

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**ESTUDIO DE LA VÍA ADENOSINÉRGICA EN CÉLULAS ESTROMALES
MESENQUIMALES Y SU EFECTO INMUNOSUPRESOR SOBRE CÉLULAS T**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

LUIS IGNACIO POBLANO PÉREZ

COMITÉ TUTORAL:

CODIRECTOR EXTERNO: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS

CODIRECTOR INTERNO: DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

ASESOR: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

México CD.MX.

7 de febrero de 2018

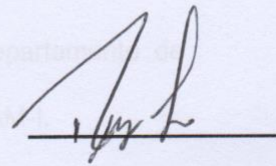
“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 592912

Los miembros del jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes, aprobaron la Tesis titulada: "ESTUDIO DE LA VÍA ADENOSINÉRGICA EN CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES Y SU EFECTO INMUNOSUPRESOR SOBRE CÉLULAS T" que presentó: Luis Ignacio Poblano Pérez, el día 07 de febrero de 2018

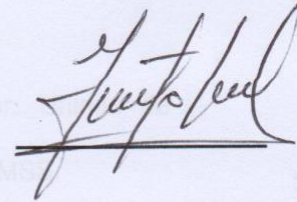
Presidente:

Dra. Leonor Rodríguez Cruz,
Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



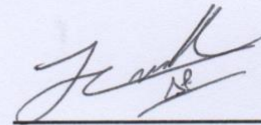
Secretario:

Dr. Monroy García Alberto
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas.
CMN Siglo XXI. IMSS



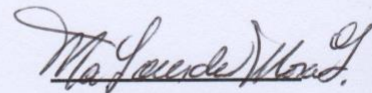
Vocal 1:

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez
Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



Vocal 2:

Dra. María de Lourdes Mora García,
Unidad de diferenciación celular y cáncer
FES-Zaragoza, UNAM





ESTUDIO DE LA VÍA
ADENOSINÉRGICA EN CÉLULAS
ESTROMALES MESENQUIMALES Y
SU EFECTO INMUNOSUPRESOR
SOBRE CÉLULAS T

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 7 del mes de febrero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. LEONOR RODRIGUEZ CRUZ
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DRA. MARIA DE LOURDES MORA GARCIA
DR. ALBERTO MONROY GARCIA



Luis Ignacio Poblano

LUIS IGNACIO POBLANO PEREZ
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: LUIS IGNACIO POBLANO PEREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ

Julio Cesar de Lara Isassi
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

Sara Lucia Camargo Ricalde

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

Leonor Rodriguez Cruz

DRA. LEONOR RODRIGUEZ CRUZ

VOCAL

Julio Cesar Almanza Perez

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

Maria Lourdes Mora Garcia

DRA. MARIA DE LOURDES MORA GARCIA

SECRETARIO

Alberto Monroy Garcia

DR. ALBERTO MONROY GARCIA

Miembros del Comité Tutorial

Co-director externo

Dr. Juan José Montesinos Montesinos, Laboratorio de Células Troncales Mesenquimales. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas. CMN Siglo XXI. IMSS.

Co-director interno

Dr. José Luis Gómez Olivares, Laboratorio de Biomembranas. Departamento de Ciencias de la Salud División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.

Asesor

Dr. Monroy García Alberto, Laboratorio de Inmunología y Cáncer. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas. CMN Siglo XXI. IMSS.

Agradecimientos

- Al Posgrado en Biología Experimental de la UAM Iztapalapa, por la oportunidad otorgada.

- Al CONACyT, por el sustento recibido durante la permanencia en el programa del posgrado.

- Al Programa para la Formación de Investigadores y al Fondo de Investigación en Salud, IMSS por el apoyo ofrecido para este proyecto (1311).

- A los miembros del comité tutor: Dr. Juan José Montesinos, Dr. Gómez Olivares José Luis y Dr. Monroy García Alberto por la asesoría brindada para la realización del presente trabajo.

- Al Dr. Juan José, por la oportunidad de dejarme ser parte de su equipo de trabajo y el apoyo durante la realización del proyecto.
- A todos los integrantes del laboratorio de Células Troncales Mesenquimales de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI.
- A la M. en C. Erika Hernández Estévez por el apoyo y la orientación brindada para el desarrollo del trabajo experimental.
- Al M. en C. Luis Roberto Ávila Ibarra por el apoyo brindado en el desarrollo de las técnicas de cromatografía en capa fina y UPLC
- A la Dra. Marta Castro Manreza por tomarse el tiempo de revisar y aportar correcciones en este escrito.

RESUMEN

Las células troncales/estromales mesenquimales (MSCs) tienen un potencial de aplicación en el tratamiento de diferentes enfermedades inmunológicas debido a su capacidad inmunoreguladora. En la actualidad, la médula ósea (MO) representa la fuente principal de MSCs. Sin embargo, nuestro grupo de investigación ha obtenido MSCs de fuentes alternativas como la pulpa dental (PD), placenta (PL) y sangre de cordón umbilical (SCU), con capacidad de inmunoregulación similar a las de la MO. Algunos grupos de trabajo han demostrado que las MSCs de la MO suprimen la proliferación de linfocitos T a través de la producción de adenosina (ADO) mediada por la coexpresión de las ectoenzimas CD39 y CD73. Sin embargo, se desconoce si las MSCs de otras fuentes recurren a esta vía. Con la finalidad de contribuir al conocimiento de las propiedades inmunosupresoras de las MSCs provenientes de fuentes alternativas a la MO, en este trabajo se determinó si éstas recurren a la vía adenosinérgica para modular la proliferación de las células T.

Nuestros resultados muestran que las MSCs de PD, PL y SCU prácticamente no expresan CD39 en su membrana, sin embargo, si expresan altos porcentajes de CD73 a nivel poblacional y membranal. Esto indica que, a diferencia de las MSCs de la MO, aquellas provenientes de las fuentes alternativas analizadas, no producen ADO a partir de ATP. En contraparte, las MSCs de todas las fuentes producen de forma similar altas concentraciones de ADO a partir de AMP, siendo funcional dado que inhibe la proliferación de linfocitos CD3⁺. En conclusión, nuestros resultados sugieren que las MSCs de PD, PL y SCU contrario a aquellas de la MO, presentan diferencias en los mecanismos inmunosupresores en los que se involucra la vía adenosinérgica. Lo anterior, se debe considerar en la posible aplicación clínica de las MSCs provenientes de dichas fuentes alternativas, como terapia celular inmunosupresora.

ABSTRACT

Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) have an application potential in the treatment of different immunological diseases due to their immunoregulatory capacity. Currently, bone marrow (BM) represents the main source of MSCs, however, our research group has obtained MSC from alternative sources such as dental pulp (DP), placenta (PL) and umbilical cord blood (UCB), with immunoregulation capacity similar to those of BM. Some working groups have shown that MSCs of BM suppress the proliferation of T lymphocytes through the production of adenosine (ADO) mediated by the co-expression of the ectoenzymes CD39 and CD73, however, it is unknown whether MSCs from other sources recur to this way. With the purpose of contributing to the knowledge of the immunosuppressive properties of MSCs from sources other than BM, in this work it was determined if you are recurrent to the adenosynergic pathway to modulate the proliferation of T cells.

Our results show that the MSCs of DP, PL and UCB practically do not express CD39 in their membrane, however if they express high percentages of CD73 at a population and membrane level. This indicates that unlike the MSCs of BM, those from the alternative sources analyzed, not produces ADO from ATP. In contrast, MSCs from all sources similarly produce high concentrations of ADO from AMP, this being functional since it inhibits the proliferation of CD3⁺ lymphocytes. In conclusion, our results suggest that the MSCs of DP, PL and UCB contrary to those of BM, present differences in the immunosuppressive mechanisms in which the adenosinergic pathway is involved. The above should be considered in the possible clinical application of MSCs from these alternative sources, such as immunosuppressive cell therapy.

Tabla de contenido

ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	4
1 INTRODUCCIÓN	5
1.1 CÉLULAS TRONCALES/ESTROMALES MESENQUIMALES	5
1.2 FUENTES DE MSCs	8
1.3 PROPIEDADES INMUNOREGULADORAS DE LAS MSCs	11
1.4 NUCLEÓTIDOS, NUCLEÓSIDOS Y SUS RECEPTORES EN EL SISTEMA INMUNOLÓGICO	14
1.5 PRODUCCIÓN DE LA ADO	20
1.6 EFECTO INMUNOSUPRESOR DE LA ADO	22
2 ANTECEDENTES	25
3 JUSTIFICACIÓN	28
4 OBJETIVOS	29
5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	29
6 HIPÓTESIS	30
7 MÉTODO	31
7.1 OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES (MSCs)	31
7.2 INMUNOFENOTIPO Y CO-EXPRESIÓN DE CD39 Y CD73 EN LAS MSCs	31
7.3 LA INDUCCIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN CÉLULAS DE LAS MSCs	32
7.4 ACTIVIDAD FOSFOHIDROLÍTICA DE CD39/CD73 ANALIZADA POR LIBERACIÓN DE PI Y EN CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE GEL DE SÍLICE	33
7.5 CUANTIFICACIÓN DE ADO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIENCIA (UPLC)	34
7.6 AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA	36
7.7 ACTIVACIÓN Y ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T CON ADO	36
7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
8 RESULTADOS	38
8.1 LAS MUESTRAS DE MO, PD, PL Y SCU PRESENTAN MORFOLOGÍA, INMUNOFENOTIPO Y CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN CARACTERÍSTICA DE LAS MSCs	38
8.2 LAS MSCs DE MO, PD, PL Y SCU MOSTRARON UNA ALTA EXPRESIÓN DE CD73, PERO BAJA DE CD39	42
8.3 LAS MSCs DE MO, PD, PL Y SCU PRODUCEN ADO A PARTIR DE AMP, PERO SOLO AQUELLAS DE MO PRODUCEN ADO A PARTIR DE ATP	44
8.4 LA ADO PRODUCIDA POR LAS MSCs DE MO, PD, PL Y SCU INHIBE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS CD3⁺	55
9 DISCUSIÓN	59
10 CONCLUSIONES	68
11 PERSPECTIVAS	69
12 BIBLIOGRAFÍA	70
13 PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS	81

ABREVIATURAS

ADA: Adenosina Desaminasa

ADO: Adenosina

ADP*: Adenosín Difosfato

AMP*: Adenosín Monofosfato

APCP: Adenosina 5` α , β Metileno
Monofosfato

ATP*: Adenosín Trifosfato

cAMP*: Adenosín Monofosfato Cíclico

CCL*: Ligando de Quimiocina Motivo C-C

CD*: Cúmulo de Diferenciación

CFSE: Carboxifluoresceína

CMN: Células Mononucleadas

DMEM*: Medio Eagle Modificado de
Dulbecco

ERK*: Proteína Cinasa Regulada por
Señales Extracelulares

FAP*: Factor Activador de Plaquetas

Fc γ Fc Gamma

fMLP*: N-formil metionil-leucil-
fenilalanina

GM-CSF*: Factor de Crecimiento

Estimulante de Colonias de
Granulocitos y Macrófagos

GPI*: Glicosilfosfatidilinositol

h Hora

HGF*: Factor de Crecimiento de
Hepatocitos

HLA*: Antígeno Leucocitario Humano

ICAM*: Molécula de Adhesión
Intracelular

IDO: Indolamina 2,3-Dioxigenasa

IGF*: Factor de Crecimiento Similar a
la Insulina

IL: Interleucina

IMF: Intensidad Media de
Fluorescencia

IFN- γ *: Interferón Gamma

ISCT*: Sociedad Internacional de
Terapia Celular

JNK*: Cinasas c-Jun N-terminal

M-CSF*: Factor Estimulante de
Colonias de Macrófagos

MAC*: Antígeno de Macrófagos

MAPK*: Proteína cinasas Activadas por Mitógenos

MIP*: Proteína Inflamatoria de Macrófagos

mL: Mili Litro

mM: Mili Molar

µg: Micro Gramo

µL: Micro Litro

µM: Micro Molar

MO: Médula Ósea

MSCs*: Célula Troncal/Estromal Mesenquimal

NF-κβ*: Factor Nuclear Kappa de Cadena Ligera Potenciador de Células B Activadas

NK*: Células Asesinas Naturales

nmol Nano Molar

PD: Pulpa Dental

PGE-2: Prostaglandina E2

Pi*: Fósforo/Fosfato Inorgánico

PL: Placenta

POM-1: Politungstato de Sodio

ROS*: Especies Reactivas de Oxígeno

Rpm: Revoluciones por Minuto

RPMI*: medio Roswell Park Memorial Institute:

SCU: Sangre de Cordón Umbilical

SFB: Suero Fetal Bovino

TGF-β*: Factor de Crecimiento Transformante Beta

Th*: Linfocitos T Helper

TNF-α*: Factor de Necrosis Tumoral Alpha

Treg: Células T Reguladoras

UDP*: Uracilo Difosfato

UPLC*: Cromatografía Liquida de Ultra Eficiencia

UTP*: Uracilo Trifosfato

VCAM*: Molécula de Adhesión de Células Vasculares

VEGF*: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

VLA*: Antígeno Muy Tardío

* **Siglas provenientes del inglés**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características de las células troncales/estromales mesenquimales (pag. 7).

Figura 2. Fuentes potenciales de obtención de células troncales/estromales mesenquimales (pag. 10).

Figura 3. Las células troncales/estromales mesenquimales ejercen su potencial inmunosupresor a través de la secreción de moléculas reguladoras inmunes (pag. 13).

Figura 4. Las células troncales/estromales mesenquimales de la MO recurren a la vía adenosinérgica como mecanismo inmunomodulador (pag. 27).

Figura 5. Las MSCs de MO, PD, PL y SCU presentan morfología y capacidad de diferenciación (pag. 41).

Figura 6. Expresión de CD39 y CD73 en MSCs de MO, PD, PL y SCU (pag. 43).

Figura 7. Actividad Fosfohidrolítica de CD39 y CD73 en MSCs de MO, PD, PL y SCU (pag. 46).

Figura 8. Actividad enzimática de CD39 y CD73 en MSCs de MO, SCU, PD y PL (pag. 48).

Figura 9. Cromatograma de UPLC (pag. 50).

Figura 10. Curva de calibración de la cuantificación de ADO (pag. 51).

Figura 11. Cromatograma de la cuantificación de ADO en MSCs de MO, PD, PL y SCU (pag. 53).

Figura 12. Los sobrenadantes obtenidos de cultivos de MSCs de MO, PD, PL y SCU presentan ADO (pag. 54).

Figura 13. Inhibición de la proliferación de linfocitos CD3⁺ con ADO sintética (pag. 57).

Figura 14. La ADO generada a partir de AMP por MSCs inhibe la proliferación de linfocitos CD3⁺ (pag. 58).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Receptores P1 o de nucleósidos (Adenosina) (pag. 16).

Tabla 2. Receptores P2 o de nucleótidos (pag. 18).

Tabla 3. Los receptores de adenosina regulan la función de las células del sistema inmunológico (pag. 23 y 24).

Tabla 4. Porcentaje de la expresión de los marcadores Inmunofenotípicos de las MSCs de diferentes fuentes (pag. 39).

Tabla 5. Porcentaje de expresión de CD39 y CD73 en MSCs de MO, PD, PL y SCU (pag. 42).

Tabla 6. Datos analíticos de la concentración de ADO en la curva estandar (pag. 51).

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Células troncales/estromales mesenquimales

Las células troncales/estromales mesenquimales (MSCs por sus siglas en inglés *Mesenchymal Stem Cells*) se describieron inicialmente en la médula ósea (MO) de ratones, cobayos, conejos, ratas, hámsteres, perros y seres humanos por Friedenstein y colaboradores (Friedenstein *et al.*, 1970; Friedenstein *et al.*, 1968) como una pequeña subpoblación de fibroblastos de unidades formadoras de colonias que podía distinguirse del resto de las células de la MO debido a su capacidad de adhesión al plástico, la apariencia en forma de huso y su rápida expansión. Además, se describió la capacidad que tienen estas células para diferenciarse a tejido osteogénico (Friedenstein *et al.*, 1968), la presencia de bajos porcentajes de células adiposas (Friedenstein, 1980) y su capacidad de diferenciarse a cartílago (Bab *et al.*, 1986), esta capacidad de diferenciación hacia trilineaje fue confirmada en estudios posteriores (Pittenger *et al.*, 1999). Finalmente, los primeros marcadores de inmunofenotipado utilizados para la identificación de estas células correspondía a SH2 (CD105), SH3 (CD73) y STRO-1, así mismo eran negativas para marcadores de células hematopoyéticas como CD14, CD34 y CD45 (Pittenger *et al.*, 1999; Simmons, 1991).

Conforme más conocimiento se tenía acerca de las MSCs y su considerable potencial terapéutico en una amplia variedad de disciplinas biomédicas, más grupos de trabajo comenzaron a estudiarlas. Sin embargo, cada uno de ellos usaba diferentes métodos de aislamiento, expansión y caracterización. Por lo cual era difícil comparar los resultados del estudio y contraste, lo que obstaculizaba el progreso en el campo,

ante esta situación la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT por sus siglas en inglés *International Society for Cellular Therapy*) en 2006 estableció los criterios mínimos para definir a una MSC (Dominici *et al.*, 2006) (Figura 1) los cuales son los siguientes:

- a) Se adhieren a la superficie del plástico y toman forma fibroblastoide bajo condiciones de cultivo estándar.
- b) Expresan simultáneamente los marcadores fenotípicos CD105, CD73 y CD90, presentan bajos niveles de moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA por sus siglas en inglés *Human Leukocyte Antigen*) I, carecen de marcadores de células hematopoyéticas como CD34 y CD45, marcadores de células endoteliales como CD31 y de HLA tipo II.
- c) Son capaces de diferenciarse cuando se cultivan en un medio inductor específico, al menos, en adipocitos, condroblastos y osteoblastos.

Además de las características previamente mencionadas, las MSCs poseen tres propiedades biológicas y funcionales. La primera propiedad es su potencial multilinaje para diferenciarse en distintos tipos celulares además de los mencionados en el párrafo anterior como, cardiomiocitos, células epiteliales, de retina, neurales, pancreáticas, hepatocitos mioblastos y miocitos al ser incubadas en medios inductores específicos (Gregory *et al.*, 2005; Karaöz *et al.*, 2011; Kim & Cho, 2013; Sabapathy *et al.*, 2012; Ullah *et al.*, 2015; Williams & Hare, 2011). La segunda propiedad es la capacidad de soporte hematopoyético, debido a que las MSCs producen moléculas que favorecen la formación de células hematopoyéticas (Fajardo-Orduña *et al.*, 2015).

La tercera propiedad es la capacidad inmunosupresora mediada por su interacción con los linfocitos y otras células del sistema inmunológico (Castro-Manrreza *et al.*, 2014; Castro-Manrreza & Montesinos, 2015).

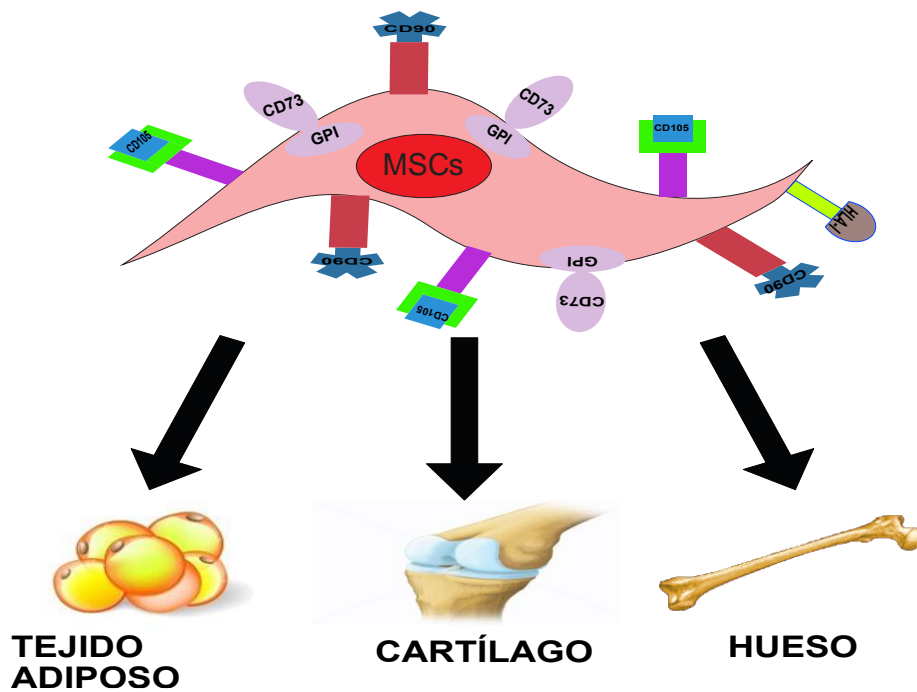


Figura 1. Características de las células troncales/estromales mesenquimales. Son células de morfología fibroblastoide, expresan simultáneamente los marcadores inmunofenotípicos CD105, CD90 y CD73 y pueden diferenciarse en adipocitos (tejido adiposo), condrocitos (cartílago) y osteoblastos (hueso).

1.2 Fuentes de MSCs

La medicina regenerativa es la innovación para el cuidado de la salud a nivel mundial, apoyada profundamente con el uso de células troncales obtenidas de diversas fuentes como las células troncales hematopoyéticas, las células troncales neuronales y las MSCs. Esta dirigida a la reparación de órganos y tejidos dañados a causa de diversos padecimientos como las enfermedades cardíacas, hepáticas, desordenes hematológicos, problemas gastrointestinales, neuromusculares, renales, pulmonares, enfermedades inmunológicas entre muchas otras (Prasajak & Leraanansaksiri, 2014; Sharma *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2016).

En los últimos años las MSCs han atraído la atención de los investigadores de todo el mundo debido a su potencial aplicación en el tratamiento de varias enfermedades. Por esto, su investigación se ha intensificado, buscando diferentes fuentes para su estudio por varias razones: en primer lugar, el desarrollo del conocimiento en cuanto a las propiedades de estas fuentes comparadas con las MSCs de la MO que son consideradas el estándar dorado; segundo, la necesidad de conseguirlas de fuentes éticamente aprobadas que de otro modo serían desechadas; en tercer lugar, el obtener MSCs de la MO en un individuo de edad avanzada representa una disminución significativa en el número y su potencial biológico, además de ser un procedimiento doloroso e invasivo para el donante, lo que lleva a la utilización de fuentes que no tengan esta problemática (Haddad & Saldanha-Araujo, 2014; Rao & Mattson, 2001).

Hoy en día se ha demostrado que se pueden obtener MSCs de casi todos los tipos de tejidos maduros como el tejido adiposo, tejido sinovial, piel, pulmón, riñón, cerebro, hígado, bazo, músculo, sangre periférica, tejidos dentales tales como la pulpa dental, tejido gingival, ligamento periodontal, entre otros. Además, también se pueden obtener de fuentes neonatales, entre las cuales podemos mencionar al fluido del amnios, sangre de cordón umbilical, cordón umbilical, placenta, entre otras (Haddad & Saldanha-Araujo, 2014; Hass *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2009; Williams & Hare, 2011) (Figura 2).

La gran mayoría de estas fuentes permiten obtener un número alto de MSCs y son obtenidas de desechos clínicos que no representan ningún procedimiento invasivo para el donador debido a que su obtención es fácil. A pesar de que varios trabajos han demostrado que las MSCs de diferentes fuentes pueden diferir en la expresión de los marcadores de superficie, morfología, capacidad de diferenciarse, proliferación, senescencia, producción de citocinas, inmunogenicidad, frecuencia de unidades formadoras de colonias y otras características. Muchas otras evidencias han demostrado que sus propiedades fisiológicas son similares a las observadas de aquellas provenientes de la MO (Castro-Manrreza *et al.*, 2014; Fajardo-Orduña *et al.*, 2015; Fossett & Khan, 2012; Hass *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2009; Karaöz *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2007; Mattar & Bieback, 2015; Montesinos *et al.*, 2009; Montesinos *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2012).

FUENTES DE MSCs

FUENTES ADULTAS

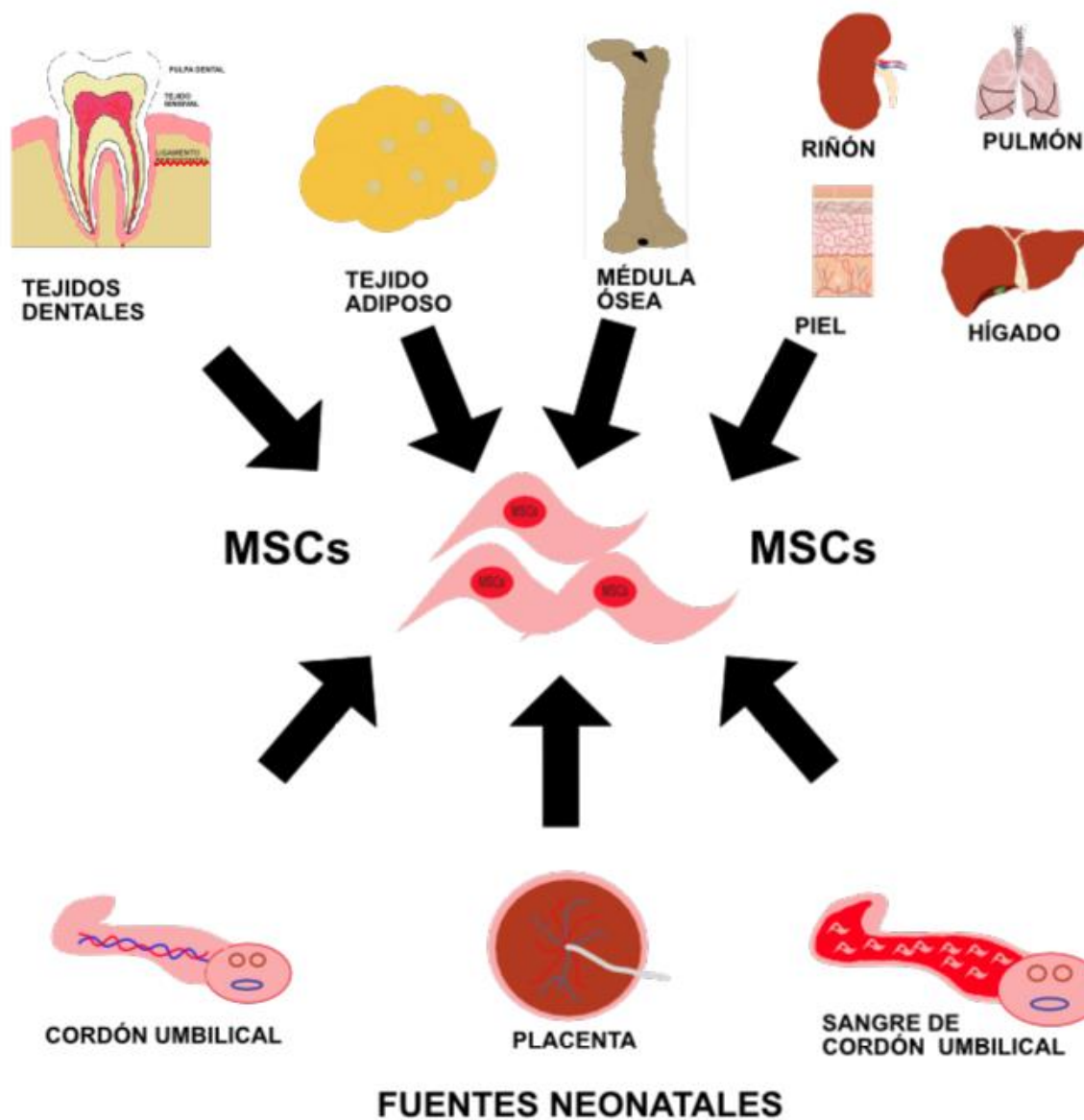


Figura 2. Fuentes potenciales de obtención de células troncales/estromales mesenquimales. Esquema representativo de algunas fuentes de MSCs, pueden ser clasificadas en tejidos adultos como médula ósea, tejido adiposo, pulpa dental o en tejidos neonatales como cordón umbilical, sangre de cordón umbilical y placenta.

1.3 Propiedades inmunoreguladoras de las MSCs

Las MSCs tienen un gran potencial para el tratamiento de diversas enfermedades, especialmente las que están relacionadas con el daño tisular que implican reacciones inmunes. Diversos estudios han demostrado que las MSCs son inmunosupresores en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Shi *et al.*, 2010). Esta propiedad inmunomoduladora que poseen las MSCs pueden ser divididas en dos características; 1) la inmunosupresión, que hace referencia a la capacidad que tienen estas células para poder suprimir las funciones de los linfocitos T, B y las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés *Natural Killers*), las cuales pueden ser; proliferación, diferenciación, producción de factores solubles como las citocinas y la citotoxicidad. 2) el inmunoprivilegio, que se refiere a la idea de que las MSCs por alguna razón están protegidas de los mecanismos de defensa inmunológica (Hass *et al.*, 2011). Esta última característica de las MSCs se debe a varias razones, por ejemplo, a una baja expresión del HLA-1 y la ausencia de marcadores clase II (Prasajak & Leeanansaksiri, 2014).

Se sabe que las MSCs pueden migrar a sitios en donde ha ocurrido un daño (Barry & Murphy, 2004; Wei *et al.*, 2013) en donde secretan moléculas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés *Hepatocyte Growth Factor*), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante (TGF- β , por sus siglas en inglés *Transforming Growth Factor beta*) - β y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés *Granulocyte Macrophage Colony-*

Stimulating Factor) que son importantes para reducir la apoptosis de los tejidos normales alrededor de los tejidos lesionados (Newman *et al.*, 2009).

Su efecto inmunomodulador tanto en el sistema inmune innato como en el adaptativo, se debe a la secreción de prostaglandina E2 (PGE-2), TGF, HGF, indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés *Macrophage Colony-Stimulating Factor*) e interleucina (IL)-6 entre otras, las cuales suprimen la proliferación de células T, aumentan secreción de citocinas anti-inflamatorias, inhiben la maduración de células dendríticas y la proliferación de células NK, permiten el arresto del ciclo celular en la fase G0/G1, inhiben la secreción de citocinas pro-inflamatorias, impiden la activación de las células T y las células B (Corcione *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014) y más aún, pueden generar y expandir a las células T reguladoras (Tregs) que son importantes para la regulación de las respuestas inmunes por su efecto anti-inflamatorio (Burr *et al.*, 2013) (Figura 3).

Por otra parte, otros estudios han demostrado que las MSCs producen citocinas inflamatorias, como el Interferón (IFN) γ , el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor*) α y la IL-1 α/β , necesarias para ejercer o mejorar sus acciones inmunosupresoras. Recientemente se ha demostrado, tienen la capacidad de generar adenosina (ADO) una molécula que posee un efecto inmunosupresor sobre las células del sistema inmunológico y que no ha sido caracterizada en las MSCs provenientes de fuentes alternativas a la MO (English, 2013; Haddad & Saldanha-Araujo, 2014).

EFFECTO INMUNOMODULADOR DE LAS MSCs

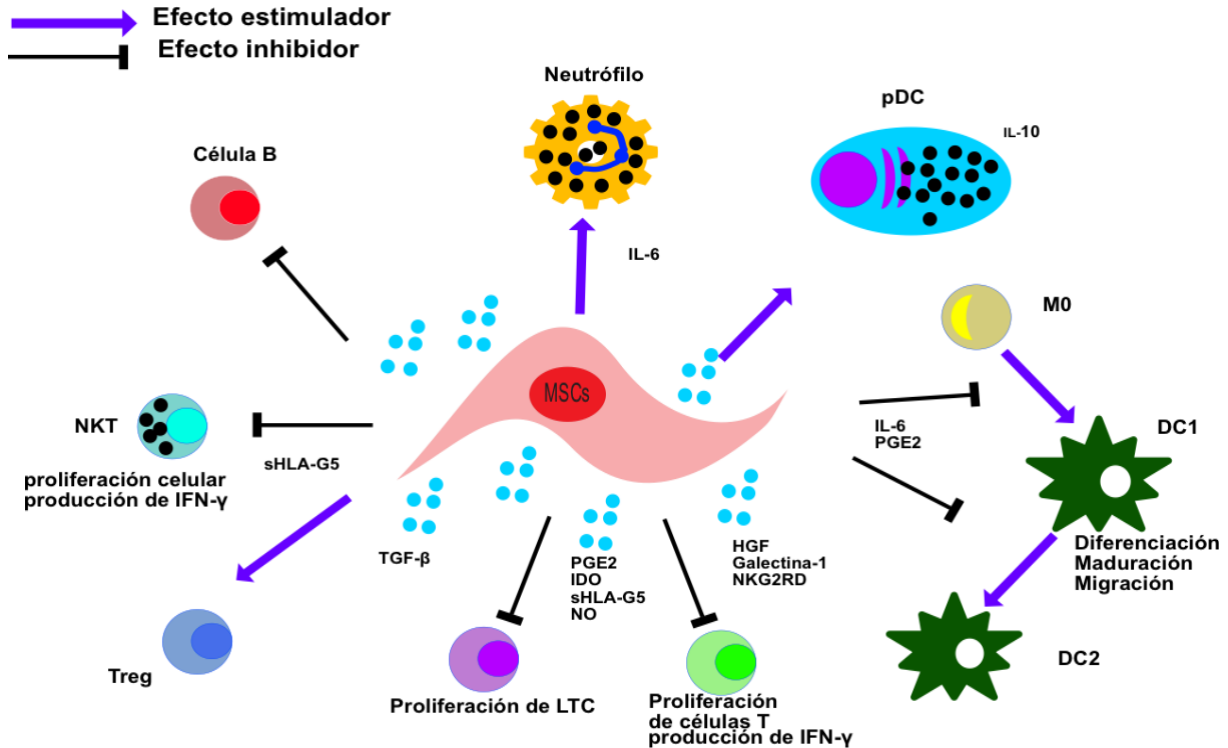


Figura 3. Las células troncales/estromales mesenquimales ejercen su potencial inmunosupresor a través de la secreción de moléculas reguladoras inmunes. Las MSCs inhiben la proliferación y la función de las células T, células T citotóxicas (LCT), células T asesinas naturales (NKT) y células B. Por otro lado, pueden estimular la producción de células T reguladoras, neutrófilos y células dendríticas (DC). Estos mecanismos se asocian a varios factores solubles que juegan un papel importante en sus efectos inmunosupresores. Entre ellos se encuentran la prostaglandina E2 (PGE2), el factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1, la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), óxido nítrico, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interleucina (IL) -6 e IL-10 entre otros. (Tomado y modificado de Zhao *et al.*, 2016. *Journal of Cellular Immunotherapy* 2 (2016) 3-20).

1.4 Nucleótidos, nucleósidos y sus receptores en el sistema inmunológico

El sistema inmunológico es una red de células fuertemente reguladas e integradas que funciona para preservar y restaurar la homeostasis en el organismo. Sin embargo, la activación inapropiada de este sistema puede dar lugar a niveles inaceptables de daño colateral en los tejidos y el desarrollo de diversas condiciones fisiopatológicas, tales como enfermedades alérgicas o autoinmunes. El sistema inmunológico se apoya de un sistema purinérgico para mejorar las funciones celulares inmunes, como la interacción célula-célula, secreción de citocinas y quimiocinas, expresión de antígenos de superficie, la eliminación de patógenos intracelulares, y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) (Antonioli *et al.*, 2013).

En su estado fisiológico, las células de los mamíferos contienen altas concentraciones (1 a 10 mM) de adenosín trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés *Adenosine Triphosphate*). Mientras tanto, el compartimiento extracelular contiene ATP [junto con otros nucleótidos como el adenosín difosfato (ADP, por sus siglas en inglés *Adenosine Diphosphate*), adenosín monofosfato (AMP, por sus siglas en inglés *Adenosine Monophosphate*), uracilo di- y trifosfato (UDP y UTP, por sus siglas en inglés *Uracil Diphosphate* y *Uracil Triphosphate* respectivamente) y el nucleósido ADO] en bajas concentraciones nanomolares, aun así, éste ATP extracelular es el más abundante entre los nucleótidos extracelulares y el incremento en su concentración se considera comúnmente como una señal de peligro clásica que estimula la respuesta inmune en tejidos dañados (Eltzschig *et al.*, 2012; Vitiello *et al.*,

2012). El incremento en el ATP extracelular no sólo se debe a la presencia de un tejido dañado o estresado, sino que, también a señales ambientales externas que permiten la liberación del ATP al medio extracelular a través de vesículas o canales, entre ellos, canales de panexina, conexina, maxicanales y el receptor P2X7. Este ATP liberado funge como una señal quimioatrayente de las células del sistema inmunológico para eliminar a las células dañadas, mediante la activación del inflamosoma y la secreción de citocinas pro-inflamatorias (Bono *et al.*, 2015).

El efecto quimioatrayente por parte de los nucleótidos se debe a la familia de receptores para nucleótidos descritos por Burnstock en 1978 (Burnstock, 1985) conocidos como la familia de los receptores P1 (los cuales interaccionan con la ADO) y la familia de receptores P2 (que interaccionan con los nucleótidos como ATP y UDP), esta última, se subdivide a su vez en dos subfamilias P2Y (con ocho miembros, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11-P2Y14) y P2X (con siete miembros, P2X1-7) (Di Virgilio & Adinolfi, 2017).

Cuatro son los subtipos de receptores P1 (Tabla 1) (Cronstein & Sitkovsky, 2017; Junger, 2011; Haskó *et al.*, 2008), los cuales corresponden a A1, A2A, A2B y A3. Todos los receptores de ADO P1 están unidos a proteínas G y, en común con otros receptores acoplados a proteínas G, que tienen siete dominios transmembranales; la región terminal NH₂ de la proteína se encuentra en el lado extracelular y el extremo COOH se encuentra en el citoplasma de la célula, todos están vinculados a la movilización de Ca²⁺ al interior de la célula así como la regulación de la enzima adenilato ciclasa, la cual está involucrada con el aumento o inhibición de

la producción de AMP cíclico (cAMP), un segundo mensajero fuertemente relacionado con la inhibición o la activación de vías de señalización involucradas en la respuesta inflamatoria (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011; Scarfi, 2014; Stagg & Smyth, 2010).

Tabla 1 Receptores P1 o de nucleósidos (Adenosina)			
Subtipo P1	Ligando natural preferido	Mecanismo de transducción de señales	Expresión en células del sistema inmunológico
A1	ADO	G _{i/o} (inhibición de la síntesis de cAMP)	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas
A2A	ADO	G _s (producción de cAMP)	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B, células NK
A2B	ADO	G _s (producción de cAMP)	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células NK
A3	ADO	G _{i/o} , G _{q/11} (inhibición de la síntesis de cAMP)	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células NK

Los receptores P2X (Tabla 2) (Junger, 2009) consisten en canales iónicos regulados por un ligando trimérico, su activación conduce a la entrada de cationes como el sodio y el calcio, que despolarizan las células excitables y activan las enzimas citosólicas, respectivamente. Desempeñan un papel clave en la señalización aferente (incluido el dolor), la regulación del flujo sanguíneo renal, el endotelio vascular y la respuesta inflamatoria (Jacobson, 2010).

Los receptores P2Y (Tabla 2) son receptores acoplados a proteínas G que se activan mediante nucleótidos de adenina, uridina y azúcares de nucleótidos. La unión de los ligandos a sus receptores activan cascadas de señalización intracelular para regular una variedad de procesos celulares, que incluyen nocicepción, proliferación, diferenciación, fagocitosis, secreción, adhesión y migración celular. Estas cascadas de señalización operan principalmente mediante la activación o desactivación secuencial de proteínas G heterotriméricas y monoméricas, fosfolipasas, adenilato y guanilato ciclasas, proteínas cinasas y fosfodiesterasas. Además, existen numerosos canales iónicos, moléculas de adhesión celular y receptores tirosina cinasas que están moduladas por los receptores P2Y y operan para transmitir una señal extracelular a una respuesta intracelular (Erb & Weisman, 2012).

En lo que respecta al sistema inmunológico, diversos estudios han demostrado que la síntesis de ATP es indispensable para soportar el requerimiento energético que ocurre tras la activación de los linfocitos T y otras células del sistema inmunológico e para su proliferación, diferenciación y producción de citocinas pro y anti-inflamatorias, posteriormente a la activación, (Schenk *et al.*, 2008).

Tabla 2 Receptores P2 o de nucleótidos			
Subtipo P2R	Ligando natural preferido	Mecanismo de transducción de señales	Expresión en células inmunes
P2X1	ATP	Canal iónico selectivo de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B, células NK
P2X2	ATP	Canal iónico selectivo de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺	Células B
P2X3	ATP	Canal iónico selectivo de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺	Células B, células NK
P2X4	ATP	Canal iónico selectivo de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B, células NK
P2X5	ATP	Canal iónico selectivo de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B
P2X6	ATP	Canal iónico selectivo de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺	Células B, células NK
P2X7	ATP	Canal iónico selectivo de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺ y poros grandes permeables a solutos de hasta 900 Da	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B, células NK
P2Y1	ADP	G _{q/11} (aumento de IP3/DAG)	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B, células NK
P2Y2	UTP y ATP	G _{q/11} (aumento de IP3/DAG)	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B, células NK
P2Y4	UTP	G _{q/11} (aumento de IP3/DAG)	Monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B
P2Y6	UDP	G _{q/11} (aumento de IP3/DAG) y G _i (inhibición de la síntesis de cAMP)	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B
P2Y11	ATP	G _{q/11} (aumento de IP3/DAG) G _s (aumento de cAMP)	Monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B
P2Y12	ADP	G _i (inhibición de la síntesis de cAMP)	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, células T, células B,
P2Y13	ADP	G _i (inhibición de la síntesis de cAMP)	Neutrófilos, monocitos, células dendríticas, células T, células B
P2Y14	UDP-glucosa	G _i (inhibición de la síntesis de cAMP)	Neutrófilos, células dendríticas, células T, células B, células NK

Por lo tanto, el ATP que se encuentra en un ambiente inflamatorio es crucial para comenzar estos procesos y soportar el requerimiento energético que implica esto, para poder aprovechar el ATP las células del sistema inmunitario se valen de estos receptores para así poder transportarlo hacia su interior, además la movilización de Ca^{2+} a través de canales activados por la unión de ATP extracelular a sus receptores, activa la síntesis aeróbica de ATP y posteriormente es liberado al medio extracelular cuando ya no es requerido en el interior de la célula a través de los diferentes canales transportadores (Schenk *et al.*, 2008).

Concluida la respuesta inmunológica, y contrariamente al efecto producido por el ATP extracelular en un ambiente inflamatorio, se ha demostrado que la ADO actúa sobre diversas células inmunes, mediando los efectos anti-inflamatorios mediante la inhibición de las células inmunes activadas en un proceso de retroalimentación negativa para prevenir el daño tisular adicional (Sitkovsky *et al.*, 2004).

La ADO es un nucleósido de purina endógeno constitutivamente presente en bajas concentraciones en el espacio extracelular, que se ha establecido aumenta drásticamente en condiciones metabólicamente estresantes. La razón para el aumento está relacionado con la activación de su regulación automática, cuya función es proteger los órganos de lesiones después de los estímulos estresantes de iniciación (Polosa & Holgate, 2006). La ADO se forma en el interior y exterior de las células por dos vías distintas que implican dos sustratos diferentes, uno es AMP y otro es S-adenosil L-homocisteína los cuales son transportados a través de las membranas celulares por los transportadores de nucleósidos (Sachdeva & Gupta, 2013).

1.5 Producción de la ADO

Los niveles de la ADO extracelular son el resultado neto de su producción mediada por diferentes vías, una es por condiciones hipóxicas, donde la ADO alcanza concentraciones altas dentro de la célula a través de una cascada de acciones enzimáticas y conduce a su liberación al espacio extracelular a través de transportadores de nucleósidos, la otra vía principal que contribuye a altas concentraciones extracelulares de ADO durante el estrés metabólico es la liberación y degradación de los precursores de nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP) por una cascada de ectonucleotidasas, que incluyen a CD39 y CD73 (Sachdeva & Gupta, 2013).

CD39 es una proteína de membrana integral que fosfohidroliza ATP y ADP de manera dependiente a Ca^{2+} y Mg^{2+} , para producir AMP. Presenta cinco dominios de secuencias altamente conservadas, conocidas como las “regiones apirasa conservadas”, que están involucradas en la formación del sitio activo y la catálisis de nucleótidos extracelulares por fosfohidrólisis. Sufre modificaciones funcionales, incluyendo la proteólisis y la glicosilación limitada, siendo ésta última un factor determinante en conferir su actividad catalítica. Presenta un dominio citosólico N-terminal que se somete a la modificación post-traducciona de palmitoilación para permitir la asociación de la enzima con los microdominios ricos en esfingolípidos y colesterol, comúnmente denominados balsas lipídicas (Allard *et al.*, 2017). Se expresa constitutivamente en el bazo, timo, pulmón y placenta y en poblaciones de células inmunes, tales como células B, células NK, células dendríticas, células de

Langerhans, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células Tregs (Antonioli *et al.*, 2013; Bono *et al.*, 2015). Además su expresión puede ser promovida bajo la exposición a citocinas pro-inflamatorias, el estrés oxidativo, la hipoxia, y ligandos endógenos.

El segundo paso en el metabolismo de los nucleótidos de purina se logra mediante la ectoenzima CD73, que desfosforila al AMP extracelular a ADO y fosfato inorgánico (Pi) de manera dependiente a Zn^{2+} y Co^{2+} . Es una enzima anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI, por sus siglas en inglés *Glycosylphosphatidylinositol*) aunque también se presenta como una forma soluble tras la separación del GPI, con actividad similar a su forma de membrana unida. Desde un punto de vista estructural, CD73 se organiza en tres dominios: (I) sitios de unión de un dominio N-terminal que contiene metal; (II) un dominio C-terminal que contiene el sitio catalítico; y (III) una hélice alfa corta que une los dominios C- y N-terminal. Su forma funcional consiste en un homodímero no unido covalentemente estabilizado por interacciones hidrofóbicas entre los dominios C-terminales adyacentes. La homodimerización de CD73, así como la unión de dos iones de Zinc, se requieren para la actividad catalítica. Existen homodímeros de CD73 en dos conformaciones: abiertas y cerradas. La hidrólisis del AMP requiere que la enzima cicle a través de ambos estados (Allard *et al.*, 2017). CD73 se encuentra en una gran variedad de tejidos, incluyendo colon, cerebro, riñón, hígado, pulmón y corazón; en los leucocitos derivados de la sangre periférica, el bazo, los ganglios linfáticos, el timo y la médula ósea; así como en el endotelio (Antonioli *et al.*, 2013). Constitutivamente se encuentra en células B, células NK, y Tregs, y su

expresión puede ser disminuida en condiciones de diferenciación de linfocitos o por enfermedades como el VIH (Allard *et al.*, 2017).

Finalmente, la conversión de la ADO en inosina por una enzima llamada adenosina desaminasa (ADA) o una rápida fosforilación a AMP por la adenosina cinasa, previene que el exceso de ADO extracelular cause daños perjudiciales al sistema inmunológico (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011).

1.6 Efecto inmunosupresor de la ADO

La ADO tiene una gran capacidad immunoreguladora la cual lleva a cabo a través de los receptores específicos P1 presentes en las células del sistema inmunológico (Deaglio *et al.*, 2007; Mandapathil *et al.*, 2010), En las células inmunes, la señalización de la ADO a través del receptor de ADO A2A, principalmente, y el receptor A2B induce una elevación del cAMP, así como la activación de las vías de señalización MAPK (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*) que incluyen ERK 1 y 2 (del inglés extracelular *Signal-Regulated Protein Kinase*), JNK (del inglés *c-Jun N-terminal Kinase*) y p38 MAPK, las cuales tiene un papel fundamental en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular así como en inducir la secreción de citocinas reguladoras como TNF- α , TGF- β , IDO, VEGF, PGE2, IL-6, IL-10, que previenen el proceso de inflamación (Kyurkchiev *et al.*, 2014; Saldanha-Araujo *et al.*, 2011). Además, se ha determinado que en los linfocitos T citotóxicos la activación de APK es responsable de inhibir otras vías de señalización implicadas en la diferenciación, proliferación y la producción de citocinas pro-inflamatorias, reduciendo la citotoxicidad, así como también activa vías involucradas en la inducción de la

apoptosis (Bono *et al.*, 2015). En la Tabla 3 se resumen algunos de los efectos de la ADO sobre las células de sistema inmunológico a través de sus diferentes receptores (Haskó & Cronstein, 2013; Linden, 2009; Blackburn *et al.*, 2009).

Tabla 3 Los receptores de adenosina regulan la función de las células del sistema inmunológico				
Célula inmune	Receptor de Adenosina			
	A1	A2A	A2B	A3
Neutrófilo	Promueve la quimiotaxis y la adherencia al endotelio	↓ adhesión a fMLP ↓ MAC-1, integrina β_2 , L-selectina, VCAM-1, ICAM-1, VLA-4 ↓ ROS, TNF- α , MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, leucotrieno B4 FAP Inhibición de la fagocitosis de neutrófilos mediada por Fc γ Inhibición de la degranulación	-	Estimula la quimiotaxis
Monocitos	-	Inhibe la fagocitosis ↓ TNF- α , ROS, IL-12, IL-12p40, IL-18, IFN- γ y la expresión de ICAM-1	↑ IL-10	Regula la producción de IL-12
Macrófago M1	↑ Fc γ	Inhibe la fagocitosis ↓ TNF- α , ROS, ↑ IL-10	↑ IL-10	Regula la producción de IL-12 ↓ MIP- α
Macrófago M2	-	Estimula la diferenciación de macrófagos M2 ↑ Factores pro-angiogénicos	↑ IL-10	-

Tabla 3 Los receptores de adenosina regulan la función de las células del sistema inmunológico (continuación)

Célula inmune	Receptor de Adenosina			
	A1	A2A	A2B	A3
Célula T	Inhibe cAMP	Inhibe la diferenciación de Th17 Estimula la diferenciación de Treg ↑ cAMP ↓ CD69, TNF- α , IL-4, IFN- γ	↓ IL-2	-
Células dendríticas	Induce la quimiotaxis y la movilización de Ca ²⁺ ↓ HLA-1	↑ CD80, CD86 ↓ TNF- α , ROS, IL-12, IL-6 ↑ IL-10, cAMP, proteínas MAPK p42/p44	-	Inhibe cAMP
Células B	-	Inhibe las señales de la vía NF- κ B	-	-
Células NK	Incrementa su actividad citotóxica	Inhibe la actividad citotóxica ↓ TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, MIP-1 α	-	-
Mastocitos	-	-	↑ IL-8, IL-4, IL-13	Media la degranulación de a través de activación de la fosfoinositida 3-cinasa ↑ Ca ²⁺ intracelular
Eosinófilos	Mejora la liberación de O ₂	-	-	↑ Ca ²⁺ intracelular Inhibe la quimiotaxis inducida por PAF, la degranulación inducida por C5a y la liberación de O ₂ inducida por C5a
Células iNKT	↑ Treg y su función ↑ cAMP ↓ TNF- α , IFN- γ			

↑ incrementa, ↓ disminuye. Abreviaturas no presentes en el texto; fMLP (*N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanine*); MAC-1 (*Macrophage-1 Antigen*); VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*); ICAM (*Intracellular Adhesion Molecule-1*); VLA-4 (*Very Late Antigen-4*); MIP (*Macrophage Inflammatory Protein*); CCL (*Chemokine (C-C Motif) Ligand*); FAP (*Platelet Activating Factor*); Fc γ (*Fc Gamma*); NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells*)

2 ANTECEDENTES

En algunos trabajos se ha demostrado que las MSCs provenientes de la MO de humano y ratón coexpresan en su membrana plasmática a las ectoenzimas CD39 y CD73, producen ADO e inhiben la proliferación de células T a través de esta vía. También se determinó que la ADO producida por las MSCs tiene efectos inhibitorios en la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-17 e IFN- γ de células T cooperadoras Th17 (Lee *et al.*, 2014; Saldanha-Araujo *et al.*, 2011; Sattler *et al.*, 2010). Otros estudios recientes han mostrado que las MSCs provenientes de cáncer de cérvix coexpresan CD39 y CD73 en membrana y producen altos niveles de ADO (Mora-García *et al.*, 2016). En un estudio preliminar se demostró la expresión de CD73 en la membrana de MSCs derivadas de la SCU, estas tuvieron la capacidad producir ADO a partir de AMP e inhibir la proliferación de linfocitos T, pero no presentaron la expresión de CD39, por tanto, no fueron capaces de fosfohidrolizar el ATP y ADP fue nula (Kerkelä *et al.*, 2016). En MSCs de tejido gingival se ha descrito la expresión de CD39 que en conjunto con CD73 es responsable de reducir la respuesta inflamatoria en células CD3⁺, y que este mecanismo es más fuerte que la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10, PGE2 y el NO (Chen *et al.*, 2013; F. Huang *et al.*, 2017). Finalmente, datos de nuestro grupo de trabajo han demostrado la capacidad inmunosupresora de MSCs derivadas de la PL y la SCU de manera similar a las MSCs de la MO a través de la secreción de citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 y PGE2 (Castro-Manrreza *et al.*, 2014), mientras que otros grupos han determinado el efecto inmunosupresor en MSCs derivadas de la PD (Vasandan *et al.*, 2014).

A pesar de que se han determinado distintos mecanismos inmunosupresores en las MSCs provenientes de fuentes alternativas a la MO, se desconoce si estas fuentes recurren a la vía adenosinérgica para efectuar dicha inmunosupresión (Figura 4). Debido a lo anterior, es necesario llevar a cabo ensayos experimentales que extiendan el conocimiento actual de la biología de la actividad de las MSCs para optimizar y controlar la respuesta inmunológica en especial de aquellas fuentes alternativas a las MSCs de la MO para que puedan ser utilizadas en la clínica (Castro-Manrreza & Montesinos, 2015).

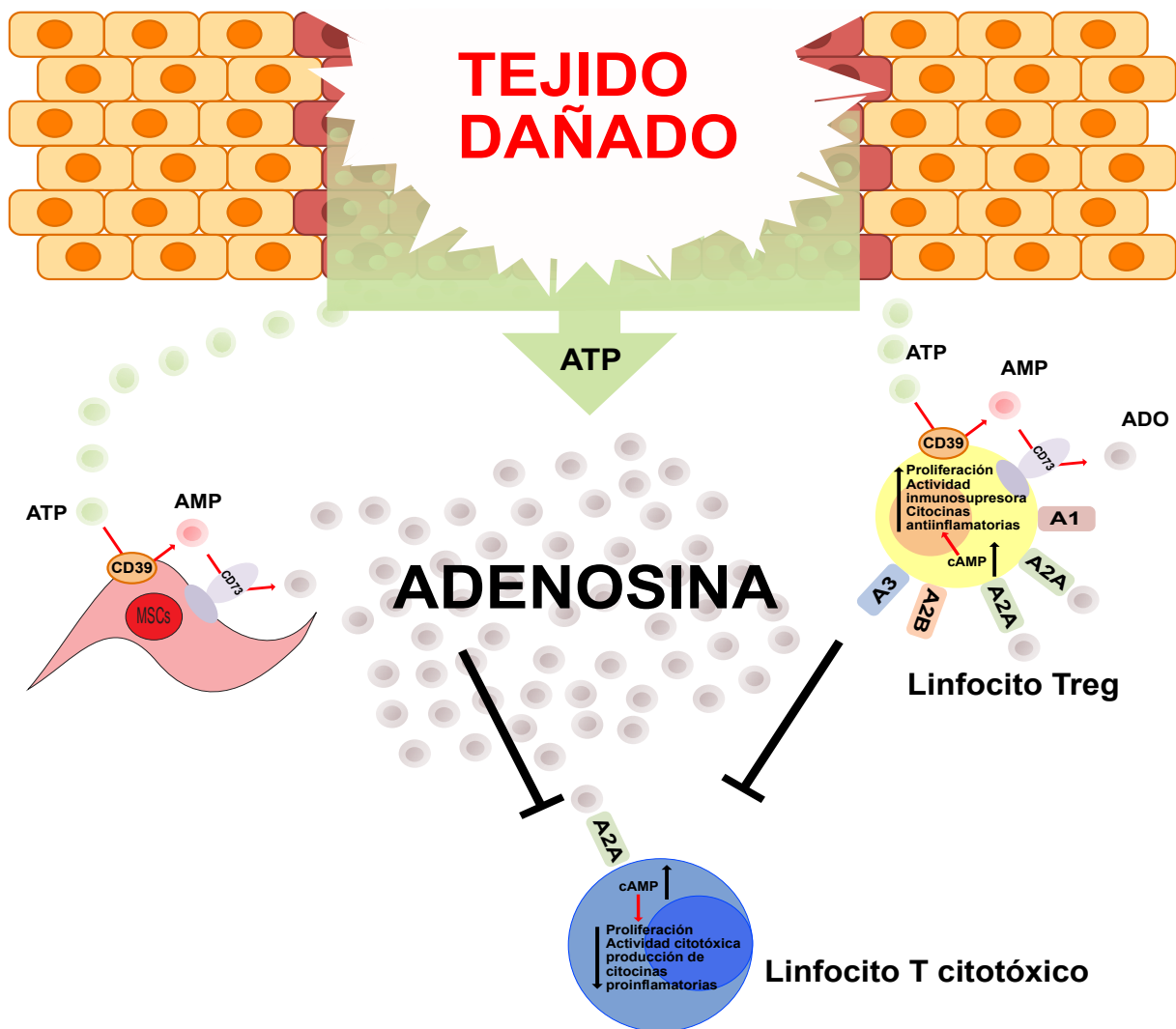


Figura 4. Las células troncales/estromales mesenquimales de la MO recurren a la vía adenosinérgica como mecanismo inmunomodulador. La vía adenosinérgica se compone de dos ectonucleasas que se presentan en la membrana celular de las MSCs de MO, una es CD39 la cual hidroliza ATP hacia AMP la segunda es CD73 la cual hidroliza al AMP en ADO, finalmente esta ADO actúa sobre las células del sistema inmune a través del receptor de ADO A2A, principalmente, incrementando los niveles de cAMP dentro de estas células, en células anti-inflamatorias como linfocitos Treg éste cAMP activa vías de señalización cruciales en la producción de citocinas anti-inflamatorias, mientras que en células pro-inflamatorias, como linfocitos T citotóxicos, la citotoxicidad se ve disminuida así como la producción de citocinas pro-inflamatorias. (Tomada y modificada de Antonioli *et al.*, 2013. *Trends Mol Med.* 19(6): 355–367).

3 JUSTIFICACIÓN

Previo a éste estudio, nuestro grupo de investigación realizó un análisis comparativo sobre la capacidad inmunosupresora de las MSCs obtenidas de MO, SCU y PL sobre linfocitos T, demostrando su potencial inmunosupresor (Castro-Manrreza *et al.*, 2014). Por otra parte, otros grupos han sugerido que las MSCs provenientes de PD, también presentan capacidad inmunosupresora sobre células T (Vasandan *et al.*, 2014). Sin embargo, aún no se conoce completamente los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo dicha actividad inmunosupresora, en este sentido se desconoce si el efecto inmunomodulador de las MSCs derivadas PD, la PL y SCU recurren a la vía de producción de ADO a través de la actividad funcional de las ectonucleasas CD39/CD73 para poder llevar a cabo esta función inmunosupresora.

Por tanto, es importante profundizar en el conocimiento de los mecanismos biológicos y bioquímicos asociados con las propiedades inmunosupresoras de las MSCs provenientes de PD, PL y SCU ya que esto nos permitira no solo establecerlas como fuentes alternativas a la MO sino que también podrán ser consideradas en futuros protocolos clínicos en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes que aún carecen de un tratamiento clínico que las erradique o las controle con efectividad.

4 OBJETIVOS

General:

1. Determinar si las MSCs provenientes de MO, PD, PL y SCU recurren al mecanismo de producción de ADO para inducir un efecto inmunosupresor sobre células T.

Particulares:

1. Evaluar la expresión de la ectonucleasa fosfohidrolítica de ATP/ADP (CD39) y la ectonucleasa fosfohidrolítica de AMP (CD73) en las MSCs provenientes de MO, PD, PL y SCU.
2. Analizar la actividad enzimática de las ectonucleasas CD39 y CD73 para generar ADO en MSCs provenientes de MO, PD, PL y SCU.
3. Evaluar el efecto inmunosupresor de la ADO obtenida de sobrenadantes de MSCs provenientes de MO, PD, PL y SCU sobre la proliferación de células T.

5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las MSCs provenientes de PD, PL y SCU tienen la capacidad producir ADO e inducir un efecto inmunosupresor sobre células T?

6 HIPÓTESIS

Si las MSCs provenientes de PD, PL y SCU recurren a la vía adenosinérgica, se espera que el aumento de ADO extracelular tenga un efecto inmunosupresor sobre la proliferación de células T.

7 MÉTODO

7.1 Obtención de las células estromales mesenquimales (MSCs)

Las MSCs utilizadas en este estudio fueron obtenidas de MO, PD, PL y SCU de donadores sanos (Castro-Manrreza *et al.*, 2014). Tres muestras diferentes de cada fuente se mantuvieron en medio de cultivo DMEM bajo en glucosa (Gibco, California, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco, California, USA), antibióticos y L-glutamina a 37 °C con 5% de CO₂ y humedad saturante. Al alcanzar una confluencia del 80% o superior, las células se despegaron mediante incubación en tripsina (Gibco, California, USA) y posteriormente fueron contadas con azul tripano en una cámara de Neubauer para evaluar su viabilidad (Hernández-Estévez, 2016).

7.2 Inmunofenotipo y co-expresión de CD39 y CD73 en las MSCs

Para determinar el inmunofenotipo de las MSCs obtenidas, se incubaron a una densidad de 1×10^5 células con uno de los siguientes anticuerpos monoclonales (Becton Dickinson, Biosciences; San José, CA, USA): CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, HLA-DR, CD45, CD34, CD31, CD14, CD13 (Hernández-Estévez, 2016). Para determinar la co-expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en la membrana celular de las MSCs, se determinó mediante el marcaje con los anticuerpos monoclonales CD39 y CD73. El análisis de las células se realizó a partir de la

adquisición de 10,000 eventos como mínimo en un citómetro de flujo FacsCanto II (Becton Dickinson, USA). Los datos se analizaron con FlowJo 10 software.

7.3 La inducción de la diferenciación células de las MSCs

Para inducir la diferenciación de las MSCs se siguieron los protocolos anteriormente establecidos en nuestro grupo de trabajo (Hernández-Estévez, 2016).

Para inducir la diferenciación adipogénica las MSCs se cultivaron en medio adipogénico comercial (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) durante 3 semanas. Para evaluar la diferenciación adipogénica, se agregó Rojo Oleoso para teñir los lípidos presentes en las vacuolas intracelulares formadas y se contrastó con hematoxilina de Harris para teñir el núcleo y el citoplasma de las células.

Para inducir la diferenciación condrogénica, las células MSCs se cultivaron en medio condrogénico comercial (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) adicionado con TGF- β 1, durante 4 semanas. Para evaluar la diferenciación condrogénica las células se tiñeron con azul alciano para la detección de mucopolisacáridos.

Para inducir la diferenciación osteogénica, las células MSCs se cultivaron en medio osteogénico comercial (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) durante 3 semanas. Las células fueron teñidas con SIGMA FAST BCIP/NBT (Sigma, St Louis MO, USA), un sustrato precipitante para determinar la actividad de la fosfatasa alcalina, presente abundantemente en huesos y otros tejidos.

7.4 Actividad fosfohidrolítica de CD39/CD73 analizada por liberación de Pi y en cromatografía en capa fina de gel de sílice

Para determinar la actividad enzimática de CD39/CD73 en las MSCs de todas las fuentes para generar ADO a partir de ATP o AMP se siguió el método descrito anteriormente (Mora-García *et al.*, 2016), se colocaron en placas de 48 pozos 5×10^5 células viables/pozo en un volumen de 1000 μL de medio Stem Cell Line libre de suero, y se agregaron, o no, cada uno de los sustratos, ATP o AMP a una concentración final de 2.5 mM. Como controles, se agregaron un inhibidor de CD39 (POM-1, Politungstato de Sodio) (Sigma, St Louis MO, USA) o un inhibidor de CD73 (APCP, Adenosina 5' α , β Metileno Monofosfato) (Sigma, St Louis MO, USA) para inhibir su actividad enzimática, posteriormente se recolectaron los sobrenadantes a las 0, 2, 4 y 6 horas, y fueron congelados a -70°C hasta su uso. Parte de los sobrenadantes obtenidos fueron evaluados con un Kit de Detección con Verde de Malaquita para fósforo inorgánico libre (R&D Systems, MN, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y evaluado en un lector de placas de microtitulación a una longitud de onda de 630 nm.

Para realizar la cromatografía de capa fina se procedió a tomar una alícuota de 1 μL de cada sobrenadante y fue colocada en la placa de cromatografía (Sigma, St Louis MO, USA). Para determinar los productos de la degradación de cada uno de los sustratos, se prepararon los estándares de ATP, ADP, AMP, INOSINA y ADO (Sigma, St Louis MO, USA) a una concentración de 2.5 mM utilizando como disolvente Agua Milli-Q. La colocación de la alícuota de 1 μL de estándares y sobrenadantes se hizo

de acuerdo a la siguiente distribución: a) ATP, ADP, AMP, ADO e INOSINA; b) sobrenadantes de las MSCs sin sustrato, las MSCs + ATP + POMP-1, las MSCs + ATP, las MSCs + AMP + APCP y las MSCs + AMP. Posteriormente, las placas se dejaron secar durante 10 minutos. Las muestras colocadas en el gel de capa fina fueron separadas en una fase móvil compuesta por: isobutanol: alcohol isoamílico: etoxietanol: amoníaco: agua (9:6:18:9:15); las placas fueron introducidas en la cámara cromatográfica con 2 ml de fase móvil y se dejó eluir 40 minutos. Posteriormente, las láminas se retiraron para su secado a temperatura ambiente y finalmente la hidrólisis de los nucleótidos de ADO se visualizó y fotografió en un transluminador con luz UV.

7.5 Cuantificación de ADO por cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC)

Para determinar de manera cuantitativa la ADO producida a partir de AMP por la actividad enzimática de las MSCs, se tomaron 10 μ L de cada sobrenadante obtenidos de MSCs de cada fuente cultivadas en presencia de AMP por 6 h, y se diluyó en 90 μ L de fase móvil (acetonitrilo: metanol: regulador de acetato de sodio 0.25 M) pH 6.3 dilución 1:100 μ L y se centrifugaron a 12000 rpm por 5 minutos en filtros de 0.1 μ m de poro.

De igual manera, se prepararon los diferentes estándares y soluciones de trabajo. Los reguladores fueron preparados diariamente y almacenados a 4 °C hasta su uso. Las soluciones que contenían la mezcla de todos los estándares fueron

preparados en fase móvil a una concentración de 1mg/mL, y se realizaron las diluciones seriadas apropiadas (1:100) para establecer los límites de detección.

Se realizó una curva estándar de 8 puntos con un estándar de ADO de una pureza del 99% (Sigma-Aldrich). Los estándares fueron separados en paralelo con todas las muestras experimentales para asegurar la precisión y exactitud del método. El estándar de ADO se usó para confirmar el tiempo de retención y el tiempo de corrida requerido. El análisis cromatográfico se realizó en un UPLC aquity (Waters, USA), se empleó un detector UV, la separación cromatográfica se alcanzó con un volumen de inyección de 5 μ L, a una temperatura de 50 °C en una columna de fase reversa de 18e 5 μ m de tamaño 125x4mm, 5mm de tamaño de partícula (Waters, USA). La determinación de ADO se realizó mediante un corrimiento isocrático utilizando como fase móvil (acetonitrilo 0.5%: metanol %5: regulador de acetato de sodio 0.25M 94.5% a pH 6.3), con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. La absorbancia se midió a 260 nm, el tiempo de retención fue de 2 minutos. La ADO se cuantificó comparando el tiempo de retención de la muestra con el de los estándares.

7.6 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Células mononucleadas (CMN) de sangre periférica se obtuvieron mediante gradiente de densidad empleando ficoll ($\delta=1.077$ g/ml). El anillo de CMN se recolectó y mantuvo en medio RPMI con 10 % de SFB y antibióticos a 37 °C con 5% de CO₂. Posteriormente, los linfocitos T CD3⁺ se seleccionaron con un anticuerpo específico dirigido a CD3 conjugado a perlas magnéticas y columnas MS Macs (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) (Castro-Manrreza *et al.*, 2014).

7.7 Activación y ensayo de proliferación de linfocitos T con ADO

La proliferación se evaluó mediante la adición de 10 μ L de carboxifluoresceína ([5 μ M]) y se analizó mediante citometría de flujo (Morales, 2013; Castro-Manrreza *et al.*, 2014). Para la activación de linfocitos T, se colocaron aproximadamente 5×10^4 linfocitos T CD3⁺/pozo en placas de 48 pozos (en un volumen de 1000 μ L de medio RPMI + 10 % SFB) y se activaron con Dynabeads CD2/CD3/CD28 T-cell expander (Invitrogene, California, USA) en proporción 2:1 (Castro-Manrreza *et al.*, 2014), al mismo tiempo se adicionó ADO sintética en diferentes concentraciones (0, 31, 62, 125, 250, 500 y 1000 μ M) como se reportó anteriormente (Mora-García *et al.*, 2016) y se mantuvieron en cultivo por 4 días.

Determinada la concentración de ADO sintética necesaria para inhibir en un 50% la proliferación de los linfocitos T CD3⁺, se evaluó la capacidad de inhibición de la ADO producida a partir de AMP por las MSCs de cada fuente. Para ello, se

obtuvieron linfocitos T CD3⁺, se cultivaron y activaron como se describió anteriormente, sin embargo, para este caso sólo se cultivaron en 500 µL de medio RPMI + 10 % SFB y se les adicionaron 500 µL (para un volumen final de en 1000 µL) de sobrenadantes obtenidos después de 6 h de cultivos de MSCs de cada fuente en presencia de AMP, como controles se usaron sobrenadantes de las MSCs cultivadas solo con medio así como sobrenadantes de MSCs + AMP, pero, donde se inhibió la actividad de CD73 con APCP. Además un control con 1000 µM de ADO sintética. La proliferación fue por la incorporación de carboxifluoresceína y evaluada a los 4 días de cultivo por citometría de flujo.

7.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el software SPSS 24.0. Usando las pruebas de ANOVA de una vía. La diferencia fue considerada como estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ y en algunos casos $p < 0.01$. Los datos fueron presentados como el valor promedio \pm DS de 2-4 experimentos independientes.

8 RESULTADOS

8.1 Las muestras de MO, PD, PL y SCU presentan morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación característica de las MSCs.

Para confirmar que las células utilizadas en este estudio son MSCs, muestras de las diferentes fuentes en resiembras tempranas (R2-R5) fueron cultivadas bajo condiciones estándar y utilizadas al alcanzar confluencias al 80 %. Posteriormente se procedió a demostrar que cumplieran con los criterios establecidos por la ISCT en 2006 para definir a una MSC. En primera instancia se evaluó el inmunofenotipo de las muestras obtenidas de cada fuente de MO, PD, PL y SCU (n=3 muestras/fuente) mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que un porcentaje alto de las poblaciones evaluadas presentaban a los marcadores de superficie característicos de las MSCs que corresponden a CD73, CD90 y CD105 (> 90 %). Aunado a lo anterior, las poblaciones expresaron porcentajes altos para otros marcadores utilizados en la identificación de las MSCs que corresponden a CD13 (> 90 %) y a HLA-1 (HLA-ABC) (> 65%). Finalmente, las poblaciones evaluadas presentaron bajos o nulos porcentajes para marcadores como HLA-II (HLA-DR) y de marcadores característicos de células hematopoyéticas como CD34 y CD45 o bien de células endoteliales como CD31(< 3 %) (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de la expresión de los marcadores Inmunofenotípicos de las MSCs de diferentes fuentes.				
<i>Inmunofenotipo\Fuente</i>	<i>Médula ósea</i>	<i>Pulpa dental</i>	<i>Placenta</i>	<i>Sangre de cordón umbilical</i>
<i>CD105</i>	<i>90 ± 13</i>	<i>94.08 ± 9.94</i>	<i>90.3 ± 8</i>	<i>94.4 ± 9.8</i>
<i>CD90</i>	<i>85 ± 15</i>	<i>98.9 ± 0.17</i>	<i>88.4 ± 9</i>	<i>73.2 ± 35</i>
<i>CD73</i>	<i>97 ± 3</i>	<i>99 ± 0.96</i>	<i>95.1 ± 2.1</i>	<i>97.6 ± 2.3</i>
<i>HLA-ABC</i>	<i>94 ± 9*</i>	<i>46.8 ± 39.95</i>	<i>87.1 ± 10*</i>	<i>68.4 ± 29.9</i>
<i>CD13</i>	<i>98 ± 1</i>	<i>97.3 ± 3.89</i>	<i>98 ± 1</i>	<i>98.4 ± 2.5</i>
<i>HLA-DR</i>	<i>3 ± 3</i>	<i>0.32 ± 0.47</i>	<i>0.96 ± 1</i>	<i>0.9 ± 0.7</i>
<i>CD45</i>	<i>1 ± 1</i>	<i>0.33 ± 0.08</i>	<i>0.96 ± 5</i>	<i>1.4 ± 2.7</i>
<i>CD34</i>	<i>0</i>	<i>1.2 ± 0.08</i>	<i>1.77 ± 1</i>	<i>0.4 ± 0.6</i>
<i>CD31</i>	<i>1 ± 1</i>	<i>0.39 ± 1.27</i>	<i>1.3 ± 1</i>	<i>1 ± 1.3</i>
<i>CD14</i>	<i>2 ± 2</i>	<i>0.44 ± 0.08</i>	<i>1.24 ± 1</i>	<i>0.9 ± 1.2</i>

Los valores se muestran en porcentajes de células positivas para los diferentes marcadores y corresponde a la media de valores a partir de experimentos separados (n=3 muestras/fuente). * Diferencia estadística significativa. p<0.05. prueba Tukey

Una vez que se demostró que las poblaciones celulares presentaban inmunofenotipo de las MSCs, se evaluaron las características restantes para definir a una MSC, una es la capacidad de adherirse al plástico y tomar forma fibroblastoide bajo condiciones de cultivo estándar (Figura 5). En todas las muestras utilizadas al ser analizadas bajo un microscopio invertido se comprobó esta característica. Finalmente, se evaluó la capacidad de las poblaciones celulares de diferenciarse a adipocitos, condrocitos y osteoblastos cuando fueron cultivadas en un medio inductor específico.

El resultado para la capacidad de diferenciación hacia adipocitos se confirmó mediante la tinción con rojo oleoso para teñir lípidos, donde se observó que las poblaciones celulares provenientes de la MO mostraron una mayor capacidad de diferenciación comparada con aquellas de PD, PL y SCU, donde la diferenciación es poca.

Con respecto a la diferenciación condrogénica, esta se confirmó con tinción de azul alciano que tiñe los mucopolisacáridos presentes en la matriz extracelular secretada por células condrocíticas lo cual nos permitió establecer que todas las muestras presentaban la capacidad de diferenciarse hacia este linaje, especialmente en las MSCs de PD, las cuales mostraron una mayor capacidad de diferenciación.

Finalmente, la diferenciación osteogénica se determinó mediante la tinción de fosfatasa alcalina mostrando que todas las muestras, a excepción de las MSCs de PL cuya diferenciación es baja, tienen una alta capacidad de dar lugar a osteoblastos (Figura 5).

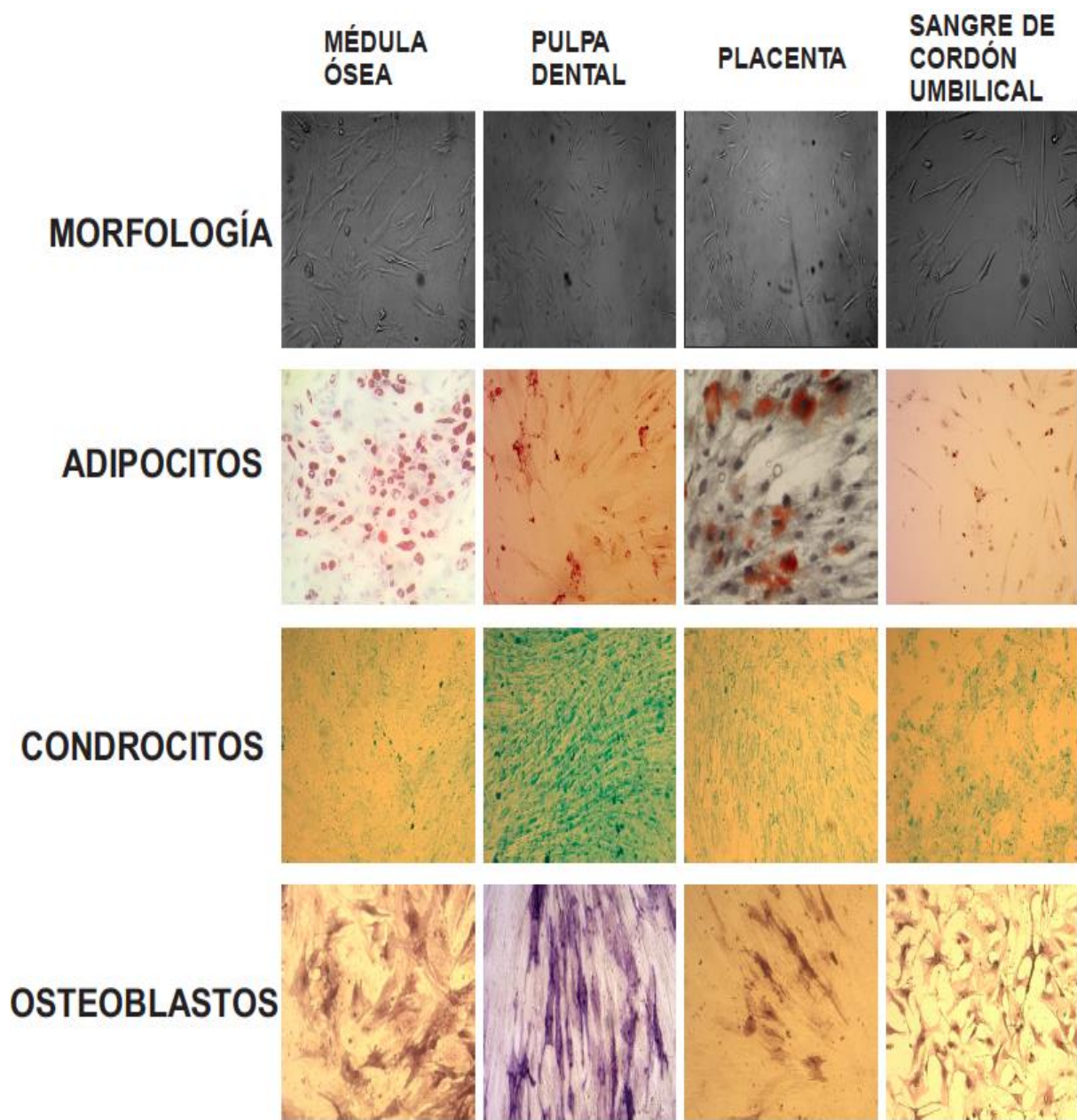


Figura 5. Las MSCs de MO, PD, PL y SCU presentan morfología y capacidad de diferenciación. Muestra la morfología fibroblastoide de las MSCs bajo condiciones de cultivo estándar y de su capacidad de diferenciarse en un medio inductor específico en adipocitos, condrocitos y osteoblastos, reveladas mediante tinción de rojo oleoso, azul alciano y fosfatasa alcalina, respectivamente. (n=3 muestras/fuente de MSCs)

8.2 Las MSCs de MO, PD, PL y SCU mostraron una alta expresión de CD73, pero baja de CD39

Para determinar si las MSCs de las diferentes fuentes recurren a la vía adenosinérgica como un mecanismo para modular la respuesta del sistema inmunológico, se evaluó la expresión de CD73 y CD39 en la membrana plasmática. Como se mostró anteriormente CD73 es un marcador de superficie que se expresa en más del 95 % de las MSCs de cada. Por otro lado, CD39 se expresa en porcentajes bajos en las MSCs de todas fuentes. Específicamente las MSCs de MO mostraron sólo un 9.5 % de expresión, la cual es significativamente mayor ($p < 0.05$) a las MSCs de PD y PL que mostraron un 1.3 % y 1.8 % de expresión respectivamente, mientras que en las MSCs de SCU, solamente se encontró un 0.7 % de expresión de CD39 (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de expresión de CD39 y CD73 en MSCs de MO, PD, PL y SCU.

<i>Expresión\Fuente</i>	<i>Médula ósea</i>	<i>Pulpa dental</i>	<i>Placenta</i>	<i>Sangre de cordón umbilical</i>
<i>CD39</i>	$9.5 \pm 1.8^*$	1.3 ± 0.28	1.8 ± 1.2	0.7 ± 0.52
<i>IMF CD39</i>	$145.38 \pm 4^*$	115.7 ± 17.5	101.76 ± 2.1	86.65 ± 20
<i>CD73</i>	97 ± 3	99 ± 0.96	95.1 ± 2.1	97.6 ± 2.3
<i>IMF CD73</i>	274.68 ± 13.7	$318.55 \pm 13.44^*$	$381.94 \pm 6^*$	273.7 ± 13.25

Los valores se muestran en porcentajes de células positivas para los diferentes marcadores, así como la intensidad media de fluorescencia (IMF) y corresponde a la media de los valores a partir de 3 experimentos separados (n=3 muestras/fuente). *Diferencia estadística significativa. $p < 0.05$. prueba de Tukey

Además del porcentaje de células positivas para CD39 y CD73 también se evaluó la intensidad media de fluorescencia (IMF), para CD39 los niveles de expresión son

bajos para todas las fuentes. Las MSCs de MO presentan mayor IMF (145.38, $p < 0.05$) en comparación con las MSCs de PD, PL y SCU que mostraron una IMF de 115.7.9, 101.76 y 86.65 respectivamente. Con relación a CD73, la IMF es significativamente mayor ($p < 0.05$) en MSCs de PD (333.1) y PL (375.4) en comparación con los de MO y SCU con una IMF de 287.8 y 277.2 respectivamente (Figura 6). Estos resultados indican que no todas las MSCs de las distintas fuentes expresan CD39, en el caso de CD73 su expresión en la población celular es similar en todas las fuentes, sin embargo, la expresión en la membrana de esta ectoenzima presenta pequeñas diferencias entre las distintas fuentes.

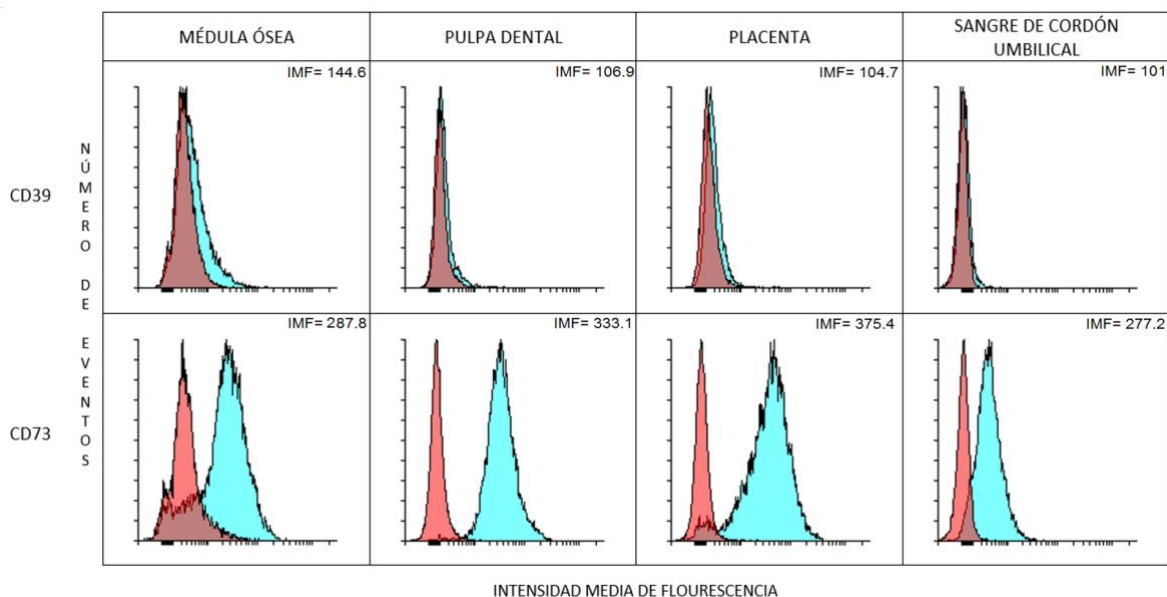


Figura 6. Expresión de CD39 y CD73 en MSCs de MO, PD, PL y SCU. Imagen representativa de la IMF de las muestras de MSCs analizados por citometría de flujo.

8.3 Las MSCs de MO, PD, PL y SCU producen ADO a partir de AMP, pero solo aquellas de MO producen ADO a partir de ATP

Una vez determinada la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en la membrana de las MSCs de MO, PD, PL y SCU se procedió a evaluar su capacidad de fosfohidrolizar al ATP y/o AMP en ADO. Para ello, 5×10^4 células de cada fuente (n=3 muestras/fuente), fueron cultivadas en medio libre de suero con 2.5 mM de ATP o AMP, los sobrenadantes fueron recolectados en diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 4 y 6 h) y fueron analizados mediante la técnica colorimétrica de verde malaquita para determinar la concentración de fósforo inorgánico (Pi). Los resultados mostraron que en los sobrenadantes de las MSCs adicionadas con ATP, hubo un incremento de las concentraciones de Pi entre 20 y 40 nanomoles/mL (nmol) a las 2 horas para las MSCs de MO, PD y PL, mientras que los sobrenadantes de las MSCs de SCU hubo una liberación del 10 nmol/mL, además, solo las MSCs de MO incrementaron los niveles de Pi libre a las 4 y 6 horas alcanzando una concentración final de 60 nmol/mL, la cual es significativamente mayor ($p < 0.05$) a las otras fuentes donde no hubo un incremento relevante de Pi después de las 2 horas.

En cuanto a las MSCs adicionadas con AMP se encontró una concentración de 15 a 30 nmol/mL de Pi en los sobrenadantes procedentes de cultivos de las MSCs de MO, PD y PL a las 2 horas mientras que en las MSC de SCU se presentaron menos de 10 nmol/mL. En cuanto a los sobrenadantes analizados a las 4 y 6 horas, los provenientes de las MSCs de MO presentaron una concentración estadísticamente significativa mayor ($p < 0.05$) de 60 nmol/mL con respecto a las otras fuentes ya que las

MSCs de PD, PL y SCU solo contenían concentraciones entre 20 y 30 nmol/mL. Como controles se utilizaron cultivos de las diferentes fuentes de MSCs en medio sin presencia de nucleótidos donde no hubo presencia de Pi libre, o bien, con presencia de los inhibidores de CD39 o CD73 más ATP o AMP respectivamente. Interesantemente, en estos cultivos se encontraron concentraciones similares de Pi a aquellos que no contenían inhibidor, principalmente en aquellos que contenían ATP (Figura 7). Este resultado sugiere que podrían existir otros mecanismos por los cuales las MSCs fosfohidrolizan a los nucleótidos presentes en el medio extracelular y que no están relacionados con las ectoenzima CD39 y CD73.

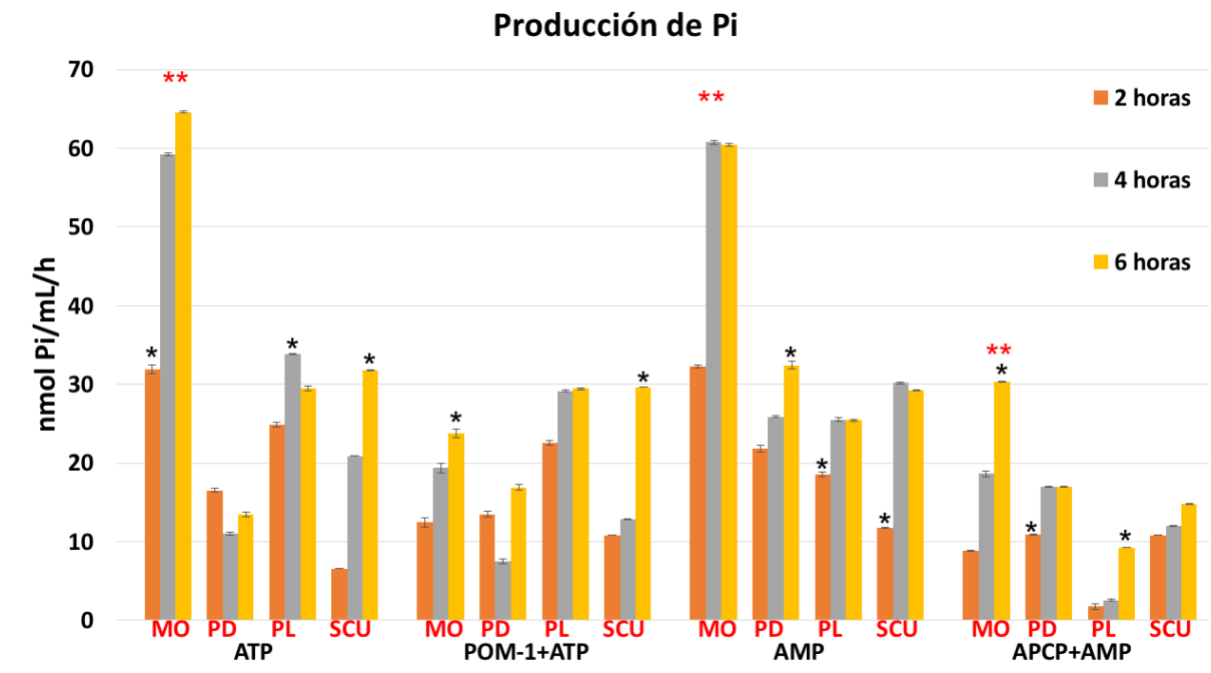


Figura 7. Actividad Fosfohidrolítica de CD39 y CD73 en MSCs de MO, PD, PL y SCU. Concentración de Pi generado a partir ATP o AMP por la actividad fosfohidrolítica de CD39 y CD73, 5×10^4 MSCs fueron cultivadas en medio libre de suero con cada uno de los sustratos solos, o con inhibidores de CD39 (POM-1) o CD73 (APCP) + los sustratos correspondientes, y posteriormente se evaluó el Pi libre en los sobrenadantes obtenidos en diferentes horas (0, 2, 4 y 6) mediante la técnica colorimétrica de verde malaquita. Los resultados representan el promedio \pm la desviación estándar de 2 experimentos independientes ($n=3$ muestras/fuente). *Diferencia estadística significativa dentro de la misma fuente. **Diferencia estadística significativa entre fuentes tomando en consideración la hora 6 $p < 0.05$. prueba de Tukey

Como una segunda prueba de la actividad fosfohidrolítica de CD39 y CD73, mediante cromatografía en capa fina se evaluó la generación de ADO a partir de ATP o AMP cuando son adicionados a cultivos de MSCs. Los resultados mostraron que, todas las fuentes son capaces de generar ADO a partir de AMP y que este evento se empieza a generar en las primeras 2 horas, sin embargo, es hasta las 6 horas cuando todo el sustrato ha sido degradado y se muestra una mayor concentración de ADO. Por otro lado, sólo las MSCs de MO fueron capaces de producir ADO a partir de ATP, evento que se observa hasta las 6 horas, de igual manera se analizaron sobrenadantes de MSCs sin sustrato o en presencia de inhibidores y no se observó la formación de ADO (figura 8). Estos datos sugieren que CD39 y CD73 son las principales responsables de la producción de ADO por parte de las MSCs y que cualquier otro mecanismo que pudiera estar hidrolizando al ATP y/o AMP como se mencionó en resultados previos no tienen una influencia importante sobre la generación de ADO.

Finalmente, al observar que sólo se generaba ADO a partir de AMP en todas las fuentes de MSCs, mediante UPLC se cuantificó la concentración de está en los sobrenadantes que cumplieran esta condición.

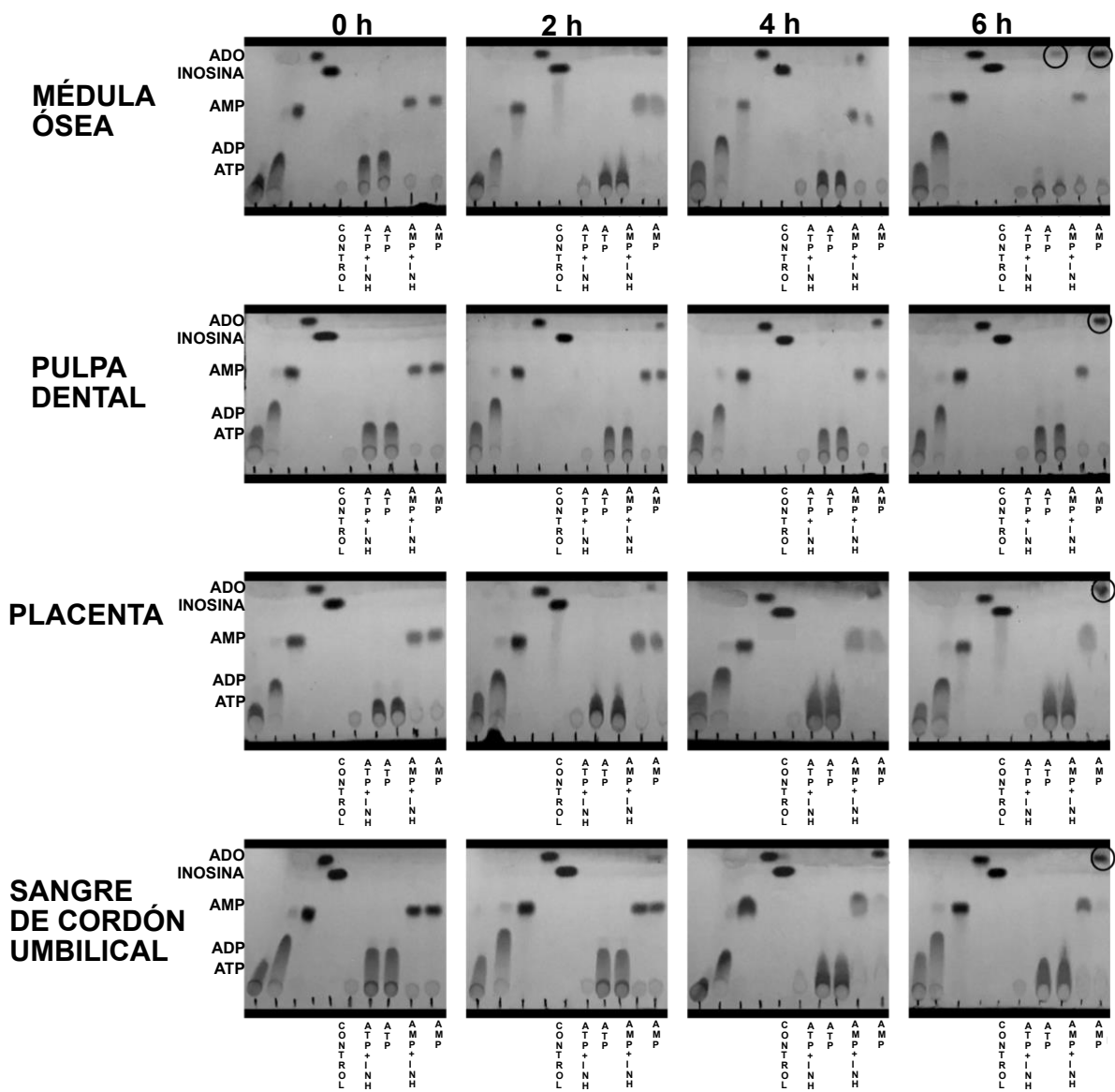


Figura 8. Actividad enzimática de CD39 y CD73 en MSCs de MO, SCU, PD y PL. Imagen representativa de la producción de ADO, 5×10^4 células fueron cultivadas en medio libre de suero en presencia, o no, de 2.5 mM/mL de ATP o AMP, o con inhibidores de CD39 (POM-1) o CD73 (APCP) + los sustratos correspondientes y posteriormente se evaluó la producción de ADO en placas de cromatografía en capa fina, de izquierda a derecha se colocaron los estándares de ATP, ADP, AMP, ADO e Inosina en concentración de 2.5 mM, seguidos de medios obtenidos en diferentes horas (0, 2, 4 y 6) de MSCs sin sustrato, con ATP o AMP, o inhibidores + sustratos.

Tomando en consideración la base estructural de nuestras moléculas (AMP y ADO), lo cual les proporciona una polaridad alta, se empleó una columna de fase reversa para que proporcionara una baja hidrofobicidad y una alta selectividad aromática y polar para mejorar la separación de los diferentes componentes. La fase móvil utilizada fue muy polar y se mantuvo a un pH de 6.3 para asegurar la separación de nucleósidos y nucleótidos quedando en su forma sin carga. En la Figura 9 se representa un cromatograma de UPLC donde se demuestra la separación de una mezcla de estándares de ATP, ADP, AMP, ADO e inosina corridos de manera simultánea y analizados mediante un detector de UV a 260 nm, en este se puede observar el tiempo de retención de cada uno de los metabolitos lo cual es importante para la identificación de la molécula de interés la cual, en este caso, corresponde a ADO, el tiempo de retención fue de 2 minutos y el tiempo de corrida por muestra fue de 5 minutos.

Para lograr detectar las concentraciones por mínimas que fueran en los sobrenadantes, se realizó una curva de calibración de ADO la cual fue obtenida a partir de un análisis de regresión lineal, partiendo de una concentración de 1 mg/mL y realizando diluciones seriadas 1:100 hasta obtener 8 concentraciones diferentes, los parámetros de regresión incluyeron la ordenada al origen de -5.28 , la pendiente de 1.85 y un coeficiente de correlación r^2 de 0.999 para ADO. El estándar se analizó por triplicado, el porcentaje de RSD (Desviación estándar de correlación) fue de 98.84 indicando una precisión satisfactoria en el análisis (Figura 10 y Tabla 6).

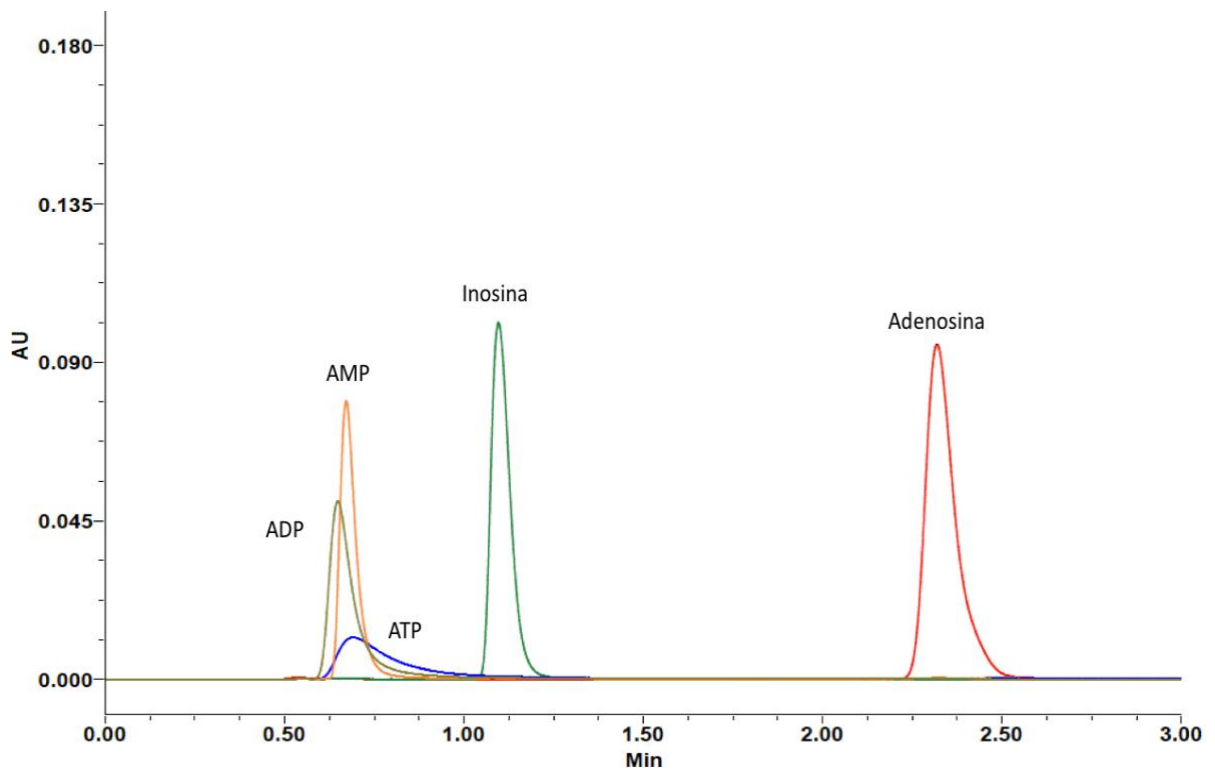


Figura 9. Cromatograma de UPLC. Cromatograma representativo de una mezcla de estándares de nucleótidos y nucleósidos separados y analizados usando una columna de fase reversa UPLC acoplada a un detector UV (260 nm). Las identidades relevantes de los picos son: ATP, ADP, AMP, Inosina y ADO.

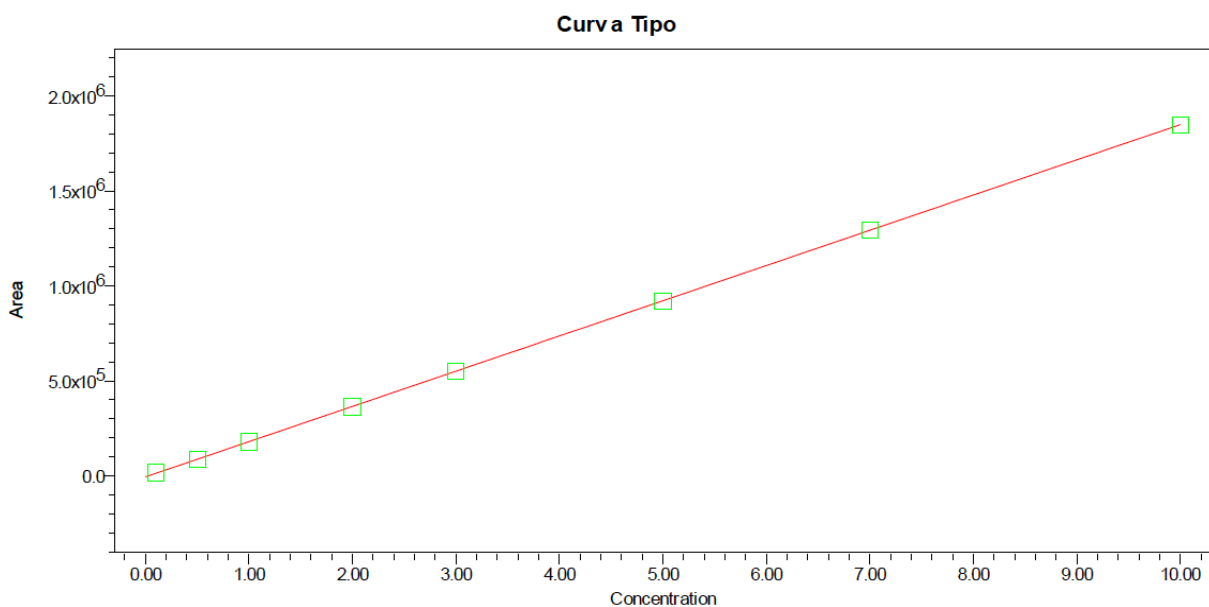


Figura 10. Curva de calibración de la cuantificación de ADO. Se muestra una regresión lineal de diluciones seriadas 1:100 de 8 puntos partiendo de una concentración de estándar de 1 mg/mL. La ordenada al origen calculada fue de $A = -5.28e+0.03$; la pendiente de $1.854e+0.07$; la ecuación de regresión lineal $Y = 1.85e+0.07X - 5.28e+0.03$; RSD de 98.84, el RSD (E) de 0.37 con un error estándar de $1.246e+0.03$ y un coeficiente de correlación r^2 de 0.999.

Tabla 6. Datos analíticos de la concentración de ADO en la curva estandar.

Curva Tipo
Peak Adenosina

	SampleName	Area	% Desviacion	Valor X	Valor calculado	Amount	Concentration	Units
1	STD ADO 1:100 0.1 uL	16686.74	18.466	0.0010	0.0012	0.000	0.001	ug
2	STD ADO 1:100 0.5 uL	88230.41	0.840	0.0050	0.0050	0.003	0.005	ug
3	STD ADO 1:100 1 uL	179015.45	-0.633	0.0100	0.0099	0.010	0.010	ug
4	STD ADO 1:100 2 uL	363568.10	-0.565	0.0200	0.0199	0.040	0.020	ug
5	STD ADO 1:100 3 uL	548742.51	-0.431	0.0300	0.0299	0.090	0.030	ug
6	STD ADO 1:100 5 uL	920716.09	-0.148	0.0500	0.0499	0.250	0.050	ug
7	STD ADO 1:100 7 uL	1296269.84	0.249	0.0700	0.0702	0.490	0.070	ug
8	STD ADO 1:100 10 uL	1849075.75	-0.021	0.1000	0.1000	1.000	0.100	ug

Una vez que el método fue estandarizado y validado, se procedió a inyectar en el UPLC los sobrenadantes colectados de 3 muestras de cada una de las fuentes de MSCs (Figura 11). Los datos analíticos obtenidos en la cuantificación de ADO se registraron en un tiempo de retención de 2 minutos y la concentración fue expresada en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Los resultados mostraron que al adicionar AMP a los medios de cultivo y mantenerlas por 6 h en cultivo, los sobrenadantes de MSCs de MO en promedio presentaron $0.46 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADO, mientras que las MSCs de PD contenían una concentración de $0.48 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, en cuanto a los sobrenadantes obtenidos de MSCs de PL y SCU presentaron una concentración de $0.48 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y $0.32 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADO respectivamente. Como controles se analizaron sobrenadantes obtenidos de MSCs cultivadas en medio sin sustrato y sobrenadantes de MSCs estimuladas con el inhibidor de CD73 + AMP, en el primer sobrenadante no hubo presencia detectable de ADO mientras que en el segundo se encontró una concentración de $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Sin embargo, estos datos fueron analizados para conocer la concentración en mM y así poder compararlos con la concentración inicial de $2.5 \text{ mM}/\text{mL}$ de AMP que se agregó a los cultivos, con ello encontramos que en los sobrenadantes de las MSCs de MO y PD después de 6 h presentaron $1.79 \text{ mM}/\text{mL}$ y $1.73 \text{ mM}/\text{mL}$ de ADO respectivamente. En cuanto a las MSCs de PL la concentración de ADO fue de $1.87 \text{ mM}/\text{mL}$ y en sobrenadantes de MSCs de SCU se presentó una concentración de ADO de $1.25 \text{ mM}/\text{mL}$, sin embargo, no hubo una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las concentraciones presentes en estos sobrenadantes. En cuanto a los controles

sin sustrato e inhibidor + AMP las concentraciones fueron de 0 mM/mL y 0.21 mM/mL de ADO respectivamente (Figura 12). Estos datos sugieren que todas las fuentes de MSCs poseen una capacidad muy similar para producir ADO a partir de AMP.

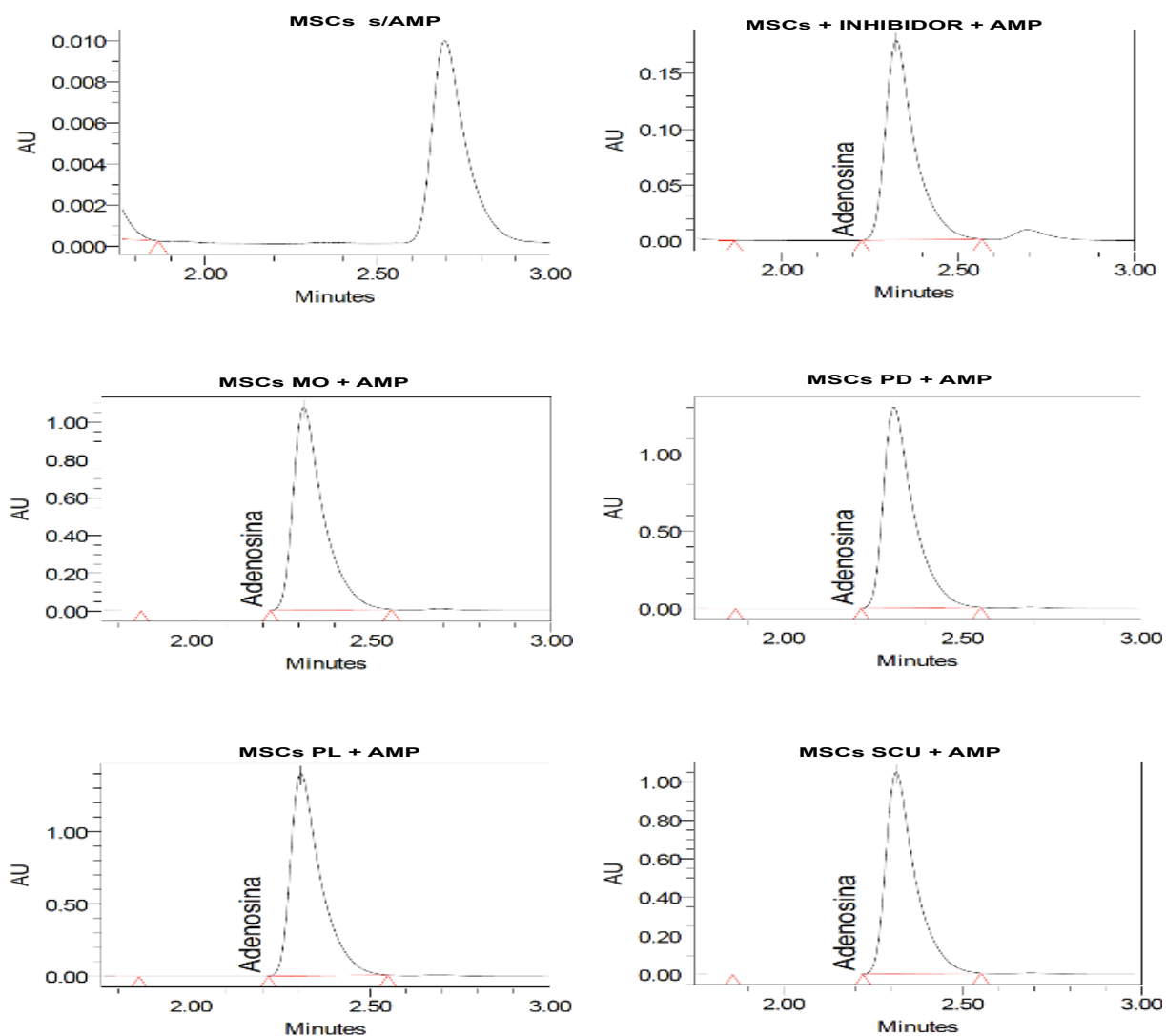


Figura 11. Cromatograma de la cuantificación de ADO en MSCs de MO, PD, PL y SCU. Imagen representativa de la presencia de ADO en los sobrenadantes obtenidos de las diferentes fuentes de MSCs.

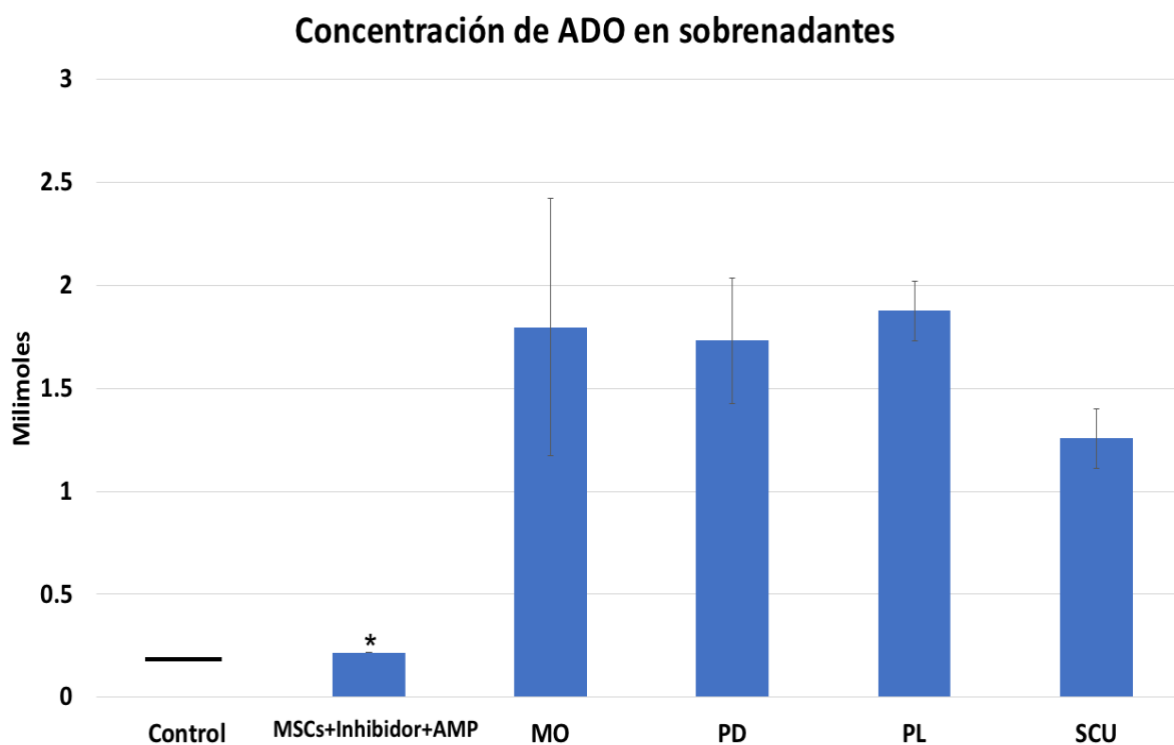


Figura 12. Los sobrenadantes obtenidos de cultivos de MSCs de MO, PD, PL y SCU presentan ADO. 5×10^4 MSCs de MO, PD, PL y SCU fueron cultivadas por 6 h en medio libre de suero y en presencia, o no, de 2.5 mM de AMP, o AMP + un inhibidor de CD73 (APCP). Posteriormente se evaluó mediante UPLC la presencia de ADO en los sobrenadantes para determinar las concentraciones en mM de ADO producidas por las MSCs. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de un experimento (n=3 muestras/fuente de MSCs). *Diferencia estadística significativa $p < 0.01$. Prueba de Tukey.

8.4 La ADO producida por las MSCs de MO, PD, PL y SCU inhibe la proliferación de linfocitos CD3⁺

Finalmente se determinó, si la ADO producida por las MSCs de cada fuente a partir de AMP era capaz de inhibir la proliferación de linfocitos CD3⁺. El primer paso para concretar este objetivo fue determinar la concentración requerida de ADO necesaria para inhibir de la proliferación de linfocitos T CD3⁺. Para ello, se realizó una estandarización de inhibición con ADO sintética en la cual linfocitos T CD3⁺ obtenidos SP de donadores sanos fueron teñidos con CFSE y activados con perlas CD2/CD3/CD28, al mismo tiempo fueron incubados con diferentes concentraciones de ADO sintética (0, 31, 62, 125, 250, 500 y 1000 μ M) y se mantuvieron en cultivo por 4 días, la proliferación fue evaluada mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que, con respecto a la proliferación de linfocitos sin ADO, a partir de los 250 μ M la proliferación comienza a reducirse de forma significativa ($p < 0.01$) en un 35 %, a 500 μ M se afecta al 50 %, mientras que a una concentración de 1000 μ M la proliferación se disminuye a casi un 40 % (Figura 13).

Determinada la concentración ideal para inhibir más del 50% de la proliferación de linfocitos CD3⁺, se realizaron cultivos de linfocitos a los cuales se les adicionaron 500 μ L de sobrenadantes obtenidos de cada una de las fuentes de las MSCs que fueron cultivadas en presencia de 2.5 mM/mL de AMP durante 6 h, dando un volumen total de 1 mL que contuviera aproximadamente la concentración de 1000 μ M de ADO. Los resultados mostraron que, efectivamente, en los sobrenadantes de todas las fuentes había la concentración de ADO necesaria para inhibir en casi un 50 % la proliferación

de los linfocitos CD3⁺ de manera muy similar a cultivos que contenían una concentración de 1000 μ M ADO sintética. Como controles se adicionaron sobrenadantes obtenidos de MSCs que no fueron enriquecidas con el sustrato, así como sobrenadantes de MSCs enriquecidas con AMP, pero a las cuales se les había inhibido CD73 con APCP, en el primer caso no hubo inhibición en la proliferación. Sin embargo, en el segundo hubo una inhibición del 20 % aproximadamente, siendo no significativa; con respecto al control. Esto posiblemente se debe a que en los sobrenadantes de MSCs con inhibidor + AMP se presentan bajas concentraciones de ADO, además, los linfocitos expresan CD73, por lo cual, ellos podrían estar produciendo ADO al encontrarse en un medio rico en AMP y por tanto inhibir su proliferación (Figura 14). Estos datos revelan que las MSCs de MO, PD, PL y SCU poseen capacidades similares para generar ADO a partir de AMP. Además de que esta inhibe la proliferación de células CD3⁺ y por tanto, nos sugiere fuertemente que la producción de ADO podría ser uno de los mecanismos cruciales, además de los ya ampliamente conocidos, que utilizan las MSCs para poder ejercer su efecto modulador sobre el sistema inmunológico.

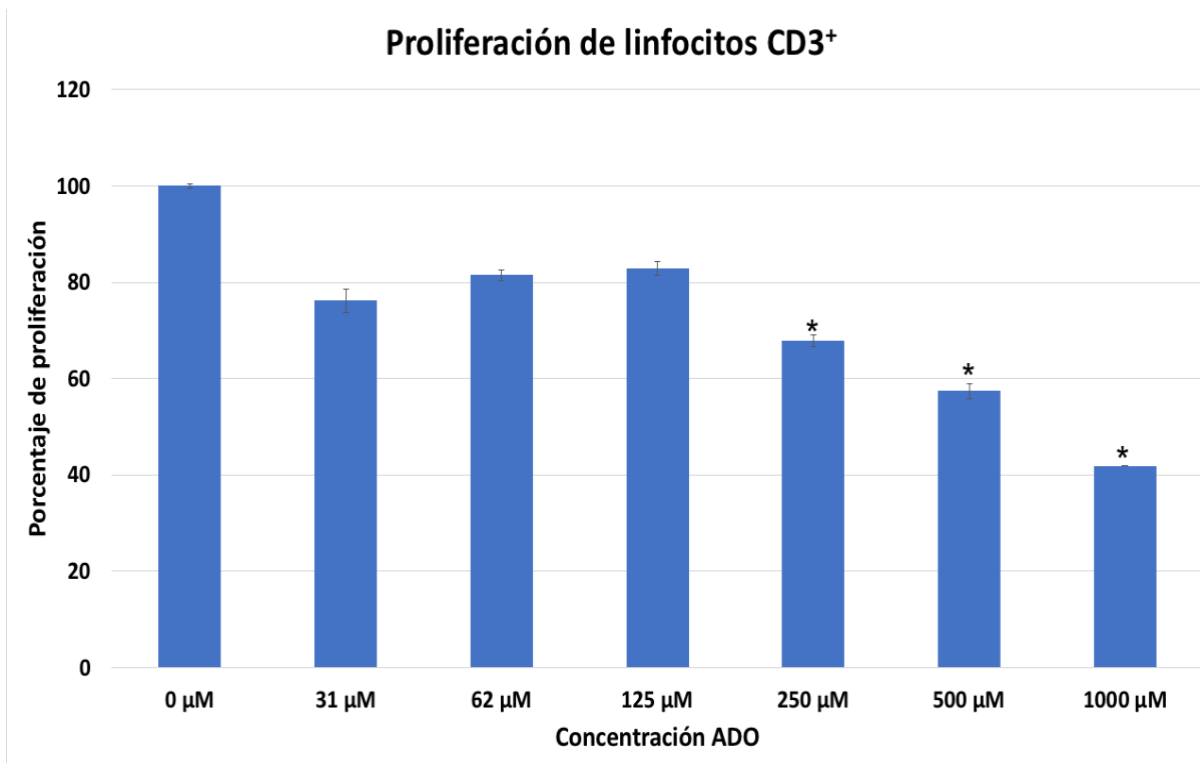


Figura 13. Inhibición de la proliferación de linfocitos CD3⁺ con ADO sintética. 5×10^4 linfocitos CD 3⁺ teñidos con CFSE, activados con perlas CD2/CD3/CD28 y cultivados con diferentes concentraciones de ADO sintética (0, 31, 62, 125, 250, 500 y 1000 μM), se mantuvieron en cultivo por 4 días y posteriormente la proliferación fue evaluada por citometría de flujo. Los resultados representan el promedio \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes (n=2 donadores CD3⁺/experimento). *Diferencia estadística significativa $p < 0.01$. Prueba de Tukey.

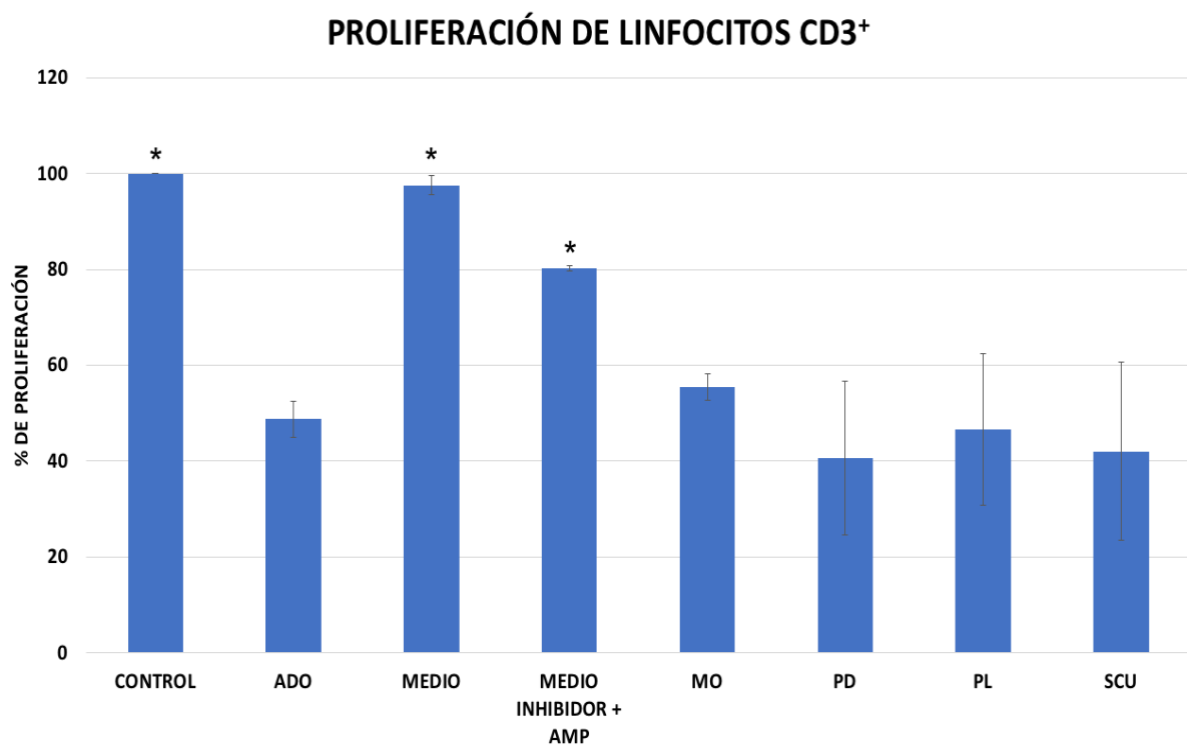


Figura 14. La ADO generada a partir de AMP por MSCs inhibe la proliferación de linfocitos CD3⁺. 5x10⁴ linfocitos CD 3⁺ teñidos con CFSE, activados con perlas CD2/CD3/CD28 y cultivados con sobrenadantes obtenidos de MSCs de MO, PD, PL o SCU [cultivadas, o no, en presencia de 2.5 mM/mL de AMP o AMP + un inhibidor de CD73 (APCP) por 6 h] se mantuvieron en cultivo por 4 días y posteriormente la proliferación fue evaluada por citometría de flujo. Los resultados muestran el promedio ± la desviación estándar de cuatro experimentos independientes (n=3 muestras/fuente de MSCs). *Diferencia estadística significativa p < 0.01 con respecto al control ADO. Prueba de Tukey.

9 DISCUSIÓN

En los últimos años, las propiedades biológicas de las MSCs han atraído la atención de investigadores de todo el mundo debido a su potencial aplicación en el tratamiento de diferentes padecimientos como las enfermedades inmunológicas. En la actualidad, la MO representa la fuente principal de las MSCs. Sin embargo, debido a la dificultad de obtenerlas de esta fuente, se hace necesaria la búsqueda de fuentes alternativas que faciliten su obtención, entre ellas podemos mencionar a las MSCs de PD, PL y SCU (Haddad & Saldanha-Araujo, 2014), todas con características similares, entre ellas, su inmunofenotipo, capacidad de proliferación, diferenciación y regulación del sistema inmunológico (Castro-Manrreza *et al.*, 2014; Vasandan *et al.*, 2014), a pesar del conocimiento previo sobre estas y varias fuentes más, aún existen muchos vacíos con respecto a los mecanismos moleculares empleados por las MSCs para regular la inmunidad en diferentes escenarios por lo que es indispensable ampliar la información que se tiene al respecto.

En 2006 las MSCs fueron definidas por la ISCT como aquellas células con capacidad de adherirse a las superficies de plástico cuando se cultivan en condiciones estándar, adquirir forma fibroblastoide, expresar un determinado panel de marcadores fenotípicos y pueden diferenciar en adipocitos, condrocitos y osteocitos cuando se cultivan en un medio inductor específico (Dominici *et al.*, 2006; Kyurkchiev *et al.*, 2014). Para demostrar que las muestras utilizadas en este estudio son MSCs se procedió a evaluar estas características confirmando que para las diferentes fuentes

se presentaba el inmunofenotipo que caracteriza a una MSC, la capacidad de adhesión y morfología y presentan una capacidad similar de diferenciación a osteoblastos y condrocitos, sin embargo, la capacidad de diferenciación adipogénica es muy baja en PD, PL y SCU con respecto a la MO, la cual presenta una alta capacidad de formación de adipocitos. Estos resultados concuerdan con los previamente reportados por nuestro grupo de trabajo (Castro-Manrreza *et al.*, 2014; Montesinos *et al.*, 2009; Matamoros, 2016), sin embargo no existe un estudio que justifique esta variabilidad en la capacidad de diferenciación, una posible respuesta sería considerar que las MSCs de diferentes fuentes están comprometidas a cumplir una función específica en su tejido de procedencia por lo cual suprimen algunas de sus características y enfocan su potencial a otras.

Como se mencionó anteriormente, las MSCs poseen la capacidad de modular el sistema inmunológico a través de la secreción de diferentes moléculas inmunosupresoras, esta característica ha sido reportada por nuestro grupo de trabajo, y otros grupos a nivel mundial, en las MSCs de MO (Roemeling-van, *et al.*, 2013; Hernández-Estéves, 2016), mientras que, en trabajos recientes se ha demostrado esta capacidad en las MSCs derivadas de SCU, PL (Castro Manrreza *et al.*, 2014) y PD (Vasandan *et al.*, 2014). Además, algunos grupos de trabajo han descrito un nuevo mecanismo de inmunosupresión en las MSCs de MO, el cual corresponde a la vía adenosinérgica (Lee *et al.*, 2014; Saldanha-Araujo *et al.*, 2011; Sattler *et al.*, 2010).

La vía adenosinérgica tiene la capacidad de fosfohidrolizar el ATP en ADO, se compone de dos ectonucleotidasas presentes en la membrana celular, la primera es

CD39 la cual es responsable de hidrolizar el ATP en ADP y este a AMP, la segunda ectonucleotidasa corresponde a CD73 que convierte el AMP en ADO.

Sattler y colaboradores (Sattler *et al.*, 2010), demostraron en las MSCs de MO de ratones por primera vez la presencia de CD39, seguidos de otros grupos de trabajo que lo demostraron en MSC de MO humana (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011). CD73 es un marcador característico de las MSCs (Dominici *et al.*, 2006) sin embargo, pocos han demostrado la expresión de CD39 en diferentes fuentes de MSCs. Nosotros evaluamos la expresión de CD39 en MSCs de MO, PD, PL, y SCU encontrando bajos porcentajes, en la MO encontramos tan solo un 9.5 %, algunos reportes han mostrado que CD39 se expresa al menos en un 20 % de la población (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011), sin embargo, otros indican la nula expresión de este marcador de superficie en las MSCs de MO (Sundin *et al.*, 2011). Un trabajo reciente realizado por Kerkelä y colaboradres (Kerkelä *et al.*, 2016), reportó la expresión de CD39 en diferentes muestras de la MO y mostró que los porcentajes variaban entre el 30 al 70 % en sus poblaciones analizadas. Todos estos estudios indican que existe una gran heterogeneidad en la expresión de esta ectoenzima entre las diferentes muestra analizadas a pesar de que todas son MSCs provenientes de la MO, esta podría ser la razón por la cual nosotros encontramos una baja expresión en nuestras muestras comparado a otras investigaciones. Por otro lado, el grupo de Kerkelä analizó la expresión de CD39 en MSCs de SCU reportando su nula expresión lo cual es similar a nuestros resultados que corresponden al 0.7% de expresión en nuestras muestras analizadas, mientras que en las MSCs de PD y PL solo encontramos 1 % de

expresión. Aún no existe un trabajo que nos ayude a avalar los resultados obtenidos para estas dos últimas fuentes, sin embargo, algunos reportes han mostrado que células endoteliales de placenta expresan CD39 asociadas a caveolas en el interior de la célula (Kittel *et al.*, 2004), por lo que sería interesante analizar si existe presencia intracelular de CD39 en las MSCs provenientes de esta fuente, mientras que otros autores reportan baja expresión de CD39 en MSCs derivadas de otros tejidos dentales (gingiva), que en conjunto con CD73 son responsables de producir ADO a partir de ATP y así, de ejercer un efecto inmunosupresor en linfocitos T (Chen *et al.*, 2013). Es importante mencionar que este último tejido se encuentra en un mayor reto inmunológico que la PD y por tanto podría no recurrir de manera adicional a la vía adenosinérgica como uno de sus mecanismos inmunomoduladores, y por tanto, los tejidos dentales podrían condicionar la presencia de esta vía dependiendo de su microambiente.

Además de evaluar el porcentaje de células que expresan CD39 y CD73 se midió la IMF, la cual nos indica arbitrariamente, la cantidad de moléculas que están presentes en la membrana celular, encontrando que la expresión de CD39 es baja para todas las MSCs de las diferentes fuentes, donde las MSCs de MO son la fuente que presenta mayor expresión. Sin embargo prácticamente es nula, estos datos concuerdan con Kerkelä y colaboradores (Kerkelä *et al.*, 2016), los cuales revelaron que la IMF de CD39 en MSCs de MO es baja, y en lo que respecta a las MSCs de SCU fue nula la IMF lo cual concuerda con nuestros resultados. En cuanto a CD73 el valor de la IMF en el caso de las MSCs de PD y PL fue mayor, estadísticamente, que

en las MSCs de MO y de SCU, sin embargo, para todas las fuentes fue alto como ya se ha reportado en algunos trabajos publicados (Montesinos *et al.*, 2009; Castro Manreza *et al.*, 2014; Matamoros, 2016).

Una vez determinada la expresión de CD39 y CD73 en las MSCs de diferentes fuentes, se procedió a evaluar su capacidad de hidrolizar ATP o AMP a ADO, en primer lugar se midió la concentración de Pi en los sobrenadantes obtenidos de las diferentes fuentes mostrando que solamente los provenientes de la MO contenían concentraciones altas de Pi a partir de ATP a las 6 horas (60 nmol/mL), en comparación con las demás fuentes (20-30 nmol/mL). Por otro lado, aquellos sobrenadantes de la MO que fueron adicionados con AMP también mostraron altas concentraciones de Pi (60 nmol/mL) desde las 4 horas, comparadas con las otras fuentes (20-30 nmol/mL) que expresaron estas concentraciones alrededor de las 6 horas, como un control se incluyeron cultivos que contenían inhibidores de las ectonucleasas, sin embargo, se encontró liberación de Pi principalmente en aquellos cultivos que contenían ATP e inhibidor. Esto es probablemente debido a que existen otros miembros de la familia de CD39 con funciones muy similares, las cuales podrían ser responsables de este evento (Scarffi, 2014).

Además de esta prueba, mediante cromatografía de capa fina se mostró que todas las fuentes tienen la capacidad de generar ADO a partir de AMP a partir de las 2 horas y degradando todo el sustrato a las 6 horas, lo cual toma sentido ya que la expresión de CD73 es alto, este resultado concuerda con un trabajo recientemente publicado por Mora y colaboradores en 2016 (Mora-García *et al.*, 2016) donde mostró

que los sobrenadantes obtenidos de las MSCs de cérvix con cáncer y de cérvix normal, contiene mayores concentraciones de ADO hasta las 5 horas después de haber sido enriquecidos los cultivos con AMP.

Por otro lado, las MSCs de MO fueron las únicas en producir ADO a partir de ATP, a diferencia de lo observado en los cultivos de MSCs + AMP, este proceso es lento, se forma poca ADO y no se degrada todo el sustrato, esto seguramente debido a que la expresión de CD39 es baja en esta fuente. Estos resultados en MO, ya se habían demostrado en trabajos anteriores (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014), donde esta fuente si produce ADO a partir de AMP en tiempos cortos y ADO a partir de ATP, sin embargo, en este último no se ha mostrado el tiempo exacto en que ocurre, solo se ha observado que en tiempos de al menos 1 hora no hay producción de ADO (Kerkelä *et al.*, 2016). En el caso de MSCs de cérvix normal, donde la expresión de CD39 es baja, el proceso de producción de ADO a partir de ATP se comienza a visualizar hasta las 6 horas de la misma manera que en nuestros resultados (Mora-García *et al.*, 2016). El hecho de que en las MSCs de las otras fuentes no se lleve a cabo el mecanismo se debe a que en ellas prácticamente no expresan esta última ectonucleotidasa. Otra posible respuesta de porque no se encuentra ADO en los sobrenadantes a pesar de que en ellos hay presencia de Pi, es debido a que en las MSCs existe una gran variedad de receptores y transportadores de nucleótidos y nucleósidos como ATP, ADP, UDP, etc., (Scarfi, 2014), por esto, existe una posibilidad de que las MSCs, principalmente de PD, PL y SCU, estén absorbiendo los nucleótidos del medio para cumplir otras tareas biológicas que estas

células consideran importantes y se libere Pi al medio. Sin embargo, es importante recalcar que al inhibir ambas ectonucleasas, no se pudo detectar presencia de ADO a partir de AMP y en el caso de las MSCs de MO tampoco a partir de ATP. Esto nos da una prueba contundente de que la producción de ADO es mediada por CD39 y CD73 y que de existir algún otro mecanismo que este fosfohidrolizando los nucleótidos presentes, estos no están repercutiendo fuertemente en la producción de ADO.

Después de observar que las MSCs de PD, PL y SCU solo podían producir ADO a partir de AMP de manera similar a las MSCs de la MO y que éstas últimas no producían suficiente ADO a partir de ATP, se evaluaron solo los sobrenadantes de las MSCs cultivadas con AMP por 6 horas en una última prueba que corroborara la presencia de ADO, así como la concentración presente en estos sobrenadantes, la cual fue cromatografía UPLC. Nuestros resultados con esta prueba mostraron que las MSCs de todas las fuentes producen ADO de manera muy similar, ya que en todas se encontraron 1-2 mM, es interesante comentar que la concentración de AMP inicial era de 2.5 mM, sin embargo esta concentración en ADO no fue similar al analizar los sobrenadantes, esto podría ser explicado debido a que bajo condiciones fisiológicas normales en un organismo existen bajas concentraciones de nucleótidos en los medios extracelulares que no activan a la vía adenosinérgica, el incremento de la concentración de nucleótidos en exceso es considerada una señal de peligro y por tanto es la responsable de su activación para contrarrestar la situación (Eltzschig *et al.*, 2012) y al estabilizarla, el mecanismo vuelve a inactivarse. Interesantemente en los sobrenadantes de las MSCs + AMP en los que fue inhibido CD73, se encontró una

baja presencia de ADO, esto podría ser por algún otro mecanismo que estén empleando las MSCs para producir ADO y poder reducir el AMP del medio extracelular.

Finalmente, como una prueba para corroborar la concentración de ADO que se estimó en los sobrenadantes así como su funcionalidad, se evaluó la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD3⁺ a partir de la ADO producida por las MSCs. El primer paso fue determinar la concentración necesaria para abatir la proliferación y para ello se utilizaron diferentes concentraciones de ADO sintética, se observó que una concentración de 1000 μ M tiene un efecto inhibitorio de al menos un 50 % en la proliferación de los linfocitos, conocido esto, se cultivaron linfocitos CD3⁺ en presencia de sobrenadantes con una concentración similar y se observó que estos tenían la misma capacidad inhibitoria que la ADO sintética.

A pesar de que la concentración de ADO era alta, no pudo abatir en un 100 % la proliferación, esto se puede explicar debido a la presencia de la ADA que se expresa en los linfocitos activados, la cual transforma a la ADO en Inosina perdiendo así su función biológica que ejerce sobre los linfocitos (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011), algunos trabajos han demostrado que la inhibición de esta molécula permite que la ADO haga efecto aún en concentraciones bajas (Kerkelä *et al.*, 2016), por otro lado se sabe que la ADO estimula la producción y proliferación de linfocitos T reguladores (Bono *et al.*, 2015), esto podría explicar la razón de que las concentraciones de altas de ADO no abaten totalmente la proliferación de los linfocitos, ya que en nuestro caso podrían estar induciendo la diferenciación de estos linfocitos por lo cual sería

interesante conocer con exactitud el efecto que produce la ADO sobre cada población de linfocitos CD3⁺.

En resumen, estos resultados sugieren que todas las fuentes de las MSCs expresan altos niveles de CD73 a nivel de población como de membrana plasmática, sin embargo, el porcentaje de CD39, fue prácticamente nulo en las MSCs provenientes de PD, PL y SCU, en la MO hay un mayor porcentaje de expresión en la población de células que en las otras fuentes de MSCs, aunque, su expresión en la membrana celular es bajo. Se demostró que todas las fuentes producen ADO a partir de AMP, pero solo la MO produce ADO a partir de ATP. En el caso de la producción de ADO a partir de AMP encontramos que todas las fuentes tienen la misma capacidad de hidrólisis y que son capaces de producir la suficiente concentración de ADO para inhibir la proliferación de linfocitos CD3⁺. Este es el primer estudio que evalúa la participación de la vía adenosinérgica en la capacidad inmunosupresora entre las MSCs provenientes de la MO y aquellas de PD, PL y SCU de manera comparativa. Es importante conocer los mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en las propiedades inmunosupresoras de las fuentes de MSCs alternativas a la MO y así, contar con nuevas y mejores herramientas enfocadas hacia la medicina regenerativa. Si bien, nosotros encontramos que las MSCs de PD, PL y SCU no presentan el mecanismo completo de la vía adenosinérgica como MO, el hecho de que posean una parte de este mecanismo tan efectivo como las MSCs de la MO aún nos deja abierta la ventana a la posibilidad de poder utilizar estas fuentes, bajo ciertas condiciones,

como alternativas para el tratamiento clínico de diferentes enfermedades autoinmunes que aún carecen de un tratamiento efectivo.

10 CONCLUSIONES

- Las muestras utilizadas en este estudio presentaron inmunofenotipo, morfología y capacidad de diferenciación, que son característicos de las MSCs.
- Las poblaciones de MSCs de MO, PD, PL y SCU presentan porcentajes altos de CD73.
- Las poblaciones de MSCs de provenientes de PD, PL y SCU prácticamente no expresaron CD39, sólo la MO expresó niveles bajos de CD39.
- Dado que solo las MSCs de MO expresaron CD39, fueron capaces de generar ADO a partir de ATP a diferencia de aquellas provenientes de las otras fuentes analizadas.
- CD73 es funcional en las MSCs derivadas de las diferentes fuentes dado que es capaz de generar ADO a partir de AMP y esta funcionalidad es similar en todas las fuentes.
- La ADO producida a partir de AMP por las mesenquimales de MO, PD, PL y SCU inhibió la proliferación de linfocitos T CD3⁺.

- Estos resultados nos dan un mayor conocimiento de las propiedades inmunosupresoras de las fuentes de MSCs alternativas a la MO, lo cual enriquece el potencial para su posterior aplicación en el tratamiento de enfermedades autoinmunes que aun carecen de un tratamiento clínico que las erradique o controle con efectividad.

11 PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto de la ADO producida por las MSCs de MO, PD, PL y SCU sobre las diferentes subpoblaciones de linfocitos CD3⁺ (CD4⁺, CD8⁺ y Treg).
- Determinar si la ADO producida por las MSCs de MO, PD, PL y SCU tiene un efecto autocrino para producir citocinas anti-inflamatorias.
- Evaluar si el estímulo con citocinas pro-inflamatorias como TNF- α y/o IFN- γ sobre las MSCs de MO, PD, PL y SCU puede inducir la expresión de CD39.
- Determinar si la vía adenosinérgica está presente en otras fuentes MSCs neonatales como cordón umbilical y tejidos adultos como ligamento periodontal y tejido gingival.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C., & Stagg, J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev*, 276(1), 121-144. doi:10.1111/imr.12528
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S., & Hasko, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*, 19(6), 355-367. doi:10.1016/j.molmed.2013.03.005
- Bab, I., Ashton, B. A., Gazit, D., Marx, G., Williamson, M. C., & Owen, M. E. (1986). Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Journal of Cell Science*, 84(1), 139-151.
- Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(4), 568-584. doi:10.1016/j.biocel.2003.11.001
- Blackburn, M. R., Vance, C. O., Morschl, E., & Wilson, C. N. (2009). Adenosine Receptors and Inflammation. In C. N. Wilson & S. J. Mustafa (Eds.), *Adenosine Receptors in Health and Disease* (pp. 215-269). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bono, M. R., Fernandez, D., Flores-Santibanez, F., Roseblatt, M., & Sauma, D. (2015). CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett*, 589(22), 3454-3460. doi:10.1016/j.febslet.2015.07.027

- Burnstock, G., & Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General Pharmacology: The Vascular System*, 16(5), 433-440. doi:[https://doi.org/10.1016/0306-3623\(85\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0306-3623(85)90001-1)
- Burr, S. P., Dazzi, F., & Garden, O. A. (2013). Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance? *Immunol Cell Biol*, 91(1), 12-18. doi:10.1038/icb.2012.60
- Castro-Manreza, M. E., Mayani, H., Monroy-Garcia, A., Flores-Figueroa, E., Chavez-Rueda, K., Legorreta-Haquet, V., . . . Montesinos, J. J. (2014). Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells. *Stem Cells Dev*, 23(11), 1217-1232. doi:10.1089/scd.2013.0363
- Castro-Manreza, M. E., & Montesinos, J. J. (2015). Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res*, 2015, 1-20. doi:10.1155/2015/394917
- Chen, G. Y., & Nunez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, 10(12), 826-837. doi:10.1038/nri2873
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., . . . Uccelli, A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107(1), 367-372. doi:10.1182/blood-2005-07-2657
- Cronstein, B. N., & Sitkovsky, M. (2017). Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 13(1), 41-51. doi:10.1038/nrrheum.2016.178

- de Lourdes Mora-Garcia, M., Garcia-Rocha, R., Morales-Ramirez, O., Montesinos, J. J., Weiss-Steider, B., Hernandez-Montes, J., . . . Monroy-Garcia, A. (2016). Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer produce high amounts of adenosine to suppress cytotoxic T lymphocyte functions. *J Transl Med*, *14*(1), 302. doi:10.1186/s12967-016-1057-8
- Di Virgilio, F., & Adinolfi, E. (2017). Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*, *36*(3), 293-303. doi:10.1038/onc.2016.206
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . . . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905
- Eltzschig, H. K., Sitkovsky, M. V., & Robson, S. C. (2012). Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med*, *367*(24), 2322-2333. doi:10.1056/NEJMra1205750
- English, K. (2013). Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol*, *91*(1), 19-26. doi:10.1038/icb.2012.56
- Erb, L., & Weisman, G. A. (2012). Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*, *1*(6), 789-803. doi:10.1002/wmts.62
- Fajardo-Orduna, G. R., Mayani, H., & Montesinos, J. J. (2015). Hematopoietic support capacity of mesenchymal stem cells: Biology and clinical potential. *Arch Med Res*, *46*(8), 589-596. doi:10.1016/j.arcmed.2015.10.001

- Fossett, E., & Khan, W. S. (2012). Optimising human mesenchymal stem cell numbers for clinical application: a literature review. *Stem Cells Int*, 2012, 465259. doi:10.1155/2012/465259
- Friedenstein, A. J. (1980). Stromal mechanisms of bone marrow: Cloning in vitro and retransplantation in vivo. In S. Thierfelder, H. Rodt, & H. J. Kolb (Eds.), *Immunobiology of Bone Marrow Transplantation: International Seminar of the Institut für Hämatologie, GSF, Munich under the auspices of the European Communities March 8–10, 1979, Neuherberg/München* (pp. 19-29). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, 3(4), 393-403. doi:10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic transplants of bone marrow. *Transplantation*, 6(2), 230-247.
- Gregory, C. A., Prockop, D. J., & Spees, J. L. (2005). Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res*, 306(2), 330-335. doi:10.1016/j.yexcr.2005.03.018
- Haddad, R., & Saldanha-Araujo, F. (2014). Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: what do we know so far? *Biomed Res Int*, 2014, 216806. doi:10.1155/2014/216806
- Hasko, G., Linden, J., Cronstein, B., & Pacher, P. (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 7(9), 759-770. doi:10.1038/nrd2638

- Hasko, G., & Cronstein, B. (2013). Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol*, 4, 1-8. doi:10.3389/fimmu.2013.00085
- Hass, R., Kasper, C., Bohm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*, 9(12), 1-14. doi:10.1186/1478-811X-9-12
- Hernández, E. H. (2016). *Evaluación de la capacidad inmunosupresora de células troncales mesenquimales provenientes de cáncer de cérvix*. (Maestría), UNAM, México.
- Huang, F., Chen, M., Chen, W., Gu, J., Yuan, J., Xue, Y., . . . Zheng, S. G. (2017). Human gingiva-derived mesenchymal stem cells inhibit xeno-graft-versus-host disease via CD39–CD73–adenosine and IDO signals. *Frontiers in Immunology*, 8(68), 1-9. doi:10.3389/fimmu.2017.00068
- Huang, G. T., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*, 88(9), 792-806. doi:10.1177/0022034509340867
- Jacobson, K. A. (2010). P2X and P2Y receptors. *Tocris Bioscience Scientific Review Series*, 33, 1-15.
- Junger, W. G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*, 11(3), 201-212. doi:10.1038/nri2938

- Karaoz, E., Demircan, P. C., Saglam, O., Aksoy, A., Kaymaz, F., & Duruksu, G. (2011). Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol*, 136(4), 455-473. doi:10.1007/s00418-011-0858-3
- Kerkela, E., Laitinen, A., Rabina, J., Valkonen, S., Takatalo, M., Larjo, A., . . . Laitinen, S. (2016). Adenosinergic Immunosuppression by Human Mesenchymal Stromal Cells Requires Co-Operation with T cells. *STEM CELLS*, 34(3), 781-790. doi:10.1002/stem.2280
- Kim, N., & Cho, S. G. (2013). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med*, 28(4), 387-402. doi:10.3904/kjim.2013.28.4.387
- Kyurkchiev, D., Bochev, I., Ivanova-Todorova, E., Mourdjeva, M., Oreshkova, T., Belemezova, K., & Kyurkchiev, S. (2014). Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*, 6(5), 552-570. doi:10.4252/wjsc.v6.i5.552
- Lee, J. J., Jeong, H. J., Kim, M. K., Wee, W. R., Lee, W. W., Kim, S. U., . . . Yang, Y. H. (2014). CD39-mediated effect of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the human Th17 cell function. *Purinergic Signal*, 10(2), 357-365. doi:10.1007/s11302-013-9385-0
- Li, Y. M., Schilling, T., Benisch, P., Zeck, S., Meissner-Weigl, J., Schneider, D., . . . Ebert, R. (2007). Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 363(1), 209-215. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.161

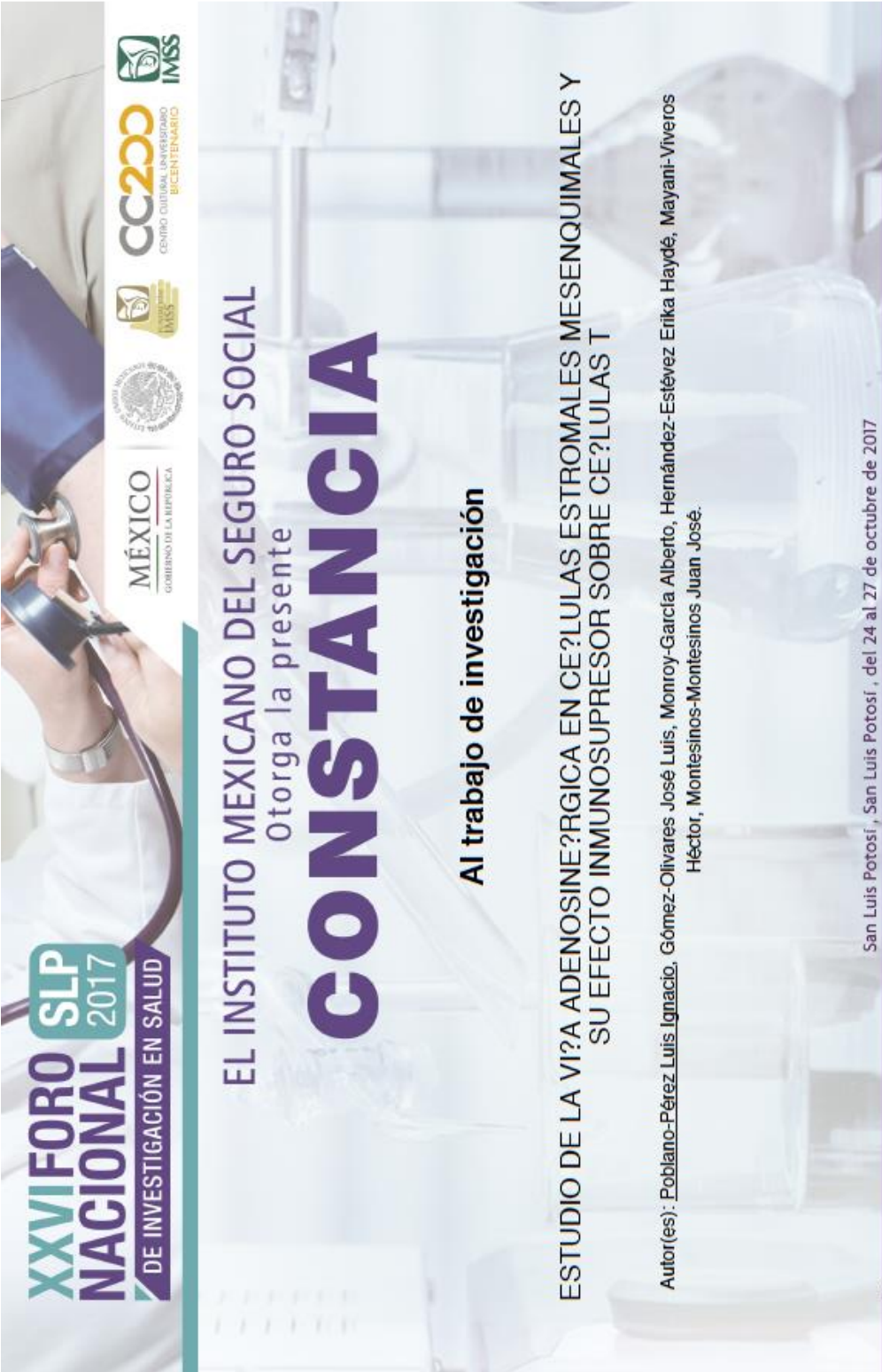
- Linden, J. (2011). Regulation of leukocyte function by adenosine receptors. *Adv Pharmacol*, 61, 95-114. doi:10.1016/B978-0-12-385526-8.00004-7
- Matamoros, D. R. (2016). *Evaluación de la capacidad de soporte hematopoyético de células troncales mesenquimales provenientes de tejidos dentales*. (Maestría), UNAM, México.
- Mattar, P., & Bieback, K. (2015). Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells. *Frontiers in Immunology*, 6(560), 1-8. doi:10.3389/fimmu.2015.00560
- Montesinos, J. J., Flores-Figueroa, E., Castillo-Medina, S., Flores-Guzman, P., Hernandez-Estevez, E., Fajardo-Orduna, G., . . . Mayani, H. (2009). Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy*, 11(2), 163-176. doi:10.1080/14653240802582075
- Montesinos, J. J., Mora-Garcia Mde, L., Mayani, H., Flores-Figueroa, E., Garcia-Rocha, R., Fajardo-Orduna, G. R., . . . Monroy-Garcia, A. (2013). 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*, 22(18), 2508-2519. doi:10.1089/scd.2013.0084
- Morales, O. (2013). *Análisis funcional de la vía adenosinérgica a través de la expresión de las ectoenzimas CD39/CD73 en células estromales mesenquimales derivadas de cérvix y su efecto inmunosupresor*. (Maestría), IPN, México.

- Newman, R. E., Yoo, D., LeRoux, M. A., & Danilkovitch-Miagkova, A. (2009). Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflammation & Allergy - Drug Targets (Discontinued)*, 8(2), 110-123. doi:<http://dx.doi.org/10.2174/187152809788462635>
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., . . . Marshak, D. R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411), 143. doi:10.1126/science.284.5411.143
- Polosa, R., & Holgate, S. T. (2006). Adenosine receptors as promising therapeutic targets for drug development in chronic airway inflammation. *Current Drug Targets*, 7(6), 699-706. doi:<http://dx.doi.org/10.2174/138945006777435236>
- Prasajak, P., & Leeanansaksiri, W. (2014). Mesenchymal stem cells: Current clinical applications and therapeutic potential in liver diseases. *Journal of Bone Marrow Research*, 02(01), 1-9. doi:10.4172/2329-8820.1000137
- Rao, M. S., & Mattson, M. P. (2001). Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(7), 713-734. doi:[https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00224-X](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00224-X)
- Ren, G., Chen, X., Dong, F., Li, W., Ren, X., Zhang, Y., & Shi, Y. (2012). Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med*, 1(1), 51-58. doi:10.5966/sctm.2011-0019
- Sabapathy, V., Ravi, S., Srivastava, V., Srivastava, A., & Kumar, S. (2012). Long-term cultured human term placenta-derived mesenchymal stem cells of maternal origin displays plasticity. *Stem Cells Int*, 2012, 174328. doi:10.1155/2012/174328

- Sachdeva, S., & Gupta, M. (2013). Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. *Saudi Pharm J*, 21(3), 245-253. doi:10.1016/j.jsps.2012.05.011
- Saldanha-Araujo, F., Ferreira, F. I., Palma, P. V., Araujo, A. G., Queiroz, R. H., Covas, D. T., . . . Panepucci, R. A. (2011). Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Res*, 7(1), 66-74. doi:10.1016/j.scr.2011.04.001
- Sattler, C., Steinsdoerfer, M., Offers, M., Fischer, E., Schierl, R., Heseler, K., . . . Seissler, J. (2011). Inhibition of T-cell proliferation by murine multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by CD39 expression and adenosine generation. *Cell Transplant*, 20(8), 1221-1230. doi:10.3727/096368910X546553
- Scarfi, S. (2014). Purinergic receptors and nucleotide processing ectoenzymes: Their roles in regulating mesenchymal stem cell functions. *World J Stem Cells*, 6(2), 153-162. doi:10.4252/wjsc.v6.i2.153
- Schenk, U., Westendorf, A. M., Radaelli, E., Casati, A., Ferro, M., Fumagalli, M., . . . Grassi, F. (2008). Purinergic Control of T Cell Activation by ATP Released Through Pannexin-1 Hemichannels. *Science Signaling*, 1(39), 1-13. doi:10.1126/scisignal.1160583
- Sharma, R. R., Pollock, K., Hubel, A., & McKenna, D. (2014). Mesenchymal stem or stromal cells: A review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion*, 54(5), 1418-1437. doi:10.1111/trf.12421
- Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., . . . Ren, G. (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*, 20(5), 510-518. doi:10.1038/cr.2010.44

- Simmons, P. J., & Torok-Storb, B. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 78(1), 55-62.
- Sitkovsky, M. V., Lukashev, D., Apasov, S., Kojima, H., Koshiba, M., Caldwell, C., . . . Thiel, M. (2004). Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol*, 22, 657-682. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104731
- Stagg, J., & Smyth, M. J. (2010). Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*, 29(39), 5346-5358. doi:10.1038/onc.2010.292
- Sun, Z., Wang, S., & Zhao, R. C. (2014). The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *Journal of Hematology & Oncology*, 7(1), 1-10. doi:10.1186/1756-8722-7-14
- Sundin, M., D'Arcy, P., Johansson, C. C., Barrett, A. J., Lönnies, H., Sundberg, B., . . . Le Blanc, K. (2011). Multipotent mesenchymal stromal cells express FoxP3: a marker for the immunosuppressive capacity? *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 34(4), 336-342. doi:10.1097/CJI.0b013e318217007c
- Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep*, 35(2), 1-18. doi:10.1042/BSR20150025
- Vasandan, A. B., Shankar, S. R., Prasad, P., Sowmya Jahnvi, V., Bhonde, R. R., & Jyothi Prasanna, S. (2014). Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament. *J Cell Mol Med*, 18(2), 344-354. doi:10.1111/jcmm.12192

- Vitiello, L., Gorini, S., Rosano, G., & la Sala, A. (2012). Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood*, *120*(3), 511-518. doi:10.1182/blood-2012-01-406496
- Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L., & Shi, Y. F. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*, *34*(6), 747-754. doi:10.1038/aps.2013.50
- Williams, A. R., & Hare, J. M. (2011). Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*, *109*(8), 923-940. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243147
- Zhao, Q., Ren, H., & Han, Z. (2016). Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*, *2*(1), 3-20. doi:10.1016/j.jocit.2014.12.001



XXVIFORO NACIONAL 2017
DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

MÉXICO
GOBIERNO DE LA REPÚBLICA

SECRETARÍA DE SALUD
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

CC2000
CENTRO CULTURAL UNIVERSITARIO
BICENTENARIO

IMSS

EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Otorga la presente

CONSTANCIA

Al trabajo de investigación

ESTUDIO DE LA VITAMINA D EN EL SÍNDROME METABÓLICO Y SU EFECTO INMUNOSUPRESOR SOBRE CELULAS T

Autor(es): Eoblando-Pérez Luis Ignacio, Gómez-Olivares José Luis, Monroy-García Alberto, Hernández-Estévez Erika Haydée, Mayani-Viveros Héctor, Montesinos-Montesinos Juan José.

San Luis Potosí, San Luis Potosí, del 24 al 27 de octubre de 2017

“Prevención, una prioridad de la investigación en salud”

Dr. Fabio Abde Salamanca Gómez
Coordinador de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social