulp (DP), gingival tissue (G), and periodontal ligament (PDL). Appearance of adherent cells with fibroblastoid morphology observed in cultures from the indicated sources (toluidine blue staining; magnification: 20 \times) (a). MSCs from the four cell sources (BM, n = 5; DP, n = 5; G, n = 5; and PDL, n = 5) were cultured in adipogenic, chondrogenic and osteogenic induction media for 35, 28, and 21 days, respectively (b–d). Adipogenic differentiation was indicated by the accumulation of neutral lipid vacuoles (Oil Red O; magnification: 40 \times) (b). Chondrogenic differentiation was indicated by chondrogenic matrix stained with alcian blue (cryosections from pelleted micromass; magnification: 20 \times) (c). Osteogenic differentiation was indicated by positive alkaline phosphatase enzyme staining (magnification: 40 \times) (d). One representative experiment is shown.

3.2. CD4⁺ and CD8⁺ T-cell Proliferation Was Similarly Inhibited by Co-culture with MSCs from BM and Dental Tissues

Previous studies in our laboratory demonstrated the importance of evaluating the immunosuppressive capacity of BM-MSCs on CD3⁺ T-cell-enriched populations in co-cultures with cell contact between the two populations [13,18]. Therefore, we analyzed the effect of DT-MSCs on CD3⁺ T-cell-enriched populations using co-cultures allowing cell contact. For this, CD3⁺ cells ($\geq 97\%$ purity) were isolated and activated with anti-CD3/CD28 in the presence or absence of BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs, or PDL-MSCs (Figure 3). T-cells that were activated in the absence of MSCs were used as positive controls, set at 100% proliferation. The levels of proliferation observed in the co-cultures were normalized to this control. As seen in Figure 3a,b, BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs, and PDL-MSCs reduced the proliferation of CD3⁺ T-cells ($83.39\% \pm 12.54\%$, $80.05 \pm 10.42\%$, $83.93 \pm 7.74\%$, and $77.5\% \pm 16.91$, respectively; $p < 0.05$), CD4⁺ T-cells ($77.75\% \pm 16.17\%$, $78.11\% \pm 10.52\%$, $78.88\% \pm 9.25\%$, and $74.79\% \pm 16.76\%$, respectively; $p < 0.05$) and CD8⁺ T-cells ($80.25\% \pm 14.46\%$, $75.25\% \pm 10.63$, $77.84\% \pm 10.23\%$, and $70.50\% \pm 16.02\%$, respectively; $p < 0.05$). These results suggest that BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs, and PDL-MSCs have a similar ability to inhibit T-cell proliferation.

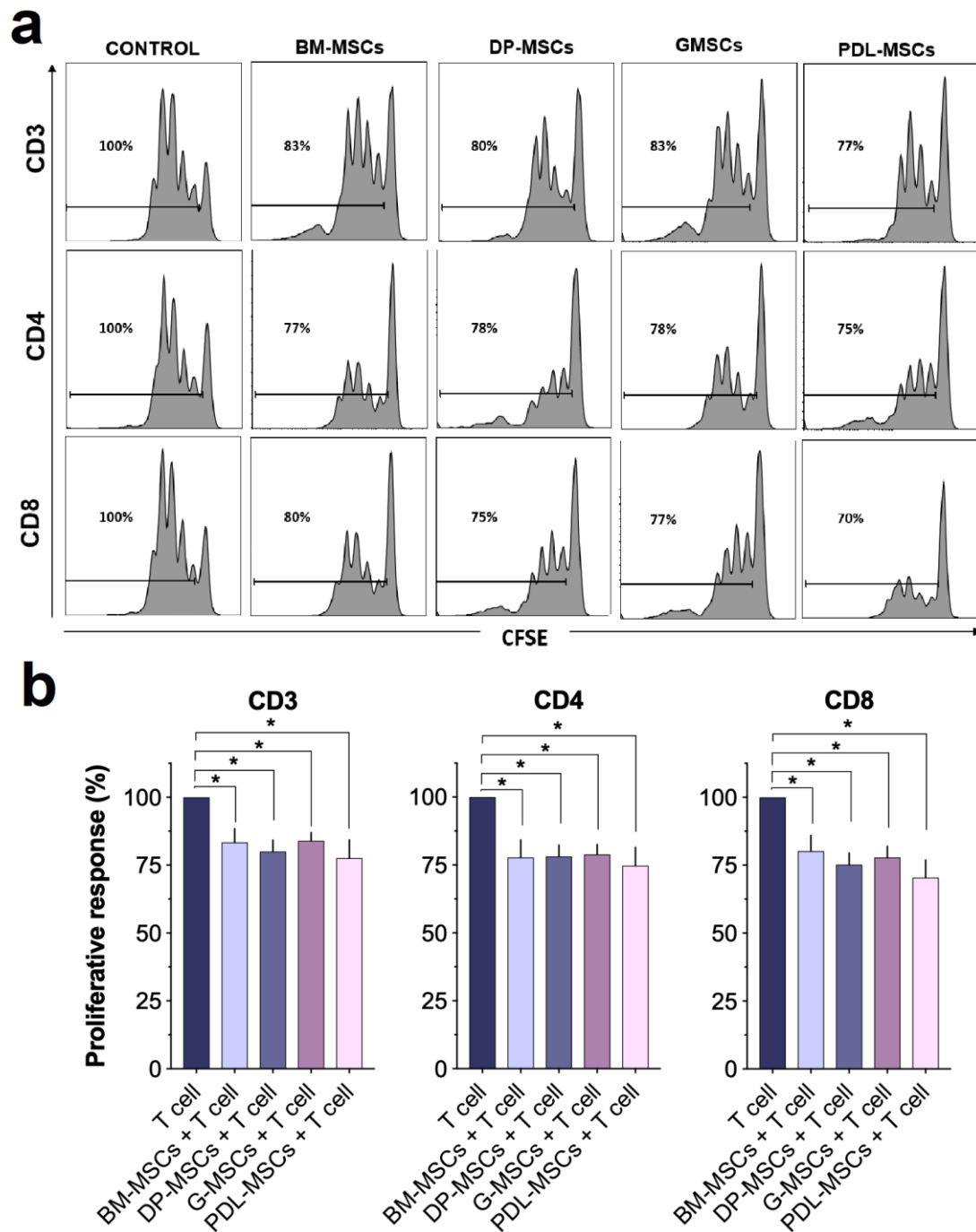


Figure 3. DT-MSCs and BM-MSCs similarly decrease T-cell proliferation. CD3⁺ cells were activated with anti-CD3/CD28 and cocultured in the presence of BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs, or PDL-MSCs at a 1:1 ratio of MSCs: CD3⁺ cells. The proliferation rate of activated CD3⁺ cells in the absence of MSCs was used as the positive control (100% proliferation; n = 5). The rate of incorporation of CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) was determined in CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ populations after four days of culture. (a) Representative histograms for one experiment. (b) Data are shown as the mean ± SEM of the proliferation rate (n = 5, individual experiments). *Significant difference, p < 0.05.

3.3. Increased Expression of the Immunosuppressive Molecules CTLA-4 and PD-L1

We previously demonstrated in a co-culture system that BM-MSCs increase the expression of CTLA-4 on CD4⁺ T-cells, favoring their immunosuppression [18]. With this background, we analyzed the expression of CTLA-4 on CD4⁺ T-cells after four days of co-culture with DT-MSCs to determine

if this molecule participates in the decreased proliferation observed in T-cells. Co-cultures were performed with BM-MSCs as controls, measuring the rate and increase in mean fluorescence intensity (MFI) for CTLA-4⁺ T-cells in the CD4⁺ population (Figure 4a–c). The expression of CTLA-4 in activated T-cells cultured in the absence of MSCs was considered as 100%.

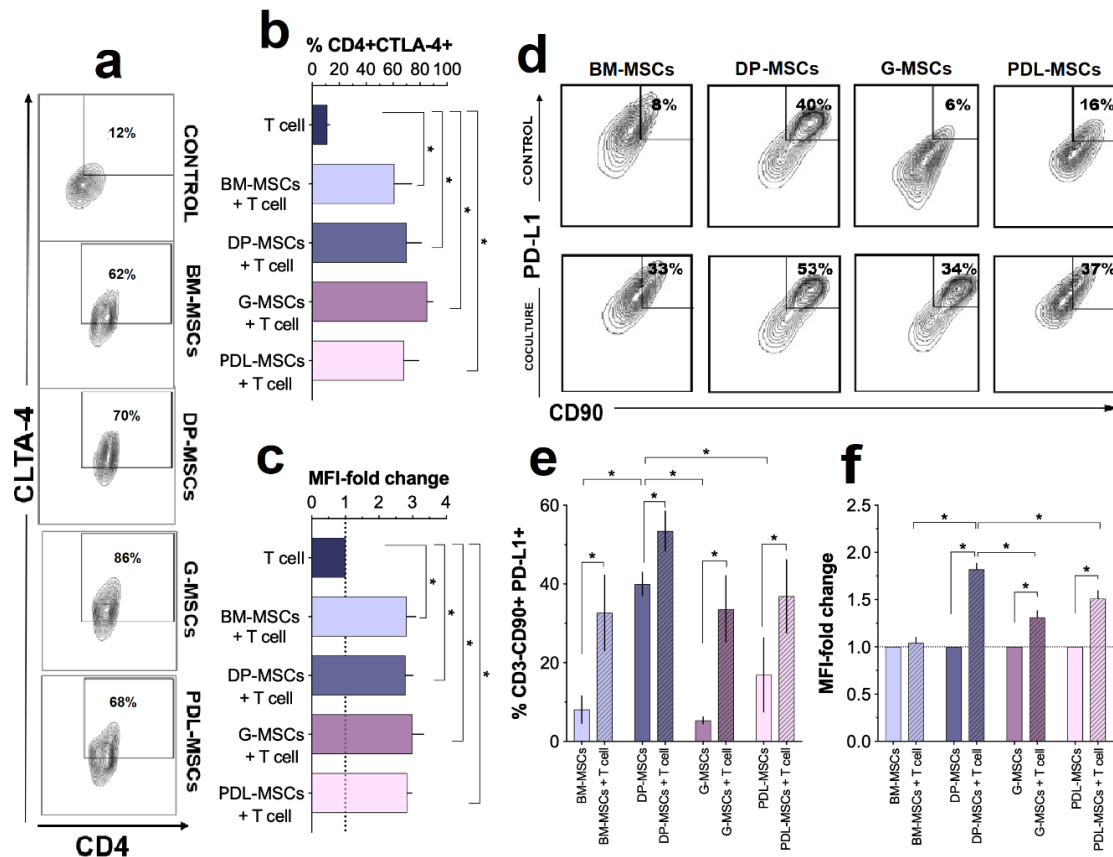


Figure 4. Increased expression of cytotoxic T-cell-associated Ag-4 (CTLA-4) in CD4⁺ T-cells and programmed death ligand 1 (PD-L1) in MSCs. CD3⁺ T-cells were activated with anti-CD3/CD28 and cocultured in the presence of BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs or PDL-MSCs at a 1:1 ratio of MSCs:T-cells. The expression of CTLA-4 in CD3⁺CD4⁺ cells cultured in the absence of MSCs was considered as the basal expression (Control). The percentage of CD3⁺CD4⁺CTLA-4⁺ cells and the fold increase in the CTLA-4 mean fluorescence intensity (MFI) were determined in the CD4⁺ population after four days of culture (n = 5). (a) Dot plots are representative of one experiment with the CD3⁺CD4⁺CTLA-4⁺ population. (b) Data are shown as the mean ± SEM of the percentage of CD4⁺ CTLA-4⁺ cells. (c) Fold increase in the CD4⁺ MFI of the CD4⁺CTLA-4⁺ population. PD-L1 expression in MSCs cultured in the absence of activated CD3⁺ T-cells was considered as the basal expression (Control). The percentage and MFI of PD-L1⁺ cells were determined in the CD3⁻CD90⁺ population after four days of culture (n = 5). (d) Dot plots are representative of one experiment. (e) Data are shown as the mean ± SEM of the percentage of CD3⁻CD90⁺PD-L1⁺ cells. (f) Fold increase in the PD-L1 MFI in the CD3⁻CD90⁺PD-L1⁺ population. * Significant difference at p < 0.05.

Co-cultures of BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs, and PDL-MSCs showed a significant increase in the percentage of CD4⁺CTLA-4⁺ cells (61% ± 22, 70% ± 9.73, 85% ± 8.04, and 68% ± 7.12, respectively) compared with the control (11% ± 2.63; p < 0.05.) (Figure 4a,b). Notably, there were no significant differences between the increases observed for MSCs from the different sources (Figure 4b). Similarly, we observed a significant increase in the MFI of CTLA-4 in CD4⁺CTLA-4⁺ MSCs from BM, PD, G, and PDL (2.93-, 2.80-, 3.02-, and 2.85-fold, respectively; p < 0.05), without differences between MSCs from different sources (Figure 4c). These results suggest that the presence of DT-MSCs,

similarly to BM-MSCs, promotes an increase in the expression of CTLA-4 in T-cells and that this molecule can contribute to reducing the proliferation of these T-cells in co-cultures.

We also previously determined that PD-L1 is expressed in BM-MSCs and that, through cell–cell contact, it participates in the decrease in T-cell proliferation [18]. Due to this, we evaluated the expression of PD-L1 in DP-MSCs, G-MSCs, and PDL-MSCs and compared its expression with that in BM-MSCs in co-cultures with activated T-cells (Figure 4d–f). The percentage and MFI of PD-L1⁺ in MSCs cultured in the absence of T-cells were considered as basal expression. The results showed a significant increase ($p < 0.05$) in the basal expression of PD-L1⁺ in DP-MSCs (CD3⁻CD90⁺PD-L1⁺; 40% \pm 5.3) compared with that in MSCs from the other sources (BM: 8.1% \pm 6.02; G: 5.4% \pm 1.5; PDL: 16.9% \pm 16.3). The presence of activated T-cells in co-cultures significantly increased ($p < 0.05$) the percentage of PD-L1⁺ in MSCs from all sources: BM (32.7% \pm 14.9), DP (53.5% \pm 8.7), G (33.6% \pm 14.6), and PDL (36.9% \pm 16.13) (Figure 4d,e). Although a trend toward a higher percentage was observed for the expression of PD-L1 in DP-MSCs, there were no significant differences when compared with PD-L1 expression in MSCs from the other sources. Regarding the increase in PD-L1 MFI in the CD3⁻CD90⁺PD-L1⁺ population, in co-cultures, significant increases were observed ($p < 0.05$) in those with MSCs isolated from DP (1.82-fold), G (1.32-fold), and PDL (1.50-fold) but not from BM (1.03-fold; Figure 4f). Interestingly, the difference in the increase in the expression of PD-L1 in DP-MSCs was significant ($p < 0.05$) when compared with that in MSCs from the other sources.

These results show greater PD-L1 expression in DP-MSCs than in those from BM, G and PDL, which could suggest differences in the immunosuppressive mechanisms of T-cells by DP-MSCs compared with MSCs from the other sources.

3.4. Cytokine and PGE₂ Secretion in MSC Co-cultures

Previous studies have confirmed the importance of IFN γ and TNF α [4] in inducing BM-MSCs' immunosuppressive properties. In turn, the decreased proliferation we observed could be related to the presence of Th2-type immunosuppressive cytokines such as IL-4 and IL-10 [4]. Based on the above, we evaluated the presence of cytokines that could be involved in the activation of the immunosuppressive response of MSCs (IFN γ and TNF α) and in the observed decrease in T-cell proliferation (IL-4 and IL-10). The concentration of cytokines detected in the conditioned medium of activated T-cells cultured in the absence of MSCs was considered the control. Concentrations of TNF α and IFN γ were detected in all conditioned media of co-cultures with MSCs (Figure 5a); however, only co-cultures with DP-MSCs and G-MSC showed significant decreases in TNF α (15.53 pg/mL \pm 1.88 and 14.55 pg/mL \pm 0.35, respectively; $p < 0.05$) compared with the control (42.60 pg/mL \pm 14.56). Regarding IFN γ , there was an increasing trend in the concentration of this cytokine in dental tissue cultures, but it was not statistically significant (Figure 5a). In contrast, higher concentrations of IL-10 ($p < 0.05$) were detected in conditioned media from co-cultures with DP-MSCs (17.37 pg/mL \pm 3.99), G-MSCs (12.65 pg/mL \pm 2.99), and PDL-MSCs (16.09 pg/mL \pm 3.07) compared with those with BM-MSCs (7.54 pg/mL \pm 0.12) and the control (7.35 pg/mL \pm 0.18) (Figure 5a). Interestingly—and contrary to what was observed for IL-10—a higher concentration of IL-4 ($p < 0.05$) was detected in co-cultures with BM-MSCs (57.95 pg/mL \pm 24.26) than in those from DP-MSCs (23.74 pg/mL \pm 7.57), G-MSC (22.75 pg/mL \pm 4.44), and PDL-MSCs (43.75 pg/mL \pm 7) (Figure 5a). These results suggest that the presence of TNF α and IFN γ differentially induce the secretion of immunosuppressive cytokines in DT-MSCs compared with BM-MSCs, with IL-4 being preferentially produced in co-cultures in the presence of the latter, while IL-10 is preferentially produced in those with DT-MSCs, which could be related to mechanisms other than cytokine-mediated immunosuppression between the two types of MSCs.

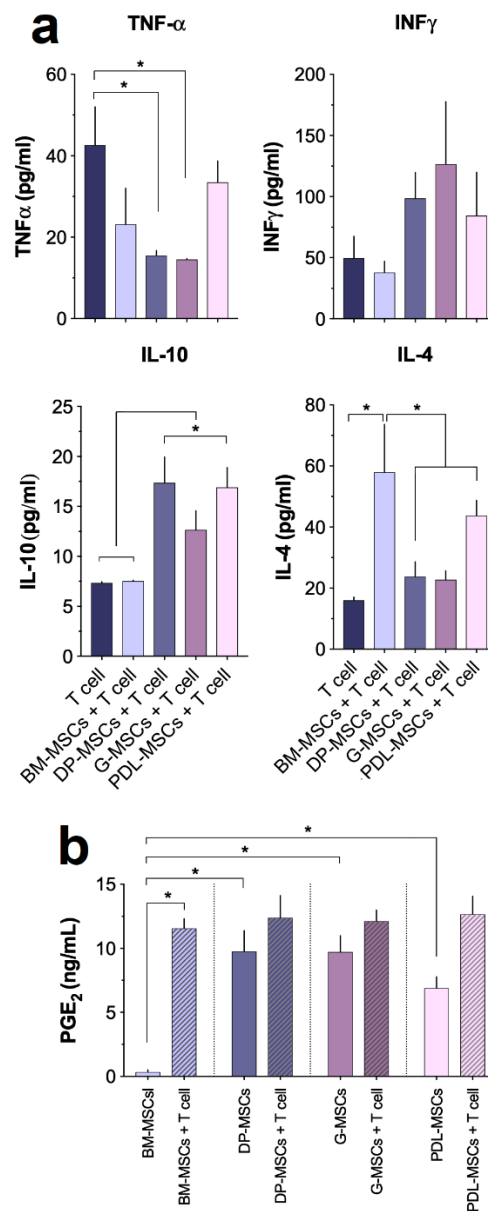


Figure 5. Molecule expression is differentially induced in co-cultures with MSCs from BM and dental tissues. CD3⁺ T-cells activated with anti-CD3/CD28 were cultured in the presence or absence of BM-MSCs or DP-MSCs or G-MSCs or PDL-MSCs at a 1:1 ratio of MSCs:T-cells. After four days of co-culture, TNF α , IFN γ , IL-10, and IL-4 were determined in the conditioned medium by cytometric bead array and PGE₂ by ELISA. (a) The concentration of cytokines detected in the conditioned medium of CD3⁺ T-cells in the absence of MSCs was considered as basal expression for tumor necrosis factor alpha (TNF α), interferon (IFN) γ , interleukin (IL)-10 and IL-4, (b) while for PGE₂, these were the concentrations detected in the conditioned medium of MSCs cultured in the absence of CD3⁺ T-cells. The data are presented as the mean \pm SEM of the concentrations of the analyzed molecules (n = 5, individual experiments). * Significant difference at $p < 0.05$. PGE₂, prostaglandin E₂; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

Similarly, PGE₂ is a molecule that decreases T-cell proliferation, stimulates the secretion of IL-4 and IL-10 and promotes T-cell differentiation toward lymphocytes with the regulatory phenotype CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ [29]. It has been shown that BM-MSCs secrete PGE₂ in response to IFN γ stimulus [14]; because we detected the presence of IFN γ in all co-cultures, we evaluated the concentration of PGE₂ in the conditioned medium of MSCs cultured in the absence and presence of activated T-cells. The concentration of PGE₂ detected in the conditioned medium of MSCs cultured in the absence of activated T-cells was considered as the basal expression of this molecule. We observed that the basal secretion of PGE₂ by DT-MSCs (DP-MSCs: 9.77 \pm 2.79 ng/mL, G-MSCs: 9.71 \pm 2.22 ng/mL and PDL-MSCs: 6.89 \pm 1.55 ng/mL) was significantly higher ($p < 0.05$) than that secreted by BM-MSCs (0.34 \pm 0.31 ng/mL) (Figure 5b). However, in the presence of activated T-cells, BM-MSCs significantly increased ($p < 0.05$) PGE₂ secretion (11.55 ng/mL \pm 1.29), but this value was similar to that observed in DT-MSCs under similar conditions (DP-MSCs: 12.39 \pm 2.99 ng/mL, G-MSCs: 12.12 \pm 1.49 ng/mL, and PDL-MSCs: 12.66 \pm 2.44 ng/mL), (Figure 5b). These results indicate differences in the basal secretion of PGE₂ between BM-MSCs and DT-MSCs; however, in the presence of activated T-cells, this secretion increases in BM-MSCs and reaches values similar those in DT-MSCs, which indicates that this molecule may be involved in inhibiting T-cell proliferation in co-cultures.

3.5. MSCs from Dental Tissues Induce a Similar Generation of T-cell Subsets Displaying a Regulatory Phenotype

Several studies have shown that molecules, such as IL-10, IL-4, and PGE₂, are involved in the induction of differentiation into regulatory T-cells [22,26,30]. Since we identified increased levels of these mediators in co-cultures with MSCs, which are related to the inhibition of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell proliferation and an increased frequency of CD4⁺CTLA-4⁺ cells, we assessed whether these findings were related to the generation of regulatory CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ and/or CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T-cells (Figure 6a–c). For this, T-cell populations were obtained from co-cultures, and the percentages and MFI of Foxp3⁺ cells and/or CTLA-4⁺ cells within the CD4⁺CD25⁺ fraction were determined. In lymphocytes activated in the absence of MSCs, the percentage of CD4⁺CD25⁺ T-cells positive for Foxp3 or CTLA-4 and the MFI of both molecules were determined and considered as basal values for T-cells with a regulatory phenotype (control). The results show that the presence of MSCs from all sources significantly increased ($p < 0.05$) the percentage of the CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ population (BM-MSCs: 4.13% \pm 1.22; DP-MSCs: 4.64% \pm 1.30; G-MSCs: 3.77% \pm 0.81, and PDL-MSCs: 3.33% \pm 1.25) compared with the control (0.54% \pm 0.37) (Figure 6a,b). However, the presence of MSCs did not favor a significant increase in Foxp3 MFI in CD4⁺CD25⁺ T-cells compared with the control (Figure 6a,b).

Similar results were observed with the four sources of MSCs regarding the generation of CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ regulatory cells because their presence significantly increased ($p < 0.05$) the percentage of this population (BM-MSCs: 32.30% \pm 7.03; DP-MSCs: 31% \pm 5.71, G-MSCs: 35.33% \pm 10.87, and PDL-MSCs: 28.55% \pm 7.3) compared with the control (3.23% \pm 0.8); an increase in CTLA-4 MFI in CD4⁺CD25⁺ T-cells compared with the control was not detected (Figure 6c). These results indicate that DT-MSCs and BM-MSCs have a similar capacity to generate populations with regulatory phenotypes and that these populations may be involved in the decrease in T-cell proliferation.

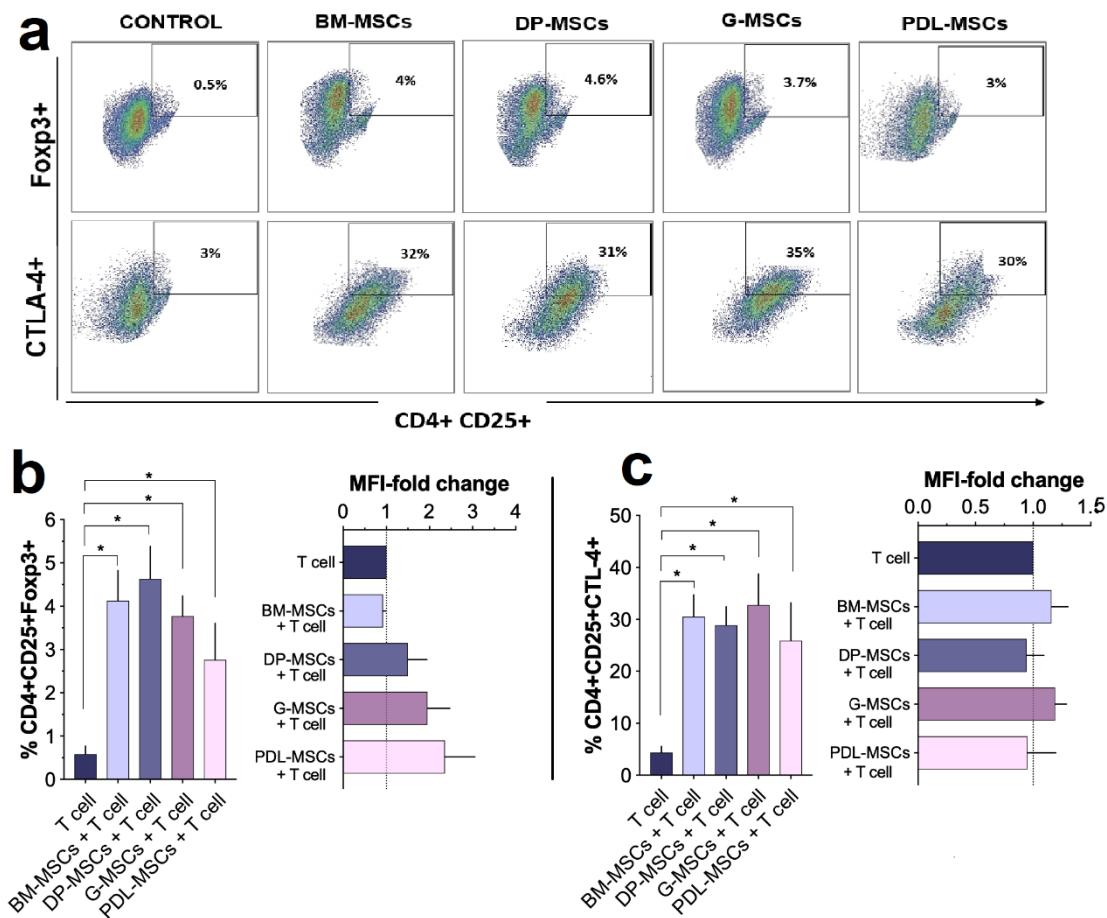


Figure 6. MSCs from dental tissues similar to those from BM induce the generation of T-cell subsets displaying a regulatory phenotype. CD3⁺ T-cells activated with anti-CD3/CD28 were co-cultured in the absence and presence of BM-MSCs or DP-MSCs or G-MSCs or PDL-MSCs at a 1:1 ratio of MSCs:T-cells (n = 5). The average percentage of Fxp3⁺ cells and CTLA-4⁺ cells, along with the fold increase in MFI of Fxp3⁺ or CTLA-4⁺ cells, were determined in the CD4⁺CD25⁺ population after four days of culture. The CD4⁺CD25⁺Fxp3⁺ and CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ populations determined from cultures in the absence of MSCs were considered as the control. (a) Dot plots representative of one experiment. (b) Data are shown as the mean ± SEM of the percentage of CD4⁺CD25⁺Fxp3⁺ cells and the fold increase in Fxp3⁺ MFI in the CD4⁺CD25⁺Fxp3⁺ population. (c) Data are shown as the mean ± SEM of the percentage of CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ cells and the fold increase in CTLA-4⁺ MFI in the CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ population. * Significant difference at p < 0.05.

4. Discussion

Currently, because of their immunoregulatory capacity, BM-MSCs have been used as a treatment for GVHD—a condition in which donor T-cells are the main effector cells participating in the immune response against host tissues [31]. BM-MSCs are the most used cells in clinical protocols; however, they have the disadvantage of being obtained by invasive procedures [9]. Notably, the presence of MSCs in dental tissues has been demonstrated [32,33], and the MSCs can be obtained through minimally invasive isolation techniques and even show an adequate proliferative capacity for expansion [34]. Different research teams have conducted in vitro studies with MSCs from different dental tissue sources and have reported immunosuppressive effects on those obtained from DP [35], G [15], and PDL [16]; however, the mechanisms by which they exert these functions have not been clearly established. To date, there is no in vitro study, under identical culture conditions, that compares the biological properties of MSCs from these sources and determines which MSC type shows the highest immunoregulatory

capacity, what mechanisms are associated with it, and if they share immunoregulatory properties with BM-MSCs, to determine if they can be considered alternative sources of MSCs for clinical protocols.

In the present *in vitro* study, we showed that BM-MSC, DP-MSCs, G-MSCs, and PDL-MSCs met the criteria established by the ISCT [7] regarding the morphology, immunophenotype, and capacity for osteogenic, chondrogenic, and adipogenic differentiation [36,37]; however, we observed a decreased adipogenic differentiation potential in DP-MSCs compared to MSCs from other sources, given the detection of small vacuoles within the cytoplasm of cells with fibroblastoid morphology, coinciding with what we previously reported for cervix MSCs [28]. In fact, it has also been reported that some sources of MSCs, such as UCB and adipose tissue, have decreased or no adipogenic differentiation [13,38].

Previous studies have established immunoregulatory effects of BM-MSCs *in vitro* in co-culture systems with total PBMCs [39] or in mixed lymphocyte reactions [40]; in fact, this same system has been used with DP-MSCs [35], G-MSCs [15] and PDL-MSCs [16]. However, few studies have analyzed this effect on CD3⁺ T-cell-enriched populations [41,42], which is important in the context of GVHD because this effector population is the most important in this disease [31]. To evaluate this, we analyzed the immunosuppressive effect of DT-MSCs on one CD3⁺ T-cell-enriched population. We observed that DT-MSCs were able to decrease the proliferation of CD3⁺ T-cells activated with anti-CD3/CD28; similar results were previously obtained by our team with BM-MSCs [18]. When we examined if the CD4⁺ and CD8⁺ populations are equally affected by DT-MSCs; we found that all significantly reduce the proliferation of both. These *in vitro* results are consistent with previous research showing that DP-MSCs, G-MSCs, and PDL-MSCs have immunosuppressive effects on PBMCs activated with PHA [15,16,35]. G-MSCs are the most studied dental tissue cells, primarily for their effects on tissue regeneration in maxillofacial surgery [33], and have been shown to decrease T-cell proliferation in *in vitro* and *in vivo* models, in addition to increasing the population of Tregs in joints, spleen, and peripheral blood and decreasing the Th17 population and the production of proinflammatory cytokines [43]. Furthermore, DP-MSCs [35], G-MSCs [41], and PDL-MSCs [16] are able to decrease T-cell proliferation via transforming growth factor- β 1 (TGF- β) *in vitro* [35] and by the induction of apoptosis via (FasL)/Fas *in vivo* [43] as well as in a collagen-induced arthritis (CIA) model [44]. Our results demonstrate for the first time, under identical culture conditions, that BM-MSCs, DP-MSCs, G-MSCs, and PDL-MSCs have the same potential to immunosuppress CD3⁺ T-cells activated with anti-CD3/CD28.

Previous *in vitro* studies in our laboratory have shown that BM-MSCs have immunoregulatory effects on T-cells through direct cell–cell contact between the two populations by the participation of surface molecules [18]; however, this aspect is unknown with DT-MSCs. Due to this, we evaluated some surface molecules involved in the mechanism of immune regulation in both DT-MSCs and CD3⁺ T-cells. In this sense, the expression of the adhesion molecules intracellular adhesion molecule (ICAM)-I and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-I in MSCs favors the decrease in proliferation in splenocytes activated with anti-CD3 antibodies [45]; additionally, both adhesion molecules can induce the expression of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4), which is related to the suppressive action and to the inhibition of T-cell proliferation [46,47]. We found that after four days of culture, the expression of CTLA-4 in T-cells of co-cultures with MSCs from all four sources significantly increased, coinciding with the decrease in T-cell proliferation; this suggests the participation of CTLA-4⁺ Tregs for this inhibition to occur. These observations are consistent with previous research, showing that BM-MSCs, UCB-MSCs, and PL-MSCs have immunosuppressive capacities by increasing CTLA-4 in co-cultures with CD3⁺ [18,48].

Likewise, the decrease in T-cell proliferation in co-cultures with MSCs may be related to the expression of PD-L1, which is involved in immunosuppression mediated by MSCs through cell contact-dependent mechanisms [20]; in fact, the PD-L1/PD-1 signaling pathway is considered an immune checkpoint in therapy for inflammation and cancer [49]. Currently, only PD-L1 has been reported in DP-MSCs [50]; this could be because dental tissues are exposed to constant immunological challenge, and thus, tolerance mechanisms increase, as in periodontitis—the most common oral pathology caused by bacterial infections—which can be resolved by PD-L1 negatively regulating

inflammation and maintaining periodontal tissue under constant immunological tolerance [17]. PD-L1 represses the maturation of Th17 and promotes CD4⁺CD25^{hi} Foxp3⁺ Treg differentiation [51]. This is one of the main mechanisms by which MSCs are considered non-immunogenic and establishes the reason for therapy in immune-mediated diseases such as GVHD, autoimmune encephalomyelitis, multiple sclerosis, type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, Crohn's disease, and cirrhosis, among others [52,53]. Our results show, under the co-culture conditions studied, that MSCs from the four cell sources significantly increased PD-L1 expression levels compared with their basal state. Similar results have been observed in BM-MSCs, UCB-MSCs and PL-MSCs [18] and Wharton's jelly [54]. Notably, DP-MSCs have constitutively higher levels of PD-L1 compared with MSCs from the other sources and an even greater expression of PD-L1 after co-culture with activated T-cells, which is an interesting aspect which we are studying and could be related to a different genetic signature from the other MSCs evaluated. Thus, in the present *in vitro* study, it was observed for the first time, under the same co-culture conditions, that BM-MSC, DP-MSCs, G-MSCs and PDL-MSCs have the potential to increase the surface expression of PD-L1 and of CTLA-4 on CD3⁺ T-cells activated with anti-CD3/CD28; both mechanisms participate in the decrease in proliferation observed in the latter.

IFN γ and TNF α have been shown to stimulate the synthesis of molecules such as IDO, PGE₂, and PD-L1 in MSCs [20], thus favoring the immunosuppressive effect of these cells [55]. Due to this, we analyzed the expression of both cytokines in the co-culture supernatants of each source of MSCs. Previous studies suggest that IFN γ and TNF α stimulate IDO secretion in placental MSCs [56] and in those MSCs from human exfoliated deciduous teeth (SHED) (SHED) [57]; this enzyme depletes tryptophan, catalyzing its degradation in the kynurenine (KYN) pathway. Both the reduction in local tryptophan concentration and the generation of KYN metabolites contribute to the immunoregulatory effects of IDO. IDO expression in antigen-presenting cells (APCs) has been suggested to induce the secretion of IL-10 by Tregs [58], promoting the inhibition of proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells [57,58]. Certain studies suggest that an inflammatory stimulus, through IFN γ , TNF α , CoX-2, and IDO, is a prerequisite for MSCs to have immunosuppressive properties. Our results showed the presence of IFN γ and TNF α in co-cultures. As described in other studies with BM, UCB, PL, adipose tissue (AT) and Wharton's jelly [20,59], even despite low IFN γ and TNF α production, it was found that the concentrations detected are sufficient to stimulate the immunosuppressive capacity in MSCs and, thus, inhibit T-cell proliferation.

Similarly, the decrease in T-cell proliferation observed in co-cultures could be related to the presence of immunosuppressive cytokines. It has been observed that T-cell activation in the presence of BM-MSCs induces the secretion of Th2 anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10). Moreover, TNF α in combination with IFN γ increases the immunosuppression mediated by MSCs by promoting the secretion of other immunosuppressive molecules such as PGE₂ [14,19]. Therefore, because of the observed pattern of production of IFN γ and TNF α in co-culture supernatants, we also analyzed the presence of IL-10, IL-4, and PGE₂. Our results showed a significant increase in the expression of IL-4 in BM-MSCs compared with DT-MSCs, suggesting that DT-MSCs may not have the ability to generate a Th2-type response. The increase in IL-4 has been reported to promote Treg differentiation [60]. On the other hand—and contrary to the detected levels of IL-4—we observed a significant increase in the production of IL-10 in co-cultures of DT-MSCs compared with BM-MSCs; these observations are consistent with previous research, in which it was determined that AT-MSCs have immunosuppressive capabilities by increasing IL-10 *in vitro* and *in vivo* in a CIA model [61].

Studies conducted in co-cultures of minipig BM-MSCs with MLR also demonstrated that PGE₂ can stimulate the secretion of IL-10 and IFN γ , favoring Treg differentiation [25]. Using antibodies, IL-10 has been determined to be produced by MSCs and is important for exerting immunosuppressive effects on T-cells and inducing Treg differentiation [21]. Similarly, it has been shown that PGE₂ stimulates the secretion of IL-10 and IL-4, favoring a decrease in T-cell proliferation and induction to CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ lymphocytes [29,61]. The immunomodulatory effect of MSCs on allogeneic responses can be explained in part by cyclooxygenase-2 (COX-2) derived from PGE₂. The biosynthesis

of PGE₂ by MSCs is not only constitutive but also induced under inflammatory stimuli [4,18]. Our *in vitro* results showed that DT-MSCs constitutively expressed significantly higher concentrations of PGE₂ than BM-MSCs; however, in co-culture with activated T-cells, we observed similar concentrations in the four sources studied. Dental tissues have an immune profile associated with mucous membranes, unlike BM, and this could be related to the difference in basal production of PGE₂ by DT-MSCs compared with BM-MSCs; in fact, it has been described that PGE₂ is necessary for G-MSCs to perform immunosuppressive functions through the prostaglandin E₂-EP₃ signaling pathway [61]. Due to the variability in the expression pattern of soluble molecules identified in the co-culture supernatants of MSCs with CD3⁺ activated with anti-CD3/CD28, it can be hypothesized that BM-MSCs and DT-MSCs, under identical culture conditions, exert their immunosuppressive effect by different mechanisms, which could be determined by their histological origin.

Because we observed high concentrations of IL-10 and PGE₂ in co-cultures, in addition to IFN γ secretion, and because it has been shown that these molecules favor the generation of Tregs [60], we decided to detect the presence of Tregs in our co-cultures. Tregs are characterized by their suppressive and anergic properties. The two most relevant classes of CD4⁺ Tregs are the CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ lineages [25]; therefore, we decided to identify them. Our *in vitro* results indicate a significant increase in both populations compared with the levels detected in the non-activated T-cell subset. These results coincide with those obtained for DP-MSCs in co-cultures with CD4⁺ T-cells where an increase in the CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ population is observed [62]. This is the first study showing that MSCs from DP, G, and PDL similarly induce the generation of Tregs *in vitro* under these co-culture conditions. Periodontal tissue has Tr1-like T-cells—a type of Treg recently described patrolling peripheral tissue [22]. Similarly, it has been reported that the presence of PDL-MSCs and G-MSCs in co-cultures with activated PBMCs increases the CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ population and suppresses T-cell effector cells, as with Th1/Th2/Th17 populations [63]. Paradoxically, it has been reported that G-MSCs *in vitro* are not capable of generating Tregs; however, after their application in an acute GVHD model, high levels of Foxp3 expression were detected, along with a reduction in the levels of proinflammatory cytokines IL-17 and IFN γ and an increase in IL-2 levels, the role of which is important for the differentiation of induced regulatory T-cells (iTregs), supporting the suppressor function of CD4 iTregs under inflammatory conditions [64]. Recent studies have shown that the expression of CD39 on CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs catalyzes the sequential generation of adenosine by degradation of extracellular ATP/ADP by CD39 and conversion of 5'-AMP by CD73 [65,66]. These events lead to a marked reduction in T-cell proliferation and secretion of proinflammatory cytokines. Interestingly, it has been demonstrated that G-MSCs not only express CD39 but also increase the frequency of CD39⁺Foxp3⁺ Tregs, which supports the generation of adenosine and promotes immune suppression of effector T-cells *in vitro* and in an acute GVHD model [64]. Currently, in our laboratory, we are studying the generation of different Treg subsets by MSCs from the different sources of dental tissues used in this study.

In summary, our study shows differences in the production of cytokines and surface molecules that may participate in T-cell immunosuppression by DT-MSCs. However, interestingly, MSCs from the dental sources evaluated presented the same capacity to reduce the proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ populations, which indicates that any of the three sources of DT-MSCs would be appropriate for *in vivo* immunoregulatory applications against T-cells, which is important because they are effector cells in immunological diseases such as graft-versus-host disease. Nevertheless, it is necessary to evaluate the immunosuppressive capacity of DT-MSCs against other cells of the immune system to determine if the functional differences we have observed are required for the suppression of the immune activity of a particular cell.

5. Conclusions

This is the first study demonstrating, under the same culture conditions, that MSCs from DP, G, and PDL have the same in vitro capacity to decrease the proliferation of activated CD3⁺ T-cell-enriched populations and that this capacity is similar to that observed with BM-MSCs. Additionally, we demonstrated differences in the production of cytokines and surface and secreted molecules that may participate in T-cell immunosuppression in co-cultures in the presence of DT-MSCs compared with BM-MSCs; however, it is important to mention that the four sources studied had the same capacity to induce the generation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ T-cell subsets displaying a regulatory phenotype. MSCs have become one of the most attractive cell types for cell therapy due to their immunosuppressive properties. At present, several clinical trials involving the use of MSCs for GVHD and autoimmune diseases are in progress. However, because dental tissues are small sources of MSCs, it is necessary to use explant cultures to obtain individual MSCs, which can be cultivated afterwards in successive passages to expand the cells to reach the number needed for clinical applications ($1-5 \times 10^6$ /kg) [67]. Different groups have been able to expand MSCs on a clinical scale and in sufficient numbers for their use in clinical trials [68,69], which can be applied in the case of MSCs from dental tissues. In light of our in vitro results, we propose that, in addition to BM-MSCs, DT-MSCs might be reliable candidates for future therapeutic applications for the treatment of immunological diseases, such as GVHD, graft rejection, or autoimmune diseases. Finally, although it is important to determine the in vitro immunoregulatory potential of DT-MSCs, it is necessary to evaluate these capacities in animal models to analyze the decrease of proinflammatory cytokine production by MSC transplantation. These experiments are being planned for future studies.

Supplementary Materials: The supplementary materials are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/12/1491/s1>.

Author Contributions: M.d.P.D.I.R.-R.: methodology, collection of data, interpretation of data, and manuscript writing; M.A.Á.-P., V.A.C.-M., A.M.-G., H.M., G.F.-G., S.C.-C., D.D., and F.C.-G.: methodology and collection of data; J.J.M.: conceptualization, supervision, formal analysis, interpretation of data, manuscript writing and editing, and funding acquisition.

Funding: This article constitutes a partial fulfillment of the Posgraduate in Production Sciences and Animal Health, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City, Mexico. Maria Del Pilar De la Rosa Ruiz acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) number 309198 for the training received during the studies. Grant sponsor: we are indebted to CONACYT for support to J.J.M.M. (grant no. 258205) and IMSS support to J.J.M.M. (grant no. 1731).

Acknowledgments: We gratefully acknowledge the excellent technical assistance of Erika Hernandez Estevez, Marta Elena Castro Manreza, Eugenia Flores Figueroa, Guadalupe Fajardo Orduña, Martina Flores Jiménez, Jessica L. Prieto-Chavez, Lourdes Andrea Arriaga Pizano, Patricia Flores, Karina Chavez Rueda, Dafne Lorenzana, and Carlos Montoya.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Friedenstein, A.J.; Chailakhjan, R.K.; Lalykina, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Prolif.* **1970**, *3*, 393–403. [[CrossRef](#)]
2. Pittenger, M.F. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* **1999**, *284*, 143–147. [[CrossRef](#)]
3. Ren, H.; Sang, Y.; Zhang, F.; Liu, Z.; Qi, N.; Chen, Y. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord, Dental Pulp, and Menstrual Blood as Sources for Cell Therapy. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, 3516574. [[CrossRef](#)]
4. Aggarwal, S.; Pittenger, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **2005**, *105*, 1815–1822. [[CrossRef](#)]
5. Meisel, R.; Zibert, A.; Laryea, M.; Gobel, U.; Daubener, W.; Dilloo, D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* **2004**, *103*, 4619–4621. [[CrossRef](#)]

6. Kuzmina, L.A.; Petinati, N.A.; Parovichnikova, E.N.; Lubimova, L.S.; Gribanova, E.O.; Gaponova, T.V.; Shipounova, I.N.; Zhironkina, O.A.; Bigildeev, A.E.; Svinareva, D.A.; et al. Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. *Stem Cells Int.* **2012**, *2012*, 968213. [[CrossRef](#)]
7. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [[CrossRef](#)]
8. Philippe, B.; Luc, S.; Valerie, P.B.; Jerome, R.; Alessandra, B.R.; Louis, C. Culture and Use of Mesenchymal Stromal Cells in Phase I and II Clinical Trials. *Stem Cells Int.* **2010**, *2010*, 503593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Caplan, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: New insight. *J. Pathol.* **2009**, *217*, 318–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Davies, J.E.; Walker, J.T.; Keating, A. Concise Review: Wharton’s Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Transl. Med.* **2017**, *6*, 1620–1630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Baer, P.C.; Geiger, H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: Tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int.* **2012**, *2012*, 812693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Riordan, N.H.; Ichim, T.E.; Min, W.P.; Wang, H.; Solano, F.; Lara, F.; Alfaro, M.; Rodriguez, J.P.; Harman, R.J.; Patel, A.N.; et al. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J. Transl. Med.* **2009**, *7*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Montesinos, J.J.; Flores-Figueroa, E.; Castillo-Medina, S.; Flores-Guzman, P.; Hernandez-Estevez, E.; Fajardo-Orduna, G.; Orozco, S.; Mayani, H. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: Comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy* **2009**, *11*, 163–176. [[CrossRef](#)]
14. Gorski, B. Gingiva as a new and the most accessible source of mesenchymal stem cells from the oral cavity to be used in regenerative therapies. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* **2016**, *70*, 858–871. [[CrossRef](#)]
15. Zhang, Q.; Shi, S.; Liu, Y.; Uyanne, J.; Shi, Y.; Shi, S.; Le, A.D. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 7787–7798. [[CrossRef](#)]
16. Wada, N.; Menicanin, D.; Shi, S.; Bartold, P.M.; Gronthos, S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J. Cell Physiol.* **2009**, *219*, 667–676. [[CrossRef](#)]
17. Yuan, H.; Zhang, H.; Hong, L.; Zhao, H.; Wang, J.; Li, H.; Che, H.; Zhang, Z. MicroRNA let-7c-5p Suppressed Lipopolysaccharide-Induced Dental Pulp Inflammation by Inhibiting Dentin Matrix Protein-1-Mediated Nuclear Factor kappa B (NF-kappaB) Pathway In Vitro and In Vivo. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 6656–6665. [[CrossRef](#)]
18. Castro-Manrreza, M.E.; Mayani, H.; Monroy-Garcia, A.; Flores-Figueroa, E.; Chavez-Rueda, K.; Legorreta-Haquet, V.; Santiago-Osorio, E.; Montesinos, J.J. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: A comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells. *Stem Cells Dev.* **2014**, *23*, 1217–1232. [[CrossRef](#)]
19. Augello, A.; Tasso, R.; Negrini, S.M.; Amateis, A.; Indiveri, F.; Cancedda, R.; Pennesi, G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur. J. Immunol.* **2005**, *35*, 1482–1490. [[CrossRef](#)]
20. Sheng, H.; Wang, Y.; Jin, Y.; Zhang, Q.; Zhang, Y.; Wang, L.; Shen, B.; Yin, S.; Liu, W.; Cui, L.; et al. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res.* **2008**, *18*, 846–857. [[CrossRef](#)]
21. Ryan, J.M.; Barry, F.; Murphy, J.M.; Mahon, B.P. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* **2007**, *149*, 353–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Selmani, Z.; Naji, A.; Zidi, I.; Favier, B.; Gaiffe, E.; Obert, L.; Borg, C.; Saas, P.; Tiberghien, P.; Rouas-Freiss, N.; et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25^{high}FOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells* **2008**, *26*, 212–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. English, K.; Wood, K.J. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2013**, *3*, 15560. [[CrossRef](#)]

24. Melief, S.M.; Schrama, E.; Brugman, M.H.; Tiemessen, M.M.; Hoogduijn, M.J.; Fibbe, W.E.; Roelofs, H. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* **2013**, *31*, 1980–1991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hsu, W.T.; Lin, C.H.; Chiang, B.L.; Jui, H.Y.; Wu, K.K.; Lee, C.M. Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10+IFN-gamma+CD4+ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 2372–2380. [[CrossRef](#)]
26. English, K.; Ryan, J.M.; Tobin, L.; Murphy, M.J.; Barry, F.P.; Mahon, B.P. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* **2009**, *156*, 149–160. [[CrossRef](#)]
27. Krampera, M.; Cosmi, L.; Angeli, R.; Pasini, A.; Liotta, F.; Andreini, A.; Santarlasci, V.; Mazzinghi, B.; Pizzolo, G.; Vinante, F.; et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **2006**, *24*, 386–398. [[CrossRef](#)]
28. Montesinos, J.J.; Mora-Garcia Mde, L.; Mayani, H.; Flores-Figueroa, E.; Garcia-Rocha, R.; Fajardo-Orduna, G.R.; Castro-Manreza, M.E.; Weiss-Steider, B.; Monroy-Garcia, A. In vitro evidence of the presence of mesenchymal stromal cells in cervical cancer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity. *Stem Cells Dev.* **2013**, *22*, 2508–2519. [[CrossRef](#)]
29. Kalinski, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 21–28. [[CrossRef](#)]
30. Kampan, N.C.; Madondo, M.T.; McNally, O.M.; Stephens, A.N.; Quinn, M.A.; Plebanski, M. Interleukin 6 Present in Inflammatory Ascites from Advanced Epithelial Ovarian Cancer Patients Promotes Tumor Necrosis Factor Receptor 2-Expressing Regulatory T Cells. *Front Immunol.* **2017**, *8*, 1482. [[CrossRef](#)]
31. Plock, J.A.; Schnider, J.T.; Zhang, W.; Schweizer, R.; Tsuji, W.; Kostereva, N.; Fanzio, P.M.; Ravuri, S.; Solari, M.G.; Cheng, H.Y.; et al. Adipose- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Prolong Graft Survival in Vascularized Composite Allotransplantation. *Transplantation* **2015**, *99*, 1765–1773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Fawzy El-Sayed, K.M.; Dorfer, C.E. Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: A Unique Tissue Engineering Gem. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, 7154327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Fournier, B.P.; Ferre, F.C.; Couty, L.; Lataillade, J.J.; Gourven, M.; Naveau, A.; Coulomb, B.; Lafont, A.; Gogly, B. Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 2891–2899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gronthos, S.; Mankani, M.; Brahimi, J.; Robey, P.G.; Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13625–13630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ding, G.; Niu, J.; Liu, Y. Dental pulp stem cells suppress the proliferation of lymphocytes via transforming growth factor-beta1. *Hum. Cell* **2015**, *28*, 81–90. [[CrossRef](#)]
36. Tomic, S.; Djokic, J.; Vasilijic, S.; Vucevic, D.; Todorovic, V.; Supic, G.; Colic, M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells Dev.* **2011**, *20*, 695–708. [[CrossRef](#)]
37. Vasandan, A.B.; Shankar, S.R.; Prasad, P.; Sowmya Jahnvi, V.; Bhonde, R.R.; Jyothi Prasanna, S. Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament. *J. Cell Mol. Med.* **2014**, *18*, 344–354. [[CrossRef](#)]
38. Sibov, T.T.; Severino, P.; Marti, L.C.; Pavon, L.F.; Oliveira, D.M.; Tobo, P.R.; Campos, A.H.; Paes, A.T.; Amaro, E., Jr.; Gamarra, L.F.; et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: Parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. *Cytotechnology* **2012**, *64*, 511–521. [[CrossRef](#)]
39. Le Blanc, K.; Rasmusson, I.; Gotherstrom, C.; Seidel, C.; Sundberg, B.; Sundin, M.; Rosendahl, K.; Tammik, C.; Ringden, O. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J. Immunol.* **2004**, *60*, 307–315. [[CrossRef](#)]
40. Di Nicola, M.; Carlo-Stella, C.; Magni, M.; Milanese, M.; Longoni, P.D.; Matteucci, P.; Grisanti, S.; Gianni, A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **2002**, *99*, 3838–3843. [[CrossRef](#)]
41. Pierdomenico, L.; Bonsi, L.; Calvitti, M.; Rondelli, D.; Arpinati, M.; Chirumbolo, G.; Becchetti, E.; Marchionni, C.; Alviano, F.; Fossati, V.; et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* **2005**, *80*, 836–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Yildirim, S.; Zibandeh, N.; Genc, D.; Ozcan, E.M.; Goker, K.; Akkoc, T. The Comparison of the Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Dental Follicles. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, 4682875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zhao, Y.; Wang, L.; Jin, Y.; Shi, S. Fas ligand regulates the immunomodulatory properties of dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* **2012**, *91*, 948–954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gu, Y.; Shi, S. Transplantation of gingiva-derived mesenchymal stem cells ameliorates collagen-induced arthritis. *Arthritis Res.* **2016**, *18*, 262. [[CrossRef](#)]
45. Ren, G.; Zhao, X.; Zhang, L.; Zhang, J.; L'Huillier, A.; Ling, W.; Roberts, A.I.; Le, A.D.; Shi, S.; Shao, C.; et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 2321–2328. [[CrossRef](#)]
46. Delasos, L.; Desai, A.; Lopetegui Lia, N.; Kethireddy, N.; Ray, C. A Case of Immunotherapy-Induced Colitis Complicated by Perforation and Treated with Infliximab Postoperatively. *Case Rep. Oncol. Med.* **2019**, *2019*, 9069354. [[CrossRef](#)]
47. Wing, K.; Yamaguchi, T.; Sakaguchi, S. Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol.* **2011**, *32*, 428–433. [[CrossRef](#)]
48. Gaber, T.; Schonbeck, K.; Hoff, H.; Tran, C.L.; Strehl, C.; Lang, A.; Ohrndorf, S.; Pfeiffenberger, M.; Rohner, E.; Matziolis, G.; et al. CTLA-4 Mediates Inhibitory Function of Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2312. [[CrossRef](#)]
49. Pinchuk, I.V.; Powell, D.W. Immunosuppression by Intestinal Stromal Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1060*, 115–129.
50. Yuan, W.; Wang, X.; Zhang, J.; Zhou, W.; Feng, Y.; Chen, J.; Zhang, P. Programmed death ligand 1 negatively regulates inflammatory response of chronic periodontitis. *West China J. Stomatol.* **2015**, *33*, 366–369.
51. Luz-Crawford, P.; Noel, D.; Fernandez, X.; Khoury, M.; Figueroa, F.; Carrion, F.; Jorgensen, C.; Djouad, F. Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 45272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Cao, W.; Cao, K.; Cao, J.; Wang, Y.; Shi, Y. Mesenchymal stem cells and adaptive immune responses. *Immunol. Lett.* **2015**, *168*, 147–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Singer, N.G.; Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of inflammation. *Annu. Rev. Pathol.* **2011**, *6*, 457–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Tipnis, S.; Viswanathan, C.; Majumdar, A.S. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Role of B7-H1 and IDO. *Immunol. Cell Biol.* **2010**, *88*, 795–806. [[CrossRef](#)]
55. Polchert, D.; Sobinsky, J.; Douglas, G.; Kidd, M.; Moadsiri, A.; Reina, E.; Genrich, K.; Mehrotra, S.; Setty, S.; Smith, B.; et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 1745–1755. [[CrossRef](#)]
56. Chang, C.J.; Yen, M.L.; Chen, Y.C.; Chien, C.C.; Huang, H.I.; Bai, C.H.; Yen, B.L. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. *Stem Cells* **2006**, *24*, 2466–2477. [[CrossRef](#)]
57. Alipour, R.; Masoumi Karimi, M.; Hashemi-Beni, B.; Adib, M.; Sereshki, N.; Sadeghi, F. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Dispensable for The Immunomodulatory Function of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *Cell J.* **2017**, *18*, 597–608.
58. Stone, T.W.; Darlington, L.G. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 609–620. [[CrossRef](#)]
59. Luan, X.; Li, G.; Wang, G.; Wang, F.; Lin, Y. Human placenta-derived mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation and support the culture expansion of cord blood CD34(+) cells: A comparison with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* **2013**, *45*, 32–38. [[CrossRef](#)]
60. Nojehdehi, S.; Soudi, S.; Hesampour, A.; Rasouli, S.; Soleimani, M.; Hashemi, S.M. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on experimental type-1 autoimmune diabetes. *J. Cell Biochem.* **2018**, *119*, 9433–9443. [[CrossRef](#)]
61. Li, P.; Zhao, Y.; Ge, L. Therapeutic effects of human gingiva-derived mesenchymal stromal cells on murine contact hypersensitivity via prostaglandin E2-EP3 signaling. *Stem Cell Res.* **2016**, *7*, 103. [[CrossRef](#)]
62. Hong, J.W.; Lim, J.H.; Chung, C.J.; Kang, T.J.; Kim, T.Y.; Kim, Y.S.; Roh, T.S.; Lew, D.H. Immune Tolerance of Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells Mediated by CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) Regulatory T-Cells and Induced by TGF-beta1 and IL-10. *Yonsei. Med. J.* **2017**, *58*, 1031–1039. [[CrossRef](#)]

63. Ng, J.; Hynes, K.; White, G.; Sivanathan, K.N.; Vandyke, K.; Bartold, P.M.; Gronthos, S. Immunomodulatory Properties of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Cells. *J. Cell Biochem.* **2016**, *117*, 2844–2853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ni, X.; Xia, Y.; Zhou, S.; Peng, H.; Wu, X.; Lu, H.; Wang, H.; Liu, R.; Blazar, B.R.; Gu, J.; et al. Reduction in murine acute GVHD severity by human gingival tissue-derived mesenchymal stem cells via the CD39 pathways. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Naamani, O.; Chaimovitz, C.; Douvdevani, A. Pharmacological preconditioning with adenosine A(1) receptor agonist suppresses cellular immune response by an A(2A) receptor dependent mechanism. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *20*, 205–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ohta, A.; Sitkovsky, M. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Front Immunol.* **2014**, *5*, 304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Fajardo-Orduna, G.R.; Mayani, H.; Montesinos, J.J. Hematopoietic Support Capacity of Mesenchymal Stem Cells: Biology and Clinical Potential. *Arch. Med. Res.* **2015**, *46*, 589–596. [[CrossRef](#)]
68. Martin-Manso, G.; Hanley, P.J. Using the quantum cell expansion system for the automated expansion of clinical-grade bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1283*, 53–63.
69. Carmelo, J.G.; Fernandes-Platzgummer, A.; Cabral, J.M.; da Silva, C.L. Scalable ex vivo expansion of human mesenchymal stem/stromal cells in microcarrier-based stirred culture systems. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1283*, 147–159.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).