



Departamento de Bioquímica

TESIS DOCTORAL

Estudio de la utilidad y mecanismos de acción de las células madre adultas del tejido adiposo para el tratamiento del rechazo tras trasplante corneal alogénico

Sherezade Fuentes Julian

Madrid, 2015

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio de la utilidad y mecanismos de acción de las células
madre adultas del tejido adiposo para el tratamiento del
rechazo tras trasplante corneal alogénico**

Sherezade Fuentes Julian

Licenciada en Veterinaria

Directores de tesis:

Dra. María Paz de Miguel González

Dr. Manuel Nistal Martín de Serrano

Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE
TESIS PARA SU PRESENTACIÓN**

MARIA PAZ DE MIGUEL GONZÁLEZ, Doctora en Ciencias Biológicas y Directora del Grupo de Ingeniería Celular del Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital Universitario La Paz de Madrid

MANUEL NISTAL MARTÍN DE SERRANO, Doctor en Medicina y Catedrático del departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICA QUE:

SHEREZADE FUENTES JULIAN, con DNI 51460377-Q, Licenciada en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “**Estudio de la utilidad y mecanismos de acción de las células madre adultas del tejido adiposo para el tratamiento del rechazo tras trasplante corneal alogénico**” y que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su exposición y defensa como tesis doctoral.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado. En Madrid, 3 de noviembre de 2015.

Fdo.: Dra. María Paz de Miguel González

Fdo.: Dr. Manuel Nistal Martín de Serrano

A mi madre y a mi padre.

Y por supuesto, a mis amig@s.

Cita

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

Resumen

En el presente estudio se investiga la utilidad de las células madre mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo (AD-MSK) en modelos de trasplante corneal alogénico de riesgo normal y de alto riesgo en conejos. Se pretende conseguir una prevención del rechazo y un aumento de la vida media del injerto mediante las propiedades inmunosupresoras atribuidas a las AD-MSK, así como establecer modelos animales más parecidos a lo que se encuentra en la práctica clínica en humano y por tanto más relevantes que los descritos hasta el momento. En contra de lo esperado, en el modelo de riesgo normal, establecido usando dos razas diferentes de conejo, la aplicación local de AD-MSK durante la cirugía no aumentó el tiempo de supervivencia del trasplante sino que lo disminuyó, aumentando la vascularización del lecho corneal, así como los signos de inflamación, concretados en un aumento del edema y la infiltración leucocitaria. En el modelo de alto riesgo establecido mediante un proceso de vascularización previa de la córnea de conejo, la aplicación sistémica de AD-MSK de conejo en varios momentos antes, durante y después de la cirugía también disminuyó el tiempo de supervivencia del trasplante, aumentando la vascularización y el edema corneal. Estos resultados pueden ser explicados por el carácter proinflamatorio mostrado por las AD-MSK *in vitro*. Estas células expresan y secretan de forma constitutiva varias citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8. El efecto de estas citoquinas parece sobrepasar el de factores inmunosupresores como IDO y NO también secretados por las AD-MSK en este estudio. Además, estas células presentan un fenotipo de célula presentadora de antígeno por la expresión de moléculas coseñalizadoras como CD40 y CD80. Por último, las AD-MSK expresan citoquinas proangiogénicas como VEGF-A y TGF- β relacionadas con un aumento de la neovascularización. Todos estos datos sugieren que las AD-MSK no serían adecuadas para su uso en tejidos avasculares e inmunoprivilegiados como la córnea, ya que previenen el mantenimiento de la homeostasis del tejido.

Summary

The effect of adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSK) into rabbit models of normal or high risk corneal allograft transplantation was investigated. Our aims were to prevent transplant rejection and to increase the time of graft survival mediated by the described immunosuppressive properties of AD-MSK, and to establish more similar corneal graft models to the clinical practice in humans, and thus more relevant than the previously reported rodent models. The normal risk corneal graft model was established by using two different rabbit strains. In contrast to our expectations, the local administration of AD-MSK during surgery worsen the outcome of the transplantation, increasing vascularization of the corneal bed and inducing signs of inflammation such as edema and leukocyte infiltration. This resulted in a shorter graft survival. In the high risk corneal graft model, immune ocular privilege was undermined by the induction of neovascularization prior to graft surgery. Systemic administration of rabbit AD-MSK at various time points also led to a shorter survival time. Rabbit AD-MSK increased vascularization and edema in these corneal grafts. Our results may be explained by the proinflammatory phenotype shown by AD-MSK *in vitro*. These cells constitutively express and secrete proinflammatory cytokines and chemokines such as IL-6 and IL-8. The effect of those cytokines seems to overcome that of immunosuppressive factors such as IDO and NO also secreted by MSC in the present graft model. In addition, these cells present an antigen presenting cell phenotype by the expression of cosignaling

molecules CD40 and CD80. Moreover, AD-MSC express proangiogenic factors such as VEGF-A and TGF- β related to neovascularization processes. All these data suggests that AD-MSC may not be appropriate for their use in avascular and immuneprivileged sites as the cornea, as they prevent the maintenance of the tissue homeostasis.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación:

Ministerio de Educación Cultura y Deporte – AP2010-0659

Ministerio de Economía y Competitividad – SAF2008-03837, IAP-560610-2008-44 y SAF2010-19230

Ministerio de Sanidad y Política Social – PI-308, TRA-053, TRA-036, RA-072, EC-11-129, FIS09-PI040654

Fundación Mutua Madrileña – AP79972010

Fundación Marató TV3 – 120630

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 ORIGEN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MSC	13
1.2 PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DE LAS MSC	14
1.2.1 REGENERACIÓN DIRECTA POR DIFERENCIACIÓN O TRANSDIFERENCIACIÓN	14
1.2.2 REGENERACIÓN Y CITOPROTECCIÓN POR FACTORES SECRETADOS	16
1.2.3 PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE LAS MSC	17
1.2.4 AVANCES IN VIVO Y APLICACIONES CLÍNICAS	22
1.3. ANATOMÍA, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA CÓRNEA	25
1.4 APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS EN TRASTORNOS CORNEALES	27
1.4.1 EL TRASPLANTE CORNEAL	27
1.4.2 TERAPIA CELULAR EN LA CÓRNEA	29
2. OBJETIVOS:	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1 OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS AD-MSC	39
3.1.1 MEDIOS DE CULTIVO	39
3.1.2 AISLAMIENTO DE LAS AD-MSC	39
3.2 INDUCCIÓN DE DIFERENCIACIÓN CONDRÓ, OSTEO Y ADIPOGÉNICA EN LAS MSC	42
3.2.1 INDUCCIÓN DE DIFERENCIACIÓN A LINAJE CONDRÓGENICO	42
3.2.2 INDUCCIÓN DE DIFERENCIACIÓN A LINAJE OSTEOGÉNICO	42
3.2.3 INDUCCIÓN DE DIFERENCIACIÓN A LINAJE ADIPOGÉNICO	42
3.3 ESTIMULACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS HAD-MSC	43
3.4. INDUCCIÓN DE ARRESTO DEL CICLO CELULAR EN LAS MSC	43
3.5 AISLAMIENTO DE PBMC (CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA) DEPLECCIONADAS DE MONOCITOS	43
3.6 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE LINFOCITOS T EN LAS PBMC	44
3.7 TINCIÓN DE LAS PBMC CON CFSE	44
3.8 ESTIMULACIÓN DE LAS PBMC	45
3.9 PROTOCOLO DE COCULTIVO	45
3.10 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T	46
3.11 CITOMETRÍA DE FLUJO	46
3.11.1 CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO	46
3.11.2 CITOMETRÍA DE FLUJO DE ÍNDOLEAMINA 2 3-DIOXIGENASA (IDO)	48
3.11.3 DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	48
3.12 DETECCIÓN DE CITOQUINAS PRODUCIDAS POR LAS AD-MSC	49
3.13 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)	50
3.13.1 AISLAMIENTO DE RNA	50
3.13.2 REACCIÓN DE LA RETROTRANSCRIPTASA INVERSA	51
3.13.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	51
3.14 GRUPOS EXPERIMENTALES	53

3.14.1 TRASPLANTE DE RIESGO NORMAL	53
3.14.2 TRASPLANTE DE ALTO RIESGO	54
3.14.3 EVALUACIÓN CLÍNICA	55
3.15 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LAS CÓRNEAS	56
3.16 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA DE LA CÓRNEA	56
3.17 LEUCOGRAMA	57
3.18 ESTADÍSTICA	57
4. RESULTADOS	59
4.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON AD-MSC EN TRASPLANTES DE RIESGO NORMAL	62
4.2.1 RESULTADO CLÍNICO DEL TRASPLANTE Y SEGUIMIENTO	62
4.2.2 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	64
4.3 CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LAS HAD-MSC	66
4.3.1 PRESENCIA DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS Y DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD II	66
4.3.2 EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA INMUNOMODULACIÓN	67
4.3.3 PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS INMUNOMODULADORAS	69
4.4. EFECTO DE LAS HAD-MSC SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T	70
4.5. EFECTO DE LAS RBAD-MSC EN TRASPLANTE CORNEAL DE ALTO RIESGO	71
4.5.1 RESULTADO CLÍNICO DEL TRASPLANTE Y SEGUIMIENTO	71
4.5.2 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	73
4.5.3 ESTUDIO DEL LEUCOGRAMA	73
5. DISCUSIÓN	75
5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS AD-MSC	77
5.2 PROPIEDADES INMUNOGÉNICAS Y PROINFLAMATORIAS DE LAS AD-MSC EN LA CÓRNEA	78
5.2.1 AUMENTO DE LA NEOVASCULARIZACIÓN	79
5.2.2 EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y DE MOLÉCULAS COSEÑALIZADORAS	81
5.2.3 EXPRESIÓN Y PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS	84
5.2.4 INCAPACIDAD DE LAS AD-MSC PARA INDUCIR TOLERANCIA SISTÉMICA	87
5.2.5 ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS T	88
5.3. COMPARACIÓN CON OTROS MODELOS	89
6. CONCLUSIONES	91
BIBLIOGRAFÍA	95
ARTÍCULOS	117

CLAVE DE ABREVIATURAS

AD-MSC: Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo

ALK: queratoplastia lamelar anterior

ALT: alanina aminotransferasa

Ang-1 (angiotensina 1),

APC: Célula presentadora de antígeno

BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro

BMI: índice de masa corporal

BM-MSC: Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea

BSA: albúmina sérica bovina

CB-MSC: Células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical

CCL2: conocido como MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos 1

CCL3: conocido como MIP-1 α , proteína inflamatoria de macrófagos alfa

CCL4: conocido como MIP-1b, proteína inflamatoria de macrófagos beta

CNTF: Factor neurotrófico ciliar

COX 2: Ciclooxygenasa 2

CTLA4: antígeno de linfocitos T citotóxico 4

DALK: queratoplastia lame anterior profunda

DC: Célula dendrítica

DMEK: queratoplastia endotelial de membrana de Descemet

DMEM: medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DS(A)EK: queratoplastia endotelial automatizada con pelado de membrana de Descemet

ECM: Matriz extracelular

ELA: esclerosis lateral amiotrófica

FBS: suero fetal bovino

FGF- β : factor de crecimiento fibroblástico beta

GDNF: factor neurotrófico derivado de glía

GGT: gamma glutamil transpeptidasa

GvHD: Enfermedad de huésped contra hospedador

hAD-MSC: Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humanas

HBSS: solución salina balanceada de Hanks, Gibco

HGF: Factor de crecimiento hepatocitario

HLA: Antígeno leucocitario humano

HSC: Células madre hematopoyéticas

IDO: Indoleamina, 2,3- dioxigenasa

IFATS: International Federation of Adipose Therapeutics

IFG-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1

IFN- γ : Interferón Gamma

IL: Interleuquina
IM: intramuscular
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
ISCT: International Society for Cellular Therapy
ITS: Insulina-transferrina-selenio
IV: intravenoso
LIF: factor inhibidor de la leucemia
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
MIP: proteína inflamatoria de macrófagos
MMP: metaloproteasas de matriz
MSC: Células madre mesenquimales
NGF: factor de crecimiento nervioso
NK: Células asesinas naturales
NO: Óxido nítrico
NZW: conejo de raza New Zealand White
OVA: ovoalbúmina
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica
PBS: tampón fosfato salino
PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PD-1: receptor de muerte programada 1
PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas),
PD-L1: Ligando del receptor de muerte programada 1
PGE-2: Prostaglandina-E2
PI3K/Akt: fosfatidilinositol 3 kinasas/protein kinasa B
PK: queratoplastia penetrante
PLA: lipoaspirado procesado
PLGF: factor de crecimiento placentario
PMNC: células polimorfonucleares
rbAD-MSC: Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de conejo
RI: índice de rechazo
RPMI: medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
SDF-1: factor derivado del estroma 1
SVE: fracción vasculoestromal
TBS: tampón tris salino
TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta
Th1: Linfocito T Helper 1
Th17: Linfocito T Helper 17
Th2: Linfocito T Helper 2

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

Treg: Linfocitos T reguladores

TSG-6: gen 6 inducible por factor de necrosis tumoral

VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular

VHC: virus de la hepatitis C

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

WJ-MSc: Células mesenquimales derivadas de gelatina de Wharton

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Origen y caracterización de las MSC

Las células madre mesenquimales (MSC) son un tipo de célula madre adulta descubiertas y aisladas por primera vez de médula ósea (Friedenstein y cols., 1974, Friedenstein y cols., 1968, Friedenstein y cols., 1966, Paul y cols., 1991, Prockop, 1997). Estas células con capacidad de autorenovación son capaces de diferenciarse a varios linajes celulares bajo determinadas condiciones (Pittenger y cols., 1999).

El estudio y caracterización de las células madre mesenquimales ha sido abordado por numerosos grupos de investigación en las últimas décadas. Aun así, no se ha encontrado un marcador único y determinante para la caracterización de estas células. Por ello, la International Society for Cellular Therapy (ISCT) estableció en el 2006 unos estándares que determinarían lo que es y lo que no es una MSC (Dominici y cols., 2006). Las características que debería de tener una población para ser considerada MSC son las siguientes:

- Adherencia al plástico en condiciones estándares de cultivo
- Expresión de marcadores de membrana (>95%): CD105, CD73 y CD90
- No expresión de marcadores (<2%): CD45 (panleucocitario), CD34 (marcador de células madre hematopoiéticas), CD14 o CD11b (marcadores de monocito/macrófago), CD79a o CD19 (marcadores de linfocitos B) y HLA-DR (Antígeno Leucocitario Humano, de las siglas en inglés Human Leukocyte Antigen).
- Capacidad de diferenciación a linajes condro-, óseo- y adipogénico in vitro.

Estos estándares se establecieron a partir de poblaciones derivadas de médula ósea y tras la manipulación in vitro. En los últimos años se han aislado MSC de diferentes tejidos como el bazo y el corazón (Hoogduijn y cols., 2007), el músculo esquelético (Williams y cols., 1999), la membrana sinovial (De Bari y cols., 2001), la pulpa dentaria (Gronthos y cols., 2000), el hueso (Kadiyala y cols., 1997), el cordón umbilical (Erices y cols., 2000) o el tejido adiposo (Zuk y cols., 2002, Zuk y cols., 2001). En teoría se podrían aislar MSC de cualquier tejido conectivo aunque las más estudiadas son las que sirven de soporte estromal a la médula ósea, a las células endoteliales y a los adipocitos (Bianco y cols., 2001). Los estándares de Dominici se suelen aplicar para la validación de MSC de todos estos orígenes. Sin embargo, esta diferencia en la procedencia también determina una variabilidad en el fenotipo de las células, siendo más o menos capaces para la diferenciación a determinados linajes o expresando unos marcadores de superficie y no otros (Busser y cols., 2015, Im y cols., 2005, Huang y cols., 2005). Además, las diferencias en las condiciones de cultivo (Horwitz, 2009) y el número de divisiones (pases) (Mitchell y cols., 2006) también pueden alterar el fenotipo de estas células. Esto dificulta a veces la generalización de los resultados y la comparación entre los diferentes estudios.

Esta estandarización se ha establecido únicamente para células humanas. Sin embargo, en animales de experimentación no se ha establecido un criterio mínimo para la identificación de estas células. Aun así, existen numerosos estudios que han avanzado en la caracterización de las MSC en ratones, definiéndolas como positivas para CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 y Sca-1, y negativas para Ter-119, CD11b, CD31 y CD45 (Baddoo y cols., 2003, Peister y cols., 2004, Tropel y cols., 2004). Algunos de estos marcadores como Sca-1

varían según la cepa de ratón. En cuanto a los conejos, los estudios que tratan de caracterizar las MSC son escasos y muy recientes, y han demostrado que estas células son positivas para CD44, CD29, actina muscular alfa, vimentina y Sox2 (Lee y cols., 2014b, Bakhtina y cols., 2014).

1.2 Propiedades terapéuticas de las MSC

Desde el descubrimiento de estas células y de su potencialidad, numerosos estudios han tratado de aplicarlas en el tratamiento de diferentes dolencias. En general se han descrito tres mecanismos por los que se producen los efectos beneficiosos de las MSC: 1) regeneración directa por diferenciación o transdiferenciación, 2) inducción de regeneración de las células residentes por la acción de factores paracrinos o endocrinos secretados por las MSC, y 3) procesos de inmunomodulación.

1.2.1 Regeneración directa por diferenciación o transdiferenciación

Las MSC derivadas de médula ósea o de otros orígenes como el adiposo son capaces de diferenciarse en células de varios tejidos de su mismo linaje mesodérmico como el hueso, el cartílago o el tejido adiposo. Asimismo, estas células han demostrado una capacidad de transdiferenciación hacia tejidos de diferente linaje como el epitelial (Spees y cols., 2003, Brzoska y cols., 2005), el miocárdico y endotelial (Yue y cols., 2008, Bai y cols., 2010, Okura y cols., 2010, Zhang y cols., 2011a, Planat-Benard y cols., 2004), el neural (Safford y cols., 2002, Safford y cols., 2004, Greco y cols., 2007a, Greco y cols., 2007b) el pancreático (Moriscot y cols., 2005, Chandra y cols., 2009, Blazquez-Martinez y cols., 2014), el hepatocitario (Schwartz y cols., 2002, Lee y cols., 2004, Hong y cols., 2005, Seo y cols., 2005, Aurich y cols., 2009) y el queratocítico (Alio del Barrio y cols., 2015, Arnalich-Montiel y cols., 2008).

Esta característica de las MSC ha llevado a numerosos grupos a plantear estrategias de regeneración tisular, ya sea implantando las células directamente en el tejido a reparar y esperando a que el microambiente propicie su diferenciación, o bien prediferenciando las células *in vitro* antes de introducirlas en el organismo. La reparación de tejido óseo y del cartílago es la más estudiada hasta la fecha por la tendencia natural de las MSC a formar tejido conectivo (Turgeman y cols., 2001). Aun así es necesaria la prediferenciación *in vitro* o la inducción mediante su sembrado en estructuras de hidroxiapatita u otro material osteoinductivo (Bruder y cols., 1998a, Bruder y cols., 1998b). En pacientes se ha demostrado una buena osteointegración de este tipo de implantes sembrados con MSC sin detectarse efectos adversos (Quarto y cols., 2001). El éxito en la reparación del cartílago ha sido algo más limitado. Aunque las MSC pueden formar cartílago *in vivo* (Im y cols., 2001), presentan problemas para generar tejido que perdure en el tiempo (Wakitani y cols., 2002). De nuevo el uso de estructuras biodegradables como vehículo y soporte de las células parece aumentar la eficiencia de la terapia en modelos animales (Li y cols., 2009).

La terapia regenerativa con MSC ha hecho su incursión en el tratamiento de otros órganos tales como corazón, cerebro, hígado, páncreas o córnea. Las MSC tanto de médula ósea (Makino y cols., 1999) como derivadas de tejido adiposo (Okura y cols., 2010) son capaces de diferenciarse a cardiomiocitos funcionales, expresando

marcadores de células musculares cardíacas y latiendo sincrónicamente *in vitro* (Makino y cols., 1999). Estas células también han demostrado ser capaces de diferenciarse *in vivo* y promover la reparación del tejido cardíaco en ratones (Toma y cols., 2002) y en grandes animales, mejorando su funcionalidad al ser prediferenciadas y sembradas en estructuras de matriz extracelular (Potapova y cols., 2008). En los estudios clínicos realizados en los últimos años, aunque se ha demostrado la seguridad en el uso de estas células para el tratamiento del fallo cardíaco, la eficacia en la mejora funcional ha sido limitada (Fuh y cols., 2009). En cuanto al tratamiento de patologías del sistema nervioso central, pese a los buenos resultados conseguidos en la inducción de un fenotipo neural en las MSC *in vitro* (Black y cols., 2001), no parece que esta capacidad sea el origen de su efecto beneficioso *in vivo* (Zhao y cols., 2002). La regeneración directa por vía de la diferenciación parece limitada a una función de célula de Schwann (Akiyama y cols., 2002, Keilhoff y cols., 2006) o de creación de estructuras guía para la regeneración astrocitaria (Hofstetter y cols., 2002). Las MSC han demostrado su capacidad para diferenciarse en células similares a hepatocitos una vez implantadas directamente en el parénquima hepático (Sato y cols., 2005). Estas células son capaces de producir albúmina y de expresar marcadores típicos de hepatocitos como las citoqueratinas 18 y la 19 o el AGPR (receptor para la asialoglicoproteína). En el caso de la reparación del daño hepático, aunque escasos, también hay estudios que demuestran una acción beneficiosa de las MSC mediante su diferenciación. Chang y cols., (Chang y cols., 2009) mostraron como las BM-MSC humanas transfundidas por vía portal en un modelo de rata son capaces de mejorar la función hepática y de disminuir la fibrosis. También es posible obtener células productoras de insulina a partir de MSC *in vitro* mediante su cultivo en medio de diferenciación pancreática (Chen y cols., 2004) o junto con extracto pancreático (Choi y cols., 2005, Xu y cols., 2009b). El microambiente pancreático diabético en modelos animales parece promover la diferenciación de las MSC *in vivo* cuando son inyectadas localmente, mejorando la glicemia y aumentando el número de isletas pancreáticas regeneradas (Dong y cols., 2008, Chang y cols., 2008). Al igual que las células derivadas de médula ósea, las derivadas de tejido adiposo (AD-MSC) también son capaces de diferenciarse a células productoras de insulina y mejorar la glicemia en modelos animales (Chandra y cols., 2009). En córnea, estudios realizados por nuestro grupo han demostrado que las AD-MSC pueden expresar marcadores de diferenciación hacia queratocitos cuando son aplicadas en un bolsillo corneal o en una queratoprótesis (Alio del Barrio y cols., 2015, Arnalich-Montiel y cols., 2008).

Algunos estudios sistémicos sobre estos efectos se han basado en la aparente capacidad que poseen estas células para migrar a través del endotelio hacia zonas dañadas, como se ha descrito en corazón (Barbash y cols., 2003), cerebro (Chen y cols., 2001, Mahmood y cols., 2003), hígado (Arbab y cols., 2004), riñón (Hauger y cols., 2006), hueso (Horwitz y cols., 2002, Horwitz y cols., 1999) y pulmón (Ortiz y cols., 2003) (Ortiz 2003). Sin embargo, la tendencia de estas células a quedarse atrapadas en el pulmón (Barbash y cols., 2003) hace que muchos estudios, sobre todo de regeneración, las apliquen directamente en el tejido dañado. Por otro lado, las estrategias sistémicas están demostrando que la acción indirecta mediada por factores secretados es realmente la responsable del efecto terapéutico que estas células tienen en la reparación del tejido.

1.2.2 Regeneración y citoprotección por factores secretados

La acción moduladora que las MSC tienen sobre la regeneración de tejidos diferentes al óseo o al cartilaginoso, parece deberse en gran medida a su efecto paracrino o endocrino. En general, las MSC han demostrado secretar una batería muy amplia de factores angiogénicos y citoprotectores tanto *in vitro* como *in vivo*.

Las MSC secretan de forma constitutiva factores cardioprotectores o estimulantes de progenitores cardíacos como PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), SDF-1 (factor derivado de células estromal tipo 1), LIF (factor inhibidor de la leucemia), PLGF (factor de crecimiento placentario) y angiogénicos como HGF (factor de crecimiento hepatocitario), Ang-1 (angiotensina 1), IFG-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1), FGF- β (factor de crecimiento fibroblástico beta) y VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular) (Nagaya y cols., 2005, Duran y cols., 2013, Gallina y cols., 2015). *In vivo*, estas células son capaces de mejorar la función cardíaca sin diferenciarse aumentando la supervivencia en modelos de infarto de miocardio. En estos modelos se observó una disminución de la fibrosis y un aumento de la vascularización de la zona dañada, así como un aumento de FGF- β y VEGF en el tejido (Nagaya y cols., 2005, Duran y cols., 2013). Además del trasplante directo de células, el medio condicionado y los exosomas derivados de MSC han demostrado ser efectivos en el tratamiento del daño cardíaco en modelos animales (Lai y cols., 2010), demostrando así la función paracrina de estas células. La presencia de factores proangiogénicos en el tejido junto con la capacidad de diferenciación a linaje endotelial demostrada por las MSC *in vivo* (Bai y cols., 2010) han llevado a considerar la neovascularización como uno de los principales mecanismos de acción de estas células en los trastornos cardiovasculares (Gallina y cols., 2015). La inducción de la regeneración a partir de progenitores cardíacos y el control de la remodelación tisular serían los otros dos mecanismos terapéuticos implicados en este tipo de patologías (Ranganath y cols., 2012). Como apuntamos en el apartado anterior, el uso clínico de estas células en patologías cardíacas ha demostrado ser seguro, aunque los resultados clínicos han sido muy discretos disminuyendo levemente el riesgo de mortalidad y de episodios isquémicos recurrentes (Fisher y cols., 2013). En varios modelos de infarto de miocardio, la aplicación local de las AD-MSc mejoró la presión ventricular tras la diástole y la fracción de eyección ventricular (Miyahara y cols., 2006, Nagaya y cols., 2005). Al igual que ocurre con los estudios realizados con BM-MSc, el mecanismo más probable es la secreción de factores cardioprotectores que favorecen una remodelación adecuada del tejido y la vascularización.

En el campo de la neurología también ha cambiado el paradigma, centrándose en el efecto paracrino de las MSC frente a su posible diferenciación. Numerosos estudios han demostrado los efectos neuroprotectores de las MSC mediante mecanismos de neurogénesis, sinaptogénesis y angiogénesis. En el secretoma de estas células se han detectado factores que favorecen la supervivencia neuronal, la diferenciación de progenitores neurales y el crecimiento de neuritas, tales como BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro), GDNF (factor neurotrófico derivado de glía), NGF (factor de crecimiento nervioso), HGF, VEGF o IGF-1 (Salgado y cols., 2015). Las AD-MSc también han demostrado promover el crecimiento de neuritas en neuronas motoras (Kingham y cols., 2007) y la regeneración de las células glias (Razavi y cols., 2013) mediante la secreción de factores tróficos. El cultivo *in vitro* de células neuronales con MSC o con medio condicionado ha demostrado promover su supervivencia frente al daño neuronal, mediada principalmente por BDNF (Crigler y cols., 2006,

Wilkins y cols., 2009). In vivo, la migración de MSC administradas sistémicamente a zonas de isquemia cerebral es controvertida. Aun así, numerosos estudios han demostrado un efecto positivo en los test de comportamiento e histológicos en modelos animales de infarto cerebral tratados con MSC. El tratamiento provoca una disminución de la apoptosis y de la zona lesionada y un aumento de la vascularización mediada por factores como FGF-2, IGF-1, BDNF, NGF o SDF-1 entre otros (Dharmasaroja, 2009). Asimismo, el tratamiento con AD-MSC en modelos animales parece disminuir el tamaño de la lesión y promover la regeneración neuronal y axonal a la vez que aumenta la vascularización local (Gutierrez-Fernandez y cols., 2015). La administración de medio condicionado también ha demostrado un efecto neurogénico en ratas mediado por un aumento de FGF-2 y NGF en el propio tejido, poniendo de relevancia su actividad paracrina (Teixeira y cols., 2015). Ensayos clínicos con pacientes de daño espinal han demostrado una mejoría notable cuando las MSC son inyectadas localmente en la zona dañada en los primeros días tras la lesión (Yoon y cols., 2007). En el caso del daño cerebral, los estudios clínicos están en las primeras fases y han demostrado ser seguros con unos discretos efectos beneficiosos asociados a la producción de factores paracrinicos (Joyce y cols., 2010, Lee y cols., 2010).

Las MSC mejoran la supervivencia y regeneración de hepatocitos dañados in vitro y son capaces así mismo de promover una regeneración del parénquima hepático en modelos animales de daño (van Poll y cols., 2008, Zhang y cols., 2012, Li y cols., 2013b, Li y cols., 2013a). Las células administradas de forma sistémica aumentan la proliferación e inhiben la apoptosis de los hepatocitos, aumentando en éstos la expresión de genes que intervienen en la replicación y de marcadores de proliferación tales como la ciclina D1 o el PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) (van Poll y cols., 2008, Wang y cols., 2014). Se ha descrito una disminución de los niveles séricos de factores proinflamatorios como IL-1 β , TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), IL-6 y IL-1 α en los animales tratados (van Poll y cols., 2008, Zhang y cols., 2012), así como una disminución considerable de la fibrosis hepática y la deposición de colágeno I y III que parece asociada a la secreción por parte de las MSC de IL10, TNF- α y HGF que actuarían inhibiendo la acción de las células hepáticas estrelladas (Parekkadan y cols., 2007, Li y cols., 2013b). Este efecto antifibrótico también se ha comprobado con el tratamiento con AD-MSC (Wang y cols., 2009, Wang y cols., 2012). Resultados similares se han conseguido mediante el tratamiento con medio condicionado de MSC o con exosomas aislados de las mismas (van Poll y cols., 2008, Li y cols., 2013b), lo que demuestra su actividad paracrina y endocrina también en el tratamiento del daño hepático. A pesar de estos prometedores resultados, los ensayos clínicos aún no han demostrado la efectividad de las células en el tratamiento enfermedades como la cirrosis hepática (Mohamadnejad y cols., 2013). En cuanto a las patologías pancreáticas, las aproximaciones terapéuticas siguen centradas en la diferenciación y en la inmunosupresión como veremos más adelante. Aun así, parece importante la vascularización local inducida por las MSC para el mantenimiento del trasplante de isletas (Figliuzzi y cols., 2009) y su acción paracrina mediante factores como IGF-1, VEGF y FGF- β para disminuir la glicemia y la apoptosis (Xu y cols., 2009b).

1.2.3 Propiedades inmunomoduladoras de las MSC

Además de promover la regeneración tisular, las MSC han demostrado poseer capacidades inmunomoduladoras que pueden ser aprovechadas para el desarrollo de nuevas terapias. En el año 2000 dos grupos definieron a las

MSC como células inmunoprivilegiadas al sobrevivir durante más de un año tras ser inyectadas intraperitonealmente en una oveja inmunocompetente (Liechty y cols., 2000, Almeida-Porada y cols., 2000). Inmediatamente después se observaron sus capacidades inmunosupresoras tanto *in vitro* como en modelos animales, en los que no solo se salvaban incompatibilidades del MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad), sino también interespecíficas (Bartholomew y cols., 2002, Di Nicola y cols., 2002, Lee y cols., 2002, Djouad y cols., 2003). A partir de entonces han sido numerosos los estudios que tratan de elucidar los mecanismos de acción de estas células y su posible aplicación clínica. En general, las MSC no expresan moléculas del MHC-II (Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo II), ni moléculas coseñalizadoras como CD40, CD80 o CD86 (Tse y cols., 2003, Le Blanc y cols., 2003, Prasanna y cols., 2010) por lo que se consideran poco inmunogénicas.

Por otro lado, las MSC se consideran buenas candidatas para el desarrollo de terapias inmunosupresoras. Numerosos estudios apuntan al IFN- γ y al TNF- α como principales actores en la activación de las capacidades inmunosupresoras de las MSC. En concreto, el IFN- γ presente en un ambiente inflamatorio o secretado por linfocitos activados sería capaz de disparar las propiedades inmunosupresoras de las MSC (Krampera y cols., 2006, Sheng y cols., 2008). El bloqueo de esta vía de señalización ha demostrado inhibir este efecto inmunosupresor de las AD-MS (Polchert y cols., 2008). Por otro lado, el TNF- α también ha demostrado su implicación en la activación de estas capacidades siempre de forma sinérgica con IFN- γ (Ren y cols., 2008). En estos estudios se intuye la necesidad de una fina regulación entre el ambiente inflamatorio y las MSC para que éstas ejerzan su efecto.

1.2.3.1 Efecto sobre la inmunidad innata

La respuesta innata es la que acontece en un primer momento tras el daño o la infección y es una respuesta no específica mediada por células como los neutrófilos y los macrófagos, las células dendríticas (DC), las células asesinas naturales (NK, del inglés natural killer), los linfocitos B-1 y los linfocitos T γ δ .

Diferentes estudios han demostrado la capacidad de las MSC para actuar en esta fase de la respuesta inmune. En concreto, estas células son capaces de inhibir la maduración de las células dendríticas, impidiendo la presentación de antígenos (Jiang y cols., 2005, English y cols., 2008) y la secreción de IL-12 y TNF- α (Aggarwal y cols., 2005, Nauta y cols., 2006, Chen y cols., 2007, Zhang y cols., 2009), induciendo por tanto un fenotipo tolerogénico, y una respuesta inmune Th2 antiinflamatoria mediada por la secreción de IL-10 por parte de las DC (Beyth y cols., 2005, Chen y cols., 2007). Estas DC inmaduras con un fenotipo tolerogénico pueden a su vez inducir la proliferación de linfocitos T reguladores (Treg) (Li y cols., 2008a) e inhibir la proliferación de linfocitos CD4 y CD8 (Eagar y cols., 2004, Amsen y cols., 2004, Rutz y cols., 2005, Zhang y cols., 2009). Esta acción inmunosupresora sobre las DC parece estar mediada por IL-6 y PGE-2 (Prostaglandina E2) (Jiang y cols., 2005, Djouad y cols., 2007, Spaggiari y cols., 2009) (Fig. 1). Las MSC también han demostrado inhibir la actividad de las NK hasta cierto punto. Esta inhibición sólo se produce si las NK no están activadas previamente y si además las MSC han sido estimuladas con IFN- γ (Sotiropoulou y cols., 2006, Spaggiari y cols., 2008, Crop y cols., 2011). Este efecto inhibitor sobre la citotoxicidad y la liberación de IFN- γ y TNF- α por parte de las NK se ha relacionado con la secreción por parte de las MSC de IDO (Indoleamina 2,3 dioxigenasa), TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante β 1), PGE-2 y HLA-G5 (antígeno leucocitario humano G5) (Poggi y cols., 2005, Sotiropoulou y cols., 2006, Spaggiari y cols., 2008, Selmani y cols., 2008), (Fig. 2).

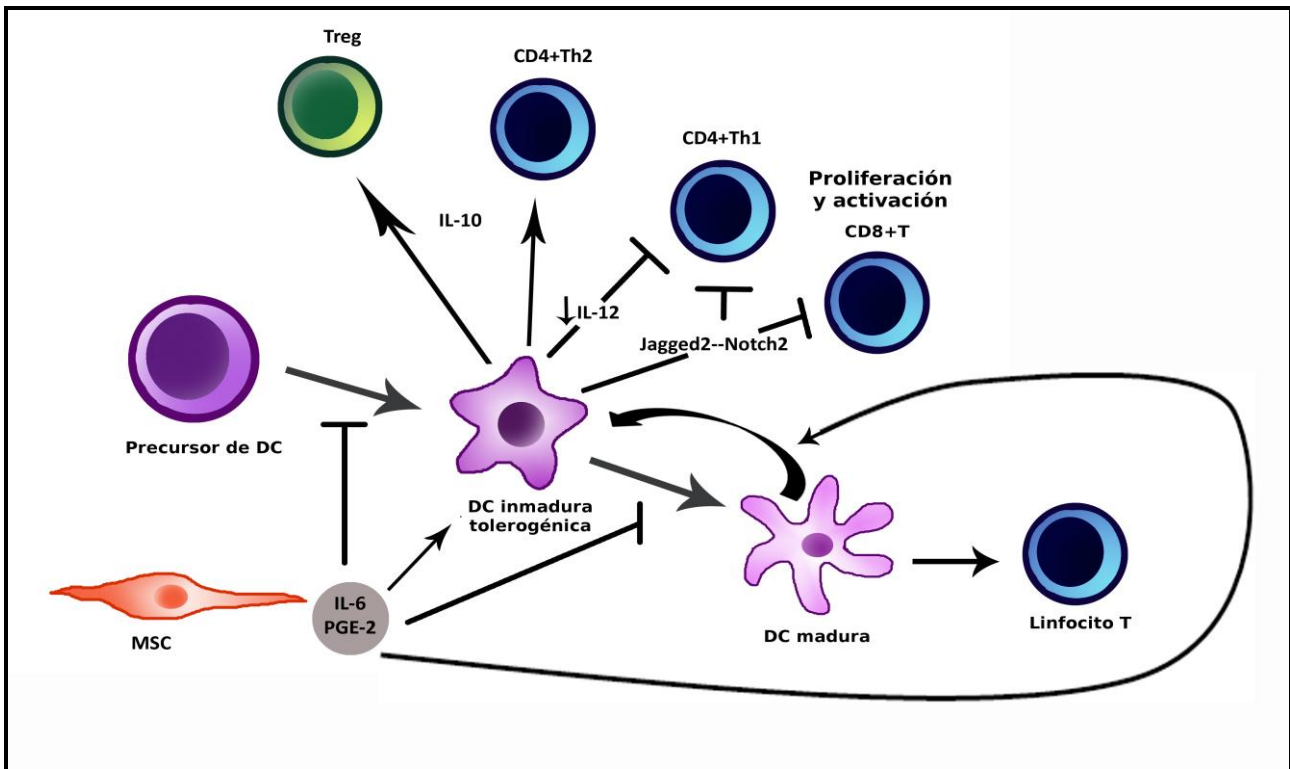


Figura 1. Esquema del efecto inmunosupresor ejercido por las MSC sobre las células dendríticas. Las MSC son capaces de inhibir la maduración de las DC e incluso revertir a un estado inmaduro/tolerogénico las que ya han sufrido un proceso de maduración. A su vez estas DC inmaduras son capaces de inducir una respuesta Th2 y la proliferación de Treg en vez de la activación de Th1 mediante la secreción de IL-10 en vez de IL-12. Algunos estudios proponen a la IL-6 y a la PGE-2 como posibles mediadores de esta acción de las MSC. Fuente: De Miguel, Fuentes-Julián y cols., 2012 (De Miguel y cols., 2012).

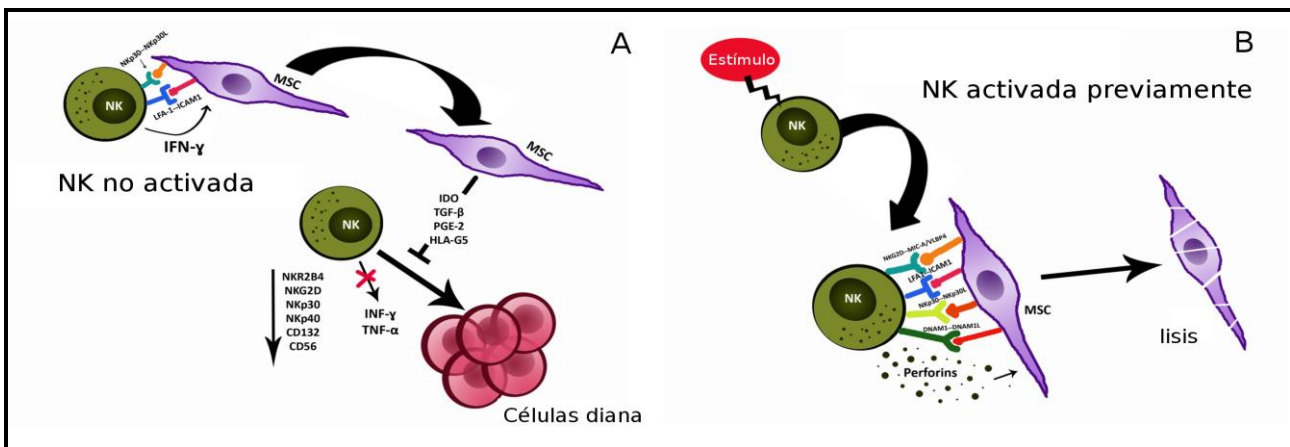


Figura 2. Interacción entre las MSC y las NK en dos contextos diferentes. A) Cuando las NK no han sido activadas por estímulos externos, las MSC son capaces de inhibir su citotoxicidad. Algunas moléculas liberadas por las MSC como IDO, TGF-β, PGE-2 o HLA-G5 han sido propuestas en la literatura como candidatas a producir este efecto. Estas moléculas producirían una disminución de receptores citotóxicos en las NK y bloquearían su capacidad de reconocer a las células diana y de secretar IFN-γ y TNF-α B) cuando las NK han sido activadas previamente, su interacción provoca la lisis de las MSC a través del reconocimiento propio de numerosos receptores y contrareceptores. Fuente: De Miguel, Fuentes-Julián y cols., 2012 (De Miguel y cols., 2012).

1.2.3.2 Efecto sobre la inmunidad adquirida

El sistema inmune adaptativo es un sistema específico de defensa que se pone en funcionamiento de forma tardía porque requiere del reconocimiento específico de antígenos y además es capaz de generar memoria inmunológica. Necesita de la maduración de células del sistema innato que presentan los antígenos a las células del sistema adaptativo para comenzar la respuesta específica. Las células implicadas son los linfocitos B y T.

Las MSC son capaces de inhibir la migración, la proliferación y la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B (Augello y cols., 2005, Corcione y cols., 2006, Rafei y cols., 2008, Asari y cols., 2009). Se ha sugerido que esta capacidad podría estar supeditada a una activación previa de las MSC (Corcione y cols., 2006). Sin embargo, las MSC no han demostrado ser capaces de inhibir las propiedades de los linfocitos B de célula presentadora de antígeno (APC) al no alterar la expresión de las moléculas coseñalizadoras ni del MHC. La vía de PD-1 (receptor de muerte programada 1) parece estar implicada en la inhibición de la proliferación (Augello y cols., 2005), mientras que la inhibición de Blimp-1 o el bloqueo de la vía de STAT3 inhibiría la función de célula plasmática (Comoli y cols., 2008, Rafei y cols., 2008, Asari y cols., 2009), (Fig. 3).

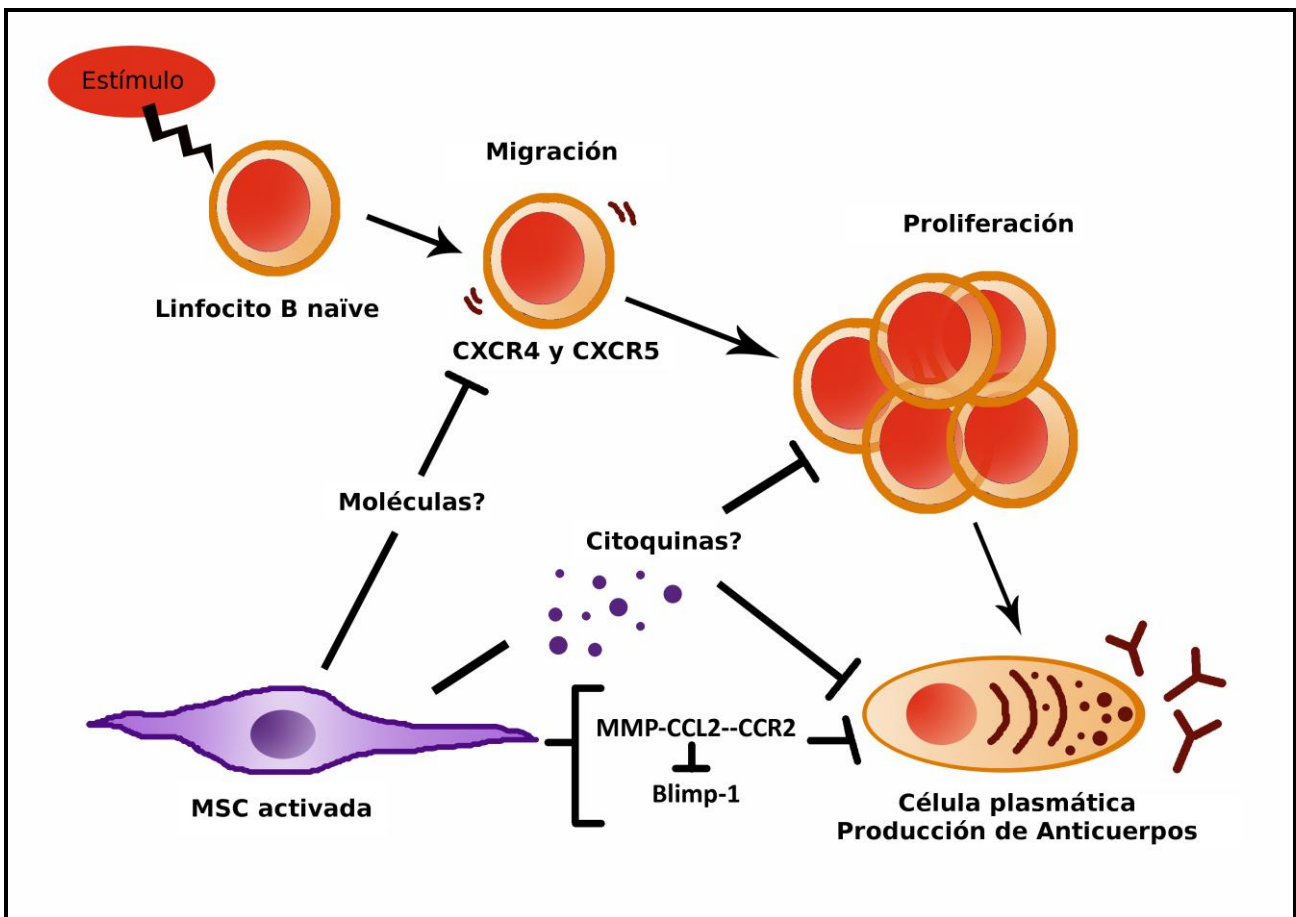


Figura 3. Efecto inmunosupresor de las MSC sobre los linfocitos B. Las MSC son capaces de inhibir la migración, la proliferación y la diferenciación a célula productora de anticuerpos de los linfocitos B. Aunque aún se desconocen las moléculas implicadas en este efecto, parece que el procesamiento de CCL2 por parte de las metaloproteasas de las MSC y su interacción con CCR2 de los linfocitos B, bloquearía la vía de Blimp-1 necesaria para la transformación en célula plasmática. Fuente: De Miguel, Fuentes-Julián y cols., 2012 (De Miguel y cols., 2012).

Respecto de la inmunidad adquirida mediada por linfocitos T, la intervención sobre esta respuesta inmune es una de las estrategias más interesantes en el tratamiento de patologías relacionadas con la inflamación, la autoinmunidad y el rechazo. Las MSC son capaces de inhibir la liberación de IFN- γ y la citotoxicidad de los linfocitos T (Bartholomew y cols., 2002, Di Nicola y cols., 2002, Krampera y cols., 2003, Meisel y cols., 2004, Angoulvant y cols., 2004, Sheng y cols., 2008). Se ha sugerido que las MSC atraerían a los linfocitos mediante factores quimiotáticos (Sato y cols., 2007, Ren y cols., 2009, Ren y cols., 2008) y éstos liberarían una pequeña cantidad de IFN- γ inicial que desencadenaría el efecto inmunosupresor de las MSC (Krampera y cols., 2006, Sheng y cols., 2008). Algunas de las moléculas que se han relacionado con esta acción inmunosupresora de las MSC son TGF- β (Groh y cols., 2005, Ryan y cols., 2007, English y cols., 2007) HGF e IL10 (Di Nicola y cols., 2002, Djouad y cols., 2005), PGE-2 (Yanez y cols., 2010) IL-6 (Xu y cols., 2009a) y Galectinas 1 y 3 (Sioud y cols., 2010, 2011). Los estudios se han centrado en los dos mecanismos que parecen predominar: Por un lado el metabolismo del triptófano y el acúmulo local de metabolitos parece promover esta inhibición de la respuesta inmune (Munn y cols., 2007). Esta vía estaría mediada por la secreción de IDO por parte de las MSC (Krampera y cols., 2006, English y cols., 2007, Ren y cols., 2009). Por otro lado, la producción de óxido nítrico (NO) se ha relacionado estrechamente con un arresto de los linfocitos T en un estado de anergia, es decir de inactividad funcional (Ren y cols., 2009, Ren y cols., 2008, Schurgers y cols., 2010). Esta acción estaría mediada por la inhibición de la fosforilación de STAT5 en las células T (Sato y cols., 2007), (Fig. 4).

Por último, las MSC pueden inducir la proliferación de linfocitos Treg que controlen la respuesta inmune tanto *in vitro* como *in vivo* (Maccario y cols., 2005, Selmani y cols., 2008, English y cols., 2009). Este efecto, que puede ser directo o mediado por la acción de las MSC sobre APC, parece estar relacionado con la expresión de moléculas como PGE-2, HLA-5, TGF- β 1 o IDO (Baratelli y cols., 2005, Selmani y cols., 2008, English y cols., 2009, Ge y cols., 2010), (Fig. 4).

En resumen, las MSC pueden ejercer su poder inmunosupresor disminuyendo la respuesta innata y generando un ambiente tolerogénico al inhibir la maduración de las DC, o bien pueden actuar de forma directa sobre los linfocitos T y B, evitando la respuesta citotóxica y la mediada por anticuerpos. Para ello es necesario una interacción previa entre las MSC y el ambiente inflamatorio que parece ser el activador de sus propiedades inmunosupresoras.

Las AD-MSc poseen capacidades inmunomoduladoras similares a las de las MSC derivadas de médula ósea, en las que clásicamente se han estudiado estas propiedades. Así, estas células derivadas de tejido adiposo son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T activados (Yoo y cols., 2009) y la diferenciación de las DC (Ivanova-Todorova y cols., 2009). Estas DC inmaduras son a su vez incapaces de estimular a los linfocitos T nativos (Najar y cols., 2010, Shi y cols., 2011) disminuyendo su secreción de IL-2 e IFN- γ (Eagar y cols., 2004). Este efecto parece estar mediado, al igual que en las BM-MSc por la vía de Notch (Shi y cols., 2011). La PGE-2 es una de las moléculas candidatas a ser la responsable de las propiedades inmunomoduladoras en estas células (Yanez y cols., 2010, Najari y cols., 2010).

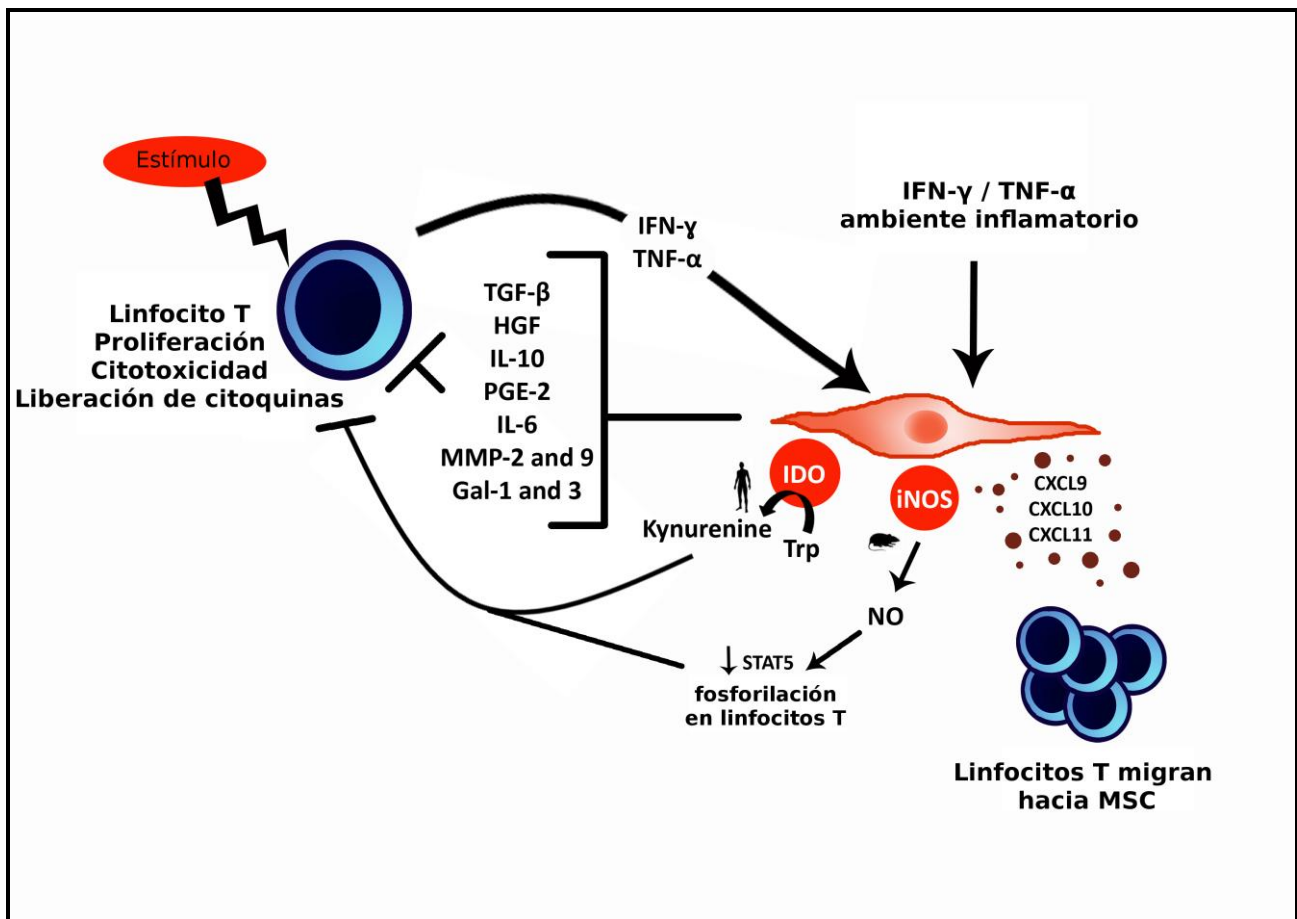


Figura 4. Efecto inmunosupresor de las MSC sobre los linfocitos T. Las MSC con capaces de inhibir la proliferación y la citotoxicidad de los linfocitos T. Para ello, parece necesario que las MSC estén previamente estimuladas con cierta cantidad de moléculas proinflamatorias como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ que pueden estar presentes en el ambiente inflamatorio inicial o ser secretados por los propios linfocitos T. Se ha descrito la secreción de moléculas quimiotácticas como CXCL9, CXCL10 y CXCL11 por parte de las MSC y se piensa que sirven para atraer a los linfocitos T hacia su radio de acción. La acción de las MSC sobre los linfocitos T parece estar mediada fundamentalmente por dos moléculas, la IDO y la NO, siendo la primera encontrada de forma más habitual en la bibliografía referente a células humanas y la segunda en la referente a células murinas. Otras moléculas como $\text{TGF-}\beta$, HGF, IL-10, PGE-2, IL-6, MMP-2 y 9 o las Galectinas 1 y 3 han sido descritas como posibles mediadoras de este efecto. Fuente: De Miguel, Fuentes-Julián y cols., 2012 (De Miguel y cols., 2012).

1.2.4 Avances in vivo y aplicaciones clínicas

Los estudios sobre el uso de las MSC en inmunoterapia se han disparado en la última década. Los trabajos van encaminados al tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias y a prevenir el rechazo en trasplantes. Un modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune demostró por primera vez que las MSC podían disminuir la inflamación y la desmielinización in vivo produciendo el arresto del ciclo celular de linfocitos T (Zappia y cols., 2005). Posteriormente se han establecido modelos animales de otras enfermedades relacionadas con la respuesta inmune como la artritis (Gonzalez y cols., 2009, Liu y cols., 2010b), la diabetes (Urban y cols., 2008, Fiorina y cols., 2009), la colitis (Gonzalez-Rey y cols., 2009, Hayashi y cols., 2008), el lupus (Gu y cols.,

2010) o la pancreatitis (Jung y cols., 2011), en las que se ha probado el tratamiento con MSC. La administración generalmente sistémica de las células ha dado como resultado una disminución de la respuesta Th1 y Th17, responsables de la inflamación y la respuesta autoinmune respectivamente, y un viraje hacia una respuesta de tipo Th2, que inhibe la respuesta citotóxica. En varios de estos trabajos se ha observado un descenso de los niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 o IL-17 tras el tratamiento con las células y un aumento de citoquinas con carácter inmunosupresor como IL-4 e IL-10 confirmando este viraje. Además, el tratamiento con MSC provoca un aumento del número de linfocitos Treg (Zhang y cols., 2011b, Zhou y cols., 2011) que desencadena la supresión de la respuesta inmune.

Al igual que ocurre con las BM-MSC, estudios in vivo corroboran la utilidad de las AD-MSC en la prevención de enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la artritis inducida por colágeno en un modelo de ratón, en el que la administración sistémica de estas células demostró disminuir la respuesta inflamatoria en las articulaciones aumentando la concentración de IL-10 en las mismas y disminuyendo la de citoquinas proinflamatorias TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, MIP-2, RANTES e IL-17. Además, los animales tratados presentaron un mayor número de Treg en los nódulos linfáticos. Resultados similares se obtuvieron en un modelo de colitis y el efecto se atribuyó a la disminución en el tejido de las mismas citoquinas proinflamatorias anteriormente descritas y al aumento de IL-10 y de Treg (Gonzalez-Rey y cols., 2009).

Algunos ensayos clínicos en enfermedades autoinmunes han arrojado datos preliminares sobre la eficacia y seguridad del tratamiento con MSC. En enfermedad de Crohn refractaria, la mitad de los individuos sometidos a tratamiento experimentaron una mejoría, mientras que la otra mitad empeoró al ser tratados sistémicamente con BM-MSC autólogas (Duijvestein y cols., 2010). En un estudio posterior en el que se usaron células alogénicas de forma sistémica en varias dosis, se halló una disminución del índice de enfermedad y una mejoría clínica en la mayoría de los individuos (Forbes y cols., 2014). En el caso del lupus, los resultados son más palpables ya que se ha demostrado una mejoría mantenida a medio plazo en la enfermedad renal asociada (Liang y cols., 2010). Un ensayo clínico abierto con pacientes de esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica (ELA) también ha demostrado la seguridad del tratamiento sistémico e intratecal con MSC, obteniéndose una leve mejoría en los pacientes de esclerosis múltiple y un mantenimiento de la estabilidad en los pacientes de ELA (Karussis y cols., 2010). En los dos últimos años varios ensayos clínicos sobre esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, anemia aplásica y cirrosis han concluido sin que se hayan publicado los resultados, mientras que otros están en marcha o en fase de reclutamiento. Estos últimos incluyen estudios sobre las patologías anteriores y otras como hepatitis, neuromielitis óptica, enfermedad de Crohn, síndrome de Sjögren, lupus, fallo respiratorio, hipertensión renal y shock séptico (www.clinicaltrials.gov palabras clave: Mesenchymal stem cells, immunosuppression, autoimmune, inflammation).

Respecto del tema que nos ocupa, en modelos de trasplante, los resultados son controvertidos. Una de las primeras experiencias en trasplante de piel en babuinos demostró que la administración de MSC de donante aumentaba la supervivencia del injerto del propio donante y de terceros, inhibiendo la proliferación linfocitaria (Bartholomew y cols., 2002) sin embargo otros estudios han obtenido resultados contradictorios (Sbano y cols., 2008, Han y cols., 2010). Resultados similares se obtuvieron con AD-MSC en un modelo de trasplante de piel, en

el que el aumento de Treg e IL-10 y la disminución de IL-17 fueron relacionados con el aumento de la supervivencia del trasplante (Larocca y cols., 2013). En modelos de trasplante de isletas pancreáticas, la administración de BM-MSC singénicas mantuvo la normoglicemia a largo plazo (Ding y cols., 2009). Las AD- MSC también son capaces de mejorar la aceptación del trasplante de isletas pancreáticas en modelos de diabetes cuando son administradas conjuntamente con el tejido trasplantado (Ohmura y cols., 2010, Veriter y cols., 2014). Los animales son capaces de regular la glicemia en las primeras semanas aunque el efecto no perdura en el tiempo. El aumento de la vasculatura de la zona de implantación de las isletas hace pensar en la angiogénesis como uno de los posibles mecanismos de acción en estos modelos. La supervivencia en trasplante de corazón y riñón aumenta cuando las MSC del donante son administradas antes del trasplante, por lo que se piensa que el mecanismo de protección frente al rechazo implica la inducción de tolerancia (Casiraghi y cols., 2008, Ge y cols., 2010). En un estudio de trasplante de pata trasera en rata, la administración de AD- MSC sistémica de las células aumentó la supervivencia del trasplante (Jeong y cols., 2014). En el caso de trasplante de hígado en modelo de rata, los resultados a 7 días indican un menor rechazo del trasplante y una funcionalidad hepática mejor mantenida en los animales tratados con estas células (Wan y cols., 2008). Todos estos estudios demuestran que las MSC derivadas de médula ósea y de tejido adiposo poseen propiedades inmunoregulatoras similares.

En humanos, pese a existir una cierta cantidad de ensayos clínicos activos, en fase de reclutamiento o incluso 3 de ellos concluidos (www.clinicaltrials.gov palabras clave: mesenchymal stem cells, transplantation), son escasos los resultados publicados. Únicamente estudios en trasplante de riñón en los que se trata al receptor con una combinación de BM- MSC autólogas y terapia inmunosupresora clásica, han demostrado la seguridad del uso de las células en este contexto y un cierto aumento de la supervivencia del trasplante (Perico y cols., 2011, Tan y cols., 2012, Reinders y cols., 2013). La administración de células antes del trasplante parece obtener mejores resultados (Perico y cols., 2013). En estos estudios, el número de pacientes es tan pequeño (en dos de ellos solo incluyen 2 y 6 pacientes), el seguimiento tan corto (1 año como máximo) y los resultados tan limitados que no se pueden obtener conclusiones fiables.

Por su parte, los ensayos clínicos que tratan de aplicar las propiedades inmunomoduladoras de las MSC derivadas de tejido adiposo son muy escasos y limitados en su efectividad. La coin fusión de AD- MSC y HSC en pacientes de trasplante de riñón, han demostrado ser seguros y reducir levemente los episodios de rechazo, pero no han obtenido resultados significativos en la supervivencia a medio plazo (Vanikar y cols., 2014). El tratamiento sistémico y repetido con AD- MSC autólogas parece ser seguro en su uso compasivo en pacientes con enfermedades autoinmunes. Así, pacientes de enfermedad autoinmune profunda del oído, esclerosis múltiple, poliomielitis, dermatitis atópica y artritis reumatoide mejoraron las puntuaciones de los respectivos test de nivel de enfermedad en el corto plazo tras el tratamiento (Ra y cols., 2011). Actualmente hay más de 70 ensayos clínicos en curso o en fase de reclutamiento para evaluar el tratamiento en artritis reumatoide y osteoartritis, esclerosis múltiple, ELA, fibrosis pulmonar, anemia aplásica y enfermedad de Crohn (www.clinicaltrials.gov palabras clave: mesenchymal stem cells, adipose).

Uno de los escenarios terapéuticos más explorados hasta la fecha es el de la enfermedad del huésped contra hospedador (GvHD). Esta enfermedad se desarrolla en los trasplantes de médula ósea, es decir, de células madre

hematopoiéticas (HSC) cuando los linfocitos T del donante atacan a las células del hospedador dando lugar a patologías de piel, hígado, sistema digestivo, etc, que pueden llevar a la muerte del paciente. En modelos animales, el uso tanto de BM-MSK como de AD-MSK ha demostrado prevenir la enfermedad o mejorarla en algunos casos (Yanez y cols., 2006, Polchert y cols., 2008, Li y cols., 2008b), mientras que en otros no se obtuvieron resultados positivos (Prigozhina y cols., 2008). En clínica, Le Blanc y cols., realizaron este tipo de estudios por primera vez en 2004 en un niño de 9 años con un estadio muy avanzado de la enfermedad. El paciente mejoró notablemente tras 2 infusiones de células (Le Blanc y cols., 2004). Otros estudios con bajo número de pacientes han obtenido buenos resultados en escenarios similares (Ringden y cols., 2006, Prasad y cols., 2011) llegando incluso a un 70% de remisión (Le Blanc y cols., 2008). La eficiencia del tratamiento parece ser independiente de la compatibilidad de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) entre donante de MSK y receptor. También se ha visto una mayor eficacia en pacientes pediátricos que en adultos (Le Blanc y cols., 2008, Sato y cols., 2010, Prasad y cols., 2011). Pese a estos resultados prometedores, el único estudio aleatorio y abierto del que se poseen resultados hasta la fecha no obtuvo diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con células, aunque sí mejoró la enfermedad en hígado y sistema digestivo (ver en <http://investor.osiris.com/releasedetai.cfm?ReleaseID=407404>) .

En resumen, el uso de MSK para el tratamiento de patologías relacionadas con enfermedades autoinmunes o inflamatorias y con el trasplante de tejidos y órganos se encuentra en fases preliminares de investigación. Se necesitan aún muchos estudios en modelos animales y ensayos clínicos multicéntricos, abiertos y aleatorios para poder determinar el efecto terapéuticos de estas células, así como el mejor momento, dosis y vía de administración para cada patología.

1.3. Anatomía, estructura y función de la córnea

La córnea junto con la esclera conforma el componente externo del globo ocular. La resistencia de las fibras de colágeno entretejidas que la forman protegen el resto de componentes internos del ojo. La córnea permite la incidencia de los rayos de luz mientras que la opacidad de la esclera permite la formación de la imagen en la retina, como si se tratara de una cámara oscura. La estructura de la córnea le confiere su funcionalidad, y ésta depende de la transparencia, la suavidad de la superficie, el contorno, y el índice de refracción. Estas características la dotan de dos tercios del poder refractivo del ojo. La córnea está bañada en su parte anterior por la lágrima y en su parte posterior por el humor acuoso. La zona de transición entre la córnea y la esclera se denomina limbo corneal y es una zona altamente vascularizada donde residen progenitores corneales. La córnea es un tejido altamente innervado pero uno de los pocos avasculares que se encuentran en el cuerpo. Sin embargo, en situaciones patológicas, los vasos del limbo pueden penetrar en el estroma corneal afectando a la transparencia (Nishida, 2011).

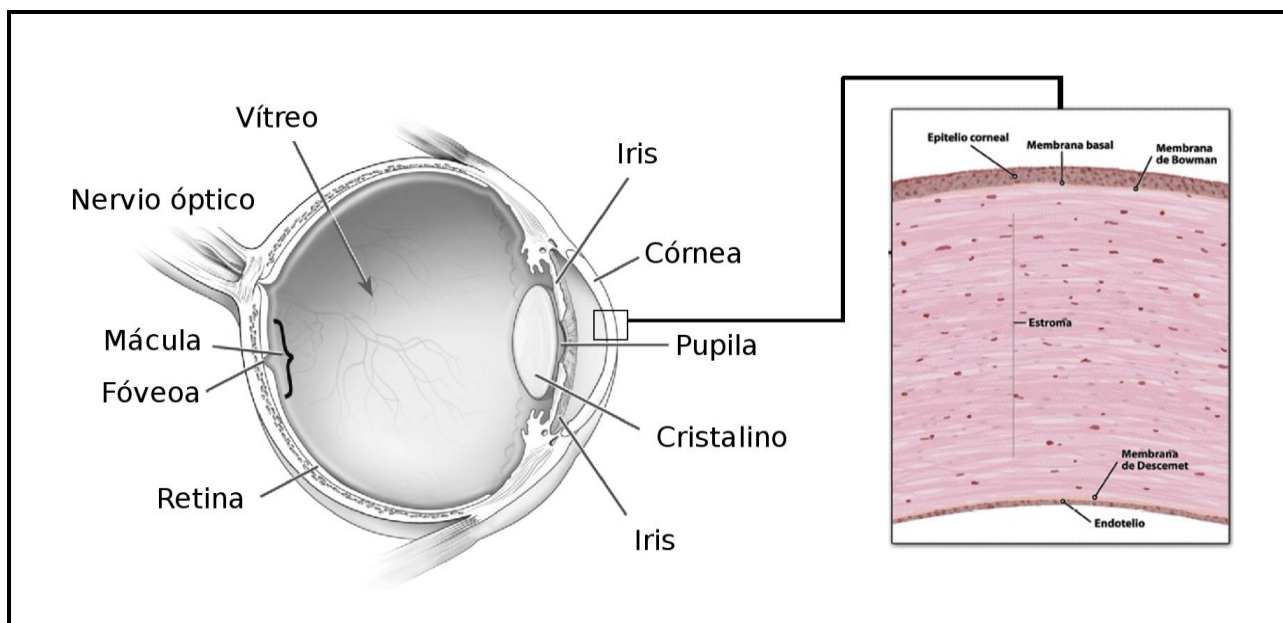


Figura 5. A) Estructura anatómica del globo ocular. B) esquema histológico de las capas de la córnea. Fuente: National Eye Institute (NIH) y (Fernandez y cols., 2008).

Las capas que componen la córnea son (Fig. 5):

Epitelio. La capa más externa de la córnea está formada por un epitelio escamoso, estratificado no queratinizado. Sólo las células basales proliferan y se diferencian para regenerar el epitelio. Estas células basales están ancladas a una Membrana basal compuesta principalmente de colágenos tipo IV y laminina.

Membrana de Bowman. Esta lámina acelular está formada por colágenos tipo I y III secretados por los queratocitos del estroma. Esta estructura no parece indispensable para la función corneal ya que no posee capacidad de renovación tras el daño y algunos animales carecen de ella.

Estroma. Esta capa constituye un 90% del grosor de la córnea, proporcionando estabilidad estructural y transparencia gracias a la conformación de las fibras de colágeno. Su componente celular está formado por queratocitos quiescentes y alargados que se encuentran embebidos en el componente acelular formado por la matriz extracelular (ECM) formada por colágeno, sobre todo de tipo I y con una menor proporción de tipos VI, III, V y proteoglicanos de tipo queratán sulfato, condroitin sulfato y dermatán sulfato.

Membrana de Descemet. Esta membrana acelular producida por las células endoteliales está formada por colágenos tipo IV y VIII, laminina y fibrina. No tiene capacidad regenerativa tras el daño y es la encargada de evitar que el humor acuoso penetre en el estroma y genere un proceso edematoso. Constituye la membrana basal del endotelio y ayuda a fijarlo al estroma.

Endotelio. Las células endoteliales corneales son muy activas metabólicamente, tienen forma hexagonal y se distribuyen en una monocapa en forma de mosaico. Su principal función es regular la hidratación del estroma a través de un sistema de intercambio de iones que permite el paso de agua del estroma al humor acuoso. El endotelio corneal no posee capacidad de regeneración en el humano.

1.4 Aproximaciones terapéuticas en trastornos corneales

Las diferentes patologías corneales pueden afectar únicamente a una de sus capas o de forma conjunta a toda su estructura. Estas patologías pueden incluir quemaduras o daños por traumatismo, enfermedades autoinmunes o congénitas como la aniridia que afectan a los progenitores limbales, infecciones, y patologías iatrogénicas por cirugía ocular o por un uso prolongado de lentes de contacto. La única capa con una buena capacidad de regeneración en caso de daño, siempre que el limbo esté sano, es el epitelio. En el caso del estroma, si se produce un daño pequeño los queratocitos pueden solventarlo, pero si el daño es mayor estas células se transdiferencian a fibroblastos y generan una matriz extracelular no organizada opaca. El endotelio corneal, como ya se ha comentado, no es replicativo, por lo que tras el daño las células remanentes migran hacia la zona afectada y se hipertrofian para intentar cubrir el defecto. Si no se consigue superar este daño, se produce un edema corneal y se pierde la transparencia.

La terapia ideal para las patologías corneales pasaría por reemplazar o tratar únicamente la capa o capas afectadas. A pesar de los avances en el campo de las queratoprótesis, y del trasplante de tejido limbal y lamelar (De Miguel y cols., 2010), el trasplante completo de córnea o queratoplastia penetrante (PK) es el tratamiento estándar elegido en la mayoría de los casos en la clínica.

1.4.1 El trasplante corneal

El trasplante corneal es el tipo de trasplante de tejido sólido más común en humanos y lleva realizándose de forma exitosa más de 100 años (Chong y cols., 2008). Cada año el número de intervenciones aumenta. En 2014 se realizaron 76.431 trasplantes de córnea sólo en Estados Unidos, 38.919 de los cuales fueron completos (PK) (America, 2015). Las queratoplastias lamelares, ya sean anteriores (ALK y DALK) o endoteliales (DMEK y DS(A)EK), en las que solo se reemplaza una o dos capas de la córnea, están ganando importancia en los últimos años. Sin embargo, en patologías estructurales o edematosas se hace necesario reemplazar la totalidad de la córnea. Tanto es así, que más de la mitad de los trasplantes realizados anualmente siguen siendo completos, 55% en 2014 en EEUU y más de un 70% en los últimos 15 años en Australia (America, 2015, Williams, 2015).

La córnea es un tejido inmunoprivilegiado por varias razones, entre ellas la falta de vasos sanguíneos y linfáticos (Niederhorn, 2003), el bajo porcentaje de APC residentes (Hamrah y cols., 2007) y la producción en la cámara anterior de moléculas inmunosupresoras como TGF- β , el antagonista de IL-1 α o Ligando Fas (Kennedy y cols., 1995, Stuart y cols., 1997). Esta barrera puede verse comprometida por procesos inflamatorios postquirúrgicos y por la neovascularización (Cursiefen y cols., 2004a, Cursiefen y cols., 2002, Chong y cols., 2008). Debido al inmunoprivilegio de la córnea, este tipo de trasplante no suele tener en cuenta la compatibilidad de HLA, ni es tratado con inmunosupresión sistémica, sólo se aplican corticoesteroides de forma tópica para el manejo de la inflamación y de los episodios de rechazo (Kharod-Dholakia y cols., 2015). Así, la probabilidad de supervivencia del trasplante en el primer año es mayor del 90%.

Sin embargo, hay diversos factores que influyen de forma negativa en los resultados clínicos de este tipo de trasplante: primero, dependiendo del estado prequirúrgico de la córnea este porcentaje de supervivencia

disminuye más o menos con el tiempo. Así la probabilidad de supervivencia de un trasplante de bajo riesgo, como por ejemplo en patologías estructurales como el queratocono, es del 84% a los 9 años. Sin embargo para un trasplante de alto riesgo, como el indicado en la queratopatía bullosa o en un rechazo de trasplante previo, la probabilidad de supervivencia a los 9 años disminuye por debajo del 40% (Williams, 2015) (Fig. 6). En general, las causas de este alto riesgo en estas patologías es el estado altamente vascularizado y de inflamación de la córnea previo a la cirugía, que suponen una ruptura de la barrera que hacía de la córnea un tejido inmunoprivilegiado.

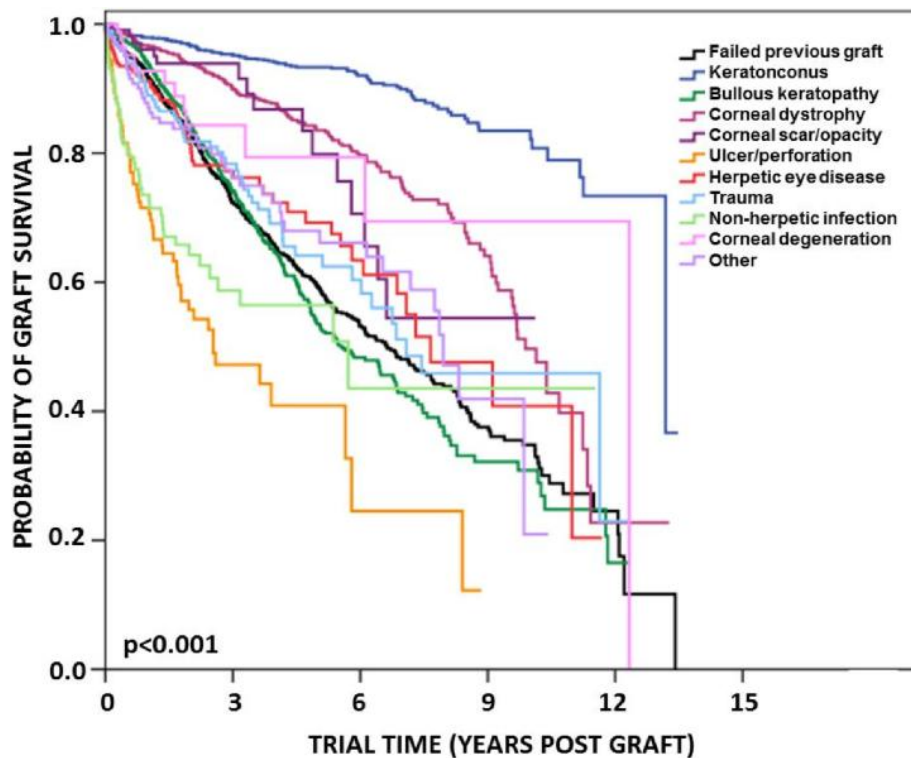


Figura 6. Probabilidad de supervivencia del trasplante según la indicación para la cirugía. La causa que provoca la necesidad del trasplante es la que determina el estado previo de la córnea. En patologías que cursan con inflamación severa y neovascularización como en el caso de ulceración, infección o rechazo previo, la probabilidad de supervivencia del trasplante disminuye. Fuente: The Australian Corneal Graft Registry, 2015 Report (Williams, 2015).

Por otro lado, en cuanto a las donaciones, además de ser escasas (menos de 130.000 córneas donadas en EEUU en 2014), factores como la edad avanzada de los donantes (cerca del 85% de donaciones son de individuos entre 40 y 80 años), hace que más del 25% del tejido donado no pueda ser usado en la clínica. En concreto, la edad del donante supone un factor de riesgo a la hora establecer la probabilidad de rechazo pese a que el tejido sí sea apto para la cirugía (Williams, 2015, America, 2015).

El rechazo inmunológico es la primera causa de fallo del trasplante. Como en otro tipo de trasplantes, la propia cirugía provoca un aumento de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y factores proangiogénicos que propician la llegada de células presentadoras de antígenos a la zona limbal. Estas células pueden migrar por gradiente quimiotáctico y gracias a moléculas de adhesión hasta zonas centrales de la córnea, captar antígenos y

migrar de nuevo a los órganos linfoides secundarios para disparar la respuesta inmune. Esta vía indirecta es la principal responsable del rechazo, aunque la presentación directa de antígenos por las células del donante también es posible (Chong y cols., 2008). En la córnea los episodios de rechazo pueden ser reversibles si se manejan adecuadamente. Sin embargo, el riesgo de padecerlo no disminuye con el paso del tiempo. Cuando las APC activan los linfocitos T, la respuesta citotóxica afecta principalmente al endotelio corneal. Cuando la destrucción es muy acusada o cuando acontecen varios episodios de rechazo, esta capa fundamental para el funcionamiento de la córnea se puede ver tan dañada que no sea posible la recuperación. Entonces el proceso de rechazo no será reversible (Claerhout y cols., 2008, Kumar y cols., 2014).

Por todo ello, es necesario encontrar nuevas estrategias para mejorar los resultados a largo plazo de este tipo de terapia. La inmunosupresión sistémica no ha demostrado ser efectiva en la prevención del rechazo (Abudou y cols., 2015) por lo que la búsqueda de soluciones está encaminándose hacia las nuevas terapias, como la terapia celular.

1.4.2 Terapia celular en la córnea

La terapia celular en la superficie ocular ha sido históricamente una terapia de tipo regenerativo. Progenitores del propio tejido corneal o células de origen extraocular han sido cultivadas *in vitro* y trasplantadas *in vivo* para tratar de solucionar defectos en las diferentes capas corneales.

1.4.2.1 Regeneración

Epitelio. Los progenitores epiteliales residen en la zona limbal (Schermer y cols., 1986, Cotsarelis y cols., 1989) y son los encargados de regenerar el epitelio en condiciones normales (Dua y cols., 2003). Sin embargo, cuando existe una patología que cursa con una deficiencia de células madre limbales, es necesario reponer el epitelio con células exógenas. El trasplante de células madre limbales (Pellegrini y cols., 1997, Schwab, 1999, Shimazaki y cols., 2002), o de células epiteliales de la mucosa oral sembradas sobre membrana amniótica (Nakamura y cols., 2004) o polímeros artificiales (Nishida y cols., 2004) han demostrado una eficiente regeneración epitelial. Por otro lado, algunos estudios han conseguido diferenciar MSC de médula ósea y tejido adiposo a células que expresan marcadores de epitelio corneal como las citoqueratinas 3 y 12 (Katikireddy y cols., 2014, Nieto-Miguel y cols., 2013). En modelos animales, las BM-MSC cultivadas con células limbales o estromales, o en medio condicionado, y sembradas sobre matrices de fibrina o membrana amniótica, han demostrado ser eficaces en la restauración del epitelio corneal (Gu y cols., 2009, Jiang y cols., 2010). Parece que estas células promueven la renovación induciendo la proliferación de células de la propia córnea en vez de diferenciarse.

Estroma. En el limbo corneal también residen células con capacidad de diferenciación a queratocitos, las células madre del estroma corneal (Du y cols., 2005, Funderburgh y cols., 2005). *In vivo*, estas células han demostrado no provocar rechazo y ser capaces de recuperar la organización de la ECM estromal y la transparencia corneal (Du y cols., 2009). En cuanto a las células de origen extraocular, nuestro grupo demostró hace unos años que las AD-MSC son capaces de integrarse en el estroma corneal sin producir rechazo y generar queratocitos al ser

depositadas en un bolsillo corneal (Arnalich-Montiel y cols., 2008). Las BM-MSC y las UC-MSC también han demostrado su capacidad para expresar marcadores de tipo queratán sulfato del estroma corneal como el queratocán o el lumican al ser cultivadas con medio condicionado de queratocitos (Liu y cols., 2010a, Park y cols., 2012). Cuando estas células sin prediferenciar son introducidas de forma intraestromal, son capaces de producir queratocán y lumican demostrando cierta capacidad de diferenciación y de reorganizar la ECM estromal mejorando la actividad de los queratocitos remanentes.

Endotelio. El endotelio, pese a no ser replicativo in vivo, ha demostrado poseer la capacidad de proliferación in vitro (Pistsov y cols., 1988, Engelmann y cols., 1989, Peh y cols., 2015). Varios estudios han determinado que existen células endoteliales con fenotipo progenitor y que son más abundantes en la zona periférica de la córnea (Whikehart y cols., 2005, Mimura y cols., 2005, Konomi y cols., 2005). Las células del endotelio corneal han sido cultivadas y sembradas con éxito sobre córnea humana (Engelmann y cols., 1999, Mimura y cols., 2004, Amano y cols., 2005) y sobre láminas de colágeno (Levis y cols., 2012), mostrando una buena funcionalidad in vitro y una buena integración in vivo en animales de experimentación. En cuanto a la terapia con MSC, estas células han demostrado tener la capacidad de diferenciarse a células similares a las del endotelio corneal con resultados limitados pero esperanzadores (Joyce y cols., 2012). Además, la secreción de factores paracrinos por parte de las MSC parece ser interesante a la hora de mejorar la expansión de células endoteliales corneales (Nakahara y cols., 2013).

1.4.2.2 Inmunomodulación

Como en el resto de tejidos, en la córnea parece interesante el abordaje terapéutico con MSC desde la perspectiva del efecto paracrino. La administración de medio condicionado de MSC o la aplicación conjuntival de las mismas (sin migración hacia la córnea) mejoran la inflamación e inducen la recuperación en modelos de daño corneal en ratas (Oh y cols., 2008, Yao y cols., 2012). En estos modelos, la expresión local de proteínas proinflamatorias como TNF- α , MIP-1a, IFN- γ , IL-2, y angiogénicas como VEGF disminuyeron significativamente, mientras que factores antiinflamatorios como IL-10 o TGF- β aumentaron, mediando la disminución de la infiltración inflamatoria.

A la luz de los descubrimientos sobre las propiedades inmunomoduladoras de las MSC, varios grupos están actualmente investigando su posible uso como terapia inmunosupresora. Sin embargo, la aplicación tópica de BM-MSC en un modelo de xenotrasplante corneal de cerdo a rata no fue eficaz en la prevención del rechazo (Oh y cols., 2009). Por otro lado, estudios posteriores de aplicación sistémica de BM-MSC en modelos de trasplante alogénico de córnea en rata y ratón sí han demostrado efectividad en el tiempo de supervivencia del trasplante (Jia y cols., 2012, Oh y cols., 2012, Omoto y cols., 2014). Este efecto se ha atribuido a un aumento de linfocitos Treg (Treacy y cols., 2014) y de factores antiinflamatorios, en concreto el TSG-6 (gen 6 inducible por factor de necrosis tumoral), que mediarían una disminución de las APC tanto en córnea como en nódulos linfáticos (Oh y cols., 2012, Lee y cols., 2014a). Los linfocitos T de las ratas tratadas demostraron una disminución de la secreción de IFN- γ e IL-2 en cultivo, lo que hace suponer una disminución en la respuesta de tipo Th1 (Jia y cols., 2012, Omoto y cols., 2014).

Sin embargo, según nuestro punto de vista, estos modelos animales no son adecuados para estudiar la fisiopatología del rechazo corneal ya que el tamaño y la anatomía del ojo de la rata y del ratón no permiten realizar una cirugía similar a la que se realiza en la clínica humana, ni establecer un modelo diferenciado de riesgo normal y alto de rechazo de trasplante. Por otro lado, todos los estudios utilizan células derivadas de médula ósea sin investigar la posible utilidad de células de otros orígenes más adecuados como el adiposo. Estas células son de especial interés, porque el tejido adiposo es la fuente más rica de células madre mesenquimales con una recuperación de células 500 veces mayor que la obtenida de la misma cantidad de médula ósea (Lindroos y cols., 2011).

2. OBJETIVOS:

1. Establecer un modelo animal de rechazo corneal de bajo riesgo más parecido a los pacientes que los utilizados actualmente.
2. Establecer un modelo animal de rechazo corneal de alto riesgo similar al que se encuentra en la práctica clínica.
3. Estudiar el posible efecto de la administración de AD-MSC en la supervivencia del trasplante en ambos modelos de trasplante corneal.
4. Dilucidar los mecanismos moleculares implicados en la inmunomodulación de las AD-MSC en los contextos de trasplante corneal de bajo y alto riesgo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención, aislamiento y cultivo de las AD-MS

3.1.1 Medios de cultivo

Medio de cultivo de MSC (Medio completo): DMEM con Glutamax (2mM), piruvato (110 mg/L) y glucosa (4,5 g/L) (Gibco-Life technologies) + FBS (Suero bovino fetal, 10%, Gibco) + Penicilina/estreptomicina (1%, Sigma-Aldrich).

Medio de cultivo de MSC P0: Igual al Medio completo + Amfotericina b 0,5% (Sigma-Aldrich).

Medio de cultivo de PBMC: RPMI (Gibco) + FBS 5% (Gibco) + Penicilina/estreptomicina (1%, Sigma-Aldrich).

Medios de diferenciación descritos por Zuk y cols., 2001 (Zuk y cols., 2001)

- **Medio de diferenciación condrogénica:** DMEM + ITS (Insulina-transferrina-selenio, 5µg/ml, Sigma-Aldrich, 5µg/ml) + dexametasona (0,1 µM, Merck) + ácido ascórbico 2-fosfato (50 µg/ml, Fluka).
- **Medio de diferenciación osteogénica:** DMEM + 10% FBS + dexametasona (0,1µM, Merck) + ácido ascórbico 2-fosfato (50 µg/ml, Fluka).
- **Medio de diferenciación adipogénica:** DMEM + 10% FBS + isobutilmetilxantina (500 µM, Sigma-Aldrich) + dexametasona (1 µM, Sigma-Aldrich) + indometacina (1 µM, Sigma-Aldrich).

3.1.2 Aislamiento de las AD-MS

3.1.2.1 Donantes humanos

Todas las donaciones fueron realizadas por un cirujano plástico bajo consentimiento informado de acuerdo con la normativa vigente (Declaración de Helsinki: World Medical Association Declaration of Helsinki, 2000, y las modificaciones de la 59th WMA General Assembly) y Ley Orgánica de protección de datos (BOE), y fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz (HULP). Simultáneamente se realizaron análisis serológicos para descartar infección por VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), VHC (Virus de la Hepatitis C) y sífilis, siguiendo las directivas del BOE para la utilización de células y tejidos humanos con fines experimentales (BOE n.126 de 27 de mayo de 2006).

Se obtuvo tejido adiposo subcutáneo (lipoaspirado) de donantes sanas que se sometieron a liposucción electiva. Se utilizaron 7 donantes, todas de sexo femenino, con edades comprendidas entre 32 y 50 años (media 43) y con índices de masa corporal (BMI) entre 19,57 y 28,35 (media de 26,3), indicativo de sobrepeso pero no de obesidad (Tabla 1). Todas las donantes estaban sanas y no recibían medicación, salvo una de las pacientes que recibía fluoxetina y otra con antecedente de cáncer de mama.

ID Donante	Sexo	Edad	Índice de masa corporal (BMI)
EU28	M	41	28,35
EU29	M	47	28,12
EU30	M	41	25,39
EU34	M	32	19,57
EU35	M	44	27,24
EU37	M	50	27,68
EU38	M	47	28,08

Tabla 1. Relación de donantes de tejido adiposo y sus correspondientes datos de sexo, edad e índice de masa corporal. Todas las donantes fueron mujeres de entre 32 y 50 años con sobrepeso pero sin obesidad (BMI<30). Las identidades se corresponden con un código alfanumérico para proteger los datos personales de las pacientes como lo exige la Ley de protección de datos.

3.1.2.2 Animales

Todos los animales utilizados en el estudio se obtuvieron de las granjas cunícolas Granja San Bernardo (Tulebras, Navarra) y Granja Riera (L'ametlla del vallés, Barcelona) y fueron estabulados en el animalario del Servicio de Cirugía Experimental del (HULP). Los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEBA) de dicho hospital.

Se ha elegido como modelo animal el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) por ser la especie más utilizada en investigación oftalmológica ya que su ojo se asemeja en tamaño y funcionalidad al de la especie humana.

Conejos donantes

En el caso del tejido adiposo de conejo, se realizó lipectomía retroperitoneal a 3 conejos New Zealand White (NZW): NZ3, NZ6 y NZ7. Se extrajo tejido adiposo de conejos que fueron previamente usados como donantes de córneas en experimentos de nuestro propio grupo para poner a punto la técnica quirúrgica, por lo que no presentaban patologías ni estaban siendo sometidos a tratamiento alguno. De esta manera redujimos el número de animales necesarios para la experimentación.

Técnica quirúrgica:

1. Los conejos fueron sedados con una mezcla de medetomidina/ketamina (0,15 mg/kg y 10 mg/kg) administrada por vía intramuscular (IM).
2. Tras esperar 15 minutos, se introdujo un catéter intravenoso de 23G por la vena marginal auricular y los conejos fueron inducidos por esta vía con propofol (5mg/kg en bolo). Inmediatamente después se aplicó por la misma vía una sobredosificación de pentobarbital sódico (Doletal). De esta manera los animales fueron eutanasiados sin sufrimiento).
3. Se procedió a rasurar la zona del abdomen desde el xifoideas hasta el ombligo y se realizó un lavado quirúrgico de la zona, aplicando etanol al 70% y povidona yodada de forma alternativa, repitiéndose esta operación 3 veces.

4. Se realizó una incisión por la línea media del abdomen con un bisturí del 20 y se extrajo de forma aséptica la grasa retroperitoneal de los conejos. Esta grasa fue lavada 2 veces con suero salino fisiológico y mantenida a 4°C en el mismo suero hasta su procesamiento.

3.1.2.3 Obtención del PLA (lipoaspirado procesado) humano

La obtención de la SVF (fracción vasculoestromal) se realizó modificando el protocolo ya establecido por Zuk y cols., 2001 (Zuk y cols., 2001) de la siguiente manera:

1. El tejido graso del lipoaspirado obtenido de cada donante se repartió en tubos de centrifuga de 50 ml a razón de 30 ml por tubo, se lavó con 20 ml de PBS centrifugando a 400g 10 minutos a 20°C.
2. La grasa remanente en la fase superior fue traspasada a un nuevo tubo y se digirió con 25 ml de colagenasa tipo I (Gibco) al 0,09% m/v en PBS, incubando a 37°C 40 minutos en agitación.
3. La colagenasa se inhibió con 2ml de FBS y se centrifugó a 300g 10 minutos a 20°C, aislando de esta manera la SVF.
4. Se eliminaron los eritrocitos de la SVF mediante la adición de un tampón de lisis (160 mM NH₄Cl + 10 mM KHCO₃ + 0,1 mM EDTA-K en agua destilada) en proporción 1:1 con la SVF. Se incubó la muestra 15 minutos a temperatura ambiente y se lavó con PBS en una proporción 5:1 centrifugando a 300g 10 minutos a 4°C.
5. La población de células contenida en el pellet se sembró en placas de cultivo de 10 cm de diámetro (Corning) a una densidad de 3x10⁴ células/cm², en medio completo de cultivo de MSC y fueron cultivadas a 37°C y en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% O₂.
6. Transcurridas 24 horas, el cultivo fue lavado con PBS para eliminar las células no adheridas. La población remanente, denominada lipoaspirado procesado (PLA) se mantuvo en cultivo en las mismas condiciones anteriormente descritas y realizando cambios de medio 3 veces por semana hasta la subconfluencia (90%). En este momento las células fueron criopreservadas en medio completo con 10% de DMSO conservándose en nitrógeno líquido hasta su utilización para los experimentos.

3.1.2.4 Obtención del tejido adiposo procesado de conejo

El aislamiento de la SVF de conejos y el procesamiento de las células derivadas de su tejido adiposo se realizó siguiendo el protocolo descrito para el tejido humano con pequeñas modificaciones:

1. El tejido adiposo de conejo fue cortado en pequeños trozos de unos 2 mm² con ayuda de unas tijeras en una placa de Petri de 10 cm con 5 ml de PBS.
2. Una vez lavada y extraída la grasa, la digestión se realizó con colagenasa I al 0,2%

3.2 Inducción de diferenciación condro, osteo y adipogénica en las MSC

3.2.1 Inducción de diferenciación a linaje condrogénico

Para la inducción de las AD-MSC hacia linaje condrogénico se utilizó un método de siembra conocido como “micromass culture technique” descrito por Denker y cols., 1995 (Denker y cols., 1995):

1. Se sembró una gota de 10 μ l de medio completo con 8×10^6 AD-MSC/ml en un pocillo de placas de 24.
2. Cinco horas después el medio se sustituyó por el medio de diferenciación condrogénico.
3. El cultivo se mantuvo durante 4 semanas cambiando el medio 3 veces por semana.
4. Para confirmar la diferenciación se realizó una tinción con azul alcian en medio ácido, que demuestra la producción de proteoglicanos sulfato característicos del cartílago (Lev y cols., 1964) (Lev y Spicer, 1964).

3.2.2 Inducción de diferenciación a linaje osteogénico

Para la inducción de las AD-MSC hacia linaje osteogénico se utilizó un método descrito por Zuk y cols., 2001 (Zuk y cols., 2001):

1. Las AD-MSC fueron sembradas en medio completo a una densidad de 2×10^4 células/cm² durante 24 horas.
2. El medio se sustituyó por uno de diferenciación osteogénica.
3. Se mantuvo el cultivo durante 2 semanas cambiando el medio 3 veces por semana.
4. La diferenciación osteogénica fue confirmada por la detección de actividad fosfatasa alcalina usando 1mg/ml de Fast-Red-TR (Sigma-Aldrich) y 0,04% de Naftol AS-MX fosfato (Sigma-Aldrich).

3.2.3 Inducción de diferenciación a linaje adipogénico

Para la inducción de las AD-MSC hacia linaje osteogénico se utilizó el siguiente método descrito por Zuk y cols., 2001 (Zuk y cols., 2001).

1. Se sembraron las AD-MSC a una densidad de 3×10^3 células/cm² en medio completo.
2. Transcurridas 24 horas, el medio fue cambiado por medio de diferenciación adipogénica.
3. Una concentración total de 10 μ M de insulina (Actrapid) fue añadida al cultivo durante 24 horas cada 3 días. Los cultivos se mantuvieron durante 2 semanas.
4. La diferenciación adipogénica fue confirmada por la presencia de vacuolas lipídicas intracelulares reveladas mediante la tinción con Oil Red O.

3.3 Estimulación inmunológica de las hAD-MSC

En algunos experimentos del presente estudio se trató de comparar la acción de hAD-MSC nativas frente a la acción de las mismas células estimuladas con TNF- α e IFN- γ (Invitrogen). Ambos compuestos han demostrado aumentar las capacidades inmunosupresoras en las MSC (Sheng y cols., 2008, Ren y cols., 2008, Ren y cols., 2009). Para ello, las células en cultivo fueron estimuladas durante 4h con 20 ng/ml de cada factor. El uso de estas células se comentará más adelante en cada uno de los experimentos.

3.4. Inducción de arresto del ciclo celular en las MSC

Se indujo un arresto del ciclo celular en las MSC mediante el tratamiento con mitomicina C, que inhibe la síntesis de DNA. De esta forma inactivamos la replicación celular en las MSC para mantener los cocultivos con PBMC 7 días sin necesidad de pasarlos y para mantener la ratio de sembrado, de la siguiente manera:

1. Las MSC en pase 3 fueron cultivadas en medio completo con 10 μ g/ml de mitomicina C (Sigma-Aldrich) durante 4 horas.
2. Posteriormente se lavaron 1 vez con PBS y 2 veces con medio de cultivo completo.
3. Se cultivaron durante 24 horas más y se congelaron en medio completo + 10% de DMSO.

3.5 Aislamiento de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) depleccionadas de monocitos

Las PBMC fueron aisladas de buffy coat (capa leucocitaria) de donantes sanos cedidos amablemente por el grupo de Tumorinmunología del Dr. López Collazo del IdiPAZ y provenientes del servicio de donaciones de la Cruz Roja. El procedimiento fue el siguiente:

1. La muestra fue diluida 1:1 en PBS
2. Se repartieron 15 ml de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) a varios tubos de centrifuga de 50 ml.
3. Suavemente y deslizando por la pared se añadieron 35 ml de la muestra diluida sobre el Ficoll de cada tubo de forma que se quedó en fase por encima y sin mezclarse.
4. Los tubos fueron centrifugados a 400g 40 minutos a 20°C sin frenado.
5. Las células mononucleares que quedan en la interfase Ficoll-PBS fueron recogidas con una pipeta Pasteur y transferidas a un nuevo tubo de 50 ml.
6. Las muestras se lavaron con PBS centrifugando a 300g 10 minutos a 20°C.
7. El pellet se resuspendió de nuevo en 50 ml de PBS y se centrifugó a 200g 15 minutos a 20°C para eliminar las plaquetas.
8. Las células se cultivaron en medio de PBMC y se dejó 1 h. en cultivo para permitir a los monocitos adherirse.
9. Se recogieron las PBMC que quedan en suspensión y que ya están depleccionadas de monocitos y se sembraron en medio de cultivo de PBMC para la realización de los diferentes experimentos.

3.6 Determinación del porcentaje de linfocitos T en las PBMC

Las PBMC obtenidas fueron sometidas a citometría de flujo para determinar el porcentaje de células CD3 positivas (linfocitos T) y ajustar de esta manera el ratio a la hora de sembrar en los cocultivos con MSC. Se siguió el protocolo de citometría que se describirá más adelante.

3.7 Tinción de las PBMC con CFSE

Las células fueron teñidas con CFSE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) para la determinación de la proliferación celular. Para ello se usó el CellTrace CFSE Cell Proliferation kit (Molecular Probes). El CFSE se introduce por difusión pasiva dentro de la célula y es incoloro y no fluorescente hasta que las esterasas intracelulares rompen los grupos acetato, dando lugar al compuesto fluorescente carboxyfluorescein succinimidyl ester. El grupo succinimidyl ester reacciona con las aminas intracelulares formando conjugados fluorescentes que son retenidos por las células. A medida que la célula se divide va repartiendo estos conjugados a las células hijas y por diferencia de intensidades se puede medir el porcentaje de proliferación (Fig.7):

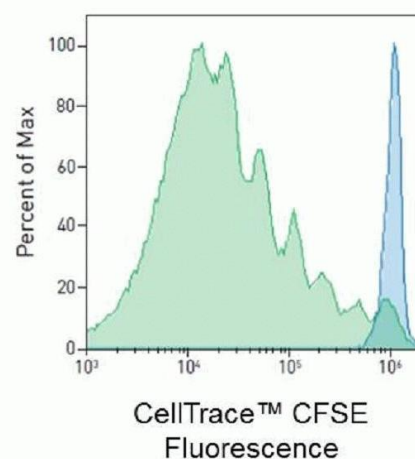


Figura 7. Gráfica obtenida por citometría de flujo para el CFSE, tras sucesivas divisiones celulares (picos). El pico de la derecha representa a una población única que no ha sufrido división celular. Fuente: Catálogo del proveedor.

1. Las PBMC deplecionadas de monocitos se centrifugaron a 200g durante 10 minutos a 20°C.
2. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en PBS + 0,1% BSA (albúmina sérica bovina) a una concentración final de 10^6 células/ml.
3. Se añadió CFSE a una concentración final de $1\mu\text{M}$, incubándose 10 minutos a 37°C
4. Para inhibir la reacción se añadieron 5 volúmenes de medio de cultivo de PBMC a 4°C, incubándose en hielo 5 minutos.
5. Se centrifugaron a 200g durante 10 minutos a 20°C.
6. Se dejaron las células en 1ml de FBS a 37°C durante 30 minutos para que se recuperasen.
7. Se lavaron las células 3 veces con medio de cultivo de PBMC centrifugando de la misma manera.
8. Se resuspendieron las células en medio de cultivo a la concentración adecuada para la realización de cada experimento.

3.8 Estimulación de las PBMC

Para la estimulación de las células T contenidas en las PBMC se usó el kit de activación linfocitaria Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 (Gibco). Este kit consta de bolitas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti CD3 y anti CD28 que mimetizan la acción activadora que realizan las células dendríticas sobre los linfocitos T in vivo. Se utilizan 2 μ l de bolitas por cada 8×10^4 células que queremos activar y se prepararon de la siguiente manera:

1. Se calculó el número de células T que se usarían en los experimentos y los microlitros necesarios de bolitas magnéticas para activar los grupos correspondientes.
2. Se mezcló vigorosamente el contenido del vial con las bolitas durante 30 segundos
3. Se transfirió la cantidad calculada anteriormente a un tubo eppendorf de 1,5ml
4. Se lavaron las bolitas. Para ello se añadió 1 ml de tampón (PBS + 0,1% BSA) y se mezcló vigorosamente durante 5 minutos.
5. Se colocó el tubo sobre un imán durante 2 minutos para concentrar las bolitas y se eliminó el sobrenadante sin separar el tubo del imán.
6. Las bolitas se resuspendieron en medio de cultivo de PBMC (en la misma cantidad recogida originalmente del vial).

Una vez establecidos los cocultivos como se indica en el siguiente apartado, se añadieron las bolitas a los grupos correspondientes.

3.9 Protocolo de cocultivo

Se realizaron cocultivos de MSC con PBMC a diferentes ratios durante 7 días.

Se establecieron **6 grupos experimentales**:

- Control negativo: PBMC sin estimulación de linfocitos T
- Control positivo: PBMC con estimulación de linfocitos T
- No estimulado (NS): MSC sin estimular + linfocitos sin estimular
- MSC estimuladas (S-MS): MSC estimuladas + linfocitos no estimulados
- PBMC estimuladas (S-PBMC): MSC sin estimular + linfocitos T estimulados
- Doble estimulado (DS): MSC estimuladas + linfocitos estimulados

Se establecieron así mismo 3 ratios de cultivo MSC:linfocitos T (1:1; 1:10; 1:100). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

El **protocolo de cocultivo** fue el siguiente:

1. Se sembraron MSC en Pase 4 mitomicinadas en placas de 96 pocillos (2×10^4 células/pocillo) en medio de cultivo de MSC. Se estimularon las MSC en los grupos correspondientes durante 4 horas como se indica en el punto 3.3, tras las cuales se lavaron los pocillos con PBS y se realizó un cambio de medio.
2. A continuación, sobre los cultivos de MSC se sembraron las PBMC correspondientes para alcanzar los diferentes ratios de sembrado de MSC:linfocitos T (teniendo en cuenta los datos obtenidos en el 3.6)
3. Por último, se estimularon las células T de los cultivos correspondientes con las bolitas magnéticas como se ha indicado anteriormente.
4. Todas las células fueron cultivadas a partir de este momento con medio de cultivo de PBMC durante 7 días.

3.10 Determinación del porcentaje de proliferación de linfocitos T

El porcentaje de PBMC proliferantes se determinó por citometría de flujo para CFSE y CD3. Las PBMC crecen en suspensión mientras que las MSC son células adherentes. Por tanto, para recuperar las PBMC se pipeteó suavemente el sobrenadante unas 20-30 veces para resuspender las PBMC sin levantar las MSC y se llevaron a un tubo de centrifuga de 1,5 ml. A continuación se realizó un marcaje con anti CD3 con el protocolo detallado en el siguiente punto. Este marcaje nos permitió estudiar por citometría únicamente la proliferación de las células CD3 positivas, es decir de las linfocitos T. El control negativo del cocultivo o en su defecto células teñidas con CFSE sin proliferar fueron usadas para establecer el pico control de CFSE. El porcentaje de proliferación de las células T se estableció como la suma de picos diferentes en intensidad del pico del control negativo.

3.11 Citometría de flujo

3.11.1 Caracterización de superficie de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo

Las células del lipoaspirado procesado fueron llevadas a pase 3-4 y caracterizadas para los marcadores de superficie CD34, CD45, CD90 y CD105 por citometría de flujo. Las células humanas fueron además caracterizadas para CD14 y las de conejo para CD44. Asimismo, se determinó la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 CD86 y de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de tipo I y II, HLA-ABC y HLA-DR respectivamente. En el caso de las células humanas, se comparó la expresión de estos marcadores antes y después de la estimulación con TNF- α e IFN- γ . Una relación de los anticuerpos utilizados puede encontrarse en la Tabla 2.

Anticuerpos				
Proteína detectada	Conjugado	Dilución	Uso	Proveedor
CD3	APC	1:20	FC	Immunostep
CD14	APC	1:20	FC	Immunostep
CD34	PE	1:20	FC	BD Biosciences
CD40	PE	1:20	FC	Abcam
CD44	NO	1:20	FC /IHQ	AbD Serotec
CD45	FITC	1:20	FC	BD Biosciences
CD45	NO	1:10	IHQ	Antigenix America
CD80	FITC	1:20	FC	Biolegend
CD86	APC	1:50	FC	BD Bioscience
CD90	PE	1:20	FC	Abcam
CD105	FITC	1:20	FC	Chemicon
HLA-ABC	PE	1:50	FC	BD Biosciences
HLA-DR	PerCP / FITC	1:20	FC	Miltenyi / immunostep
IDO	PE	1:20	FC	R&D systems
Isotipo IgG1 ratón	FITC	1:20	FC	immunostep
Isotipo IgG1 ratón	PE	1:20	FC	immunostep
Isotipo IgG1 ratón	APC	1:20	FC	immunostep
Anti-ratón	Biotina	1:100	IHQ	Vector Labs

Tabla 2. Relación de anticuerpos utilizados a lo largo de todo el estudio. Se indica si el anticuerpo está conjugado y con qué fluoróforo, la concentración de uso, el tipo de protocolo en el que se ha usado y la casa comercial.

Procedimiento de inmunomarcaje:

1. Las células cultivadas fueron lavadas con PBS y levantadas por raspado sobre placa fría. Se centrifugaron a 600g 8 minutos a 4°C y el sobrenadante se desechó.
2. Se realizó la incubación con los anticuerpos primarios diluidos en PBS a 4°C durante 30 minutos y en oscuridad. Como control negativo se usaron isotipos de las inmunoglobulinas conjugados con los mismos fluoróforos.
3. Tras la incubación, se lavaron con 1 ml de PBS, y se centrifugaron las células a 600g 8 minutos a 4°C.
4. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo (Becton Dickinson FACSCalibur™ cytometer analysers) mediante el uso del programa CellQuest™.

3.11.2 Citometría de flujo de Indoleamina 2 3-dioxigenasa (IDO)

La determinación del porcentaje de células positivas para IDO se realizó de la misma manera, añadiendo una permeabilización previa a la incubación con el anticuerpo primario. Este procedimiento consistió en:

1. Se añadió 1 ml de FACS lysing solution (BD biosciences) a concentración 1:10 en agua destilada y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Posteriormente se centrifugó 9 minutos a 650g y 4°C, y se retiró el sobrenadante.
3. Se lavó con 1 ml de PBS y se volvió a centrifugar y a retirar el sobrenadante.
4. Se incubó con el anticuerpo anti IDO y se procedió como se ha descrito en el punto anterior.

3.11.3 Detección de la producción de Óxido Nítrico (NO)

Para la detección de óxido nítrico (NO) se utilizó el kit DAF-FM diacetato (4-amino-5metilamino-2',7'-difluorescein diacetato) (Molecular Probes). Este kit basa su acción en el compuesto DAF-FM diacetato. Este compuesto atraviesa la membrana celular por difusión pasiva y una vez en el interior de la célula es deacetilado por esterasas convirtiéndose simplemente en DAF-FM. El nuevo compuesto tiene una baja fluorescencia que aumenta 160 veces al reaccionar con el NO y formar un benzotriazol. De esta manera, pequeñas cantidades de NO intracelular pueden ser visibilizadas por microscopía de fluorescencia o bien cuantificadas por citometría de flujo.

1. Las células fueron levantadas por raspado en PBS sobre placa fría, centrifugadas a 600g 5 minutos a 4°C y eliminado el sobrenadante.
2. Las células humanas fueron incubadas con 5µM de DAF-FM diacetato durante 30 minutos a 4°C. En el caso de las células de conejo, la incubación con el compuesto fue a una concentración de 10µM y durante 60 minutos.
3. Una vez eliminado el DAF-FM diacetato mediante lavado con PBS y centrifugado a 600g durante 5 minutos, las células se incubaron 30 minutos adicionales en PBS a 4°C y se volvieron a lavar por centrifugación.

- Finalmente las células se resuspendieron en 200 μ l PBS para ser analizadas por citometría de flujo. Este compuesto se excita a 495 nm y emite a 515 nm por lo que puede detectarse en el mismo canal que el FITC.

3.12 Detección de citoquinas producidas por las AD-MSC

Para la detección de citoquinas se utilizó el sobrenadante de 16 horas de cultivo de hAD-MSC en Pase 3 estimuladas (4h) y sin estimular. Para ello se usó el Kit Cytometric Bead Array (CBA) para citoquinas inflamatorias humanas (BD Biosciences). Este test es capaz de detectar en una misma muestra las concentraciones de 6 citoquinas diferentes: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF α . Consta de seis poblaciones de bolitas que emiten fluorescencia a diferentes intensidades. Cada población está recubierta con anticuerpos específicos para una de estas seis citoquinas. Las bolitas, los anticuerpos conjugados con ficoeritrina (PE) y las proteínas de la muestra se incuban juntas para dar lugar a unos complejos sándwich que pueden ser analizados en un citómetro de flujo gracias al programa BD CBA Analysis Software o FCAP Array™ Software (Figs. 8 y 9).

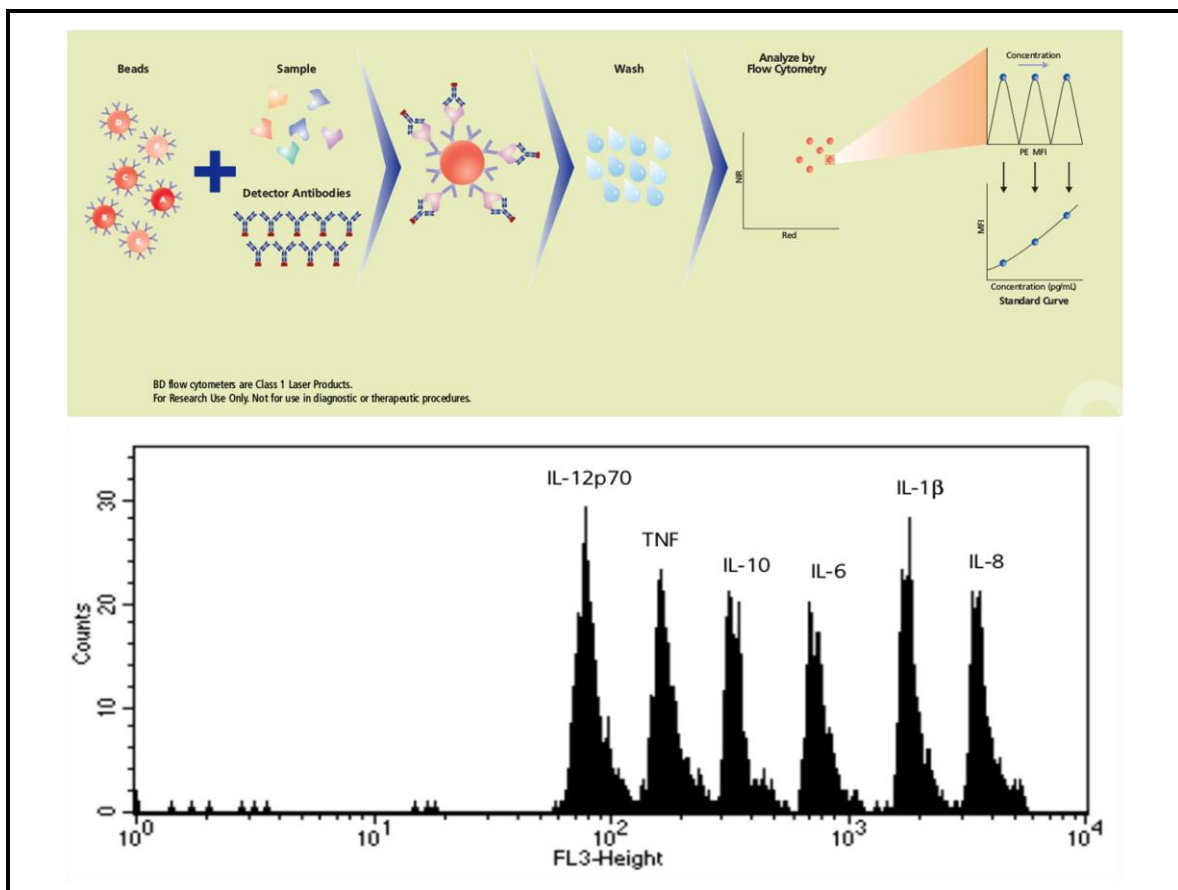


Figura 8. A) Principio del test CBA: bolitas conjugadas con anticuerpos son incubadas junto con la muestra y los anticuerpos detectores conjugados con PE. B) Ejemplo de las diferentes intensidades de fluorescencia que emiten las diferentes bolitas analizadas por citometría de flujo. Fuente: Catálogo del proveedor.

1. Las diferentes poblaciones de bolitas vienen por separado, por lo que se realizó una mezcla original con 4µl de cada tipo de bolita por muestra y se mezcló vigorosamente.
2. Se prepararon tantos tubos como muestras de sobrenadante y se añadieron 50 µl de cada una en su tubo correspondiente.
3. Se repartieron 24 µl de la mezcla de bolitas y 15 µl de PE a cada tubo y se incubó durante 3h a RT (temperatura ambiente) en oscuridad.
4. Se realizó un lavado directamente en el tubo con 500 µl de buffer de lavado (presente en el kit) a 200g durante 5 minutos.
5. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las muestras en tampón de lavado para ser analizadas en el citómetro.

Además el kit viene provisto de un control que siempre se ha de usar antes de procesar las muestras para calibrar la plantilla (Fig. 9):

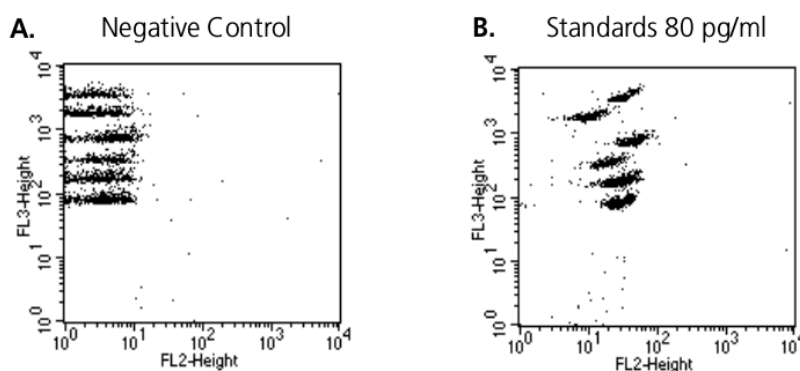


Figura 9. Ejemplo de datos obtenidos con el citómetro para control negativo y muestras estándar de concentración conocida (80pg/ml) de cada citoquina. Fuente: Catálogo del proveedor

3.13 Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Para determinar la expresión por parte de las MSC de ciertas moléculas inmunomoduladoras se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello se aisló primero el RNA de las MSC y luego se retrotranscribió a cDNA, que se usó como patrón para la reacción de PCR.

3.13.1 Aislamiento de RNA

1. Se despegaron 10^6 células de cada placa de cultivo mediante tripsina-EDTA como se ha descrito anteriormente para el pase o bien por raspado sobre placa fría. Se recogieron en un tubo que se centrifugó a 300g y se eliminó el sobrenadante.
2. El lisado de células se realizó mediante la adición de RNA Bee (Amsbio), usando 1 ml por cada 10^6 células y pipeteando para conseguir la lisis de las mismas.

3. Para la separación se añadieron 200 μ l de cloroformo por cada ml de RNA Bee utilizado y se agitó vigorosamente para homogeneizar, dejando reposar durante 5 minutos en hielo. Transcurrido el tiempo de reposo, se centrifugaron las muestras a 12000g durante 15 minutos a 4°C.
4. Se recogió la fase acuosa superior donde quedó retenido el RNA y se transfirió a un tubo limpio, al cual se añadieron 500 μ l de isopropanol para precipitar el ácido nucleico. La muestra se dejó reposar durante 10 minutos a RT y se centrifugó a 12000g durante 5 minutos a 4°C.
5. El pellet se lavó con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de RNA Bee usado, agitando para despegar el pellet del tubo y se centrifugó a 11000g 5 minutos a 4°C.
6. Se eliminó el sobrenadante y la muestra se dejó reposar para evaporar todo el etanol durante 15 minutos con el tubo boca abajo sobre un papel de filtro y 5 minutos más a 56°C. El RNA aislado se solubilizó en agua DEPC (agua tratada con dietil pirocarbonato para eliminar las RNAsas).
7. La concentración y pureza de la muestra de RNA se determinó con un espectrofotómetro (NanoDrop). Alternativamente también se usó el kit de aislamiento de RNA, NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.13.2 Reacción de la retrotranscriptasa inversa

El RNA se transcribió a cDNA mediante el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Se hizo una mezcla de 10 μ l por reacción con la transcriptasa inversa (50U/reacción), los dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato, 4mM concentración final), los oligonucleótidos (hexámeros al azar), el inhibidor de RNAsas y el tampón de reacción. A todo ello se añadió la misma cantidad de RNA (10 μ l) hasta un máximo de 5 μ g por reacción. Siguiendo las instrucciones del proveedor se sometió a las muestras a los siguientes cambios de temperatura mediante un termociclador: 25°C – 10 minutos; 37°C – 120 minutos; 85 °C – 10 minutos; 4°C -- ∞ .

La concentración y pureza de la muestra de RNA se determinó con un espectrofotómetro (NanoDrop) y se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.13.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Para llevar a cabo la PCR se usó el kit Suprem NZYtaq DNA polymerase (Nzytech). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l y con las concentraciones recomendadas por el proveedor, ligeramente modificadas: MgCl₂ (2,5 mM), dNTPs (0,5 mM), Oligonucleótidos (0,8 μ M), Buffer de reacción 10x, Muestra de cDNA (1 μ g), Polimerasa (2,5 U/reacción), Agua libre de nucleasas (hasta 20 μ l). Se realizó un primer proceso de desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C, anillamiento y extensión a 72°C (consultar tiempos y temperatura de anillamientos en Tabla 3). Por último se realizó un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72°C.

El diseño de los oligonucleótidos se realizó tomando como patrón las correspondientes secuencias de referencia para el mRNA humano del Gene Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Para el diseño de oligonucleótidos,

el análisis de autoanillamiento y anillamiento cruzado, y para el análisis de complementariedad de las secuencias con la base de datos de mRNA se usaron los siguientes programas:

- Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research – <http://primer3.ut.ee/>)
- Primer Blast (NIH - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)

mRNA	Oligonucleótidos	bp	T ^a	T ^o	Ciclos	Referencia
IL-1 β	F 5'-GAAGCTGATGGCCCTAAACA-3' R 5'-TCTTTCAACACGCAGGACAG-3'	500	62°C	1'	35	NM_000576.2
IL-4	F 5' GCAAATCGACACCTATTAATGG 3' R 5' AATATTCAGCTGGAACACTTTG 3'	437 y 485	59°C	1'	35	(Kwon y cols., 2002)
IL-6	F 5'-CTCCTTCTCCACAAGCGCCTT-3' R 5'-GGCAAGTCTCCTCATTGAATC-3'	329	60°C	1'	35	(Sempere y cols., 2014)
IL-8	F 5'-TCTGCAGCTCTGTGIGAAGGTG-3' R 5'-CCCTCTTCAAAAACCTTCTCCAC-3'	241	59°C	1'	35	(Sempere y cols., 2014)
IL-10	F 5'-CTTTAAGGGTTACCTGGGTG-3' R 5'-GAAATCGATGACAGCGCCGTA-3'	170	60°C	1'	35	(Sempere y cols., 2014)
IL-12b	F2 5' ATGCCGTTCACAAGCTCAAG 3' R 5' TGGGTCTATTCCGTTGTGTC 3'	430	60°C	1'	35	NM_002187.2
IL-13	F 5'-GTTTTCCAGCTTGCATGTCC-3' R 5'-CCAAGAAGAAGTGTGCCTGA-3'	502	59°C	1'	35	NM_002188.2
IL-17	F 5'-AGGAATCACAATCCCACGAA-3' R 5'-TCCGAAATGAGGCTGTCTTT-3'	499	59°C	1'	35	NM_002190.2
IL-18	F 5'-GCATCAACTTTGTGGCAATG-3' R 5'-CCCCCAATTCATCCTCTTTT-3'	516	60°C	2'	35	NM_001562.3
IL-32	F 5'-ATGCACCAGGCCATAGAAAAG-3' R 5'-TTGGGGTTCAGAGCACTTCT-3'	504	60°C	2'	35	NM_001012631.1
CCL2	F 5'-GCCTCCAGCATGAAAAGTCTC-3' R 5'-GCAATTTCCCAAGTCTCTG-3'	520	60°C	2'	35	NM_002982.3
CCL3	F 5'-CCTTTCTTGGCTCTGCTGAC-3' R 5'-TTTCTGGACCCACTCCTCAC-3'	303	61°C	1'	35	NM_002983.2
CCL4	F 5'-CCAAACCAAAAGAAGCAAGC-3' R 5'-TGCAACAGCAGAGAAACAGTG-3'	325	61°C	1'	35	NM_002984.3
COX-2 (PTGS2)	F 5'-GGTTGCTGGTGGTAGGAATG-3' R 5'-CGGGAAGAAGTTCATTGAT-3'	498	60°C	2'	35	NM_000963.3
IFN- γ	F 5'-GCGAAAAAGGAGTCAGATGC-3' R 5'-GTTGGCCCTGAGATAAAGC-3'	311	60°C	1'	35	NM_000619.2
TFG- β 1	F 5' TGACAGCAGGGATAACACACT 3' R 5' GTAGGGGCAGGGCCCGAGGCA 3'	310	60°C	1'	35	(Saito y cols., 1993)
TGF- β 2	F 5' CCCACATCTCCTGCTAATGT 3' R 5' GCTGAGTGTCTGAACTCCAT 3'	245	60°C	1'	35	(Saito y cols., 1993)
VEGF-A	F 5' CTACCTCCACCATGCCAAGT 3' R 5' GCAGTAGCTGCGCTGATAGA 3'	109	60°C	1'	35	(Ito y cols., 2007)

Tabla 3. Relación de oligonucleótidos utilizados en las PCR, temperaturas y tiempos de anillamiento. Bp: pares de bases; T^a: temperatura de anillamiento; T^o: tiempo de extensión

El producto de la PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó en un transiluminador. Para comprobar el tamaño de los productos de reacción se utilizó un marcador de peso molecular. La determinación semicuantitativa se realizó por densitometría usando el programa Image J (imagej.nih.gov/ij/) (Schneider y cols., 2012).

3.14 Grupos experimentales

3.14.1 Trasplante de riesgo normal

Como receptores se utilizaron 36 conejos NZW, machos de 3 kg de peso y más de 3 meses de edad. Como donantes se utilizaron 18 conejos Black Fox, machos de 2,5 kg y más de 3 meses de edad. Todos los conejos receptores fueron sometidos a un trasplante corneal completo o queratoplastia penetrante (PK) en el ojo izquierdo, en el que sustituyó la parte central de la córnea receptora por la correspondiente córnea donante. Inmediatamente después se les inyectó MSC o vehículo de forma intraestromal alrededor del injerto. Se dividieron los conejos en 4 grupos (n=9) dependiendo del tipo de agente inyectado:

- **Control.** Se administraron 300 µl de HBSS (solución salina balanceada de Hanks, Gibco).
- **hAD-MSC.** Se administraron 2×10^6 AD-MSC humanas en 300 µl de HBSS.
- **hAD-MSC estimuladas.** Se administraron 2×10^6 hAD-MSC humanas estimuladas en 300 µl de HBSS.
- **rbAD-MSC.** Se les administraron 2×10^6 AD-MSC de conejo en 300 µl de HBSS.

3.14.1.1 Procedimiento quirúrgico y preparación de células para el tratamiento

Anestesia. Todos los animales fueron anestesiados mediante el siguiente protocolo para las cirugías y para la retirada de puntos:

1. Los conejos fueron sedados con una mezcla de medetomidina/ketamina (0,15mg/kg y 10mg/kg) administrada por vía intramuscular (IM).
2. Tras esperar 10 minutos, se administraron 5mg/kg de tramadol y 1mg/kg de midazolam IM.
3. Se introdujo un catéter intravenoso de 23G por la vena marginal auricular para la administración de suero salino fisiológico intravenoso a dosis de mantenimiento (10 ml/kg/h) durante toda la cirugía. También se aplicó calor mediante una manta de agua y oxígeno al 75% a libre disposición mediante una máquina anestésica (Primus, Dräger). De esta forma se mantuvo la temperatura e hidratación de los animales durante el procedimiento, así como una correcta oxigenación.
4. Para la mayoría de los conejos esta pauta fue suficiente para mantener el plano anestésico. En algunos casos los conejos fueron inducidos con propofol (5mg/kg en bolo) e intubados intratraquealmente para mantener el plano anestésico con Isoflurano inhalatorio al 1,2-2%.

Procedimiento quirúrgico: Queratoplastia penetrante

1. Un botón corneal del conejo donante fue extraído con ayuda de un Punch Barron (Altomed) de 7mm de diámetro y conservado en suero salino fisiológico.
2. El lecho en la córnea del receptor se realizó con ayuda de un trépano de vacío Hessburg-Barron (Altomed) de 6,5 mm de diámetro.
3. La queratoplastia se llevó a cabo colocando el botón corneal donante encajado sobre el lecho corneal del receptor. Para la unión se realizaron 16 puntos discontinuos con sutura de nylon de 10/0 (Alcon).

El tratamiento postoperatorio fue el siguiente: Tramadol 5 mg/kg/12h + Colirio 0,6% gentamicina 1-2 gotas/12h, durante 14 días.

Los puntos fueron retirados bajo anestesia a los 14 días con ayuda de unas pinzas y una aguja de 23G.

Preparación de las células para el trasplante in vivo

Las AD-MSc tanto de conejo como humanas en fase 3 fueron trispsinizadas. Un pequeño porcentaje de células se tiñeron con Azul Tripán para determinar su viabilidad y el resto se incubó con una solución fluorescente de dialquilcarbocianina (Vybrant CM-DiI, Molecular Probes) a 1:200 en PBS durante 15 minutos a 37°C. La dialquilcarbocianina tiñe las membranas intracitoplasmáticas (las de los orgánulos) en rojo fluorescente, de manera que al recuperar el tejido inoculado, las células puedan ser observadas por microscopía de fluorescencia sobre los cortes. Las células fueron posteriormente lavadas 3 veces con PBS mediante centrifugación a 300g a 4 °C 5 minutos para eliminar los restos de colorante, y resuspendidas en HBSS para su inoculación.

3.14.2 Trasplante de alto riesgo

Como receptores se utilizaron 16 conejos NZW, machos de 3 kg de peso y más de 3 meses de edad. Como donantes se utilizaron 8 conejos NZW, machos de 2,5 kg y más de 3 meses de edad.

Todos los conejos receptores fueron sometidos a una prevascularización corneal del ojo izquierdo 2 semanas antes del trasplante: Se indujo una prevascularización corneal mediante la aplicación de una doble sutura continua y concéntrica con seda virgen azul 8/0 (Ethicon). La sutura se mantuvo durante 14 días, hasta que al menos 3 cuartos del perímetro de la córnea presentó neovascularización. Posteriormente, estos conejos fueron sometidos a una queratoplastia penetrante en el ojo izquierdo mediante el mismo protocolo anestésico, quirúrgico, postquirúrgico y de retirada de puntos descrito para el trasplante de riesgo normal. Las células también fueron preparadas de la misma forma. Se realizaron 4 inyecciones intravenosas de MSC o vehículo a través de la vena marginal auricular a lo largo del estudio. Estas administraciones se realizaron en los días -7, 0, 3 y 14-15, siendo el día 0 el día del trasplante y el 14-15 el de la retirada de puntos (Fig. 10). Se dividieron los conejos en 2 grupos dependiendo del tipo de agente inyectado:

- **Control.** Se administró 1ml de HBSS.
- **rbAD-MSc.** Se administraron 2×10^6 rbAD-MSc en 1ml de HBSS.



Figura 10. Línea temporal de los experimentos de alto riesgo

3.14.3 Evaluación clínica

La evolución clínica fue realizada por varios Médicos Residentes del servicio de oftalmología del Hospital Universitario Ramón y Cajal con ayuda de una lámpara de hendidura portátil. Estos observadores ciegos determinaron el Índice de Rechazo (RI) de los trasplantes 2-3 veces por semana durante el tiempo de seguimiento de los casos (8 semanas o hasta el rechazo). El RI se estableció atendiendo a 3 criterios que fueron evaluados del 0-4 basados en publicaciones previas (Shi y cols., 2006), (Tabla 4). Se estableció como momento del rechazo un RI mayor o igual a 6 obtenido sumando las puntuaciones de los tres criterios, o cuando la opacidad superó los 3 puntos.

Transparencia/Opacidad	0	Córnea transparente
	1	Opacidad ligera
	2	Opacidad pero con imagen clara de estructuras de cámara anterior
	3	Opacidad avanzada con imagen no clara de estructuras de cámara anterior
Edema	4	Córnea opaca sin imagen de estructuras de cámara anterior
	0	Sin edema estromal o epitelial
	1	Ligero engrosamiento estromal
	2	Edema estromal difuso
	3	Edema estromal difuso con edema microquístico epitelial
Neovascularización	4	Queratopatía bullosa
	0	Sin vascularización
	1	Vascularización en un cuadrante
	2	Vascularización en dos cuadrantes
	3	Vascularización en tres cuadrantes
4	Vascularización en cuatro cuadrantes	

Tabla 4. La puntuación de las diferentes variables que componen el índice de rechazo (RI) se realizó siguiendo las indicaciones de la presente tabla derivadas de las publicadas por Shi y cols., 2006 (Shi y cols., 2006).

3.15 Estudio histopatológico de las córneas

Además de la valoración clínica de las corneas in vivo, se realizó una valoración histopatológica del edema, la neovascularización y la infiltración corneal. También se determinó la presencia de las AD-MSc inyectadas. Para ello los conejos fueron sacrificados como se ha indicado en el apartado 3.1.2.2. Se extrajeron las córneas de todos los conejos, y los pulmones en el caso de los animales inoculados intravenosamente. El edema corneal se determinó midiendo el grosor de la córnea en su zona más ancha con ayuda del programa de procesamiento de imagen ImageJ (U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). Así mismo se valoró cualitativamente la presencia de neovasos en las preparaciones histológicas. El estudio histológico de la infiltración se realizó por medio de técnicas de inmunohistoquímica descritas más abajo.

Inclusión en parafina. El tejido fue fijado en 10% de formol durante 24 horas y embebido en parafina mediante la deshidratación en etanol a creciente concentración (70°,80°,96°,100°x2, 5 minutos en cada solución), xileno (x2) y parafina (x2). El tejido se mantuvo en cada solución durante 1 hora.

Tinción con Hematoxilina Eosina. Los bloques de parafina se cortaron con un microtomo (Leica) en preparaciones de 3 µm de grosor. Se hidrataron las preparaciones mediante el pase por xileno (10 minutos) y alcoholes decrecientes (100°x2, 96°, 80°, 70°, 5 minutos en cada solución). Se tiñeron las muestras con Hematoxilina de Harris durante 20 segundos, se lavaron con agua corriente y se tiñeron con eosina 1 minuto para después ser deshidratadas de forma inversa al primer paso. Se montaron las preparaciones con DPX y se examinaron al microscopio óptico.

3.16 Estudio inmunohistoquímico de la infiltración leucocitaria de la córnea

Para determinar el nivel de infiltración inflamatoria de las córneas se realizó una tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo antipanleucocitario que tiñe todas las células del linaje linfoide.

1. Los cortes de 3 µm de tejido desparafinado e hidratado fueron incubados con una solución de H₂O₂ (0,3% en TBS, tris buffer salino) durante 15 minutos para bloquear la peroxidasa endógena.
2. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos con TBS.
3. Las muestras fueron incubadas con una solución de bloqueo consistente en TBS + 10% de suero de caballo (Gibco) + 1% BSA (Sigma) durante 1,5 horas a RT.
4. Seguidamente se incubaron los cortes con el anticuerpo primario anti conejo CD45 (Antigenix America, Tabla 1) hecho en ratón y diluido 1:10 en TBS + 1% BSA durante 1 hora a RT.
5. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos con TBS.
6. Se incubaron las muestras con un anticuerpo secundario anti ratón biotinilado (Vector Labs) hecho en caballo y diluido 1:100 en TBS + 1%BSA durante 1 hora.
7. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos con TBS.
8. Se incubaron las muestras con el complejo avidina-peroxidasa para lo que se usó el kit ABC (Vector

- Labs) media hora a RT.
9. Se hizo 1 lavado de 5 minutos con TBS y otro de 10 minutos con Tris-clorhídrico 0,05M a pH 7,6.
 10. Se reveló mediante la aplicación de diaminobencidina (Invitrogen) durante 15 minutos a RT con o sin CoCl_2 como intensificador.
 11. Las muestras fueron deshidratadas y montadas con DPX.

Se realizó un recuento de células teñidas positivamente en 3 campos al azar con el objetivo de 40x.

3.17 Leucograma

En el grupo experimental de alto riesgo se realizaron determinaciones periódicas del Leucograma. Para ello se extrajo sangre de la vena marginal de la oreja una vez por semana y se determinaron los porcentajes de leucocitos, linfocitos, neutrófilos y monocitos. Para la determinación de los porcentajes y el recuento celular, se enviaron las muestras de sangre a DLV Laboratorio Veterinario (Diag-Labor-Vet, España SLU) donde usaron un sistema Sysmex XT 2000 de Roche. El recuento leucocitario se realizó mediante observación bajo el microscopio óptico.

Se estableció un rango de normalidad de dichos parámetros para nuestra población de conejos, ya que las condiciones de estrés derivadas de la estabulación pueden alterar los parámetros normales. Para ello se utilizaron los datos de los análisis realizados el día 14 antes del trasplante, justo antes de realizar la prevascularización y por tanto con los conejos completamente sanos. El rango de normalidad se estableció con la media ± 2 desviaciones típicas.

3.18 Estadística

Para la comparación entre la supervivencia del trasplante de los diferentes grupos se utilizó un método no paramétrico, el de Kaplan-Meier y el test de Chi-cuadrado. Para comparar el RI entre grupos se utilizó el método de Mann-Whitney para comparar 2 variables y el de Kruskal-Wallis para comparar variables múltiples. El test de t de Student se utilizó para realizar las comparativas entre grupos para el grosor corneal, el infiltrado leucocitario y los leucogramas. También se utilizó este test para la comparación entre los diferentes grupos en las citometrías, las PCR, en la determinación de la secreción de citoquinas y en los cocultivos. Los estudios de bioestadística se realizaron con ayuda del Servicio de Bioestadística del Hospital Universitario La Paz.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización de marcadores de superficie y multipotencia de las AD-MSK

Como se define en los estándares de la International Society for Cellular Therapy (ISCT) (Dominici y cols., 2006), tanto las AD-MSK de origen humano como cunícola mostraron una fuerte adhesión al plástico de cultivo y un aspecto típico fibroblástico en los diferentes pases. Además, las hAD-MSK mostraron capacidad de diferenciación a linajes osteo, condro y adipogénico (Fig. 11).

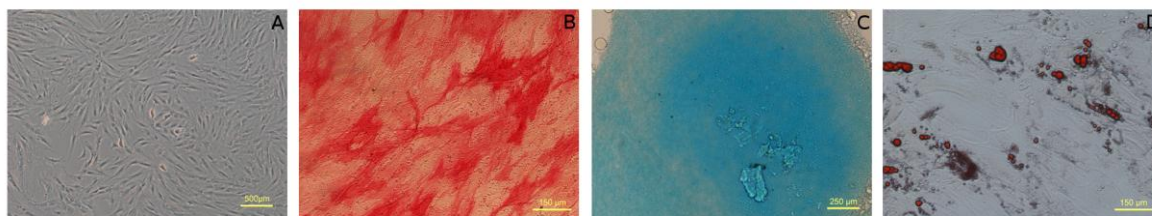


Figura 11. Las AD-MSK mostraron adhesión al plástico de cultivo, forma ahusada y poder de diferenciación. A) Imagen de contraste de fase de hAD-MSK en cultivo. B) Tinción con Fast Red para la Fosfatasa Alcalina indicativo de diferenciación osteogénica. C) Tinción con azul alcian indicativa de diferenciación condrogénica. D) Tinción con Oil Red indicativa de diferenciación adipogénica.

Las principales moléculas de superficie que determinan el fenotipo mesenquimal fueron analizadas por citometría de flujo. Las hAD-MSK fueron positivas para los marcadores CD90 ($98,7\% \pm 0,9$) y CD105 ($97,5\% \pm 1,6$) y negativas para CD45 ($1,0\% \pm 0,5$) y CD14 ($2,7\% \pm 3,6$). El porcentaje de células positivas para CD34 fue de un $74,7\% \pm 15,0$ de acuerdo con la variabilidad que estas células expresan para este marcador dependiendo del pase y las condiciones de cultivo (Mitchell y cols., 2006, Bourin y cols., 2013) (Fig. 12).

Asimismo, las rbAD-MSK mostraron ser negativas para CD45 ($0,2\% \pm 0,06$), CD90 ($0,6\% \pm 0,2$) y CD105 ($0,58\% \pm 0,56$) y variabilidad en la expresión de CD44 ($45,4\% \pm 21,2$), de acuerdo con los estudios publicados hasta el momento (Bakhtina y cols., 2014, Lee y cols., 2014b). La expresión de CD34 fue variable ($47,8\% \pm 3,6$) como ocurre en las de humano (Fig. 12).

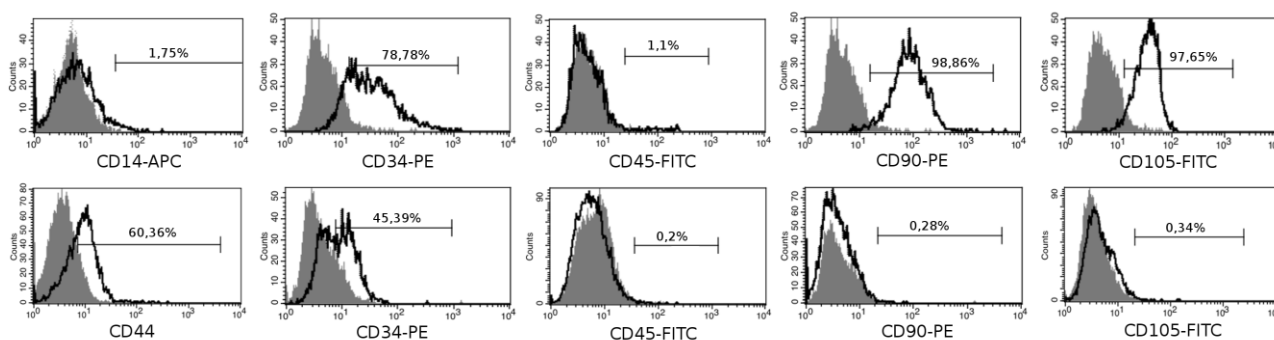


Figura 12. Caracterización de superficie de las AD-MSK por citometría de flujo. En la fila superior se observa la caracterización de las hAD-MSK y en la inferior a la de las rbAD-MSK. Se muestra un experimento representativo de 4 experimentos independientes.

4.2 Efecto del tratamiento con AD-MSC en trasplantes de riesgo normal

4.2.1 Resultado clínico del trasplante y seguimiento

En nuestro primer diseño experimental usamos conejos de 2 razas diferentes para mimetizar las condiciones del trasplante en la clínica humana, en la que no se tienen en cuenta compatibilidades de HLA. Denominamos a estos trasplantes de riesgo normal ya que los conejos receptores no tenían ninguna patología previa.

En la figura 13 se puede ver la curva de supervivencia del trasplante de los diferentes grupos experimentales. Cinco de los 9 trasplantes del grupo control superaron las 8 semanas del período de seguimiento sin ser rechazados con una supervivencia del 55%. La media de tiempo que permanecieron los injertos sin ser rechazados fue de $44,9 \pm 6,5$ días, siendo la mediana y la moda 60 días, que en nuestro modelo experimental equivale a no rechazar. Los injertos de los animales que recibieron tratamiento intraestromal con hAD-MSC, tanto estimuladas como sin estimular, no consiguieron sobrevivir las 8 semanas de seguimiento. En el grupo de hAD-MSC sin estimular el tiempo medio de supervivencia fue de $29,3 \pm 4,8$ siendo su mediana de 26 días, mientras que en los grupos que fueron tratados con hAD-MSC activadas el tiempo medio de supervivencia fue de $21,8 \pm 3,3$ días, siendo su mediana de 19. A pesar de encontrar una tendencia de las células estimuladas a empeorar el resultado del trasplante, no se encontraron diferencias significativas entre los 2 grupos tratados con células humanas. Sin embargo sí podemos afirmar que estos grupos empeoraron significativamente el resultado del trasplante cuando los comparamos con los resultados del grupo control sin tratar ($p \leq 0,05$).

Se estableció un cuarto grupo experimental en el que se trató a los conejos con células AD-MSC de conejo NZW, de la misma raza que el receptor, para minimizar los posibles problemas inmunológicos derivados del xenotrasplante que pudieran estar afectando a los resultados. Sorprendentemente, tampoco en este grupo experimental hubo supervivencia del trasplante a 8 semanas (Fig. 13). El tiempo medio de rechazo fue de $26,5 \pm 4,5$ días con una mediana de 22. Esta medida no mostró diferencias significativas con el tiempo de rechazo de los grupos tratados con AD-MSC humanas, pero sí fue significativamente menor que el tiempo de los controles.

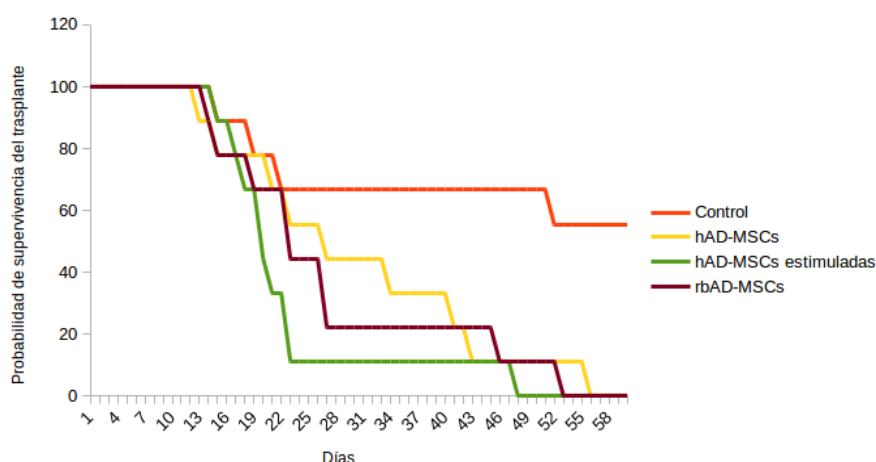


Figura 13. Curva de Kaplan-Maier de supervivencia del injerto en trasplante de riesgo normal. La gráfica muestra la probabilidad de supervivencia del injerto en los diferentes grupos con respecto a los días posttrasplante.

En la Figura 14 podemos ver el índice de rechazo de los diferentes grupos a lo largo del tiempo. En estas gráficas se aprecia el número de animales con los puntos de rechazo que tienen en cada momento. En la primera semana todos los grupos experimentan un aumento en el RI causado por la cirugía. Asimismo se aprecia un ligero empeoramiento alrededor del día 14 debido a la retirada de los puntos, sin embargo este hecho no es determinante en el resultado último del trasplante. Al realizar el estudio estadístico, se encontró que el día 11 de seguimiento manifestaba un carácter predictivo con respecto al rechazo o no a las 8 semanas. De manera que los animales cuyo RI era igual a 0 en día 11 postrasplante, no rechazaron el injerto.

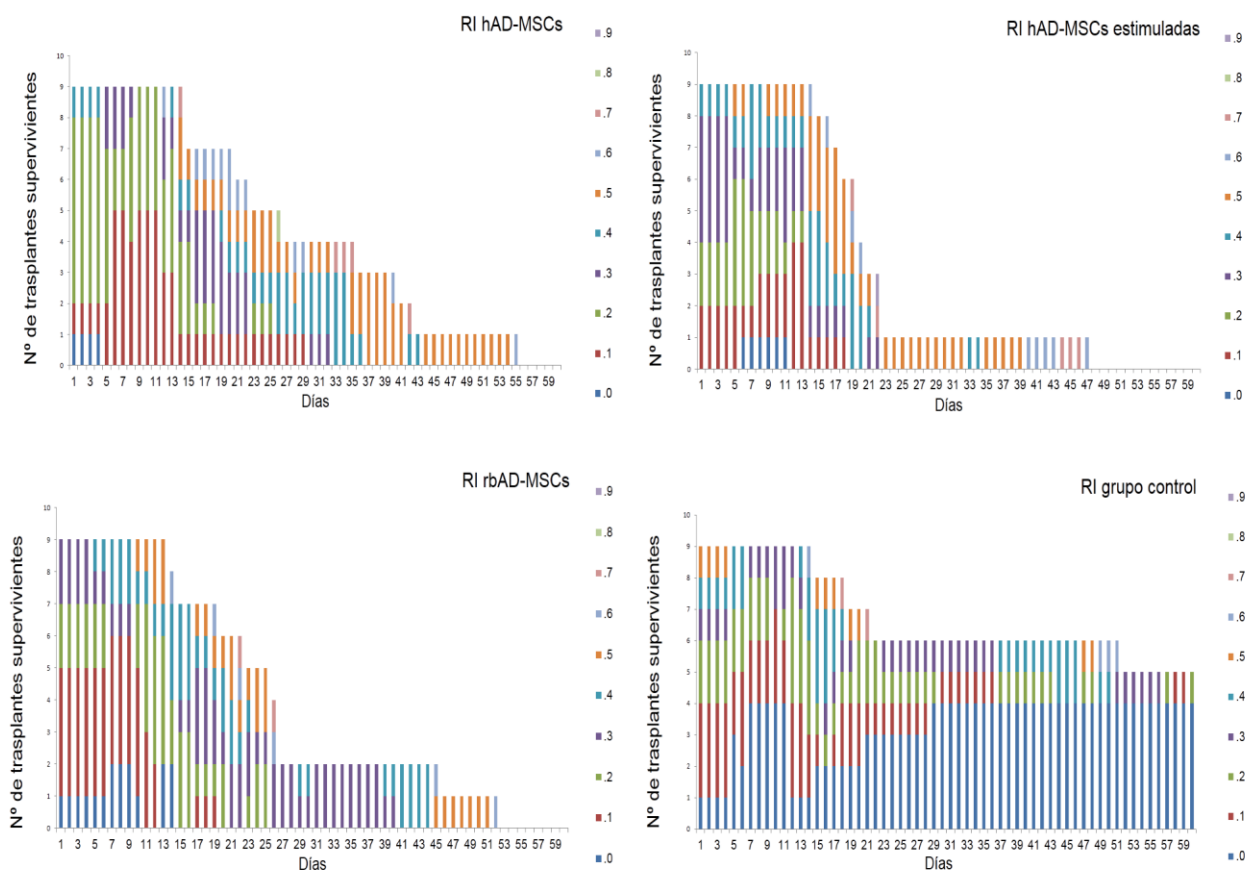


Figura 14. Se muestra el número de trasplantes de cada grupo que posee un RI determinado con respecto al tiempo. La escala de la izquierda indica el número de trasplantes, mientras que la escala de colores de la derecha representa el valor del RI. El acumulado en cada barra corresponde al número de trasplantes supervivientes en cada momento. RI: índice de rechazo.

En la Figura 15 aparecen las imágenes representativas de los diferentes grupos en las que se aprecian las diferencias clínicas **de opacidad, edema y vascularización corneales**. En la primera semana tras la cirugía, todos los grupos mostraron la misma progresión debido al daño quirúrgico, sin embargo a partir del día 7 se aprecia una tendencia a la opacificación, al edema y a la neovascularización en los grupos tratados con células con respecto al control.

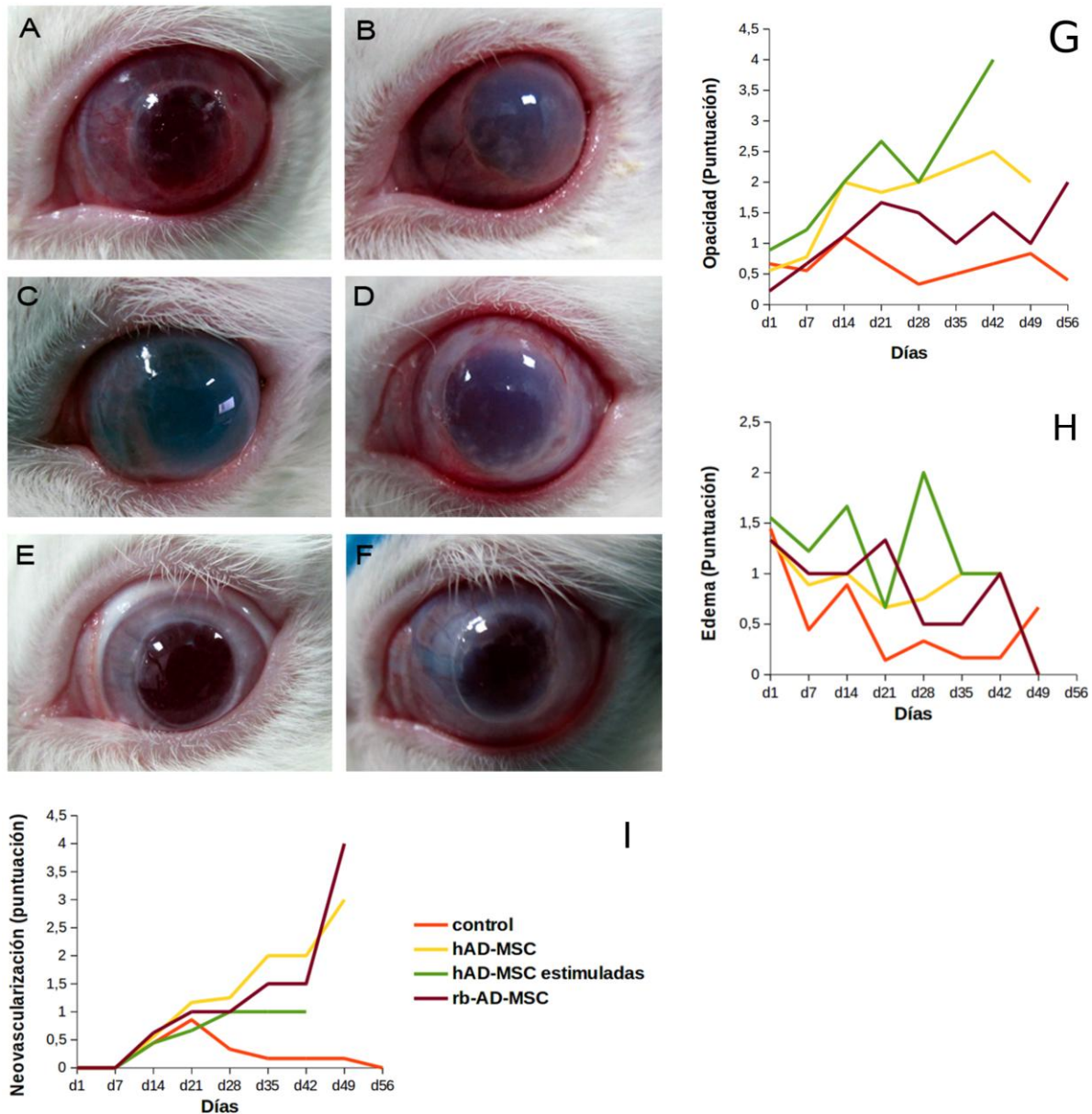


Figura 15. Progresión clínica de las córneas trasplantadas. A-D Imagen representativa de cada grupo. A) Control. B) hAD-MSC. C) hAD-MSC estimuladas. D) rbAD-MSC. E) cornea no rechazada a 60 días de un conejo del grupo control. F) córnea aún sin rechazar de un conejo tratado con rbAD-MSC. G-I) Representación gráfica de la evolución de los parámetros que componen el RI a lo largo del tiempo: G) opacidad, H) edema, I) neovascularización.

4.2.2 Estudio anatomopatológico

Se estudió la **presencia de las células** inyectadas en el estroma corneal de los conejos receptores. Se encontraron células en todos los animales tratados. Esto demuestra que las células, independientemente de su origen o tratamiento in vitro, sobrevivieron hasta el momento del sacrificio del animal. El tiempo máximo de supervivencia en cada grupo fue de 55 días en el grupo al que se le administraron hAD-MSC sin estimular, 47 en el de hAD-MSC estimuladas y 52 en el caso de tratamiento con células de conejo. Las AD-MSC se hallaron alrededor del anillo corneal receptor en los lugares de inoculación. Estas células teñidas con CM-Dil se dispusieron de forma estratificada en el estroma corneal y no migraron (Fig. 16).

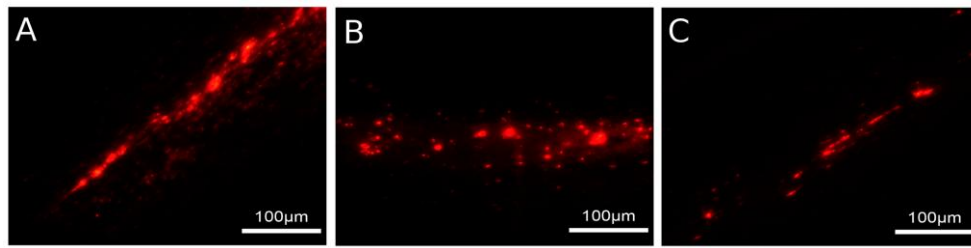


Figura 16. Las AD-MSC teñidas con CM-DiI permanecen en el estroma hasta el momento del rechazo. A) hAD-MSC. B) hAD-MSC estimuladas. C) rbAD-MSC.

Todos los grupos tratados con células mostraron un **grosor corneal** significativamente mayor que el grupo control, en el que los animales que no rechazaron mostraron un grosor normal (Fig. 17). En la inspección de las preparaciones histológicas se detectó una mayor **infiltración inflamatoria** en los grupos tratados con hAD-MSC que en los tratados con células de conejo y los controles no tratados. Esta infiltración estaba principalmente compuesta por células mononucleares y eosinófilos. La tinción con el anticuerpo panleucocitario CD45 y el recuento de células positivas demostró que efectivamente la respuesta inflamatoria era significativamente mayor en los conejos tratados con células humanas que en el resto de grupos (Fig.17). Por último se investigó la presencia de **neovasos** en las córneas receptoras, ya que es un factor de riesgo para el rechazo. Los grupos que demostraron una mayor presencia de formación de nueva vasculatura fueron los tratados, hallándose menos vasculatura en el grupo control en el que los conejos no mostraron apenas presencia de neovasos en las córneas con injertos no rechazados (Fig.17).

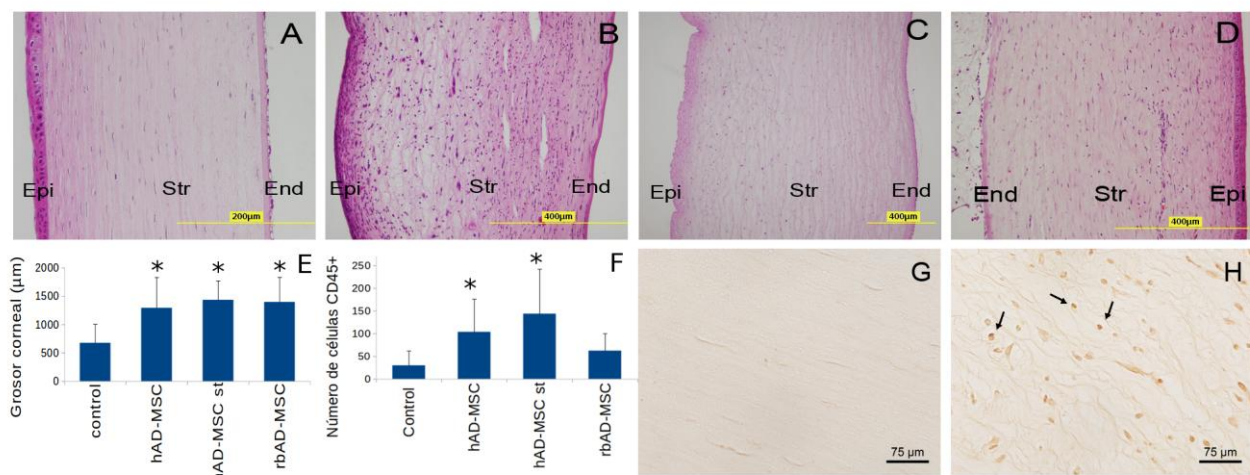


Figura 17. El grosor corneal y la infiltración inflamatoria fue mayor en los grupos tratados con células. A-D: Tinción con hematoxilina y eosina de cortes de histológicos de las córneas, A) Control, B) hAD-MSC, C) hAD-MSC estimuladas, D) rbAD-MSC. E) Cuantificación del grosor corneal debido al edema. F) Nivel de infiltración inflamatoria mostrado como número de células CD45+. G) Imagen representativa de una tinción negativa para CD45 en una córnea del grupo control. H) Imagen representativa de una tinción positiva para CD45 marcadas en marrón (flechas), en una córnea tratada con AD-MSC. Epi: epitelio; Str: estroma; End: endotelio; (* $p \leq 0,05$).

4.3 Caracterización inmunofenotípica de las hAD-MSc

Ante los sorprendentes resultados de la experimentación in vivo y el empeoramiento sufrido en los grupos tratados con células, sobre todo en los que las MSC fueron de origen humano, se realizaron una serie de experimentos para determinar el fenotipo inmunomodulador de dichas células.

4.3.1 Presencia de moléculas coestimuladoras y del complejo mayor de histocompatibilidad II

Según la literatura, las MSC tienen capacidad inmunoreguladora gracias, entre otras cosas, a la baja presencia de moléculas coestimuladoras en su superficie (Menard y cols., 2013). Estas moléculas son necesarias para que algunas células del sistema inmune como las células presentadoras de antígeno (APC) activen los linfocitos T. En particular, se estudió la presencia de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86.

Se estudió la presencia de moléculas coseñalizadoras en las células de conejo mostrándose éstas negativas para CD86 y positivas en cantidad variable para CD40 ($44,4\% \pm 13,8$) y CD80 ($64,1\% \pm 25,3$) (Fig. 18).

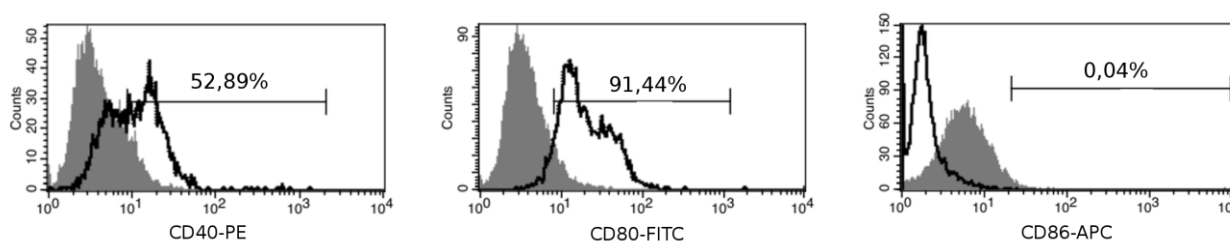


Figura 18. Expresión en las rbAD-MSc de moléculas coseñalizadoras. Se muestra un experimento representativo de 4 independientes

Así mismo, las hAD-MSc resultaron ser positivas para CD40 y CD80 en un $92,5\% \pm 8,9$ y $95,5\% \pm 3,6$ respectivamente, mientras que fueron totalmente negativas para CD86. Tras la estimulación con IFN- γ y TNF- α , se produjo un ligero aumento en el porcentaje de células que expresan CD40 ($99,0 \pm 0,2$) (Fig. 189). Este aumento resultó más significativo al tener en cuenta la intensidad media de fluorescencia entre las células sin estimular y las estimuladas ($5,9 \pm 1,6$ veces mayor, $p \leq 0,1$), lo que significa que la estimulación aumenta la cantidad de moléculas CD40 expresadas por célula (Fig. 19E).

Se analizó la presencia de las moléculas de superficie HLA-ABC y HLA-DR (moléculas del MHC tipo I y II respectivamente). Se ha visto que las MSC tienen una expresión baja de moléculas del MHC II. En nuestro caso, las células humanas demostraron un porcentaje bajo de HLA-DR ($2,4\% \pm 2,8$) que no se vio incrementado cuando las células fueron estimuladas. Como era de esperar, las células presentaron positividad para las moléculas del MHC de tipo I, HLA-ABC ($75\% \pm 18,4$), mostrando un mayor porcentaje de células positivas cuando fueron estimuladas ($86,3 \pm 13,3$) (Fig. 19) y una mayor intensidad de señal ($1,4 \pm 0,03$ veces mayor) (Fig. 19E).

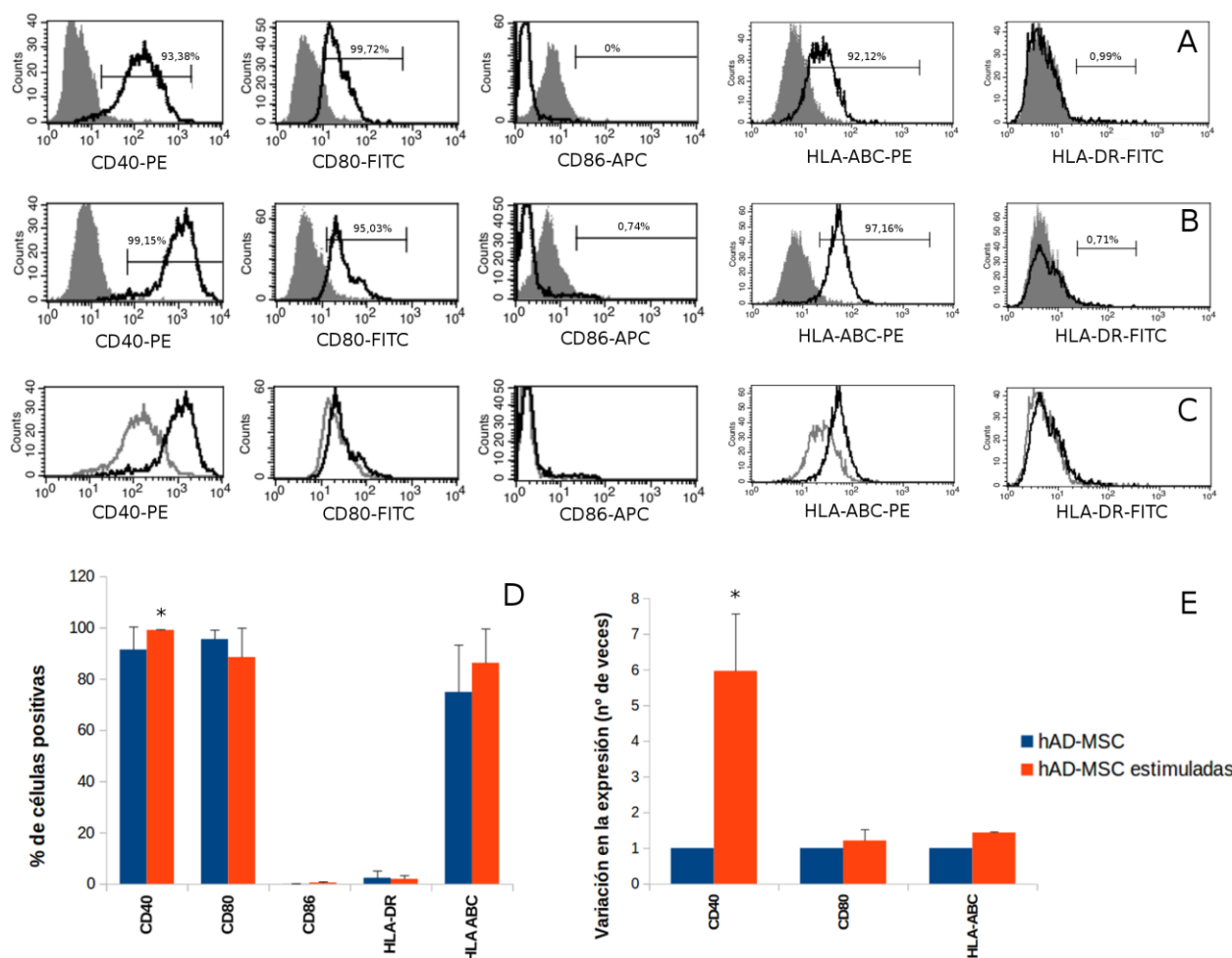


Figura 19. La citometría de flujo mostró que las hAD-MSC expresaron moléculas coseñalizadoras CD40 y CD80 y del MHC de tipo I. A) Marcaje en hAD-MSC (el control de Isotipo está representado por la curva gris rellena). B) Marcaje en hAD-MSC estimuladas (el control de Isotipo está representado por la curva gris rellena). C) comparación entre las células humanas estimuladas (línea negra) y sin estimular (línea gris). Se muestra un experimento representativo de 4 independientes. D) Porcentaje de células positivas para cada marcador. E) Comparativa de la intensidad media de fluorescencia para las células estimuladas sin estimular. Las células sin estimular están normalizadas a 1. (* $p \leq 0,1$).

4.3.2 Expresión de genes relacionados con la inmunomodulación

Se realizó una primera aproximación para determinar la expresión por parte de las hAD-MSC estimuladas y sin estimular de genes que codifican para citoquinas de interés. Para ello se analizó la expresión de mRNA en las células de 4 donantes, en los que se pudo demostrar que las hAD-MSC codifican para citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β , IL-18, IL-32, CCL2 y CCL3, proangiogénicas como VEGF-A, TGF- β 1 y TGF- β 2, y antiinflamatorias como COX2. Sin embargo no se encontró una expresión de genes para citoquinas antiinflamatorias como IL-4 o IL-10. Cuando las células fueron estimuladas, los niveles de mRNA de IL-1 β , IL-8, IL18, IL32, CCL2, CCL3 y CCL4 aumentaron siendo significativos para IL-8 y CCL3 ($p \leq 0,05$). Esto demuestra que las hAD-MSC pueden expresar de forma constitutiva un genotipo proinflamatorio que puede ser

aún más acusado cuando las células están expuestas a factores como IFN- γ y TNF- α en un ambiente inflamatorio (Fig. 20).

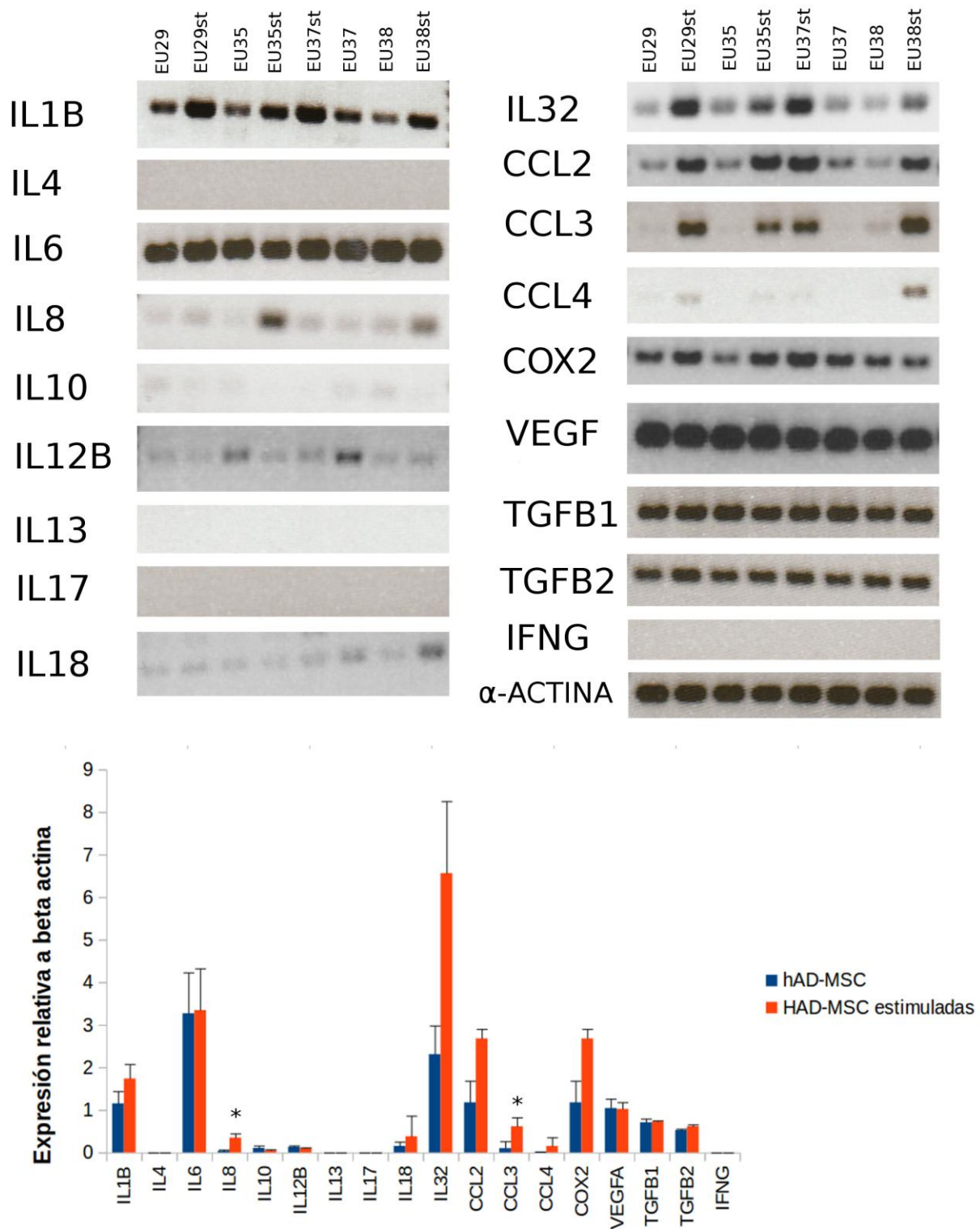


Figura 20. Las hAD-MSC expresan de forma constitutiva mRNA para citoquinas proinflamatorias que aumentan al ser estimuladas con IFN- γ y TNF- α . A) bandas indicativas de la presencia del producto de la PCR para los diferentes genes estudiados. B) Representación gráfica de la expresión de mRNA para los diferentes

genes de interés. Comparativa de la expresión en células estimuladas y sin estimular. (* $p \leq 0,05$).

4.3.3 Producción de moléculas inmunomoduladoras

Además de la primera aproximación de la expresión de mRNA, se determinó la producción de citoquinas en el sobrenadante de cultivos de hAD-MSC. Tanto en el cultivo normal como en el de células estimuladas se detectaron niveles altos de las citoquinas IL-6 e IL-8. La estimulación con IFN- γ y TNF- α aumentó la producción de estas citoquinas proinflamatorias. La producción de ambas fue muy variable de unos donantes a otros. Ambos cultivos fueron negativos para el resto de citoquinas estudiadas, tanto para las proinflamatorias (TNF α , IL-1 β e IL-12) como para la antiinflamatoria IL-10 (Fig. 21). Además se estudió la producción por parte de las AD-MSC de moléculas relacionadas con la inmunomodulación. Numerosos estudios han relacionado la secreción por parte de las MSC de moléculas como idamina 2 3-dioxigenasa (IDO) y óxido nítrico (NO) con sus propiedades inmunosupresoras. En nuestro estudio, tanto las hAD-MSC como las rbAD-MSC mostraron una producción constitutiva de ambas moléculas. La citometría de flujo demostró que un 77,02% \pm 3,2 de la población de rbAD-MSC expresa IDO, mientras que en las células humanas la producción fue de un 79,4% \pm 14,3. Esta positividad se vio aumentada significativamente al estimular las células con IFN- γ y TNF- α hasta llegar a un 93,6% \pm 3,9 de células positivas ($p \leq 0,05$) (Fig. 21). En cuanto al NO, las células humanas mostraron una alta producción con un 96,3% \pm 3,9 de células productoras y un 96,1% \pm 4,8 tras las estimulación. Las células de conejo mostraron una positividad del 97% \pm 3,5 para la producción de NO (Fig. 21).

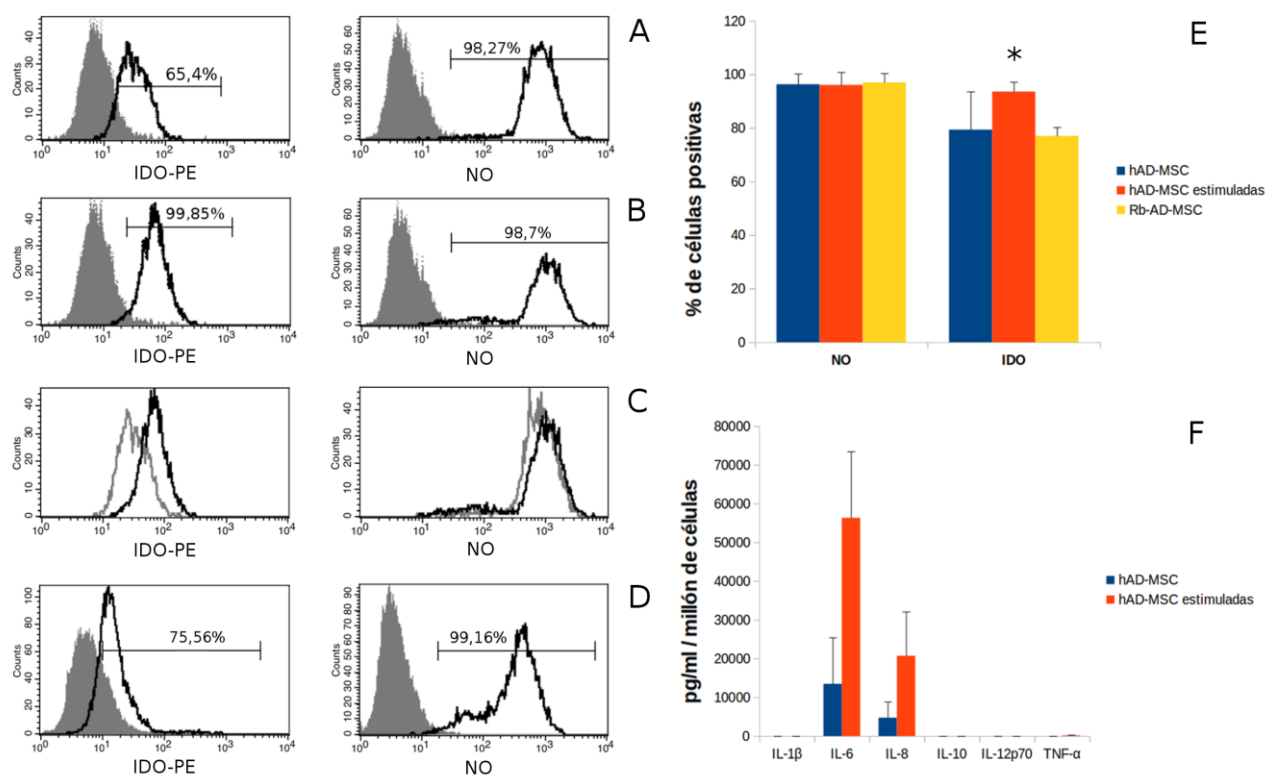


Figura 21. Producción de moléculas inmunoregulatoras en las AD-MSC. A-D: citometría de flujo para IDO y NO, se muestra un experimento representativo de 4 independientes. A) hAD-MSC (control de isotipo representado por la curva gris rellena). B) hAD-MSC estimuladas (control de isotipo representado por la curva gris rellena). C) Comparativa entre las hAD-MSC estimuladas (línea negra) y sin estimular (línea gris). D) rbAD-MSC (control de

isotipo representado por la curva gris rellena). E) representación gráfica del porcentaje de células positivas para IDO y NO. F) Producción de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de hAD-MSC. (* $p \leq 0,05$)

4.4. Efecto de las hAD-MSC sobre la proliferación de linfocitos T

Para demostrar que las hAD-MSC del presente estudio son capaces de estimular la proliferación de linfocitos T, se realizaron cocultivos con ratios MSC:linfocitos T de 1:1, 1:10 y 1:100. Los monocultivos de linfocitos T sin activar (control negativo) murieron durante el tiempo de seguimiento del experimento como era de esperar, mientras que el control positivo de linfocitos T activados con anti CD3/CD28 mostraron una proliferación del 37,1% ($\pm 1,3$). Las MSC demostraron su capacidad para mantener el cultivo y la proliferación de linfocitos T cuando fueron cocultivadas con éstos, aumentando esta capacidad a medida que aumentó el ratio de cultivo pero sin llegar en ningún momento al porcentaje de proliferación del control positivo. La estimulación de las MSC con IFN- γ y TNF- α no provocó diferencias significativas con respecto a los cocultivos con células no estimuladas ni con el control positivo debido a las altas desviaciones estándar. Sólo los cultivos con un ratio 1:10 mostraron una proliferación significativamente más baja que el control positivo. Los cocultivos con linfocitos T estimulados con anti CD3/CD28 mostraron una proliferación significativamente mayor que el control positivo en el caso de ratios 1:1, siendo esta proliferación solo ligeramente mayor en el caso de ratios 1:10 e igual al control positivo en el caso de ratios 1:100. Por último, en los cocultivos en los que ambas poblaciones celulares fueron estimuladas, la proliferación fue muy similar a la presentada por el control positivo. De nuevo, la proliferación en los cultivos de ratio 1:10 fue significativamente menor a la del control positivo (Fig. 22).

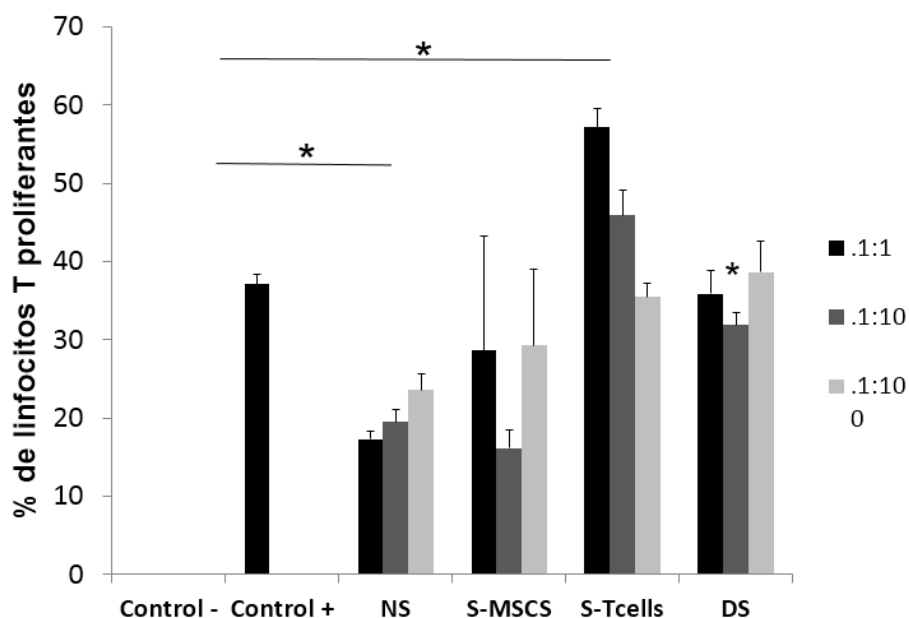


Figura 22. Porcentaje de linfocitos T proliferantes al ser cocultivados con las hAD-MSC. NS: grupo sin estimular; S-MSC: grupo con las MSC estimuladas; S-Tcells: grupo con las estimuladas; DS: grupo con ambas poblaciones estimuladas. (* $p \leq 0,05$)

4.5. Efecto de las rbAD-MSc en trasplante corneal de alto riesgo

Ante los resultados inesperados en el modelo de trasplante corneal de riesgo normal se planteó la posibilidad de usar un abordaje sistémico para el tratamiento de patologías de alto riesgo. Los buenos resultados en los controles de riesgo normal podrían estar enmascarando el efecto de las AD-MSc. Por otro lado, el trasplante corneal de riesgo normal en humanos tiene una tasa de éxito del 80% a 5 años, por lo que es en caso de alto riesgo (rechazo previo o córneas muy vascularizadas) donde el posible uso de la terapia celular inmunomoduladora sería aplicable. Por otro lado, en el modelo anterior la inyección intraestromal pareció contribuir al daño quirúrgico. Por último, el ambiente local extremadamente inflamatorio podría estar produciendo alteraciones en las propiedades inmunomoduladoras de las AD-MSc al ser inoculadas en el mismo lugar del daño. Por todo ello, la inoculación de las AD-MSc se realizó esta vez por vía intravenosa. Las células que demostraron generar una menor inflamación en el modelo anterior fueron las de conejo, por lo que para esta serie de experimentos únicamente se utilizaron las rbAD-MSc.

El modelo de alto riesgo consistió en la generación de neovascularización corneal previa al trasplante, mimetizando de esta manera las condiciones que se dan en algunos casos de alto riesgo de rechazo en trasplante de córnea en humanos. La neovascularización se realizó mediante la sutura de la córnea en su zona periférica. Al cabo de 2 semanas, al menos 3 cuartos de la misma presentaban vasos de nueva formación (Fig. 23).

4.5.1 Resultado clínico del trasplante y seguimiento

En el grupo control, sólo 3 de 8 injertos superaron el período de seguimiento de 8 semanas, con una supervivencia del 37.5%, significativamente menor que en el modelo de riesgo normal. Sin embargo en el grupo tratado ningún injerto llegó sin ser rechazado a las 8 semanas, con un tiempo de supervivencia medio de $19,6 \pm 2,8$ días y una mediana de 17 días (Fig. 23).

En la Fig. 23 se puede analizar la evolución del RI en los 2 grupos de estudio. Al igual que en el modelo anterior, la técnica quirúrgica afectó a ambos grupos por igual no existiendo diferencias significativas en los RI en la primera semana. Además, las inyecciones intravenosas de células no supusieron un aumento del daño en ningún caso. Sin embargo, la retirada de puntos sí supuso un empeoramiento similar en ambos grupos. A lo largo del tiempo de seguimiento, tanto la opacidad como el edema y la vascularización fueron mayores en los animales tratados con células que en los animales control (Fig. 23G)

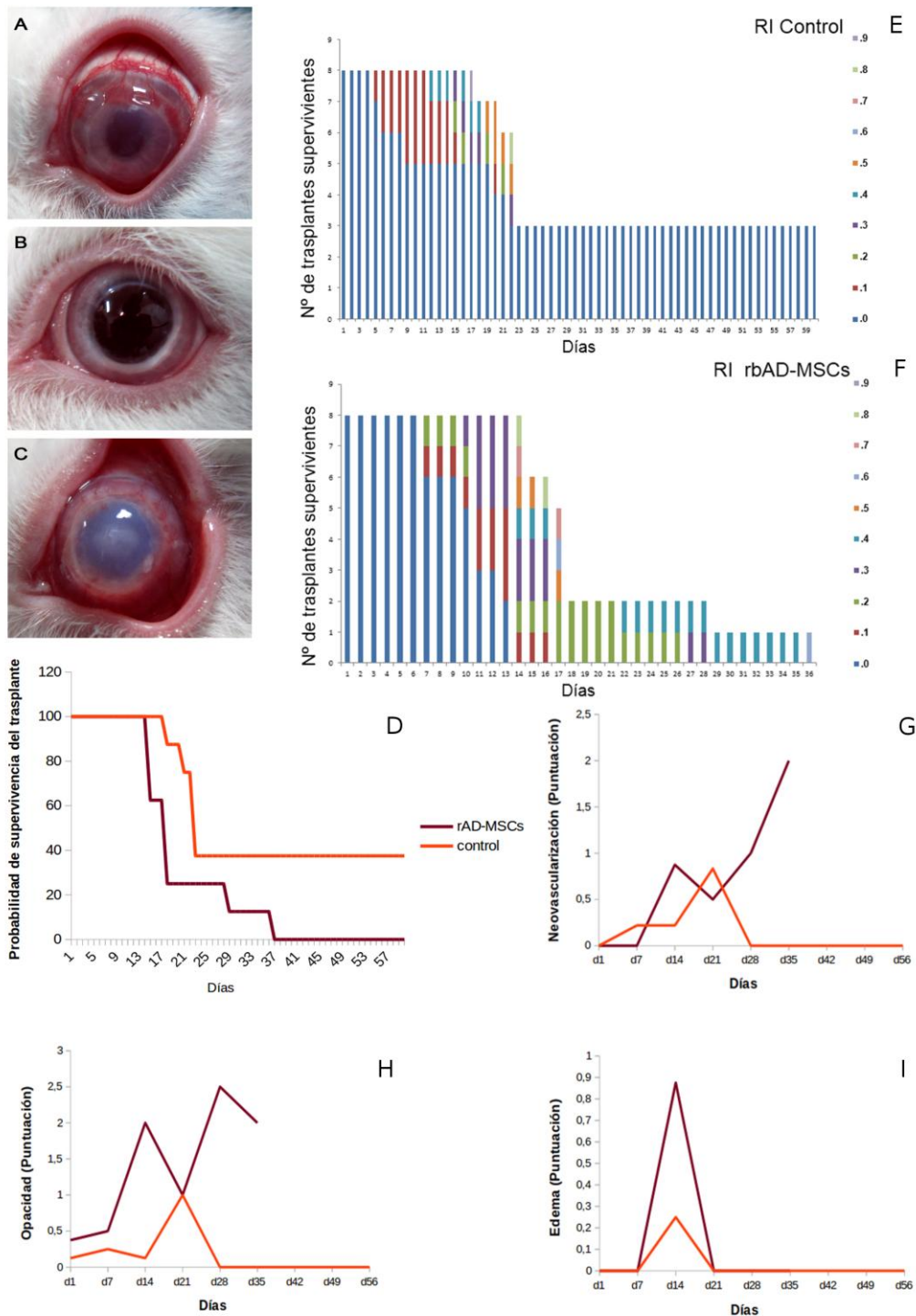


Figura 23. Supervivencia y evolución clínica de los grupos. A) Imagen representativa del proceso de prevascularización a día 0 (día de la cirugía). B) Imagen representativa de un conejo del grupo control a 60 días sin rechazar. C) Imagen representativa de una córnea rechazada del grupo tratado. D) Curva de Kaplan-Meier que indica la probabilidad de supervivencia del trasplante con respecto al tiempo. E y F) Índices de rechazo según el tiempo en los diferentes grupos. G-I) Evolución de los parámetros clínicos con respecto al tiempo: G) neovascularización, H) opacidad, I) edema.

4.5.2 Estudio anatomopatológico

El grosor corneal y por tanto el **edema**, fue estadísticamente inferior en las córneas control que en las tratadas. Sin embargo, la **infiltración** inflamatoria determinada por el conteo de células positivas para CD45 no demostró diferencias estadísticamente significativas entre los 2 grupos, pese a presentar una tendencia a la mayor infiltración de las córneas tratadas. La **neovascularización**, aunque presente en ambos grupos, fue menor en el grupo control (Fig. 24). Así mismo, se estudió la **presencia de rbAD-MSc** en el grupo tratado y no se hallaron células en ninguna de las 8 córneas estudiadas. Sin embargo sí se encontraron células en los pulmones de los conejos tratados. Estas células tuvieron una supervivencia mínima igual al número máximo de días que se mantuvo el injerto más longevo (36 días) (Fig. 24).

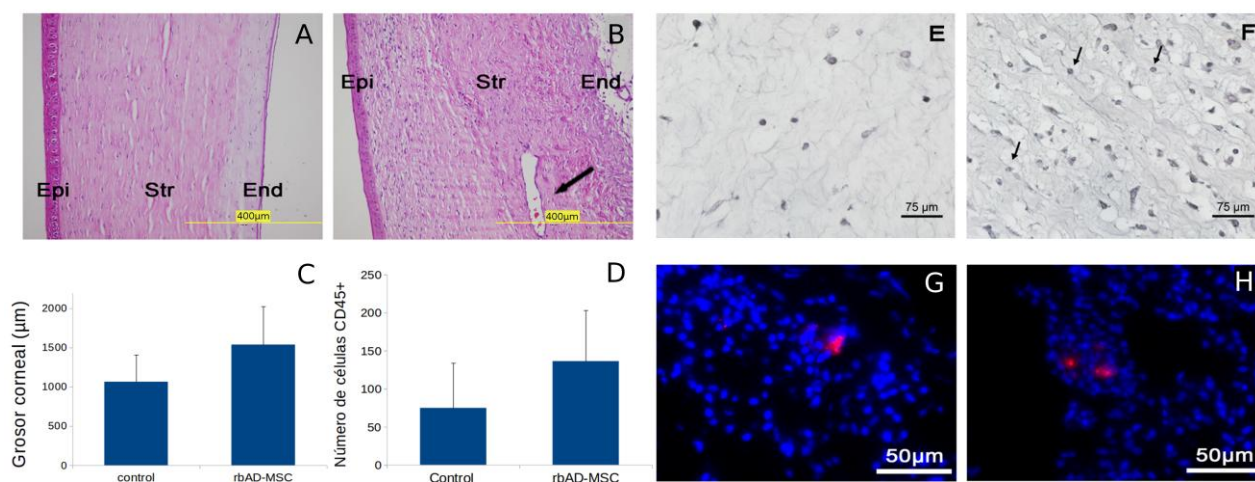


Figura 24. El grosor corneal y la infiltración inflamatoria fueron mayores en los grupos tratados con células. A-B: Tinción con hematoxilina y eosina de cortes histológicos de las córneas, A) Control, B) rbAD-MSc. C) cuantificación del grosor corneal debido al edema. D) Nivel de infiltración inflamatoria mostrado como células CD45+. E) Imagen representativa de una tinción para CD45 en una córnea del grupo control. F) Imagen representativa de una tinción para CD45 en una córnea tratada con AD-MSc. Células positivas marcadas en negro (flechas). G-H) Presencia de rb-AD-MSc atrapadas en pulmón. En la imagen se aprecian MSC que fueron marcadas con CM-DiI en rojo previa a la inyección y que quedan atrapadas en el pulmón y mantienen hasta el momento del rechazo. El resto de las células del pulmón del conejo se ha marcado en azul con DAPI. Epi: epitelio; Str: estroma; End: endotelio. (* $p \leq 0,05$)

4.5.3 Estudio del leucograma

Para determinar el efecto de la inoculación intravenosa de las MSC sobre la movilización de células del sistema inmune a sangre periférica, se realizó un recuento leucocitario de forma semanal en ambos grupos. Ni los leucocitos totales, ni las poblaciones estudiadas (neutrófilos, monocitos y linfocitos), fueron hallados fuera de los límites de normalidad en ninguno de los animales a lo largo del período de seguimiento, por lo que la inyección intravenosa de las células no parece afectar de forma sistémica a la concentración de leucocitos en sangre (Fig. 25).

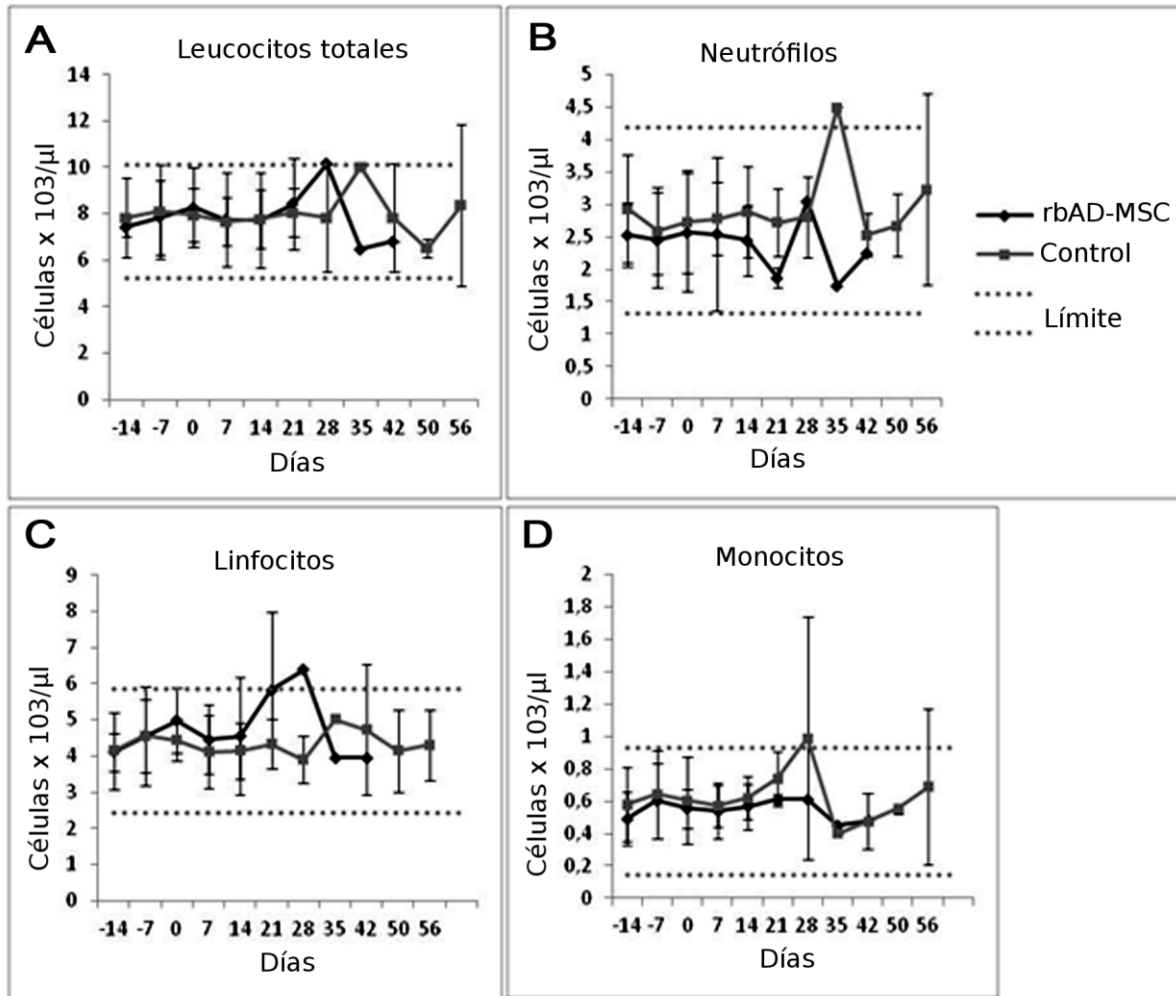


Figura 25. Leucograma de los conejos tratados con inyección intravenosa de rbAD-MSC frente a los no tratados. Las líneas punteadas horizontales representan los límites de normalidad, establecidos para nuestros animales como la media \pm 2 desviaciones estándar de las medidas de los animales sanos. No se encontraron diferencias significativas.

5. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, diferentes estudios han puesto de manifiesto la utilidad de las MSC no solo en el campo de la medicina regenerativa, si no en el de la inmunoregulación. El uso de estas células ha sido estudiado en inflamación, en autoinmunidad y en trasplante como ya se indicó en la introducción. La córnea es un tejido ideal para estudiar el efecto local que tienen estas células en trasplante, ya que es de fácil acceso y es considerado un tejido inmunoprivilegiado por lo que no es necesaria la inmunoterapia sistémica.

En estudios previos del grupo se demostró que las hAD-MSc introducidas en un bolsillo del estroma corneal de conejo en un ambiente no inflamatorio son capaces de integrarse y diferenciarse a queratocitos sin producir rechazo (Arnalich-Montiel y cols., 2008). Siguiendo este planteamiento, en el presente trabajo se ha estudiado el efecto de AD-MSc xenogénicas y alogénicas en alotrasplante completo de córnea en conejos.

5.1. Caracterización de las AD-MSc

El tejido adiposo se ha establecido como una de las fuentes mejor consideradas para la obtención de MSC por su facilidad de obtención y su alto rendimiento. Desde el descubrimiento de estas células en el tejido adiposo (Hollenberg y cols., 1969), muchos han sido los estudios que han tratado de caracterizar las propiedades multipotentes y terapéuticas de esta población heterogénea (Zuk y cols., 2002). También han sido varios los estudios que han tratado de caracterizar citológicamente estas células, destacando el trabajo de la International Federation of Adipose Therapeutics (IFATS) que trata de sentar las bases para unos futuros estándares (Bourin y cols., 2013). La principal diferencia con las BM-MSc radica en la expresión de marcadores, y se ha consensuado que el inmunofenotipo para las AD-MSc humanas una vez cultivadas debería ser el siguiente:

- Principales marcadores positivos estables (>80% de la población): CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105.
- Principales marcadores positivos inestables (% variable de la población positiva según condiciones de cultivo y pase) : CD34
- Principales marcadores negativos estables (<2%): CD31, CD45, CD235a
- Otros marcadores positivos: CD10, CD26, CD36, CD49d, CD49e
- Otros marcadores negativos o de baja expresión: CD3, CD11b, CD49f, CD106, PODXL

Se recomienda el uso de al menos 2 marcadores positivos y 2 negativos (Bourin y cols., 2013). Además las células han de ser adherentes al plástico de cultivo y poseer capacidad de diferenciación osteo, condro y adipogénica in vitro como las derivadas de médula ósea.

Para validar nuestro protocolo de aislamiento y por tanto las muestras que usaríamos en el resto del estudio, se llevó a cabo la caracterización de las AD-MSc. Se caracterizaron muestras de 5 pacientes que se ajustaron a los estándares señalados siendo adherentes y derivables a los 3 linajes descritos (Fig. 11). Además, las células fueron positivas para CD105 y CD90 en más de un 97% y negativas para CD45 y CD14, mostrando una positividad intermedia para CD34 ($74,7 \pm 15,04$) (Fig. 12).

Como ya se ha comentado, la expresión de CD34 depende de las condiciones de cultivo y del número de duplicaciones de la población a partir del cultivo de la SVF, siendo positivo en las primeras duplicaciones y disminuyendo su expresión hasta desaparecer en pases avanzados (Mitchell y cols., 2006, Maumus y cols., 2011, Yoshimura y cols., 2006). Además, las MSC en el tejido adiposo in vivo y en la SVF son positivas para este marcador (Maumus y cols., 2011, Traktuev y cols., 2008). Un estudio reciente ha relacionado la expresión de CD34 en las AD-MSC con un estado multipotente más primitivo (Suga y cols., 2009). En ese estudio la población cultivada de AD-MSC-CD34+ presentó un tiempo de duplicación y una tendencia a la diferenciación menor, y una mayor capacidad de formación de colonias cuando se comparó con la población de AD-MSC CD34-. Por todo ello, el alto porcentaje de células D34+ en nuestra población puede estar indicando un fenotipo multipotente más parecido al que se encuentra en condiciones fisiológicas.

En cuanto a las MSC de conejo, solo algunos estudios muy recientes han comenzado a caracterizarlas. Estas células son negativas para la mayoría de marcadores mesenquimales clásicos como CD105 o CD90 (Fig. 12) y los únicos marcadores altamente expresados y comunes a las células humanas descritos hasta el momento son vimentina, actina muscular lisa alfa y CD44 (Lee y cols., 2014b, Bakhtina y cols., 2014). Las AD-MSC también expresan este último marcador, por lo que decidimos incluirlo en el estudio obteniendo positividad, aunque variable, para los diferentes conejos ($45,4 \pm 21,2$) (Fig. 12). La capacidad de adherencia al plástico y la morfología ahusada similar a la de las hAD-MSC, junto con el marcaje para CD44 y CD34 nos indican la naturaleza mesenquimal y pluripotente de estas células.

5.2 Propiedades inmunogénicas y proinflamatorias de las AD-MSC en la córnea

Las hAD-MSC utilizadas en el presente estudio expresan de forma constitutiva varias moléculas que se han relacionado directamente con su poder inmunosupresor in vitro e in vivo, como son: IDO (Krampera y cols., 2006, English y cols., 2007, Munn y cols., 2007, Spaggiari y cols., 2008, Ren y cols., 2009, Ge y cols., 2010), NO (Sato y cols., 2007, Ren y cols., 2009, Ren y cols., 2008, Schurgers y cols., 2010), IL-6 (Jiang y cols., 2005, Djouad y cols., 2007, Xu y cols., 2009a), TGF- β (Ryan y cols., 2007, English y cols., 2007) y COX2 (Spaggiari y cols., 2009, Spaggiari y cols., 2008, Yanez y cols., 2010). Algunas de ellas como IDO, IL-6 o COX2 aumentan su expresión al ser estimuladas con IFN- γ y TNF- α , de acuerdo con (Hemeda y cols., 2010). Asimismo, demostramos por primera vez que las AD-MSC de conejo producen de forma constitutiva tanto IDO como NO, al igual que sus homólogas humanas. Sin embargo, y en contra de lo esperado, la expresión de estas moléculas no ha resultado ser efectiva en la prevención del rechazo en el trasplante corneal. La aplicación periquirúrgica y local de las AD-MSC tanto de origen humano como cunícola en los estudios de bajo riesgo provocó de hecho un aumento en el rechazo del injerto. En un primer momento se podría pensar que este resultado negativo podría deberse al uso de células xenogénicas pero, salvo en la mayor infiltración experimentada por las córneas tratadas con células humanas frente a las de conejo, los signos de rechazo y las curvas de supervivencia en ambos casos fueron similares (Fig. 13-15). Por tanto, el aumento del rechazo está

directamente relacionado con el comportamiento de las AD-MSc y de su relación con un tejido que es constitutivamente inmunoprivilegiado, independientemente de su origen inter/intraespecífico.

La posterior caracterización de las hAD-MSc nos dio una pista de las diferentes formas en las que estas células y las moléculas que expresan provocan la ruptura de las características inmunoprivilegiadas inherentes a la córnea y que la diferencian de otros tipos de tejido. En resumen encontramos las siguientes particularidades:

- Aumento de la neovascularización
- Expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y de moléculas coseñalizadoras
- Expresión y producción de citoquinas proinflamatorias
- Incapacidad de inducir tolerancia
- Estimulación de Linfocitos T

5.2.1 Aumento de la neovascularización

La aparición de neovasos sanguíneos y linfáticos es una consecuencia normal del proceso quirúrgico incluso en trasplantes corneales de bajo riesgo (Maguire y cols., 1994, Dana y cols., 1995, Cursiefen y cols., 2002). Este proceso es reversible y los vasos suelen desaparecer a medida que el proceso inflamatorio disminuye, como se ha podido observar en algunos animales de los grupos control tanto de bajo como de alto riesgo de rechazo del presente estudio (Fig. 15 y 23). Sin embargo, en la mayoría de los animales tratados, la neovascularización persiste y supone un factor de riesgo para la supervivencia del trasplante. Esta es una de las causas de ruptura de la barrera inmunológica corneal, tanto aferente (llegada de células del sistema inmune) como eferente (salida de células presentadoras de antígeno hacia el tejido linfoide).

Varios estudios han señalado al VEGF-A como uno de los principales responsables del aumento de la hemangiogénesis en la córnea (Cursiefen y cols., 2004a, Cursiefen y cols., 2004b, Dohlman y cols., 2015). En estos trabajos, el uso de un inhibidor de VEGF-A y de animales mutantes que expresan sólo una isoforma de las tres que tiene este factor de crecimiento, disminuyó considerablemente la formación de neovasos sanguíneos y aumentó significativamente la supervivencia del trasplante corneal. Además, el VEGF-A es capaz de reclutar macrófagos que liberan a su vez VEGF-C y D que median la linfangiogénesis (Cursiefen y cols., 2004b). Por otro lado, la IL-8 es una de las moléculas más importantes en la quimiotaxis de células endoteliales y en la producción de neovasos. Esta citoquina presenta una actividad altamente proangiogénica cuando es inoculada en la córnea (Koch y cols., 1992, Strieter y cols., 1995, Arenberg y cols., 1997, Brat y cols., 2005). El uso de anticuerpos contra VEGF e IL-8 en la córnea inhiben completamente la angiogénesis inducida por TNF- α (Yoshida y cols., 1997) lo que refuerza la implicación de estas moléculas en el proceso. Las hAD-MSc utilizadas en este estudio expresan de forma constitutiva tanto VEGF-A como IL-8 (Figs. 20 y 21), así como otras citoquinas proangiogénicas como TGF β 1 y 2. Esto podría explicar en parte porqué los animales tratados con células presentaron una mayor tendencia a la neovascularización, con 3 ó 4 cuadrantes afectados en el 25% de los casos.

Esta cualidad proangiogénica de las MSC ya ha sido aprovechada con anterioridad en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la falta de flujo sanguíneo. Así, las MSC tanto de médula ósea (Tang y cols., 2004, Matsumoto y cols., 2005) como de tejido adiposo (Nakagami y cols., 2005, Nie y cols., 2011, Rigol y cols., 2014, Chen y cols., 2015, Park y cols., 2015) han demostrado un alto poder angiogénico y beneficioso en el tratamiento del infarto agudo de miocardio, de la isquemia y de traumatismos cutáneos en ensayos preclínicos. En estos estudios, la aplicación local de MSC aumentó la vasculatura y el flujo sanguíneo de la zona, correlacionada con un aumento en la producción de VEGF y de otros factores proangiogénicos como HGF, TGF- β o FGF.

Además, se ha relacionado la estimulación de AD-MSK con TNF- α con un aumento en la secreción de factores proangiogénicos como VEGF, IL-6, IL-8, TGF- β o HGF (Wang y cols., 2006, Zubkova y cols., 2015). En el presente estudio, la estimulación con TNF- α e IFN- γ aumentó considerablemente la producción de IL-6 e IL-8 a nivel traduccional (Fig. 21). Los resultados ligeramente peores de los grupos tratados con células estimuladas pueden estar relacionados con este aumento de la proangiogénesis mediada por el incremento en la secreción de IL-8 (Fig. 26).

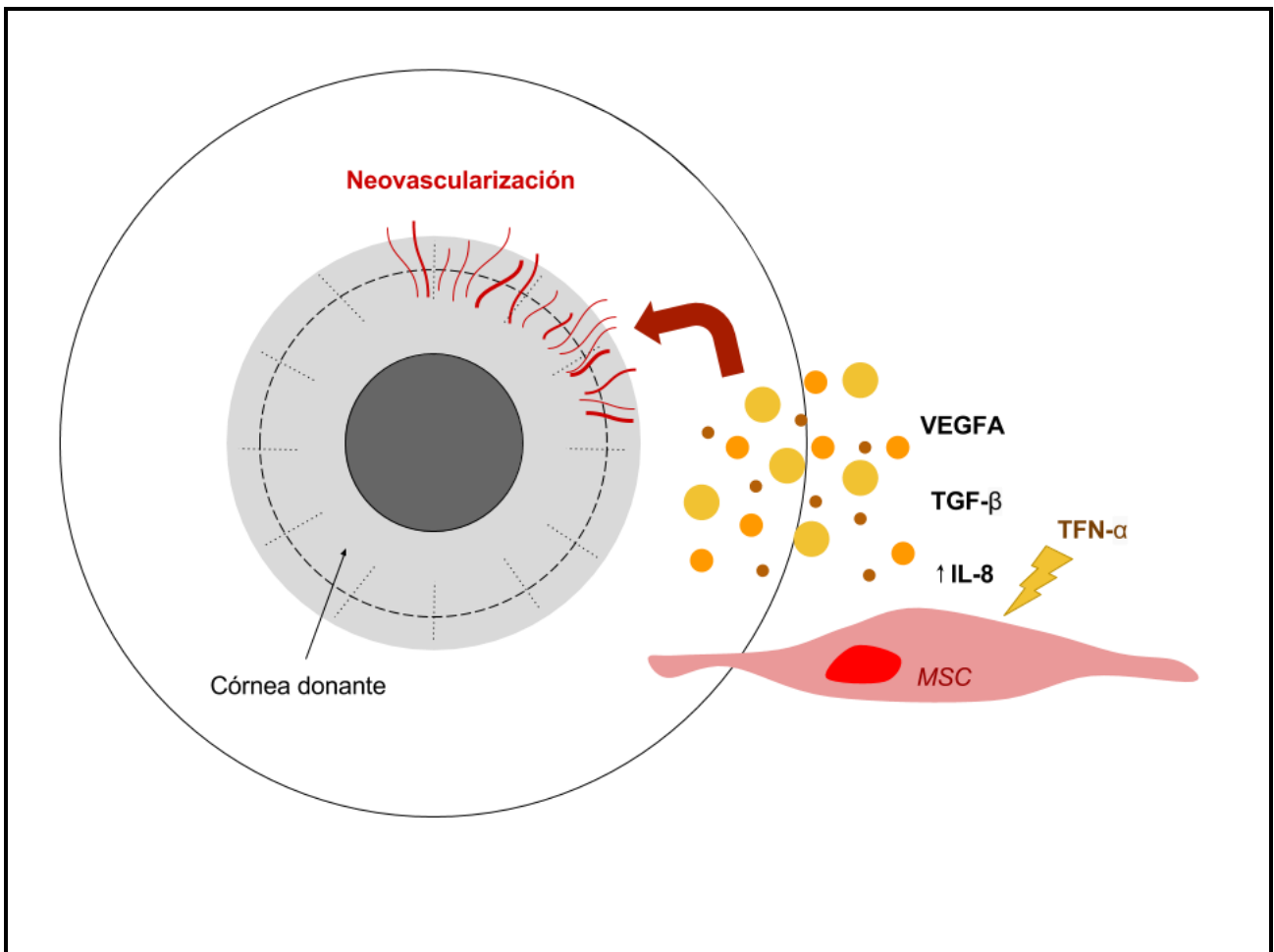


Figura 26. Neovascularización producida por las MSC. Los factores proangiogénicos VEGF-A, TGF- β e IL-8 expresados por las MSC darían lugar al aumento de neovascularización corneal encontrada en los animales tratados.

5.2.2 Expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y de moléculas coseñalizadoras

Todas las células del organismo expresan moléculas del MHC de tipo I que presentan antígenos intracelulares propios y extraños a los linfocitos T CD8+. Este proceso es necesario por dos razones. En primer lugar para la detección de células infectadas que no son presentadoras de antígenos (APC) profesionales y en segundo lugar para mantener la tolerancia central y periférica que hace que el sistema inmune no se ataque a sí mismo. Por otro lado, las moléculas del MHC de tipo II son expresadas únicamente por APC profesionales tales como células dendríticas, fagocitos, linfocitos B y tipos celulares relacionados con la tolerancia como las células del epitelio del timo o las células endoteliales. De acuerdo con numerosos estudios (Dominici y cols., 2006, McIntosh y cols., 2006, Stagg y cols., 2006, Lee y cols., 2014b, Jang y cols., 2014, Busser y cols., 2015), las MSC humanas de todos los donantes usados en esta tesis presentaron una alta positividad para HLA-ABC (MHC tipo I) y una muy baja positividad para HLA-DR (MHC tipo II). El porcentaje de células positivas para HLA-ABC aumentó ligeramente al ser estimuladas con IFN- γ y TNF- γ , pero no el HLA-DR (Fig. 19), como se ha descrito en algunos estudios previos (Tse y cols., 2003, Le Blanc y cols., 2003, Dominici y cols., 2006).

Lo que no es tan habitual en los estudios publicados de MSC es que dichas células presenten una alta positividad para las moléculas coseñalizadoras CD40 y CD80 como ocurre en nuestro caso (Fig. 19). De hecho, la no presencia de estas moléculas es una de las razones por las que estas células se consideran inmunoprivilegiadas (McIntosh y cols., 2006, Menard y cols., 2013), aunque algunos autores sí han reportado la expresión constitutiva de CD80 en BM-MSK de ratón (Krampera y cols., 2003, Stagg y cols., 2006). La acción de CD40, CD80 y CD86 junto con sus ligandos y contrareceptores, y en combinación con la formación del complejo MCH-antígeno-TCR, dan lugar a una fina regulación del sistema inmune en el que éste es capaz de distinguir lo propio de lo extraño, de tal manera que es necesario que haya una señal coestimuladora tras la formación del complejo MCH-antígeno-TCR entre una APC y un linfocito T para producir una activación de este último. De no darse dicha señal, el linfocito entra en anergia y es eliminado (Gimmi y cols., 1993, Noel y cols., 1996). La regulación de este sistema es muy compleja ya que la expresión de estos coseñalizadores aumenta y disminuye ante diferentes estímulos e incluso regulándose entre ellos (Foy y cols., 1996, Lenschow y cols., 1996). De esta manera, una APC forma un complejo MCH-antígeno-TCR con un linfocito. A su vez, la unión entre CD40 de la APC y el CD40L del linfocito T da lugar al aumento de la expresión de CD80 y/o CD86 en la primera, que al interactuar con su contrareceptor CD28 en linfocitos T dará lugar a la respuesta inflamatoria (Ranheim y cols., 1993, Caux y cols., 1994, Yang y cols., 1996). Además, la producción de anticuerpos específicos también está regulada por la relación entre linfocitos B y T a través de la vía de CD40 (Lederman y cols., 1992a, Lederman y cols., 1992b). Por tanto, está ampliamente aceptado que la unión de CD40 con su ligando CD40L (CD154) desencadena señales de activación en diferentes células del sistema inmune tales como la activación de isotipos de células B productoras de anticuerpos específicos, la activación de monocitos, o la activación y supervivencia de DCs (revisado por (Somoza y cols., 1995)y(Mackey y cols., 1998)). Esta activación de las DC desencadena la

producción de IL-12 y activa la respuesta Th1 y la producción de IFN- γ en linfocitos T (Macatonia y cols., 1995, Cella y cols., 1996). La respuesta citotóxica desencadenada por la interacción entre células B y linfocitos T también está mediada por la unión CD40-CD40L (Borrow y cols., 1996, Kelleher y cols., 2001).

En cuanto a la regulación de la vía de CD80/CD86 (también conocidos como B7.1 y B7.2), la variabilidad de receptores y de patrones de expresión en las diferentes células del sistema inmune hace compleja su explicación. En origen se pensaba que estas dos moléculas tenían roles similares en la activación linfocitaria a través del receptor activador CD28 (Revisado en (Lenschow y cols., 1996) que provocaba la secreción de IL-2 en el linfocito (Shapiro y cols., 1997). Sin embargo, tras el descubrimiento de un segundo y tercer receptores inhibidores CTLA4 y PD-L1, capaces de unirse a CD80 y CD86 (Brunet y cols., 1987, Dong y cols., 1999), el paradigma de la activación/inhibición de la respuesta inmune cambió (revisado en (Chen y cols., 2013). De esta manera, en un entorno inflamatorio normal, los linfocitos T expresan CD28 en un primer momento para activar la respuesta inmune, pero al cabo de unos días este receptor va desapareciendo y dando paso a la expresión de CTLA4, que al activar su vía daría lugar a la inhibición de dicha respuesta (Lenschow y cols., 1996, Chen y cols., 2013). Aunque se ha descrito una mayor tendencia de CD80 por unirse a CTLA4 y provocar su acúmulo en la sinapsis inmunológica y de CD86 por hacer lo mismo con CD28 (Linsley y cols., 1994, Pentcheva-Hoang y cols., 2004), otros estudios han demostrado que tanto CD80 como CD86 estimulan la proliferación de linfocitos T, la secreción de citoquinas proinflamatorias y la generación de células citotóxicas (Lanier y cols., 1995). Por último, la inhibición de ambas moléculas tiene un efecto sinérgico en la mejora de los resultados de trasplantes y enfermedades autoinmunes (Lenschow y cols., 1995, Webb y cols., 1996, Larsen y cols., 2005) por lo que ambas moléculas están implicadas de una u otra forma en la proinflamación y el rechazo. En general, el bloqueo de la vía de B7 en inflamación, autoinmunidad y trasplante se ha demostrado efectiva (Kirk y cols., 1997, Kremer y cols., 2003, Vincenti y cols., 2005, Vincenti, 2008). Actualmente derivados de CTLA4-Ig que bloquean esta vía están siendo utilizados en ensayos clínicos de trasplante renal (Rostaing y cols., 2013).

Por tanto, la expresión de las moléculas coseñaladoras CD40 y CD80 en nuestras células mesenquimales puede provocar un aumento de la respuesta inflamatoria al interactuar directamente con las células del sistema inmune en un ambiente inflamatorio. Sería necesario realizar experimentos *in vivo* más detallados para determinar cómo se puede estar produciendo esta interacción y qué células del sistema inmune mediarían la respuesta. Parece que lo más probable sea que estas células actúen como células presentadoras de antígenos a través de estos dos receptores. Así, la expresión de moléculas del MHC tipo I conjugadas con antígenos de la propia célula (xeno o alotrasplantada) junto con la expresión de CD40 podría dar lugar a un aumento de la respuesta inmune por vía directa. Algunos autores ya han demostrado la capacidad de las MSC de ratón y de humano para presentar antígenos extracelulares a través de moléculas del MHC tipo II a poblaciones de linfocitos CD4+ reactivos específicos y activar su producción de IL-2 a través de la vía de CD80 (Stagg y cols., 2006, Chan y cols., 2006). Este aumento de la proinflamación podría ser una de las causas del empeoramiento de los animales tratados con células frente a los grupos control. Además, en el caso de activación específica, los linfocitos CD8+ citotóxicos eliminarían a las MSC, evitando cualquier actividad inmunoreguladora que pudieran realizar (Fig. 27).

La importancia de estas vías de coseñalización en el rechazo corneal ha sido demostrada por varios estudios. Por un lado, se ha visto que los queratocitos de ratón expresan constitutivamente moléculas del MHC tipo I, así como CD80 y CD40 y que son capaces de actuar como APC ante una infección estimulando la proliferación y activación de linfocitos CD4 y CD8 (Seo 2001). Por otro lado, un estudio reciente ha demostrado la importancia de la vía de CD40 en el rechazo corneal, ya que el bloqueo de CD40-CD40L aumentó la supervivencia de xenotrasplantes de córnea en primates (Choi y cols., 2015), disminuyendo la infiltración leucocitaria, la producción de citoquinas, quimioquinas y moléculas del complemento en el humor acuoso, la presencia de linfocitos T de memoria y la producción de anticuerpos. En estudios en otro tipo de trasplantes encontramos numerosas muestras de implicación de esta vía en el rechazo. En un estudio de alotrasplante cardíaco en ratones transgénicos CD40^{-/-}, la falta de señalización demostró disminuir considerablemente el rechazo (Lu y cols., 1997). Asimismo, el uso de bloqueantes de CD40 ha demostrado ser beneficioso, tanto individualmente como conjuntamente con bloqueantes de la vía B7, en alotrasplante renal y pancreático en primates no humanos (Kirk y cols., 1997, Adams y cols., 2005, Cordoba y cols., 2015).

Por último, estudios recientes han demostrado la capacidad de las MSC para la presentación cruzada de antígenos (Francois y cols., 2009). Este proceso consiste en captar, procesar y presentar antígenos extracelulares a través del MHC tipo I en vez del MHC tipo II (Carbone y cols., 1990, Kurts y cols., 1997, Bonifaz y cols., 2002). En el estudio de François y colaboradores se demostró que las MSC de ratón son capaces de captar OVA (ovoalbúmina) y activar la producción de IL-2 en linfocitos CD8⁺ a través del MHC tipo I. Esta producción se vio incrementada cuando las MSC fueron pre-estimuladas con IFN- γ . En concordancia, cuando se realizaron estudios in vivo en ratones deficientes para la presentación de antígenos a través de MHC de tipo I, la inyección intravenosa de MSC prestimuladas con IFN- γ y OVA fue capaz de inducir la proliferación de linfocitos CD8⁺ reactivos para OVA. Por todo ello, otra posible vía para la activación de la alosensibilización del sistema inmune mediada por las MSC sería la presentación cruzada de antígenos liberados de la córnea donante. Además de provocar un rechazo directo por su propia inmunogenicidad, las AD-MSc inyectadas intraestromalmente tendrían la capacidad de captar antígenos de la córnea donante, procesarlos y presentarlos a través de su MHC de tipo I a los linfocitos circulantes, aumentando así la respuesta inmune y la probabilidad de rechazo. Esta capacidad estaría aumentada por la estimulación con el IFN- γ que daría como resultado el empeoramiento marcado del grupo tratado con células estimuladas (Fig. 27).

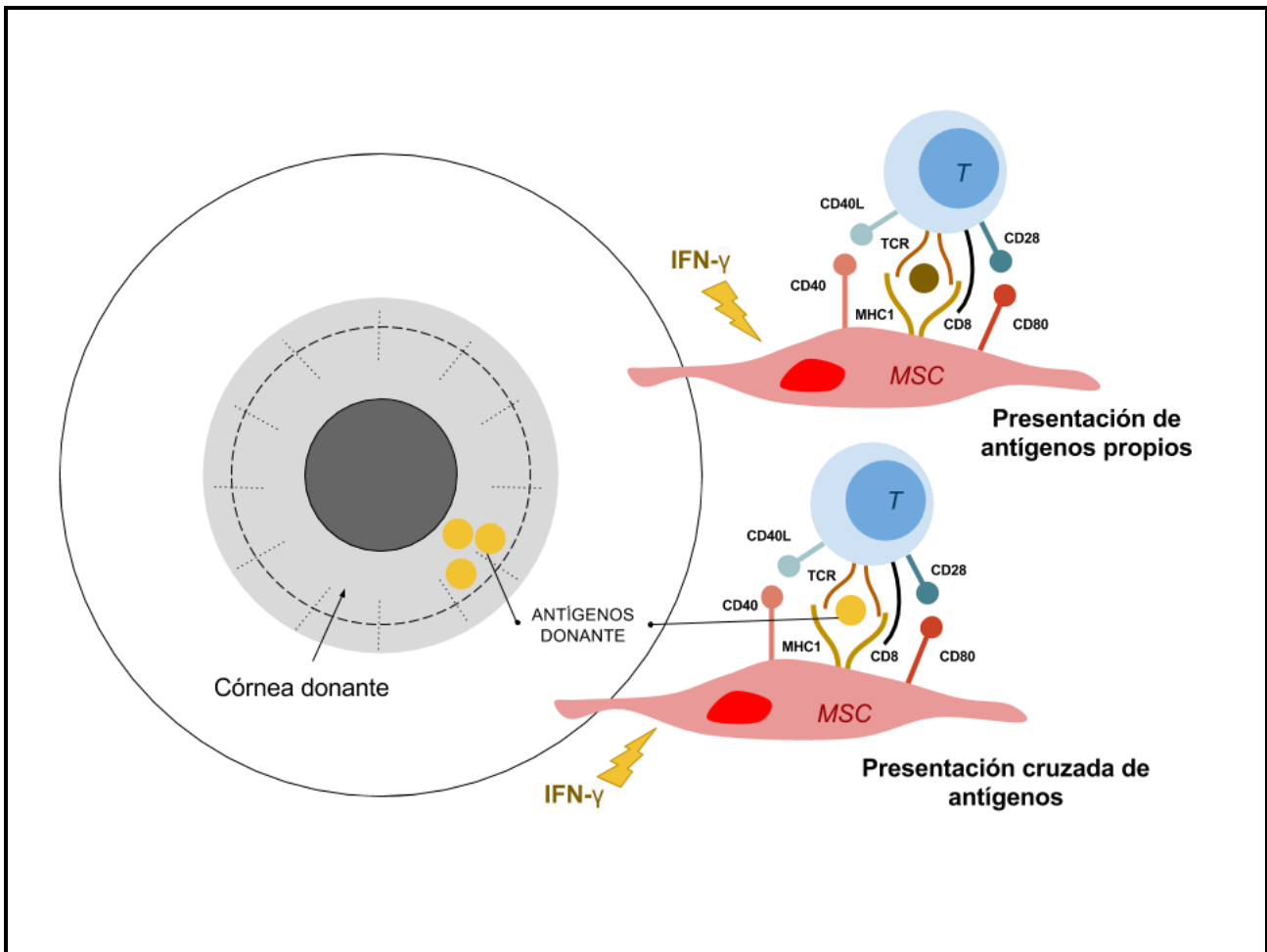


Figura 27. Las MSC tienen la capacidad de presentar antígenos propios y externos expresando un fenotipo de célula presentadora de antígenos gracias a la expresión de moléculas del MHC tipo I y de las moléculas coseñalizadoras CD40 y CD80. Esta característica se puede ver incrementada al estimular las MSC con IFN- γ .

5.2.3 Expresión y producción de citoquinas proinflamatorias

Además de promover la respuesta inmune ayudando a la circulación de las células implicadas mediante la vascularización y a su activación mediante la coseñalización como se ha visto en los dos apartados anteriores, las MSC expresan de forma constitutiva toda una batería de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias que además en algunos casos son capaces de secretar al medio extracelular. Así, las hAD-MSD demostraron una expresión constitutiva de IL-1 β (a pesar de resultar negativa su secreción en el sobrenadante de cultivo), IL-6 (tanto a nivel de mRNA como de proteína), IL-8 (detectable en sobrenadante, aunque relativamente bajo a nivel transcripcional), IL-12 β (a pesar de no detectarse la subunidad IL-12p40 en sobrenadante), IL-18, IL-32, CCL2, CCL3 y CCL4 en algún donante, mientras que la expresión de moléculas consideradas clásicamente como antiinflamatorias como IL4, IL10 e IL13 fue baja o indetectable.

Se observó que las citoquinas IL-6 e IL-8 fueron secretadas en una cantidad variable pero casi siempre elevada por las AD-MSD de todos los donantes incluidos en el estudio. Esta cantidad se vio significativamente

aumentada cuando las células fueron estimuladas con IFN- γ y TNF- α al igual que en estudios previos de otros autores (Hemeda y cols., 2010). Lo mismo ocurre para IL-1 β e interesantemente para quimioquinas CCL2 y CCL3. Además existe variabilidad en la traducción proteica, mostrando la baja secreción en cultivo de algunas citoquinas que son expresadas a nivel de mRNA (IL-1 β e IL12b) (Figs. 20 y 21). Todos estos resultados sugieren una gran plasticidad de estas células en su definición hacia un fenotipo pro o antiinflamatorio y hace intuir una fuerte regulación en este sentido dependiente del donante y/o del momento de la liposucción. Sería interesante profundizar más en los mecanismos que pueden influir en el comportamiento de estas células a nivel inflamatorio e intentar controlar la expresión del fenotipo mediante la variación de las condiciones del cultivo.

En el presente estudio, la secreción de citoquinas y quimioquinas preferiblemente proinflamatorias explicaría el aumento de la infiltración que se observa en las córneas de los animales tratados, sobre todo cuando las MSC son administradas localmente. Aunque la discusión de este apartado se centrará a continuación en las citoquinas IL-6 e IL-8 por ser las que se han detectado en el sobrenadante de cultivos, hay que destacar la fuerte expresión a nivel de mRNA de quimioquinas como CCL2, también conocida como MCP1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1) y CCL3, conocida como MIP1 α (proteína inflamatoria de macrófagos 1 α). Estas proteínas que producen una fuerte quimiotaxis para monocitos, células dendríticas, polimorfonucleares y linfocitos T en los lugares de inflamación (Wolpe y cols., 1988, Carr y cols., 1994, Xu y cols., 1996), aumentaron significativamente su expresión cuando las AD-MSc fueron estimuladas. Esto explicaría el aumento de infiltración detectado en las córneas de los animales tratados con hAD-MSc estimuladas (Fig. 20).

En este sentido, además del poder angiogénico ya descrito, varios grupos definieron la actividad quimiotáctica de IL-8 (Yoshimura y cols., 1987, Walz y cols., 1987, Van Damme y cols., 1988). En concreto, esta citoquina producida por macrófagos es responsable de la migración de los neutrófilos hacia el tejido dañado donde liberan enzimas granulocíticas y especies reactivas de oxígeno como H₂O₂ (Walz y cols., 1987).

La participación de IL-8 en la inflamación postrasplante y en el rechazo ha sido demostrada en varios estudios. Así, los islotes pancreáticos trasplantados a través de la vena porta provocan un aumento de IL-8 circulante (Citro y cols., 2012). Cuando el trasplante se realizó en ratones deficientes para CXCR2 (principal receptor de IL-8) o tratados con inhibidores de CXCR1/2, la aceptación y la supervivencia del trasplante mejoraron significativamente, mientras que el reclutamiento de células polimorfonucleares (PMNC) y NK disminuyó (Citro y cols., 2012). Resultados similares se obtuvieron usando estos inhibidores en alotrasplante renal en rata, en los que la infiltración y el nivel de inflamación disminuyeron a los 7 días del tratamiento (Bedke y cols., 2010). El uso conjunto de inhibidores para IL-8 y CD40L o para la vía de B7 resultaron aún más beneficiosos para la supervivencia del alotrasplante cardíaco en ratones, que su uso por separado (El-Sawy y cols., 2005). Estos resultados sugieren que las células que expresen ambos tipos de moléculas coestimuladoras, como las del presente estudio, tienden a aumentar la inflamación y el rechazo y no al revés.

Por otro lado, la IL-6 tiene un papel muy importante en el establecimiento de la fase aguda de la inflamación y en el paso hacia la fase más adaptativa. Su sobreproducción está implicada en la patogénesis de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (revisado por (Naugler y cols., 2008, Kishimoto, 2010, Scheller y cols., 2011).

Pese a su actividad compartida con otros factores como LIF, oncostatina M o CNTF, esta citoquina actúa a través de un sistema de señales propio que implican a su receptor específico (de membrana o soluble) IL-6R (Yamasaki y cols., 1988) y al correceptor inespecífico gp130 (Taga y cols., 1989, Hibi y cols., 1990). Su señalización, tanto clásica como trans, da lugar a una serie de fenómenos proinflamatorios como son la atracción de neutrófilos en la fase aguda de la inflamación y la posterior transición hacia una infiltración monocitaria (Wegenka y cols., 1993, Hurst y cols., 2001, Kaplanski y cols., 2003), la diferenciación de los linfocitos naïve CD4⁺ en Th17 y el bloqueo de la producción de Treg (Bettelli y cols., 2006), y la diferenciación final de células B y su consiguiente producción de anticuerpos (Suematsu y cols., 1989, Kopf y cols., 1994).

En los últimos años se ha puesto de relevancia el papel que la IL-6 tiene en el rechazo inmunológico (Ohzato y cols., 1993, Booth y cols., 2011) sobre todo a través de la inducción de una respuesta Th17 y en la regulación negativa de Treg (Itoh y cols., 2011). Ambas acciones están mediadas por la acción conjunta de IL-6 y TGF- β (Bettelli y cols., 2006), factor que también se expresa constitutivamente a nivel de mRNA en las hAD-MSC del presente estudio. Así, la inhibición de la producción de IL-6 mediante mutagénesis o el tratamiento con inhibidores del receptor aumenta la supervivencia en alotrasplante cardíaco en ratones, mediada por el aumento de Treg (Liang y cols., 2007, Booth y cols., 2011). Por último, el bloqueo conjunto de la vía B7 y de la acción de la IL-6 demostró ser altamente efectiva en la prevención de este rechazo disminuyendo la infiltración, las células efectoras de memoria y las citoquinas proinflamatorias, y aumentando los Treg en la zona del injerto (Zhao y cols., 2012). De nuevo la acción conjunta de citoquinas y de moléculas coseñalizadoras expresadas por las AD-MSC del presente estudio parece tener implicaciones directas en el aumento de la probabilidad de rechazo, explicando nuestros resultados clínicos.

De hecho, tanto IL-6 como IL-8 están altamente aumentadas en el humor acuoso de pacientes con rechazo corneal (Funding y cols., 2006) y por tanto su implicación en el proceso parece bastante clara. Estos datos son apoyados por el aumento de IL-6 e IL-8 que se produce en la secreción lagrimal tras la realización de un trasplante completo de córnea (Fodor y cols., 2006). Las hAD-MSC del presente estudio demostraron provocar un aumento en la infiltración de las córneas donante y receptora con células del sistema inmune, tanto polimorfonucleares como mononucleares (Figs. 17 y 24). Esta infiltración puede estar mediada en un principio por el efecto quimiotáctico de IL-8 e IL-6, y en un estado más avanzado por la acción de transición hacia una respuesta adaptativa mediada por IL-6. En concreto, estas células estarían capacitadas para facilitar una respuesta Th17 en la córnea gracias a su expresión constitutiva de TGF- β e IL-6 en conjunto con la coestimulación de la vía B7. La implicación de esta respuesta ya ha sido sugerida anteriormente en la fase temprana de la inflamación en el trasplante corneal (Wang y cols., 2015) (Wang 2015). Tanto IL-6 como IL-8 y TGF- β son factores secretados y pueden jugar un papel tanto paracrino cuando las células son administradas localmente en la córnea, como endocrino cuando son administradas de forma sistémica (Fig. 28).

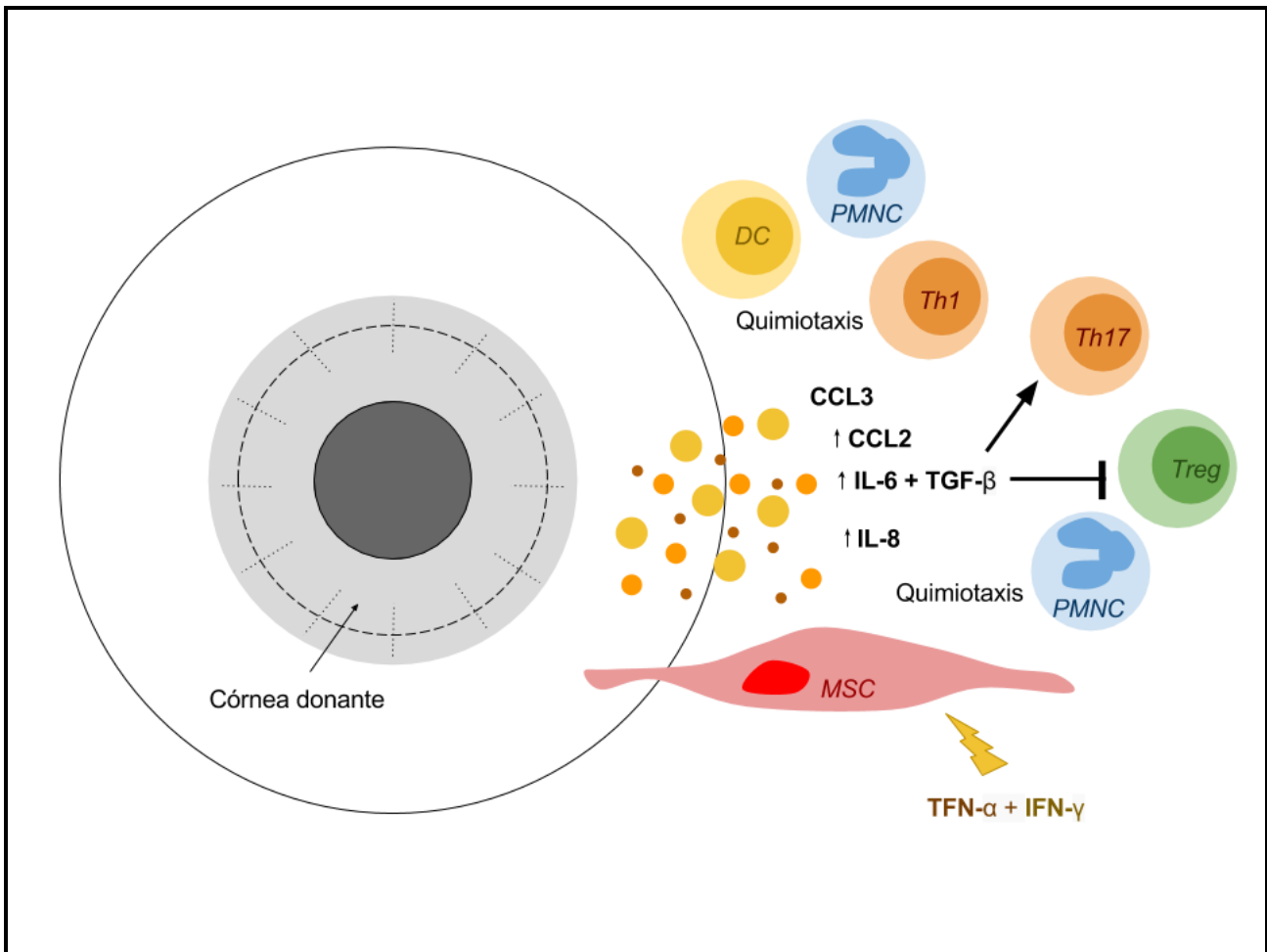


Figura 28. Secreción de moléculas proinflamatorias y quimiotácticas por parte de las MSC y su implicación en el aumento de infiltración y de rechazo en las córneas tratadas. Las MSC secretan factores quimiotácticos como IL-6 e IL-8 y expresan otros como CCL2 y CCL3. Algunos de estos factores aumentan su expresión tras la estimulación con TNF- α e IFN- γ . Además, la acción conjunta de IL-6 y TGF- β puede desencadenar una respuesta proinflamatoria Th17 e inhibir la proliferación de Treg.

Por último, en nuestro estudio, las AD-MSc tanto de conejo como de humano han demostrado tener un alto contenido en NO. Esta molécula que en otros contextos ha demostrado ser un potente inhibidor de linfocitos T y mejorar la enfermedad del huésped contra hospedador (Sato y cols., 2007, Ren y cols., 2008), en la córnea ha sido relacionada con el rechazo (Strestikova y cols., 2003) y el daño al endotelio corneal (Sagoo y cols., 2004). Por tanto, el aporte extra de óxido nítrico que generan las células AD-MSc en el tejido puede explicar el aumento del daño endotelial que se percibe en los grupos tratados con células, expresado principalmente por el aumento del edema (Figs. 17 y 24).

5.2.4 Incapacidad de las AD-MSc para inducir tolerancia sistémica

Las MSc son capaces de inducir tolerancia en las DC (Jiang y cols., 2005, Li y cols., 2008a, Spaggiari y cols., 2009) y aumentar la proporción de Treg (Casiraghi y cols., 2008, Ge y cols., 2010, Ge y cols., 2009). En el

presente estudio tratamos de conseguir un ambiente sistémico tolerogénico administrando rbAD-MSc singénicas 7 días antes del trasplante y mantenerlo al administrar dosis en los días 0, 3 y 14 (retirada de puntos). En este caso, el tratamiento celular también tuvo como resultado un empeoramiento de la supervivencia del trasplante. Las células administradas sistémicamente no se encontraron en la córnea en el momento del sacrificio de los animales, sino que se encontraron atrapadas en el pulmón (Fig. 24), coincidiendo con lo descrito anteriormente en otros estudios (Oh y cols., 2012). Por tanto hemos de suponer que los efectos negativos observados se deben a la producción sistémica de factores por parte de las células atrapadas en el pulmón que aceleran el rechazo. De nuevo los factores proangiogénicos como VEGF-A, IL-8 o TGF- β son los claros candidatos a mantener la prevascularización en los animales tratados, en contra de lo que ocurre en los controles no rechazados, en los que los neovasos desaparecen a las pocas semanas del trasplante.

5.2.5 Estimulación de linfocitos T

En los experimentos *in vitro* de interacción entre AD-MSc y PBMC se demostró la capacidad estimulante de las primeras sobre los linfocitos T, apoyando los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo*. Así, los linfocitos T no fueron capaces de sobrevivir a los 7 días de cultivo en solitario, mientras que el cocultivo con las MSc facilitó su supervivencia y proliferación (Fig. 22). Esta proliferación como era de esperar fue inferior a la estimulación directa de los controles positivos. Esto indica que la activación del CTR mediante HLA-ABC y de las vías coestimuladoras de CD40 y CD80 junto con la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8 mediada por las AD-MSc no es tan efectiva como la activación directa de los linfocitos con anticuerpos frente a CD3/CD28. Los linfocitos T estimulados presentaron a su vez una proliferación similar a los que fueron simplemente enfrentados a las AD-MSc pre estimuladas con IFN- γ y TNF- α . Estas AD-MSc han demostrado tener una expresión de CD40 y MHC de clase I ligeramente mayor y una producción de IL-6 e IL-8 varias veces mayor que las células sin estimular, lo que podría ser el origen de este aumento en la proliferación de linfocitos T. Sorprendentemente la mayor proliferación de linfocitos se consiguió al estimular éstos y enfrentarlos a AD-MSc sin estimular, lo cual es indicativo de una interacción recíproca entre la activación de los linfocitos T y el aumento del poder estimulante de las AD-MSc. Estos resultados serían contrarios a lo descrito por algunos autores que describen la activación de los linfocitos T como premisa para la expresión de la actividad inmunosupresora de las MSc (Bartholomew y cols., 2002, Krampera y cols., 2003, Le Blanc y cols., 2004, Chan y cols., 2008, Polchert y cols., 2008). Pese a ser la condición que logró una mayor estimulación, ésta no fue estadísticamente significativa al compararla con el uso de AD-MSc estimuladas. Se deduce entonces que la producción de factores por parte de los linfocitos T estimulados o su interacción directa con las MSc estarían provocando un aumento de la capacidad estimulante de éstas similar a la preestimulación. Por último, al enfrentar linfocitos estimulados con AD-MSc estimuladas, la proliferación alcanzó valores similares a los del control positivo. Existe una fina regulación de las capacidades inmunoreguladoras de las MSc por parte de diversas moléculas incluidas IFN- γ , TNF- α , IL-1 β que pueden ser secretadas por las células del sistema inmune (Chan y cols., 2006, English y cols., 2007, Ren y cols., 2008, Hemeda y cols., 2010, Bernardo y cols., 2013), por lo que es complicado determinar las causas de este comportamiento. Por todo ello es necesario profundizar en la naturaleza de estas interacciones y seguir investigando para entender cómo se lleva a cabo esa regulación y si se puede controlar externamente.

5.3. Comparación con otros modelos

En los últimos años, algunos estudios han tratado de esclarecer el papel que las MSC tienen en la reparación del daño en la superficie ocular. Así, Lan y cols. 2012 demostraron la capacidad de las MSC propias y exógenas, administradas de forma intravenosa, de llegar a la córnea dañada a las 48 horas tras un daño abrasivo (Lan y cols., 2012). En los otros dos únicos estudios realizados en los que se estudió la migración y anidamiento de las MSC administradas sistémicamente tras el trasplante corneal, las células demostraron migrar y mantenerse en la córnea sólo en las primeras horas (Omoto y cols., 2014) para desaparecer en las siguientes semanas (Oh y cols., 2012). Estas células suelen quedarse atrapadas en el pulmón (Gao y cols., 2001, Oh y cols., 2012). En el presente trabajo, la presencia de las células en la córnea se estudió en el momento del rechazo, por lo que se desconoce si las células anidaron en los primeros días en el tejido dañado. Sin embargo, sí se detectó el anidamiento antes descrito en el tejido pulmonar (Fig. 24).

Nuestros resultados indican que la terapia celular con AD-MSK tanto local como sistémica no mejora sino que empeora el resultado del trasplante corneal completo en conejos. En otros estudios, las MSC han demostrado no ser efectivas en la prevención del rechazo corneal cuando son aplicadas tópicamente durante 2 horas a pesar de migrar e incluirse en el estroma corneal en rata (Oh y cols., 2009). En este estudio de Oh y cols. se realizó un trasplante xenogénico por lo que los resultados negativos no eran fácilmente trasladables a la clínica. En nuestro caso, un trasplante alogénico entre 2 cepas diferentes de conejo con aplicación local, intraestromal y no tópica, de células derivadas de grasa y no de médula ósea, tampoco ha resultado de utilidad en la prevención del rechazo corneal. Por tanto parece desaconsejable la aplicación local de MSC en este tipo de patología.

Recientemente se han conseguido resultados alentadores con la terapia sistémica. Las células fueron capaces de acelerar la regeneración epitelial mediada aparentemente por TGF- β y IL-1Ra en ratones (Oh y cols., 2012). Resultados parecidos se habían obtenido con anterioridad en ratas al administrar las células de forma local disminuyendo los mediadores proinflamatorios en la córnea (Oh y cols., 2008), sin embargo los mecanismos de actuación de las células no están claros. Esto es debido a la diferencia entre los modelos experimentales, el origen de las células y las pautas de administración. La administración de MSC humanas en días d-1 y d0 (d0 = día del trasplante) aumentó la supervivencia del injerto en ratones a través de la producción de TSG-6, provocando una disminución en la infiltración y en las citoquinas proinflamatorias detectadas en la córnea (Oh y cols., 2012). Sin embargo en otro estudio, el tratamiento postrasplante y no previo al mismo con MSC alogénicas, consiguió retrasar, aunque no inhibir el rechazo en ratas (Jia y cols., 2012). En este estudio se necesitó la acción sinérgica de la ciclosporina A a dosis altas. En ratas, las células alogénicas y de terceros y no las singénicas parecen ser efectivas en la inducción de tolerancia y en el aumento de la supervivencia del injerto cuando son administradas en días d-7 y d0 (Treacy y cols., 2014). Estas células demostraron una disminución en la infiltración de la córnea pero no de los nódulos linfáticos. Sólo las MSC alogénicas presentaron un aumento de la neovascularización coincidiendo con nuestros hallazgos. Además, ensayos de aloestimulación demostraron que las células alogénicas provocan un aumento muy considerable de la respuesta humoral inespecífica. Por último, las células singénicas parecen ser más efectivas cuando se administran en el período postoperatorio disminuyendo la migración de las APC a los órganos linfáticos secundarios (Omoto y cols., 2014). En oftalmología, el animal más

utilizado es el conejo por la similitud de su ojo con el ojo humano y por la facilidad para trasladar los datos a la clínica. En estos animales el tamaño del ojo permite una cirugía de trasplante estándar igual a la que se realiza en clínica humana. Esto se concreta en el uso del mismo tipo de suturas y de puntos, y de herramientas de trepanación idénticas sobre un lecho intacto. En animales pequeños como los descritos en los trabajos arriba mencionados, la técnica se tiene que adaptar y los modelos no son adecuados. La vascularización que se consigue en el conejo en el modelo de alto riesgo de rechazo se asemeja al estado de las córneas de pacientes de alto riesgo que llegan a la clínica para someterse a un trasplante. Por otro lado, las células elegidas en el presente estudio fueron las AD-MSc por su facilidad de obtención y por la baja capacidad inmunogénica demostrada en estudios anteriores del grupo en los que no existía un daño previo ni se empleaban suturas (Arnalich-Montiel y cols., 2008). En el presente estudio presentamos por primera vez el efecto de la terapia con células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo en trasplante completo de córnea en conejo. Se ha demostrado que las AD-MSc en contra de lo esperado, pueden mostrar un fenotipo proinflamatorio y proangiogénico, que deriva en una disminución de la probabilidad de supervivencia del injerto en un tejido inmunoprivilegiado como es la córnea.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha establecido un modelo animal de trasplante de córnea de bajo riesgo en conejo, basado en diferencia de HLA, que reproduce la tasa de éxito de dicho trasplante en la práctica clínica.
2. Se ha desarrollado un modelo animal de trasplante de córnea de alto riesgo en conejo, basado en la prevascularización quirúrgica, que mimetiza las condiciones y el procedimiento en la clínica humana.
3. Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de conejo o de humano previamente estimuladas o no con IFN- γ y TNF- α , aumentan la probabilidad de rechazo en el trasplante corneal de riesgo normal cuando son administradas localmente.
4. Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de conejo aumentan la probabilidad de rechazo en trasplante corneal de alto riesgo cuando son administradas de forma sistémica.
5. Las células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo, presentan dualidad en su fenotipo, expresando citoquinas proinflamatorias: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL18, IL32, CCL2, CCL3 y CCL4, que se concreta en la secreción de al menos IL-6 e IL-8, y citoquinas antiinflamatorias: IDO, COX2 y producción de óxido nítrico.
6. Las células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo, presentan un fenotipo proangiogénico, con expresión de VEGF-A y TFG- β , que hacen no recomendable su uso en tejidos que requieran permanecer avasculares para mantener su funcionalidad.

BIBLIOGRAFÍA

- ABUDOU, M., WU, T., EVANS, J.R. & CHEN, X. 2015. Immunosuppressants for the prophylaxis of corneal graft rejection after penetrating keratoplasty. *Cochrane Database Syst Rev*, 8, CD007603.
- ADAMS, A.B., SHIRASUGI, N., JONES, T.R., y cols. 2005. Development of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody that synergizes with LEA29Y to prolong islet allograft survival. *J Immunol*, 174, 542-50.
- AGGARWAL, S. & PITTENGER, M.F. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105, 1815-22.
- AKIYAMA, Y., RADTKE, C. & KOCSIS, J.D. 2002. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J Neurosci*, 22, 6623-30.
- ALIO DEL BARRIO, J.L., CHIESA, M., GARAGORRI, N., y cols. 2015. Acellular human corneal matrix sheets seeded with human adipose-derived mesenchymal stem cells integrate functionally in an experimental animal model. *Exp Eye Res*, 132, 91-100.
- ALMEIDA-PORADA, G., PORADA, C.D., TRAN, N. & ZANJANI, E.D. 2000. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood*, 95, 3620-7.
- AMANO, S., MIMURA, T., YAMAGAMI, S., OSAKABE, Y. & MIYATA, K. 2005. Properties of corneas reconstructed with cultured human corneal endothelial cells and human corneal stroma. *Jpn J Ophthalmol*, 49, 448-52.
- AMERICA, E.B.A.O. 2015. 2014 Eye Banking statistical report.
- AMSEN, D., BLANDER, J.M., LEE, G.R., y cols. 2004. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell*, 117, 515-26.
- ANGOULVANT, D., CLERC, A., BENCHALAL, S., y cols. 2004. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. *Biorheology*, 41, 469-76.
- ARBAB, A.S., JORDAN, E.K., WILSON, L.B., y cols. 2004. In vivo trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells. *Hum Gene Ther*, 15, 351-60.
- ARENBERG, D.A., POLVERINI, P.J., KUNKEL, S.L., SHANAFELT, A. & STRIETER, R.M. 1997. In vitro and in vivo systems to assess role of C-X-C chemokines in regulation of angiogenesis. *Methods Enzymol*, 288, 190-220.
- ARNALICH-MONTIEL, F., PASTOR, S., BLAZQUEZ-MARTINEZ, A., y cols. 2008. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cells*, 26, 570-9.
- ASARI, S., ITAKURA, S., FERRERI, K., y cols. 2009. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp Hematol*, 37, 604-15.
- AUGELLO, A., TASSO, R., NEGRINI, S.M., y cols. 2005. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*, 35, 1482-90.
- AURICH, H., SGODDA, M., KALTWASSER, P., y cols. 2009. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut*, 58, 570-81.
- BADDOO, M., HILL, K., WILKINSON, R., y cols. 2003. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem*, 89, 1235-49.
- BAI, K., HUANG, Y., JIA, X., FAN, Y. & WANG, W. 2010. Endothelium oriented differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under chemical and mechanical stimulations. *J Biomech*, 43, 1176-81.
- BAKHTINA, A., TOHFAFAROSH, M., LICHTLER, A. & ARINZEH, T.L. 2014. Characterization and differentiation potential of rabbit mesenchymal stem cells for translational regenerative medicine. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 50, 251-60.
- BARATELLI, F., LIN, Y., ZHU, L., y cols. 2005. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol*, 175, 1483-90.

- BARBASH, I.M., CHOURAQUI, P., BARON, J., y cols. 2003. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, 108, 863-8.
- BARTHOLOMEW, A., STURGEON, C., SIATSKAS, M., y cols. 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*, 30, 42-8.
- BEDKE, J., NELSON, P.J., KISS, E., y cols. 2010. A novel CXCL8 protein-based antagonist in acute experimental renal allograft damage. *Mol Immunol*, 47, 1047-57.
- BERNARDO, M.E. & FIBBE, W.E. 2013. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 13, 392-402.
- BETTELLI, E., CARRIER, Y., GAO, W., y cols. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441, 235-8.
- BEYTH, S., BOROVSKY, Z., MEVORACH, D., y cols. 2005. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*, 105, 2214-9.
- BIANCO, P., RIMINUCCI, M., GRONTHOS, S. & ROBEY, P.G. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19, 180-92.
- BLACK, I.B. & WOODBURY, D. 2001. Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. *Blood Cells Mol Dis*, 27, 632-6.
- BLAZQUEZ-MARTINEZ, A., CHIESA, M., ARNALICH, F., y cols. 2014. c-Kit identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells in adipose tissue with higher telomerase expression and differentiation potential. *Differentiation*, 87, 147-60.
- BONIFAZ, L., BONNYAY, D., MAHNKE, K., y cols. 2002. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*, 196, 1627-38.
- BOOTH, A.J., GRABAUSKIENE, S., WOOD, S.C., y cols. 2011. IL-6 promotes cardiac graft rejection mediated by CD4+ cells. *J Immunol*, 187, 5764-71.
- BORROW, P., TISHON, A., LEE, S., y cols. 1996. CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8+ CTL response. *J Exp Med*, 183, 2129-42.
- BOURIN, P., BUNNELL, B.A., CASTEILLA, L., y cols. 2013. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15, 641-8.
- BRAT, D.J., BELLAIL, A.C. & VAN MEIR, E.G. 2005. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol*, 7, 122-33.
- BRUDER, S.P., KRAUS, K.H., GOLDBERG, V.M. & KADIYALA, S. 1998a. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*, 80, 985-96.
- BRUDER, S.P., KURTH, A.A., SHEA, M., y cols. 1998b. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 16, 155-62.
- BRUNET, J.F., DENIZOT, F., LUCIANI, M.F., y cols. 1987. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature*, 328, 267-70.
- BRZOSKA, M., GEIGER, H., GAUER, S. & BAER, P. 2005. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 330, 142-50.
- BUSSER, H., NAJAR, M., RAICEVIC, G., y cols. 2015. Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stromal Cell Subpopulations: Comparison of Bone Marrow and Adipose Tissue. *Stem Cells Dev*.
- CARBONE, F.R. & BEVAN, M.J. 1990. Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J Exp Med*, 171, 377-87.
- CARR, M.W., ROTH, S.J., LUTHER, E., ROSE, S.S. & SPRINGER, T.A. 1994. Monocyte

- chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 3652-6.
- CASIRAGHI, F., AZZOLLINI, N., CASSIS, P., y cols. 2008. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J Immunol*, 181, 3933-46.
- CAUX, C., MASSACRIER, C., VANBERVLIET, B., y cols. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*, 180, 1263-72.
- CELLA, M., SCHEIDEGGER, D., PALMER-LEHMANN, K., y cols. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*, 184, 747-52.
- CITRO, A., CANTARELLI, E., MAFFI, P., y cols. 2012. CXCR1/2 inhibition enhances pancreatic islet survival after transplantation. *J Clin Invest*, 122, 3647-51.
- CLAERHOUT, I., BEELE, H. & KESTELYN, P. 2008. Graft failure: I. Endothelial cell loss. *Int Ophthalmol*, 28, 165-73.
- COMOLI, P., GINEVRI, F., MACCARIO, R., y cols. 2008. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrol Dial Transplant*, 23, 1196-202.
- CORCIONE, A., BENVENUTO, F., FERRETTI, E., y cols. 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107, 367-72.
- CORDOBA, F., WIECZOREK, G., AUDET, M., y cols. 2015. A Novel, Blocking, Fc-Silent Anti-CD40 Monoclonal Antibody Prolongs Nonhuman Primate Renal Allograft Survival in the Absence of B Cell Depletion. *Am J Transplant*, 15, 2825-36.
- COTSARELIS, G., CHENG, S.Z., DONG, G., SUN, T.T. & LAVKER, R.M. 1989. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*, 57, 201-9.
- CRIGLER, L., ROBEY, R.C., ASAWACHAICHARN, A., GAUPP, D. & PHINNEY, D.G. 2006. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol*, 198, 54-64.
- CROP, M.J., KOREVAAR, S.S., DE KUIPER, R., y cols. 2011. Human mesenchymal stem cells are susceptible to lysis by CD8(+) T cells and NK cells. *Cell Transplant*, 20, 1547-59.
- CURSIEFEN, C., CAO, J., CHEN, L., y cols. 2004a. Inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after normal-risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 2666-73.
- CURSIEFEN, C., CHEN, L., BORGES, L.P., y cols. 2004b. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest*, 113, 1040-50.
- CURSIEFEN, C., MARTUS, P., NGUYEN, N.X., y cols. 2002. Corneal neovascularization after nonmechanical versus mechanical corneal trephination for non-high-risk keratoplasty. *Cornea*, 21, 648-52.
- CHAN, J.L., TANG, K.C., PATEL, A.P., y cols. 2006. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*, 107, 4817-24.
- CHAN, W.K., LAU, A.S., LI, J.C., y cols. 2008. MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge. *Exp Hematol*, 36, 1545-55.
- CHANDRA, V., G, S., PHADNIS, S., NAIR, P.D. & BHONDE, R.R. 2009. Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells*, 27, 1941-53.
- CHANG, C., NIU, D., ZHOU, H., y cols. 2008. Mesenchymal stroma cells improve hyperglycemia and insulin deficiency in the diabetic porcine pancreatic microenvironment. *Cytherapy*, 10, 796-805.
- CHANG, Y.J., LIU, J.W., LIN, P.C., y cols. 2009. Mesenchymal stem cells facilitate recovery from

- chemically induced liver damage and decrease liver fibrosis. *Life Sci*, 85, 517-25.
- CHEN, J., LI, Y., WANG, L., y cols. 2001. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 32, 1005-11.
- CHEN, L. & FLIES, D.B. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*, 13, 227-42.
- CHEN, L., ZHANG, W., YUE, H., y cols. 2007. Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34+ cells. *Stem Cells Dev*, 16, 719-31.
- CHEN, L.B., JIANG, X.B. & YANG, L. 2004. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*, 10, 3016-20.
- CHEN, Y.L., SUN, C.K., TSAI, T.H., y cols. 2015. Adipose-derived mesenchymal stem cells embedded in platelet-rich fibrin scaffolds promote angiogenesis, preserve heart function, and reduce left ventricular remodeling in rat acute myocardial infarction. *Am J Transl Res*, 7, 781-803.
- CHOI, H.J., LEE, J.J., KIM, D.H., y cols. 2015. Blockade of CD40-CD154 costimulatory pathway promotes long-term survival of full-thickness porcine corneal grafts in nonhuman primates: clinically applicable xenocorneal transplantation. *Am J Transplant*, 15, 628-41.
- CHOI, K.S., SHIN, J.S., LEE, J.J., y cols. 2005. In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun*, 330, 1299-305.
- CHONG, E.M. & DANA, M.R. 2008. Graft failure IV. Immunologic mechanisms of corneal transplant rejection. *Int Ophthalmol*, 28, 209-22.
- DANA, M.R., SCHAUMBERG, D.A., KOWAL, V.O., y cols. 1995. Corneal neovascularization after penetrating keratoplasty. *Cornea*, 14, 604-9.
- DE BARI, C., DELL'ACCIO, F., TYLZANOWSKI, P. & LUYTEN, F.P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, 44, 1928-42.
- DE MIGUEL, M.P., ALIO, J.L., ARNALICH-MONTIEL, F., y cols. 2010. Cornea and ocular surface treatment. *Curr Stem Cell Res Ther*, 5, 195-204.
- DE MIGUEL, M.P., FUENTES-JULIAN, S., BLAZQUEZ-MARTINEZ, A., y cols. 2012. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med*, 12, 574-91.
- DENKER, A.E., NICOLL, S.B. & TUAN, R.S. 1995. Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1. *Differentiation*, 59, 25-34.
- DHARMASAROJA, P. 2009. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. *J Clin Neurosci*, 16, 12-20.
- DI NICOLA, M., CARLO-STELLA, C., MAGNI, M., y cols. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99, 3838-43.
- DING, Y., XU, D., FENG, G., y cols. 2009. Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogeneic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes*, 58, 1797-806.
- DJOUAD, F., CHARBONNIER, L.M., BOUFFI, C., y cols. 2007. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*, 25, 2025-32.
- DJOUAD, F., FRITZ, V., APPARAILLY, F., y cols. 2005. Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 52, 1595-603.
- DJOUAD, F., PLENCE, P., BONY, C., y cols. 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, 102, 3837-44.
- DOHLMAN, T.H., OMOTO, M., HUA, J., y cols. 2015. VEGF-trap aflibercept significantly improves long-term graft survival in high-risk corneal transplantation. *Transplantation*, 99,

678-86.

- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., y cols. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.
- DONG, H., ZHU, G., TAMADA, K. & CHEN, L. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*, 5, 1365-9.
- DONG, Q.Y., CHEN, L., GAO, G.Q., y cols. 2008. Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat. *Clin Invest Med*, 31, E328-37.
- DU, Y., CARLSON, E.C., FUNDERBURGH, M.L., y cols. 2009. Stem cell therapy restores transparency to defective murine corneas. *Stem Cells*, 27, 1635-42.
- DU, Y., FUNDERBURGH, M.L., MANN, M.M., SUNDARRAJ, N. & FUNDERBURGH, J.L. 2005. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells*, 23, 1266-75.
- DUA, H.S., JOSEPH, A., SHANMUGANATHAN, V.A. & JONES, R.E. 2003. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye (Lond)*, 17, 877-85.
- DUIJVESTIEN, M., VOS, A.C., ROELOFS, H., y cols. 2010. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*, 59, 1662-9.
- DURAN, J.M., MAKAREWICH, C.A., SHARP, T.E., y cols. 2013. Bone-derived stem cells repair the heart after myocardial infarction through transdifferentiation and paracrine signaling mechanisms. *Circ Res*, 113, 539-52.
- EAGAR, T.N., TANG, Q., WOLFE, M., y cols. 2004. Notch 1 signaling regulates peripheral T cell activation. *Immunity*, 20, 407-15.
- EL-SAWY, T., BELPERIO, J.A., STRIETER, R.M., REMICK, D.G. & FAIRCHILD, R.L. 2005. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte-mediated graft damage synergizes with short-term costimulatory blockade to prevent cardiac allograft rejection. *Circulation*, 112, 320-31.
- ENGELMANN, K., DREXLER, D. & BOHNKE, M. 1999. Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part I: Cell culturing and transplantation procedure. *Cornea*, 18, 199-206.
- ENGELMANN, K. & FRIEDL, P. 1989. Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol*, 25, 1065-72.
- ENGLISH, K., BARRY, F.P., FIELD-CORBETT, C.P. & MAHON, B.P. 2007. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*, 110, 91-100.
- ENGLISH, K., BARRY, F.P. & MAHON, B.P. 2008. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol Lett*, 115, 50-8.
- ENGLISH, K., RYAN, J.M., TOBIN, L., y cols. 2009. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*, 156, 149-60.
- ERICES, A., CONGET, P. & MINGUELL, J.J. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 109, 235-42.
- FERNANDEZ, A., MORENO, J., PROSPER, F., GARCIA, M. & ECHEVESTE, J. 2008. [Regeneration of the ocular surface: stem cells and reconstructive techniques]. *An Sist Sanit Navar*, 31, 53-69.
- FIGLIUZZI, M., CORNOLTI, R., PERICO, N., y cols. 2009. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats. *Transplant Proc*, 41, 1797-800.
- FIORINA, P., JUREWICZ, M., AUGELLO, A., y cols. 2009. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol*, 183, 993-1004.
- FISHER, S.A., DOREE, C., BRUNSKILL, S.J., MATHUR, A. & MARTIN-RENDON, E. 2013. Bone Marrow Stem Cell Treatment for Ischemic Heart Disease in Patients with No Option of Revascularization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 8, e64669.

- FODOR, M., FACSKO, A., RAJNAVOLGYI, E., y cols. 2006. Enhanced release of IL-6 and IL-8 into tears in various anterior segment eye diseases. *Ophthalmic Res*, 38, 182-8.
- FORBES, G.M., STURM, M.J., LEONG, R.W., y cols. 2014. A phase 2 study of allogeneic mesenchymal stromal cells for luminal Crohn's disease refractory to biologic therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 12, 64-71.
- FOY, T.M., ARUFFO, A., BAJORATH, J., BUHLMANN, J.E. & NOELLE, R.J. 1996. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol*, 14, 591-617.
- FRANCOIS, M., ROMIEU-MOUREZ, R., STOCK-MARTINEAU, S., y cols. 2009. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood*, 114, 2632-8.
- FRIEDENSTEIN, A.J., CHAILAKHYAN, R.K., LATSINIK, N.V., PANASYUK, A.F. & KEILISS-BOROK, I.V. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17, 331-40.
- FRIEDENSTEIN, A.J., PETRAKOVA, K.V., KUROLESOVA, A.I. & FROLOVA, G.P. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6, 230-47.
- FRIEDENSTEIN, A.J., PIATETZKY, S., II & PETRAKOVA, K.V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 16, 381-90.
- FUH, E. & BRINTON, T.J. 2009. Bone marrow stem cells for the treatment of ischemic heart disease: a clinical trial review. *J Cardiovasc Transl Res*, 2, 202-18.
- FUNDERBURGH, M.L., DU, Y., MANN, M.M., SUNDARRAJ, N. & FUNDERBURGH, J.L. 2005. PAX6 expression identifies progenitor cells for corneal keratocytes. *FASEB J*, 19, 1371-3.
- FUNDING, M., HANSEN, T.K., GJEDSTED, J. & EHLERS, N. 2006. Simultaneous quantification of 17 immune mediators in aqueous humour from patients with corneal rejection. *Acta Ophthalmol Scand*, 84, 759-65.
- GALLINA, C., TURINETTO, V. & GIACHINO, C. 2015. A New Paradigm in Cardiac Regeneration: The Mesenchymal Stem Cell Secretome. *Stem Cells Int*, 2015, 765846.
- GAO, J., DENNIS, J.E., MUZIC, R.F., LUNDBERG, M. & CAPLAN, A.I. 2001. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*, 169, 12-20.
- GE, W., JIANG, J., ARP, J., y cols. 2010. Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation*, 90, 1312-20.
- GE, W., JIANG, J., BAROJA, M.L., y cols. 2009. Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. *Am J Transplant*, 9, 1760-72.
- GIMMI, C.D., FREEMAN, G.J., GRIBBEN, J.G., GRAY, G. & NADLER, L.M. 1993. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6586-90.
- GONZALEZ-REY, E., ANDERSON, P., GONZALEZ, M.A., y cols. 2009. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*, 58, 929-39.
- GONZALEZ, M.A., GONZALEZ-REY, E., RICO, L., BUSCHER, D. & DELGADO, M. 2009. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*, 60, 1006-19.
- GRECO, S.J. & RAMESHWAR, P. 2007a. Enhancing effect of IL-1alpha on neurogenesis from adult human mesenchymal stem cells: implication for inflammatory mediators in regenerative medicine. *J Immunol*, 179, 3342-50.
- GRECO, S.J., ZHOU, C., YE, J.H. & RAMESHWAR, P. 2007b. An interdisciplinary approach and characterization of neuronal cells transdifferentiated from human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 16, 811-26.

- GROH, M.E., MAITRA, B., SZEKELY, E. & KOC, O.N. 2005. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol*, 33, 928-34.
- GRONTHOS, S., MANKANI, M., BRAHIM, J., ROBEY, P.G. & SHI, S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13625-30.
- GU, S., XING, C., HAN, J., TSO, M.O. & HONG, J. 2009. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. *Mol Vis*, 15, 99-107.
- GU, Z., AKIYAMA, K., MA, X., y cols. 2010. Transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells alleviates lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Lupus*, 19, 1502-14.
- GUTIERREZ-FERNANDEZ, M., OTERO-ORTEGA, L., RAMOS-CEJUDO, J., y cols. 2015. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a strategy to improve recovery after stroke. *Expert Opin Biol Ther*, 15, 873-81.
- HAMRAH, P. & DANA, M.R. 2007. Corneal antigen-presenting cells. *Chem Immunol Allergy*, 92, 58-70.
- HAN, K.H., KANG, H.G., GIL, H.J., y cols. 2010. The immunosuppressive effect of embryonic stem cells and mesenchymal stem cells on both primary and secondary alloimmune responses. *Transpl Immunol*, 23, 141-6.
- HAUGER, O., FROST, E.E., VAN HEESWIJK, R., y cols. 2006. MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy. *Radiology*, 238, 200-10.
- HAYASHI, Y., TSUJI, S., TSUJII, M., y cols. 2008. Topical implantation of mesenchymal stem cells has beneficial effects on healing of experimental colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 326, 523-31.
- HEMEDA, H., JAKOB, M., LUDWIG, A.K., y cols. 2010. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 19, 693-706.
- HIBI, M., MURAKAMI, M., SAITO, M., y cols. 1990. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, 63, 1149-57.
- HOFSTETTER, C.P., SCHWARZ, E.J., HESS, D., y cols. 2002. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2199-204.
- HOLLENBERG, C.H. & VOST, A. 1969. Regulation of DNA synthesis in fat cells and stromal elements from rat adipose tissue. *J Clin Invest*, 47, 2485-98.
- HONG, S.H., GANG, E.J., JEONG, J.A., y cols. 2005. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 330, 1153-61.
- HOOGDUIJN, M.J., CROP, M.J., PEETERS, A.M., y cols. 2007. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev*, 16, 597-604.
- HORWITZ, E.M. 2009. Culture conditions shape mesenchymal stromal cell phenotype and function. *Cytotherapy*, 11, 101-2.
- HORWITZ, E.M., GORDON, P.L., KOO, W.K., y cols. 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8932-7.
- HORWITZ, E.M., PROCKOP, D.J., FITZPATRICK, L.A., y cols. 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*, 5, 309-13.
- HUANG, J.I., KAZMI, N., DURBHAKULA, M.M., y cols. 2005. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res*, 23, 1383-9.

- HURST, S.M., WILKINSON, T.S., MCLOUGHLIN, R.M., y cols. 2001. Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*, 14, 705-14.
- IM, G.I., KIM, D.Y., SHIN, J.H., HYUN, C.W. & CHO, W.H. 2001. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. *J Bone Joint Surg Br*, 83, 289-94.
- IM, G.I., SHIN, Y.W. & LEE, K.B. 2005. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*, 13, 845-53.
- ITO, T.K., ISHII, G., CHIBA, H. & OCHIAI, A. 2007. The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells. *Oncogene*, 26, 7194-203.
- ITOH, S., KIMURA, N., AXTELL, R.C., y cols. 2011. Interleukin-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion. *Circulation*, 124, S187-96.
- IVANOVA-TODOROVA, E., BOCHEV, I., MOURDJEVA, M., y cols. 2009. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*, 126, 37-42.
- JANG, I.K., YOON, H.H., YANG, M.S., y cols. 2014. B7-H1 inhibits T cell proliferation through MHC class II in human mesenchymal stem cells. *Transplant Proc*, 46, 1638-41.
- JEONG, S.H., JI, Y.H. & YOON, E.S. 2014. Immunosuppressive activity of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in a rat model of hind limb allotransplantation. *Transplant Proc*, 46, 1606-14.
- JIA, Z., JIAO, C., ZHAO, S., y cols. 2012. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat corneal allograft rejection model. *Exp Eye Res*, 102, 44-9.
- JIANG, T.S., CAI, L., JI, W.Y., y cols. 2010. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis*, 16, 1304-16.
- JIANG, X.X., ZHANG, Y., LIU, B., y cols. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105, 4120-6.
- JOYCE, N., ANNETT, G., WIRTHLIN, L., y cols. 2010. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med*, 5, 933-46.
- JOYCE, N.C., HARRIS, D.L., MARKOV, V., ZHANG, Z. & SAIITA, B. 2012. Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium. *Mol Vis*, 18, 547-64.
- JUNG, K.H., SONG, S.U., YI, T., y cols. 2011. Human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells inhibit inflammation and reduce acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology*, 140, 998-1008.
- KADIYALA, S., YOUNG, R.G., THIEDE, M.A. & BRUDER, S.P. 1997. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*, 6, 125-34.
- KAPLANSKI, G., MARIN, V., MONTERO-JULIAN, F., MANTOVANI, A. & FARNARIER, C. 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol*, 24, 25-9.
- KARUSSIS, D., KARAGEORGIU, C., VAKNIN-DEMBINSKY, A., y cols. 2010. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*, 67, 1187-94.
- KATIKIREDDY, K.R., DANA, R. & JURKUNAS, U.V. 2014. Differentiation potential of limbal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stem cells to corneal epithelial cells. *Stem Cells*, 32, 717-29.
- KEILHOFF, G., GOIHL, A., LANGNASE, K., FANSA, H. & WOLF, G. 2006. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *Eur J Cell Biol*, 85, 11-24.
- KELLEHER, M. & BEVERLEY, P.C. 2001. Lipopolysaccharide modulation of dendritic cells is

- insufficient to mature dendritic cells to generate CTLs from naive polyclonal CD8+ T cells in vitro, whereas CD40 ligation is essential. *J Immunol*, 167, 6247-55.
- KENNEDY, M.C., ROSENBAUM, J.T., BROWN, J., y cols. 1995. Novel production of interleukin-1 receptor antagonist peptides in normal human cornea. *J Clin Invest*, 95, 82-8.
- KHAROD-DHOLAKIA, B., RANDLEMAN, J.B., BROMLEY, J.G. & STULTING, R.D. 2015. Prevention and treatment of corneal graft rejection: current practice patterns of the Cornea Society (2011). *Cornea*, 34, 609-14.
- KINGHAM, P.J., KALBERMATTEN, D.F., MAHAY, D., y cols. 2007. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol*, 207, 267-74.
- KIRK, A.D., HARLAN, D.M., ARMSTRONG, N.N., y cols. 1997. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 8789-94.
- KISHIMOTO, T. 2010. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol*, 22, 347-52.
- KOCH, A.E., POLVERINI, P.J., KUNKEL, S.L., y cols. 1992. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 258, 1798-801.
- KONOMI, K., ZHU, C., HARRIS, D. & JOYCE, N.C. 2005. Comparison of the proliferative capacity of human corneal endothelial cells from the central and peripheral areas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 4086-91.
- KOPF, M., BAUMANN, H., FREER, G., y cols. 1994. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*, 368, 339-42.
- KRAMPERA, M., COSMI, L., ANGELI, R., y cols. 2006. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24, 386-98.
- KRAMPERA, M., GLENNIE, S., DYSON, J., y cols. 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101, 3722-9.
- KREMER, J.M., WESTHOVENS, R., LEON, M., y cols. 2003. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med*, 349, 1907-15.
- KUMAR, V. & KUMAR, A. 2014. Immunological aspects of corneal transplant. *Immunol Invest*, 43, 888-901.
- KURTS, C., KOSAKA, H., CARBONE, F.R., MILLER, J.F. & HEATH, W.R. 1997. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med*, 186, 239-45.
- KWON, O., LEE, E., MOON, T.C., y cols. 2002. Expression of cyclooxygenase-2 and pro-inflammatory cytokines induced by 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) in human mast cells requires NF-kappa B activation. *Biol Pharm Bull*, 25, 1165-8.
- LAI, R.C., ARSLAN, F., LEE, M.M., y cols. 2010. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*, 4, 214-22.
- LAN, Y., KODATI, S., LEE, H.S., y cols. 2012. Kinetics and function of mesenchymal stem cells in corneal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 3638-44.
- LANIER, L.L., O'FALLON, S., SOMOZA, C., y cols. 1995. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol*, 154, 97-105.
- LAROCCA, R.A., MORAES-VIEIRA, P.M., BASSI, E.J., y cols. 2013. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells increase skin allograft survival and inhibit Th-17 immune response. *PLoS One*, 8, e76396.
- LARSEN, C.P., PEARSON, T.C., ADAMS, A.B., y cols. 2005. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant*, 5, 443-53.
- LE BLANC, K., FRASSONI, F., BALL, L., y cols. 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, 371, 1579-

86.

- LE BLANC, K., RASMUSSEN, I., SUNDBERG, B., y cols. 2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363, 1439-41.
- LE BLANC, K., TAMMIK, C., ROSENDAHL, K., ZETTERBERG, E. & RINGDEN, O. 2003. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 31, 890-6.
- LEDERMAN, S., YELLIN, M.J., INGHIRAMI, G., y cols. 1992a. Molecular interactions mediating T-B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. Roles of T cell-B-cell-activating molecule (5c8 antigen) and CD40 in contact-dependent help. *J Immunol*, 149, 3817-26.
- LEDERMAN, S., YELLIN, M.J., KRICHEVSKY, A., y cols. 1992b. Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med*, 175, 1091-101.
- LEE, H.J., KO, J.H., KO, A.Y., y cols. 2014a. Intravenous infusion of mesenchymal stem/stromal cells decreased CCR7(+) antigen presenting cells in mice with corneal allotransplantation. *Curr Eye Res*, 39, 780-9.
- LEE, J.S., HONG, J.M., MOON, G.J., y cols. 2010. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells*, 28, 1099-106.
- LEE, K.D., KUO, T.K., WHANG-PENG, J., y cols. 2004. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, 40, 1275-84.
- LEE, S.T., JANG, J.H., CHEONG, J.W., y cols. 2002. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol*, 118, 1128-31.
- LEE, T.C., LEE, T.H., HUANG, Y.H., y cols. 2014b. Comparison of surface markers between human and rabbit mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 9, e111390.
- LENSCHOW, D.J., WALUNAS, T.L. & BLUESTONE, J.A. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 14, 233-58.
- LENSCHOW, D.J., ZENG, Y., HATHCOCK, K.S., y cols. 1995. Inhibition of transplant rejection following treatment with anti-B7-2 and anti-B7-1 antibodies. *Transplantation*, 60, 1171-8.
- LEV, R. & SPICER, S.S. 1964. Specific Staining of Sulphate Groups with Alcian Blue at Low Ph. *J Histochem Cytochem*, 12, 309.
- LEVIS, H.J., PEH, G.S., TOH, K.P., y cols. 2012. Plastic compressed collagen as a novel carrier for expanded human corneal endothelial cells for transplantation. *PLoS One*, 7, e50993.
- LI, H., GUO, Z., JIANG, X., y cols. 2008a. Mesenchymal stem cells alter migratory property of T and dendritic cells to delay the development of murine lethal acute graft-versus-host disease. *Stem Cells*, 26, 2531-41.
- LI, M., SUN, K., WELNIAK, L.A. & MURPHY, W.J. 2008b. Immunomodulation and pharmacological strategies in the treatment of graft-versus-host disease. *Expert Opin Pharmacother*, 9, 2305-16.
- LI, Q., ZHOU, X., SHI, Y., y cols. 2013a. In vivo tracking and comparison of the therapeutic effects of MSCs and HSCs for liver injury. *PLoS One*, 8, e62363.
- LI, T., YAN, Y., WANG, B., y cols. 2013b. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells Dev*, 22, 845-54.
- LI, W.J., CHIANG, H., KUO, T.F., y cols. 2009. Evaluation of articular cartilage repair using biodegradable nanofibrous scaffolds in a swine model: a pilot study. *J Tissue Eng Regen Med*, 3, 1-10.
- LIANG, J., ZHANG, H., HUA, B., y cols. 2010. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann Rheum Dis*, 69, 1423-

9.

- LIANG, Y., CHRISTOPHER, K., FINN, P.W., COLSON, Y.L. & PERKINS, D.L. 2007. Graft produced interleukin-6 functions as a danger signal and promotes rejection after transplantation. *Transplantation*, 84, 771-7.
- LIECHTY, K.W., MACKENZIE, T.C., SHAABAN, A.F., y cols. 2000. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*, 6, 1282-6.
- LINDROOS, B., SUURONEN, R. & MIETTINEN, S. 2011. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev*, 7, 269-91.
- LINSLEY, P.S., GREENE, J.L., BRADY, W., y cols. 1994. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*, 1, 793-801.
- LIU, H., ZHANG, J., LIU, C.Y., y cols. 2010a. Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells: lumican null mice. *PLoS One*, 5, e10707.
- LIU, Y., MU, R., WANG, S., y cols. 2010b. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 12, R210.
- LU, L., LI, W., FU, F., y cols. 1997. Blockade of the CD40-CD40 ligand pathway potentiates the capacity of donor-derived dendritic cell progenitors to induce long-term cardiac allograft survival. *Transplantation*, 64, 1808-15.
- MACATONIA, S.E., HOSKEN, N.A., LITTON, M., y cols. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*, 154, 5071-9.
- MACCARIO, R., PODESTA, M., MORETTA, A., y cols. 2005. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, 90, 516-25.
- MACKEY, M.F., BARTH, R.J., JR. & NOELLE, R.J. 1998. The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol*, 63, 418-28.
- MAGUIRE, M.G., STARK, W.J., GOTTSCH, J.D., y cols. 1994. Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Ophthalmology*, 101, 1536-47.
- MAHMOOD, A., LU, D., LU, M. & CHOPP, M. 2003. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*, 53, 697-702; discussion 702-3.
- MAKINO, S., FUKUDA, K., MIYOSHI, S., y cols. 1999. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 103, 697-705.
- MATSUMOTO, R., OMURA, T., YOSHIYAMA, M., y cols. 2005. Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 1168-73.
- MAUMUS, M., PEYRAFITTE, J.A., D'ANGELO, R., y cols. 2011. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)*, 35, 1141-53.
- MCINTOSH, K., ZVONIC, S., GARRETT, S., y cols. 2006. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*, 24, 1246-53.
- MEISEL, R., ZIBERT, A., LARYEA, M., y cols. 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, 103, 4619-21.
- MENARD, C., PACELLI, L., BASSI, G., y cols. 2013. Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various good manufacturing practice processes differ in their immunomodulatory properties: standardization of immune quality controls. *Stem Cells Dev*, 22, 1789-801.
- MIMURA, T., AMANO, S., USUI, T., y cols. 2004. Transplantation of corneas reconstructed with

- cultured adult human corneal endothelial cells in nude rats. *Exp Eye Res*, 79, 231-7.
- MIMURA, T., YAMAGAMI, S., YOKOO, S., ARAIE, M. & AMANO, S. 2005. Comparison of rabbit corneal endothelial cell precursors in the central and peripheral cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 3645-8.
- MITCHELL, J.B., MCINTOSH, K., ZVONIC, S., y cols. 2006. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, 24, 376-85.
- MIYAHARA, Y., NAGAYA, N., KATAOKA, M., y cols. 2006. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*, 12, 459-65.
- MOHAMADNEJAD, M., ALIMOGHADDAM, K., BAGHERI, M., y cols. 2013. Randomized placebo-controlled trial of mesenchymal stem cell transplantation in decompensated cirrhosis. *Liver Int*, 33, 1490-6.
- MORISCOT, C., DE FRAIPONT, F., RICHARD, M.J., y cols. 2005. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem Cells*, 23, 594-603.
- MUNN, D.H. & MELLOR, A.L. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest*, 117, 1147-54.
- NAGAYA, N., KANGAWA, K., ITOH, T., y cols. 2005. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 112, 1128-35.
- NAJAR, M., RAICEVIC, G., BOUFKER, H.I., y cols. 2010. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol*, 264, 171-9.
- NAKAGAMI, H., MAEDA, K., MORISHITA, R., y cols. 2005. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 2542-7.
- NAKAHARA, M., OKUMURA, N., KAY, E.P., y cols. 2013. Corneal endothelial expansion promoted by human bone marrow mesenchymal stem cell-derived conditioned medium. *PLoS One*, 8, e69009.
- NAKAMURA, T., INATOMI, T., SOTOZONO, C., y cols. 2004. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*, 88, 1280-4.
- NAUGLER, W.E. & KARIN, M. 2008. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med*, 14, 109-19.
- NAUTA, A.J., KRUISSELBRINK, A.B., LURVINK, E., WILLEMZE, R. & FIBBE, W.E. 2006. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 177, 2080-7.
- NIE, C., YANG, D., XU, J., y cols. 2011. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. *Cell Transplant*, 20, 205-16.
- NIEDERKORN, J.Y. 2003. The immune privilege of corneal grafts. *J Leukoc Biol*, 74, 167-71.
- NIETO-MIGUEL, T., GALINDO, S., REINOSO, R., y cols. 2013. In vitro simulation of corneal epithelium microenvironment induces a corneal epithelial-like cell phenotype from human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Curr Eye Res*, 38, 933-44.
- NISHIDA, K., YAMATO, M., HAYASHIDA, Y., y cols. 2004. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*, 351, 1187-96.
- NISHIDA, T., SAIKA, S. 2011. Cornea and Esclera: Anatomy and Physiology. *Cornea*. 3rd ed. USA: Mosby Elsevier.
- NOEL, P.J., BOISE, L.H., GREEN, J.M. & THOMPSON, C.B. 1996. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol*, 157, 636-42.

- OH, J.Y., KIM, M.K., KO, J.H., y cols. 2009. Rat allogeneic mesenchymal stem cells did not prolong the survival of corneal xenograft in a pig-to-rat model. *Vet Ophthalmol*, 12 Suppl 1, 35-40.
- OH, J.Y., KIM, M.K., SHIN, M.S., y cols. 2008. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells*, 26, 1047-55.
- OH, J.Y., LEE, R.H., YU, J.M., y cols. 2012. Intravenous mesenchymal stem cells prevented rejection of allogeneic corneal transplants by aborting the early inflammatory response. *Mol Ther*, 20, 2143-52.
- OHMURA, Y., TANEMURA, M., KAWAGUCHI, N., y cols. 2010. Combined transplantation of pancreatic islets and adipose tissue-derived stem cells enhances the survival and insulin function of islet grafts in diabetic mice. *Transplantation*, 90, 1366-73.
- OHZATO, H., MONDEN, M., YOSHIZAKI, K., y cols. 1993. Serum interleukin-6 levels as an indicator of acute rejection after liver transplantation in cynomolgous monkeys. *Surg Today*, 23, 521-7.
- OKURA, H., MATSUYAMA, A., LEE, C.M., y cols. 2010. Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model. *Tissue Eng Part C Methods*, 16, 417-25.
- OMOTO, M., KATIKIREDDY, K.R., REZAZADEH, A., DOHLMAN, T.H. & CHAUHAN, S.K. 2014. Mesenchymal stem cells home to inflamed ocular surface and suppress allosensitization in corneal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55, 6631-8.
- ORTIZ, L.A., GAMBELLI, F., MCBRIDE, C., y cols. 2003. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8407-11.
- PAREKKADAN, B., VAN POLL, D., MEGEED, Z., y cols. 2007. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 363, 247-52.
- PARK, I.S., CHUNG, P.S. & AHN, J.C. 2015. Adipose-derived stromal cell cluster with light therapy enhance angiogenesis and skin wound healing in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 462, 171-7.
- PARK, S.H., KIM, K.W., CHUN, Y.S. & KIM, J.C. 2012. Human mesenchymal stem cells differentiate into keratocyte-like cells in keratocyte-conditioned medium. *Exp Eye Res*, 101, 16-26.
- PAUL, S.R., YANG, Y.C., DONAHUE, R.E., GOLDRING, S. & WILLIAMS, D.A. 1991. Stromal cell-associated hematopoiesis: immortalization and characterization of a primate bone marrow-derived stromal cell line. *Blood*, 77, 1723-33.
- PEH, G.S., CHNG, Z., ANG, H.P., y cols. 2015. Propagation of human corneal endothelial cells: a novel dual media approach. *Cell Transplant*, 24, 287-304.
- PEISTER, A., MELLAD, J.A., LARSON, B.L., y cols. 2004. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*, 103, 1662-8.
- PELLEGRINI, G., TRAVERSO, C.E., FRANZI, A.T., y cols. 1997. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*, 349, 990-3.
- PENTCHEVA-HOANG, T., EGEN, J.G., WOJNOONSKI, K. & ALLISON, J.P. 2004. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity*, 21, 401-13.
- PERICO, N., CASIRAGHI, F., GOTTI, E., y cols. 2013. Mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: pretransplant infusion protects from graft dysfunction while fostering immunoregulation. *Transpl Int*, 26, 867-78.
- PERICO, N., CASIRAGHI, F., INTRONA, M., y cols. 2011. Autologous mesenchymal stromal

- cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6, 412-22.
- PISTSOV, M.Y., SADOVNIKOVA, E. & DANILOV, S.M. 1988. Human corneal endothelial cells: isolation, characterization and long-term cultivation. *Exp Eye Res*, 47, 403-14.
- PITTINGER, M.F., MACKAY, A.M., BECK, S.C., y cols. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.
- PLANAT-BENARD, V., MENARD, C., ANDRE, M., y cols. 2004. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res*, 94, 223-9.
- POGGI, A., PREVOSTO, C., MASSARO, A.M., y cols. 2005. Interaction between human NK cells and bone marrow stromal cells induces NK cell triggering: role of NKp30 and NKG2D receptors. *J Immunol*, 175, 6352-60.
- POLCHERT, D., SOBINSKY, J., DOUGLAS, G., y cols. 2008. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*, 38, 1745-55.
- POTAPOVA, I.A., DORONIN, S.V., KELLY, D.J., y cols. 2008. Enhanced recovery of mechanical function in the canine heart by seeding an extracellular matrix patch with mesenchymal stem cells committed to a cardiac lineage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295, H2257-63.
- PRASAD, V.K., LUCAS, K.G., KLEINER, G.I., y cols. 2011. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol Blood Marrow Transplant*, 17, 534-41.
- PRASANNA, S.J., GOPALAKRISHNAN, D., SHANKAR, S.R. & VASANDAN, A.B. 2010. Pro-inflammatory cytokines, IFN-gamma and TNF-alpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One*, 5, e9016.
- PRIGOZHINA, T.B., KHITRIN, S., ELKIN, G., y cols. 2008. Mesenchymal stromal cells lose their immunosuppressive potential after allotransplantation. *Exp Hematol*, 36, 1370-6.
- PROCKOP, D.J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276, 71-4.
- QUARTO, R., MASTROGIACOMO, M., CANCEDDA, R., y cols. 2001. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*, 344, 385-6.
- RA, J.C., KANG, S.K., SHIN, I.S., y cols. 2011. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med*, 9, 181.
- RAFEI, M., HSIEH, J., FORTIER, S., y cols. 2008. Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood*, 112, 4991-8.
- RANGANATH, S.H., LEVY, O., INAMDAR, M.S. & KARP, J.M. 2012. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell*, 10, 244-58.
- RANHEIM, E.A. & KIPPS, T.J. 1993. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med*, 177, 925-35.
- RAZAVI, S., RAZAVI, M.R., ZARKESH ESFAHANI, H., KAZEMI, M. & MOSTAFAVI, F.S. 2013. Comparing brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor secretion of induced neurotrophic factor secreting cells from human adipose and bone marrow-derived stem cells. *Dev Growth Differ*, 55, 648-55.
- REINDERS, M.E., DE FIJTER, J.W., ROELOFS, H., y cols. 2013. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. *Stem Cells Transl Med*, 2, 107-11.
- REN, G., SU, J., ZHANG, L., y cols. 2009. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*, 27, 1954-62.
- REN, G., ZHANG, L., ZHAO, X., y cols. 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem*

- Cell*, 2, 141-50.
- RIGOL, M., SOLANES, N., ROURA, S., y cols. 2014. Allogeneic adipose stem cell therapy in acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*, 44, 83-92.
- RINGDEN, O., UZUNEL, M., RASMUSSEN, I., y cols. 2006. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*, 81, 1390-7.
- ROSTAING, L., VINCENTI, F., GRINYO, J., y cols. 2013. Long-term belatacept exposure maintains efficacy and safety at 5 years: results from the long-term extension of the BENEFIT study. *Am J Transplant*, 13, 2875-83.
- RUTZ, S., MORDMULLER, B., SAKANO, S. & SCHEFFOLD, A. 2005. Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells. *Eur J Immunol*, 35, 2443-51.
- RYAN, J.M., BARRY, F., MURPHY, J.M. & MAHON, B.P. 2007. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*, 149, 353-63.
- SAFFORD, K.M., HICOK, K.C., SAFFORD, S.D., y cols. 2002. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 294, 371-9.
- SAFFORD, K.M., SAFFORD, S.D., GIMBLE, J.M., SHETTY, A.K. & RICE, H.E. 2004. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol*, 187, 319-28.
- SAGOO, P., CHAN, G., LARKIN, D.F. & GEORGE, A.J. 2004. Inflammatory cytokines induce apoptosis of corneal endothelium through nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 3964-73.
- SAITO, S., YOSHIDA, M., ICHIJO, M., ISHIZAKA, S. & TSUJII, T. 1993. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human milk. *Clin Exp Immunol*, 94, 220-4.
- SALGADO, A.J., SOUSA, J.C., COSTA, B.M., y cols. 2015. Mesenchymal stem cells secretome as a modulator of the neurogenic niche: basic insights and therapeutic opportunities. *Front Cell Neurosci*, 9, 249.
- SATO, K., OZAKI, K., MORI, M., MUROI, K. & OZAWA, K. 2010. Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease : basic aspects and clinical outcomes. *J Clin Exp Hematop*, 50, 79-89.
- SATO, K., OZAKI, K., OH, I., y cols. 2007. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*, 109, 228-34.
- SATO, Y., ARAKI, H., KATO, J., y cols. 2005. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, 106, 756-63.
- SBANO, P., CUCCIA, A., MAZZANTI, B., y cols. 2008. Use of donor bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model. *Arch Dermatol Res*, 300, 115-24.
- SCHELLER, J., CHALARIS, A., SCHMIDT-ARRAS, D. & ROSE-JOHN, S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 878-88.
- SCHERMER, A., GALVIN, S. & SUN, T.T. 1986. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol*, 103, 49-62.
- SCHNEIDER, C.A., RASBAND, W.S. & ELICEIRI, K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9, 671-5.
- SCHURGERS, E., KELCHTERMANS, H., MITERA, T., GEBOES, L. & MATTHYS, P. 2010. Discrepancy between the in vitro and in vivo effects of murine mesenchymal stem cells on T-cell proliferation and collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 12, R31.
- SCHWAB, I.R. 1999. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 97, 891-986.

- SCHWARTZ, R.E., REYES, M., KOODIE, L., y cols. 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, 109, 1291-302.
- SELMANI, Z., NAJI, A., ZIDI, I., y cols. 2008. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*, 26, 212-22.
- SEMPERE, J.M., MARTINEZ-PEINADO, P., ARRIBAS, M.I., y cols. 2014. Single cell-derived clones from human adipose stem cells present different immunomodulatory properties. *Clin Exp Immunol*, 176, 255-65.
- SEO, M.J., SUH, S.Y., BAE, Y.C. & JUNG, J.S. 2005. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 328, 258-64.
- SHAPIRO, V.S., TRUITT, K.E., IMBODEN, J.B. & WEISS, A. 1997. CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites. *Mol Cell Biol*, 17, 4051-8.
- SHENG, H., WANG, Y., JIN, Y., y cols. 2008. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res*, 18, 846-57.
- SHI, D., LIAO, L., ZHANG, B., y cols. 2011. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate the immunosuppressive effect of cyclosporin A on T lymphocytes through Jagged-1-mediated inhibition of NF- κ B signaling. *Exp Hematol*, 39, 214-224 e1.
- SHI, W., GAO, H., XIE, L. & WANG, S. 2006. Sustained intraocular rapamycin delivery effectively prevents high-risk corneal allograft rejection and neovascularization in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 3339-44.
- SHIMAZAKI, J., AIBA, M., GOTO, E., y cols. 2002. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*, 109, 1285-90.
- SIOUD, M., MOBERGSLIEN, A., BOUDABOUS, A. & FLOISAND, Y. 2010. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. *Scand J Immunol*, 71, 267-74.
- SIOUD, M., MOBERGSLIEN, A., BOUDABOUS, A. & FLOISAND, Y. 2011. Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *Int J Oncol*, 38, 385-90.
- SOMOZA, C. & LANIER, L.L. 1995. T-cell costimulation via CD28-CD80/CD86 and CD40-CD40 ligand interactions. *Res Immunol*, 146, 171-6.
- SOTIROPOULOU, P.A., PEREZ, S.A., GRITZAPIS, A.D., BAXEVANIS, C.N. & PAPAMICHAIL, M. 2006. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 24, 74-85.
- SPAGGIARI, G.M., ABDELRAZIK, H., BECCHETTI, F. & MORETTA, L. 2009. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*, 113, 6576-83.
- SPAGGIARI, G.M., CAPOBIANCO, A., ABDELRAZIK, H., y cols. 2008. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, 111, 1327-33.
- SPEES, J.L., OLSON, S.D., YLOSTALO, J., y cols. 2003. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2397-402.
- STAGG, J., POMMEY, S., ELIOPOULOS, N. & GALIPEAU, J. 2006. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*, 107, 2570-7.
- STRESTIKOVA, P., PLSKOVA, J., FILIPEC, M. & FARGHALI, H. 2003. FK 506 and aminoguanidine suppress iNOS induction in orthotopic corneal allografts and prolong graft survival in mice. *Nitric Oxide*, 9, 111-7.

- STRIETER, R.M., POLVERINI, P.J., KUNKEL, S.L., y cols. 1995. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*, 270, 27348-57.
- STUART, P.M., GRIFFITH, T.S., USUI, N., y cols. 1997. CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J Clin Invest*, 99, 396-402.
- SUEMATSU, S., MATSUDA, T., AOZASA, K., y cols. 1989. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7547-51.
- SUGA, H., MATSUMOTO, D., ETO, H., y cols. 2009. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 18, 1201-10.
- TAGA, T., HIBI, M., HIRATA, Y., y cols. 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*, 58, 573-81.
- TAN, J., WU, W., XU, X., y cols. 2012. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *JAMA*, 307, 1169-77.
- TANG, Y.L., ZHAO, Q., ZHANG, Y.C., y cols. 2004. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept*, 117, 3-10.
- TEIXEIRA, F.G., CARVALHO, M.M., NEVES-CARVALHO, A., y cols. 2015. Secretome of mesenchymal progenitors from the umbilical cord acts as modulator of neural/glial proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev*, 11, 288-97.
- THERAPUETICS, O. 2009. Osiris investors press release.
- TOMA, C., PITTENGER, M.F., CAHILL, K.S., BYRNE, B.J. & KESSLER, P.D. 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105, 93-8.
- TRAKTUEV, D.O., MERFELD-CLAUSS, S., LI, J., y cols. 2008. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res*, 102, 77-85.
- TREACY, O., O'FLYNN, L., RYAN, A.E., y cols. 2014. Mesenchymal stem cell therapy promotes corneal allograft survival in rats by local and systemic immunomodulation. *Am J Transplant*, 14, 2023-36.
- TROPEL, P., NOEL, D., PLATET, N., y cols. 2004. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res*, 295, 395-406.
- TSE, W.T., PENDLETON, J.D., BEYER, W.M., EGALKA, M.C. & GUINAN, E.C. 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 75, 389-97.
- TURGEMAN, G., PITTMAN, D.D., MULLER, R., y cols. 2001. Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *J Gene Med*, 3, 240-51.
- URBAN, V.S., KISS, J., KOVACS, J., y cols. 2008. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells*, 26, 244-53.
- VAN DAMME, J., VAN BEEUMEN, J., OPDENAKKER, G. & BILLIAU, A. 1988. A novel, NH₂-terminal sequence-characterized human monokine possessing neutrophil chemotactic, skin-reactive, and granulocytosis-promoting activity. *J Exp Med*, 167, 1364-76.
- VAN POLL, D., PAREKKADAN, B., CHO, C.H., y cols. 2008. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology*, 47, 1634-43.
- VANIKAR, A.V., TRIVEDI, H.L., GOPAL, S.C., KUMAR, A. & DAVE, S.D. 2014. Pre-transplant co-infusion of donor-adipose tissue derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells may help in achieving tolerance in living donor renal transplantation. *Ren Fail*, 36, 457-60.
- VERITER, S., GIANELLO, P., IGARASHI, Y., y cols. 2014. Improvement of subcutaneous bioartificial pancreas vascularization and function by coencapsulation of pig islets and mesenchymal stem cells in primates. *Cell Transplant*, 23, 1349-64.
- VINCENTI, F. 2008. Costimulation blockade in autoimmunity and transplantation. *J Allergy Clin Immunol*, 121, 299-306; quiz 307-8.

- VINCENTI, F., LARSEN, C., DURRBACH, A., y cols. 2005. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med*, 353, 770-81.
- WAKITANI, S., IMOTO, K., YAMAMOTO, T., y cols. 2002. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 199-206.
- WALZ, A., PEVERI, P., ASCHAUER, H. & BAGGIOLINI, M. 1987. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 149, 755-61.
- WAN, C.D., CHENG, R., WANG, H.B. & LIU, T. 2008. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 7, 29-33.
- WANG, J., BIAN, C., LIAO, L., y cols. 2009. Inhibition of hepatic stellate cells proliferation by mesenchymal stem cells and the possible mechanisms. *Hepatol Res*, 39, 1219-28.
- WANG, M., CRISOSTOMO, P.R., HERRING, C., MELDRUM, K.K. & MELDRUM, D.R. 2006. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291, R880-4.
- WANG, W., DU, Z., YAN, J., y cols. 2014. Mesenchymal stem cells promote liver regeneration and prolong survival in small-for-size liver grafts: involvement of C-Jun N-terminal kinase, cyclin D1, and NF-kappaB. *PLoS One*, 9, e112532.
- WANG, X., WANG, W., XU, J., WU, S. & LE, Q. 2015. All-trans retinoid acid promotes allogeneic corneal graft survival in mice by regulating Treg-Th17 balance in the presence of TGF-beta. *BMC Immunol*, 16, 17.
- WANG, Y., LIAN, F., LI, J., y cols. 2012. Adipose derived mesenchymal stem cells transplantation via portal vein improves microcirculation and ameliorates liver fibrosis induced by CCl4 in rats. *J Transl Med*, 10, 133.
- WEBB, L.M., WALMSLEY, M.J. & FELDMANN, M. 1996. Prevention and amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: requirement for both B7-1 and B7-2. *Eur J Immunol*, 26, 2320-8.
- WEGENKA, U.M., BUSCHMANN, J., LUTTICKEN, C., HEINRICH, P.C. & HORN, F. 1993. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol*, 13, 276-88.
- WHIKEHART, D.R., PARIKH, C.H., VAUGHN, A.V., MISHLER, K. & EDELHAUSER, H.F. 2005. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. *Mol Vis*, 11, 816-24.
- WILKINS, A., KEMP, K., GINTY, M., y cols. 2009. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem Cell Res*, 3, 63-70.
- WILLIAMS, J.T., SOUTHERLAND, S.S., SOUZA, J., CALCUTT, A.F. & CARTLEDGE, R.G. 1999. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg*, 65, 22-6.
- WILLIAMS, K.A., KEANE, M.C., GALLETIS, R.A., JONES, V.J., MILLS, R.A.D., COTER, D.J. 2015. The Australian corneal graft registry. 2015 report.
- WOLPE, S.D., DAVATELIS, G., SHERRY, B., y cols. 1988. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med*, 167, 570-81.
- XU, G., ZHANG, Y., ZHANG, L., ROBERTS, A.I. & SHI, Y. 2009a. C/EBPbeta mediates synergistic upregulation of gene expression by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 27, 942-8.
- XU, L.L., WARREN, M.K., ROSE, W.L., GONG, W. & WANG, J.M. 1996. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *J Leukoc Biol*, 60, 365-71.

- XU, Y.X., CHEN, L., HOU, W.K., y cols. 2009b. Mesenchymal stem cells treated with rat pancreatic extract secrete cytokines that improve the glycometabolism of diabetic rats. *Transplant Proc*, 41, 1878-84.
- YAMASAKI, K., TAGA, T., HIRATA, Y., y cols. 1988. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science*, 241, 825-8.
- YANEZ, R., LAMANA, M.L., GARCIA-CASTRO, J., y cols. 2006. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*, 24, 2582-91.
- YANEZ, R., OVIEDO, A., ALDEA, M., BUEREN, J.A. & LAMANA, M.L. 2010. Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res*, 316, 3109-23.
- YANG, Y. & WILSON, J.M. 1996. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science*, 273, 1862-4.
- YAO, L., LI, Z.R., SU, W.R., y cols. 2012. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One*, 7, e30842.
- YOO, K.H., JANG, I.K., LEE, M.W., y cols. 2009. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol*, 259, 150-6.
- YOON, S.H., SHIM, Y.S., PARK, Y.H., y cols. 2007. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells*, 25, 2066-73.
- YOSHIDA, S., ONO, M., SHONO, T., y cols. 1997. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol*, 17, 4015-23.
- YOSHIMURA, K., SHIGEURA, T., MATSUMOTO, D., y cols. 2006. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*, 208, 64-76.
- YOSHIMURA, T., MATSUSHIMA, K., TANAKA, S., y cols. 1987. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 9233-7.
- YUE, W.M., LIU, W., BI, Y.W., y cols. 2008. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, reduce neointimal formation, and enhance endothelial function in a rat vein grafting model. *Stem Cells Dev*, 17, 785-93.
- ZAPPIA, E., CASAZZA, S., PEDEMONTE, E., y cols. 2005. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 106, 1755-61.
- ZHANG, B., LIU, R., SHI, D., y cols. 2009. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood*, 113, 46-57.
- ZHANG, P., MOUDGILL, N., HAGER, E., y cols. 2011a. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells from elderly patients with cardiovascular disease. *Stem Cells Dev*, 20, 977-88.
- ZHANG, S., CHEN, L., LIU, T., y cols. 2012. Human umbilical cord matrix stem cells efficiently rescue acute liver failure through paracrine effects rather than hepatic differentiation. *Tissue Eng Part A*, 18, 1352-64.
- ZHANG, X., REN, X., LI, G., y cols. 2011b. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune uveoretinitis by comprehensive modulation of systemic autoimmunity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 3143-52.
- ZHAO, L.R., DUAN, W.M., REYES, M., y cols. 2002. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*, 174, 11-20.
- ZHAO, X., BOENISCH, O., YEUNG, M., y cols. 2012. Critical role of proinflammatory cytokine IL-6 in allograft rejection and tolerance. *Am J Transplant*, 12, 90-101.
- ZHOU, Y., YUAN, J., ZHOU, B., y cols. 2011. The therapeutic efficacy of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on experimental autoimmune hearing loss in mice.

- Immunology*, 133, 133-40.
- ZUBKOVA, E.S., BELOGLAZOVA, I.B., MAKAREVICH, P.I., y cols. 2015. Regulation of Adipose Tissue Stem Cells Angiogenic Potential by Tumor Necrosis Factor-Alpha. *J Cell Biochem*.
- ZUK, P.A., ZHU, M., ASHJIAN, P., y cols. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13, 4279-95.
- ZUK, P.A., ZHU, M., MIZUNO, H., y cols. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7, 211-28.

ARTÍCULOS

