



**Universidad
Andrés Bello®**

UNIVERSIDAD NACIONAL ANDRÉS BELLO

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**NIVELES DE GAD-67/GAD-65 Y ACTIVIDAD
INMUNOSUPRESORA DE LAS CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES EXPUESTAS A CITOQUINAS
PRO-INFLAMATORIAS *IN VITRO*.**

Tesis de pregrado para optar al título de Tecnólogo Médico con mención en
Bioanálisis Clínico, Inmunohematología y Banco de Sangre.

Autores:

Marisol Isabel González Barrientos

Rodrigo Alberto Vilches Vargas

Profesor tutor: Rodrigo Esteban Fuentealba Alday, PhD.

Santiago de Chile, 2014

*Dedicada a nuestras familias, a los que están con nosotros y a los que ya partieron.
Gracias a su apoyo incondicional se pudo llevar a cabo esta investigación.*

AGRADECIMIENTOS.

Nuestros más profundos agradecimientos a nuestro profesor tutor Rodrigo Fuentealba Alday por confiar en nosotros, darnos las herramientas para desarrollarnos y guiarnos en todo momento para llevar a cabo este proyecto, ya que gracias a sus enseñanzas hemos podido abrir las puertas hacia la investigación, un mundo totalmente fascinante.

Agradecer también a nuestras familias y más cercanos que estuvieron apoyando en todo momento nuestro arduo trabajo para consignar la meta y cumplir nuestros objetivos, tendiéndonos una mano en los días más extenuantes y brindándonos con cariño su apoyo incondicional.

Damos las gracias también al equipo que conforma el Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB) de la Universidad de los Andes, por permitirnos desarrollar nuestra unidad de investigación en sus dependencias, por brindarnos un espacio confortable y un ambiente muy grato; agradecer a Don Flavio Carrión Arriagada, Mónica Kurte Gómez, Ana María Vega Letter, por su colaboración y apoyo en todo momento. A Mariana Urrutia Cabrera por su gran apoyo y compañerismo en esta etapa que recorrimos.

A Don Patricio Rojas Montecinos por ofrecernos en forma generosa su ayuda cuando lo necesitamos en nuestros experimentos.

Finalmente, agradecemos a todos quienes nos brindaron su apoyo y que pertenecen al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de los Andes y sus diversos laboratorios que también aportaron con su ayuda de manera muy gentil.

Índice

CAPÍTULO 1: RESUMEN.....	7
CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN.....	8
2.1. Células madre Mesenquimales.....	8
2.2. “Licenciamiento” de MSC y acción inmunosupresora.....	9
2.3. GABA y sistema inmune.....	12
CAPÍTULO 3: HIPÓTESIS.....	18
CAPÍTULO 4: OBJETIVOS.....	18
4.1. Objetivos generales.....	18
4.2. Objetivos específicos.....	18
CAPÍTULO 5: METODOLOGÍA.....	19
5.1. Tipo de estudio.....	19
5.2. Lugar de realización.....	19
5.3. Financiamiento.....	20
5.4. Método estadístico.....	20
5.5. Métodos y procedimientos.....	20
5.5.1. Cultivo celular.....	20
5.5.2. Descongelamiento de Células Mesenquimales.....	21
5.5.3. Tripsinización de Células Mesenquimales.....	21
5.5.4. Tratamiento de Células Mesenquimales con IFN- γ + IL-1 β	22
5.5.5. Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA.....	23
5.5.6. Cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR.....	24
5.5.7. Obtención de lisado celular proteico.....	25
5.5.8. Cuantificación de proteínas (Método de Bradford).....	25
5.5.9. Inmunodetección de GAD-65, GAD-67 y β -actina mediante Western Blot.....	26
5.5.10. Ensayos de inmunosupresión.....	27

5.5.11. Algoritmo para el cálculo del índice de proliferación.	30
CAPÍTULO 6: RESULTADOS.....	32
6.1. Ensayos de inmunosupresión.	32
6.1.1. Control de pureza de T CD4 ⁺	34
6.1.2. Determinación del rango dinámico de inmunosupresión de MSC. ...	35
6.1.3. El tratamiento con IL-1 β o con IFN- γ +IL-1 β estimula las capacidades inmunosupresoras de MSC a una razón 1:10 (MSC:T CD4 ⁺).	39
6.1.4. Pérdida gradual de las propiedades inmunosupresoras a razones 1:15 y 1:30 (MSC:T CD4 ⁺).	41
6.1.5. Pre-tratamiento con IL-1 β por 24 horas habilita las propiedades inmunosupresoras de MSC Invitrogen a una proporción 1:10 (MSC:T CD4 ⁺).	42
6.2. RT-qPCR.....	44
6.2.1. Determinación de los niveles de mRNA de GAD-67 bajo estímulos de citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-1 β por RT-qPCR.	44
6.3. Western Blot.....	49
6.3.1. Determinación de los niveles de GAD-67 y GAD-65 bajo estímulos de citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-1 β mediante Western Blot.	49
CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN.....	52
CAPÍTULO 8: CONCLUSIÓN.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS.	64

Índice de Figuras.	Página
FIGURA 1. <i>Inmunomodulación por MSC.</i>	11
FIGURA 2. <i>Acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa.</i>	13
FIGURA 3. <i>Representación esquemática de un receptor GABA-A.</i>	14
FIGURA 4. <i>Esquema para cálculo de índice de proliferación.</i>	31
FIGURA 5. <i>Microfotografía representativa de un cultivo de MSC.</i>	32
FIGURA 6. <i>Inmunofenotipo de MSC Invitrogen.</i>	33
FIGURA 7. <i>Control de pureza T CD4⁺ de un experimento representativo.</i>	34
FIGURA 8. <i>Microfotografías de un ensayo de inmunosupresión representativo.</i>	36
FIGURA 9. <i>Optimización de condiciones para el ensayo de inmunosupresión.</i>	37
FIGURA 10. <i>Ensayo de inmunosupresión con 30.000 MSC pre-tratadas por 48 horas con IFN-γ e IL-1β.</i>	40
FIGURA 11. <i>Ensayo de inmunosupresión con 20.000 y 10.000 MSC pre-tratadas por 48 horas con IFN-γ e IL-1β.</i>	41
FIGURA 12. <i>Ensayo de inmunosupresión con 30.000 MSC pre-tratadas por 24 horas.</i>	43
FIGURA 13. <i>Aumento de la expresión relativa de GAD-67 y ABAT en MSC estimuladas con IL-1β e IFN-γ.</i>	46
FIGURA 14. <i>Curvas de disociación y amplificación de los genes GAD-67, ABAT y 18S en experimentos de RT-qPCR.</i>	48
FIGURA 15. <i>Co-tratamiento con IFN-γ e IL-1β incrementa niveles de GAD-67 en MSC.</i>	50
FIGURA 16. <i>Co-tratamiento con IFN-γ e IL-1β no incrementa niveles de GAD-65 en MSC.</i>	51

Índice de Tablas	Página
TABLA 1. <i>Tratamiento de MSC con citoquinas pro-inflamatorias</i>	22
TABLA 2. <i>Determinación de pureza de las preparaciones de Linfocitos T CD4⁺ en los experimentos realizados</i>	35
TABLA 3. <i>Valores de Ct y cálculo de veces aumento de los niveles de GAD-67 usando la formula $2^{-\Delta\Delta ct}$</i>	47
TABLA 4. <i>Valores de Ct y cálculo de veces aumento de los niveles de ABAT usando la formula $2^{-\Delta\Delta ct}$</i>	47

CAPÍTULO 1: RESUMEN.

Las Células Madre Mesenquimales (MSC) son células multipotentes que tienen la capacidad de diferenciarse a osteocitos, condrocitos y adipocitos. El éxito alcanzado en medicina regenerativa se debe a que las MSC poseen también una fuerte capacidad inmunosupresora, condición esencial en el proceso regenerativo. Estudios recientes demuestran un claro efecto de estimulación de las capacidades inmunosupresoras de MSC por Interferón- γ (IFN- γ), ya sea sólo o en combinación con otras citoquinas pro-inflamatorias, como Interleuquina-1 β (IL-1 β). Recientemente, se ha demostrado la interacción funcional del sistema nervioso central y el sistema inmune. Las células del sistema inmune responden, y producen ellas mismas, neurotransmisores como dopamina, acetilcolina y ácido γ -aminobutírico (GABA). Se ha descrito que GABA actúa como un potente agente inmunosupresor y numerosos estudios demuestran su efectividad en la prevención de enfermedades autoinmunes en estudios pre-clínicos. Sin embargo, se desconoce si la biosíntesis de GABA está relacionada con la capacidad inmunosupresora de MSC.

Mediante técnicas moleculares de RT-qPCR y Western Blot, se determinaron los niveles de mRNA y proteína de las enzimas biosintéticas de GABA, ácido glutámico descarboxilasa (GAD)-67 y GAD-65 en MSC expuestas a IFN- γ e IL-1 β . Aquí, nosotros demostramos: (1) aumento de los niveles de mRNA y proteína de GAD-67 en MSC expuestas a las citoquinas IFN- γ e IL-1 β ; (2) aumento de mRNA de GAD-67 con IL-1 β ; (3) aumento de las propiedades inmunosupresoras de MSC pre-tratadas con IL-1 β por sí sola o en conjunto con IFN- γ , en ensayos de inmunosupresión de células T CD4⁺. Nuestros resultados indican que existe un aumento selectivo de los niveles de GAD-67 en condiciones pro-inflamatorias, que concuerda con la mayor capacidad inmunosupresora de MSC. Estos resultados sugieren que GABA podría constituir parte de la maquinaria inmunosupresora de MSC. Experimentos de pérdida de función de GAD-67 (*knockdown*) permitirán definir el papel de GABA en la inmunosupresión mediada por MSC.

Palabras clave: MSC, GAD-67, IL-1 β , IFN- γ , inmunosupresión, GABA.

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN.

2.1. Células madre Mesenquimales.

Las células madre mesenquimales, también denominadas células estromales, o MSC (de sus siglas en inglés Mesenchymal Stem Cells) son células residentes de casi todos los tejidos adultos, como médula ósea, músculo, tejido adiposo, folículo piloso, pulpa dental, placenta, periostio cerebral, dermis, pericondrio, cordón umbilical, gelatina de Wharton, pulmón, hígado y bazo (Bianco, Robey, & Simmons, 2008). Las MSC presentan facultades multipotentes, capaces de diferenciarse a otras líneas celulares de origen mesenquimal, tales como osteocitos, condrocitos, adipocitos y, bajo algunas condiciones de cultivo, en células musculares y neuronas (Pittenger, y cols., 1999) (Tantrawatpan, y cols., 2013). En el año 1991, el Dr. Arnold I. Caplan, en un reporte visionario, empleó por primera vez el término MSC para células estromales presentes en aspirados de médula ósea y en el periostio, las que poseen capacidades de diferenciación a tendón y hueso, facultades propias de las células embrionarias de origen mesenquimal (de ahí su nombre) y se delineó la idea del aislamiento, expansión y uso de MSC adultas como posible terapia celular para regeneración de hueso y cartílago (Caplan, 1991). Las MSC han sido blanco de intensa investigación en los últimos 20 años, no sólo debido a su capacidad de generar distintos tipos celulares diferenciados *in vitro*, sino que también a su capacidad para regenerar tejidos *in vivo* y sus habilidades para regular la respuesta inmunitaria, expandiendo el campo de uso de MSC en biomedicina.

Las MSC, a diferencia de las demás células madre, tales como las células troncales hematopoyéticas y las células madre embrionarias, carecen de antígenos específicos de superficie. La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció criterios mínimos para la identificación de MSC humanas, debiendo estas cumplir con los parámetros mínimos de: (1) ser adherentes al plástico, (2) expresar los marcadores de superficie CD105, CD90 y CD73, así como también carecer de los marcadores de linaje

hematopoyético CD11b, CD14, CD19, CD34 y CD45 y carecer también de HLA-DR (3) ser capaces de diferenciarse a las células de linaje mesenquimal osteocitos, condrocitos y adipocitos (Dominici, y cols., 2006) (Karp & Leng Teo, 2009) (Frenette, Pinho, Lucas, & Scheiermann, 2013).

Debido a la facilidad de establecer cultivos celulares de MSC, junto a su propiedad de auto-renovación y la facultad de mantener sus capacidades multipotentes durante sucesivas rondas de sub-cultivo *in vitro*, la medicina regenerativa se ha visto particularmente beneficiada con el uso de MSC (Murphy, Moncivais, & Caplan, 2013). Se desconoce si el efecto positivo en la reparación de tejidos es por una directa incorporación de las MSC diferenciada a los distintos tipos celulares en la zona a regenerar, pero se ha planteado que la secreción de factores tróficos, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas y antioxidantes (Karp & Leng Teo, 2009), así como de factores paracrinos y moléculas inmunomoduladoras sería más importante en la contribución a la regeneración tisular. Los estudios con MSC apuntan hacia la terapia celular. Además de poseer, dentro de sus principales características, la capacidad de modular el sistema inmune. Numerosas investigaciones han demostrado que las MSC son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T *in vitro*, tanto en modelos de experimentación animales como en humanos (Di Nicola, y cols., 2002) (Bartholomew, y cols., 2002). En linfocitos T es donde principalmente se ha visto un efecto modulador por parte de las MSC. Se ha visto que las MSC, bajo ciertas condiciones, tienen la capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos T. Investigaciones *in vitro* han demostrado que las propiedades inmunosupresoras de las MSC pueden ser revertidas con la adición de IL-2 al medio experimental (Bartholomew, y cols., 2002).

2.2. “Licenciamiento” de MSC y acción inmunosupresora.

Estudios recientes sugieren que, para que las MSC adquieran máxima actividad inmunosupresora, es necesario que sean expuestas a una activación previa con factores pro-inflamatorios, lo que se denomina licenciamiento o *priming*. Dichas citoquinas pro-

inflamatorias pueden ser por ejemplo, IFN- γ , TNF- α , IL-1 α o IL-1 β . La citoquina de mayor relevancia es IFN- γ . En dichos estudios se ha descrito la presencia de receptores de IFN- γ funcionales en MSC (Ren, y cols., 2008). Estas citoquinas pro-inflamatorias, combinadas de forma que siempre IFN- γ esté presente, muestran la expresión elevada de Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS) y de quimioquinas, cuya acción concertada permite el reclutamiento de linfocitos hasta las proximidades de MSC para una inhibición Óxido Nítrico (NO) dependiente a corta distancia, causando así la inhibición de la proliferación de linfocitos T (Ren, y cols., 2012).

En modelos experimentales murinos, se ha demostrado que la exposición de MSC a la citoquina IFN- γ , y en combinación con alguna de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 α o IL-1 β , promueve la migración de linfocitos T a las cercanías de las MSC (quimiotaxis) concomitantemente con una elevación de los niveles proteicos y la actividad de la enzima iNOS, así como de las concentraciones de NO, provocando un potente efecto inmunosupresor (Ren, y cols., 2008). Es importante mencionar que en ausencia de los estímulos con citoquinas pro-inflamatorias, las MSC no logran causar inmunosupresión por sí sola. Notablemente, las citoquinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 α e IL-1 β por sí solas no son capaces de inducir la inmunosupresión mediada por las MSC tratadas, indicando un efecto sinérgico sobre las MSC tratadas con dichas combinaciones de citoquinas para un máximo efecto inmunosupresor. En dicho estudio, se destaca también que las MSC inhibieron la producción de citoquinas IFN- γ , IL-4 y TNF- α por parte de linfocitos T, lo cual ha llevado a plantear que las MSC son un dispositivo celular inteligente capaz de sensar ambientes pro-inflamatorios para regular finamente el nivel de inflamación local. Se han observado fenómenos de quimiotaxis también por parte de las MSC, inducidas por estímulos pro-inflamatorios. Las MSC son inmóviles, y al ser estimulada con IFN- γ (en conjunto con otra citoquina), tiene la capacidad de atraer células del sistema inmunológico con lo cual aumenta su eficacia como ente inmunosupresor (Ren, y cols., 2008).

Es oportuno mencionar que la actividad inmunosupresora se puede demostrar *in vivo*. Se ha descrito que las MSC expuestas a IFN- γ se convierten en células potentemente inmunosupresoras y que de esta forma disminuyen por ejemplo la enfermedad injerto

versus huésped en trasplante de medula ósea, con un efecto 5 veces más eficiente en comparación con las MSC sin tratamiento (Krampera, 2011) (Polchert, y cols., 2008).

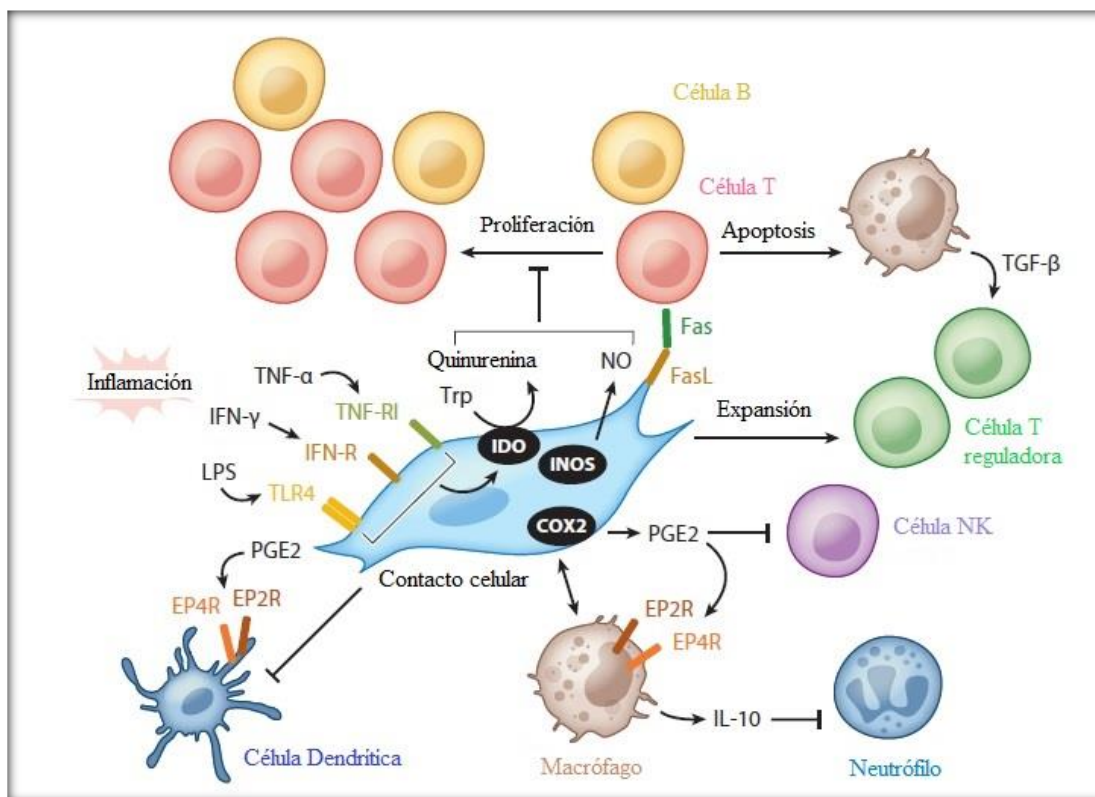


FIGURA 1. Inmunomodulación por MSC. En ambiente inflamatorio, IFN- γ , TNF- α y Lipopolisacáridos (LPS) pueden actuar sobre receptores presentes en superficie de MSC. Dichos eventos, en MSC humanas, generan producción de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y quinurenina, que suprimen proliferación de células B y T. En MSC murinos, el estímulo provocado por citoquinas genera iNOS con efectos anti-proliferativos sobre células B y T. Liberación de TGF- β e interacción Fas-FasL producen expansión de células T reguladoras. La actividad inmunomoduladora de MSC con células dendríticas y macrófagos esta mediada por Ciclooxygenasa 2 (COX2) y Prostaglandina E2 (PGE2). Fuente: Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol* 2013;31:285-316

Existen otros mecanismos descritos a través de los cuales las MSC podrían causar inmunosupresión. Como se puede observar en la Figura 1, la expresión de ligando Fas en MSC (Akiyama, y cols., 2012) y metabolitos del aminoácido triptófano (MSC humanas) (Ren, y cols., 2009) para la inhibición de los linfocitos T y la producción de

PGE2 para la regulación de células del sistema inmune innato, tales como células Natural Killer (NK) (inhibición) y macrófagos (polarización a un fenotipo inmunosupresor). Es imperante describir y caracterizar mejor los variados mecanismos inmunosupresores que las MSC utilizan y la especificidad de acción frente a diferentes células del sistema inmune, para mejorar y potenciar su utilidad en terapia celular inmunosupresora. Nuestro laboratorio está interesado en potenciar las capacidades inmunosupresoras de las MSC basados en la manipulación de efectores inmunosupresores establecidos, particularmente el neurotransmisor GABA como agente efector.

2.3. GABA y sistema inmune.

El ácido- γ -aminobutírico o GABA (de su sigla en inglés γ -aminobutyric acid) es el principal neurotransmisor de tipo inhibitorio en el Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos. Fue descubierto en el año 1950 simultáneamente por Eugene Roberts y Jorge Awapara (Roberts, 2000). Estudios electrofisiológicos entre los años 1950 y 1965 sugirieron un rol para GABA como un neurotransmisor en el SNC de mamíferos: GABA está presente en los terminales nerviosos, es liberado desde neuronas eléctricamente estimuladas, existe un mecanismo de acción para detener la acción del neurotransmisor liberado, su aplicación exógena en neuronas imita la acción de la estimulación del nervio inhibitorio, y posee receptores específicos (G. J. Siegel, 2006). Su existencia en el tejido nervioso asegura un equilibrio entre la excitación y la inhibición neuronal causando una hiperpolarización de la membrana post-sináptica, contrarrestando así la neurotransmisión excitatoria.

GABA es producido por la descarboxilación del glutamato mediante la acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa o GAD (de su sigla en inglés Glutamic acid decarboxylase), (Jin, Mendu, & Birnir, 2013) como lo ilustra la Figura 2.

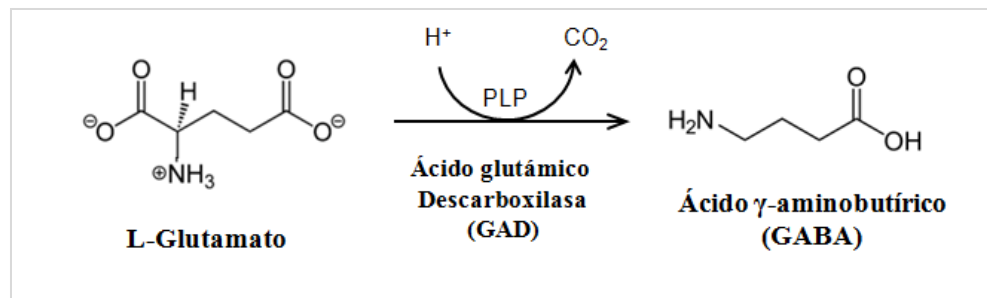


FIGURA 2. Acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa. En la figura se ilustra la acción de la enzima Ácido glutámico descarboxilasa (GAD), mediante la descarboxilación del ácido glutámico o glutamato, formándose el neurotransmisor Ácido γ -aminobutírico. La actividad de GAD requiere fosfato de piridoxal (PLP) como cofactor. *Fuente: Elaboración propia.*

Se han identificado dos isoformas para esta enzima, GAD-67 y GAD-65, que poseen pesos moleculares de 67 kDa y 65 kDa, respectivamente. Ambas isoformas poseen una gran similitud en su secuencia aminoacídica, la que alcanza a un 73 % de similitud (Martin, Liu, Martin, & Wu, 2000). Las mayores diferencias de las isoformas de GAD están presentes en la región N-terminal. En humanos, las enzimas GAD-67 y GAD-65 están codificadas por genes distintos, GAD1 y GAD2, ubicados en los cromosomas 10 y 2, respectivamente (Lariviere, y cols., 2002). Similarmente, estas dos isoformas están también codificadas por genes distintos en ratón y en rata, y estudios filogenéticos han permitido establecer que las dos isoformas surgieron evolutivamente a partir de un único ancestro común (Bu & Tobin, 1994) (Bosma, y cols., 1999). Las dos isoformas de esta enzima se expresan simultáneamente en las neuronas GABAérgicas, pero difieren en su regulación, interacción con el cofactor piridoxal 5'-fosfato (PLP) y en su localización subcelular (Lariviere, y cols., 2002). Así, GAD-67 se distribuye de manera uniforme por el citoplasma neuronal y GAD-65 se localiza mayoritariamente en vesículas sinápticas (Jin, y cols., 2013).

La producción de GABA a través de esta enzima, activa los canales iónicos GABA-A y los receptores GABA-B en la neurona, lo que determina una inhibición neuronal. La activación de los canales GABA-A resulta en una respuesta rápida de hiperpolarización de la neurona por entrada de iones cloruro (Alam, Laughton, Walding, & Wolstenholme, 2006), mientras que los receptores GABA-B, compuestos por dos subunidades, GABA-B1 y GABA-B2, corresponden a receptores acoplados a proteína G (Couve, Moss, & Pangalos, 2000) (Jacob, Moss, & Jurd, 2008), los cuales actúan como heterodímeros y activan canales de potasio en respuesta a GABA, llevando las concentraciones de K^+ a equilibrio, causando también hiperpolarización y por ende, previniendo la activación de canales de sodio y de canales dependientes por voltaje, previniendo la transmisión del impulso sináptico (Couve, y cols., 2000).

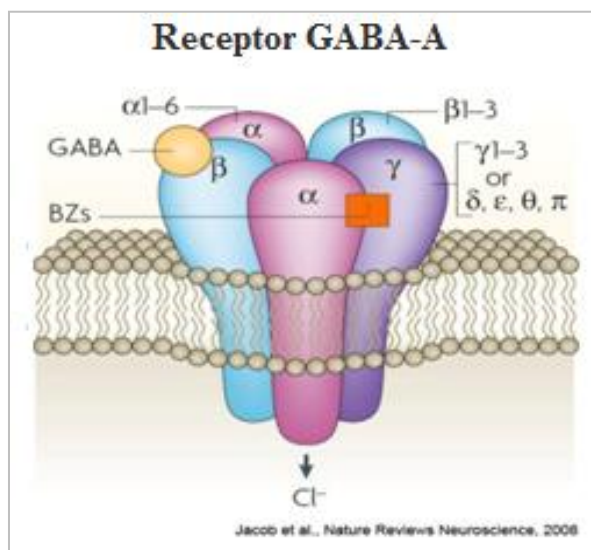


FIGURA 3. Representación esquemática de un receptor GABA-A.

Los receptores GABA-A son canales permeables a iones cloruro heteropentaméricos, típicamente formados por 3 tipos de subunidades diferentes: 2 subunidades α , 2 subunidades β y una tercera subunidad ocupada por cualquiera de los 18 tipos existentes. Fuente: Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 2008;9:331-343.

Los canales iónicos GABA-A, son canales de cloruro conformados por una estructura pentamérica que normalmente se encuentran cerrados, pero pueden ser abiertos por GABA, activando la conductancia de cloruro por la membrana y la entrada de éste, hiperpolarizando la membrana neuronal (Bjurstom, y cols., 2008). Estos canales están conformados por distintas subunidades, conteniendo normalmente tres tipos de subunidades, 2α s, 2β s y un tercer tipo de subunidad, que puede ser cualquiera de los 18 tipos existentes. Entre las subunidades que han sido clonadas, se encuentran 18 tipos diferentes de subunidades (Jacob, y cols., 2008), que se pueden agrupar en 7 subfamilias, $\alpha(1-6)$, $\beta(1-3)$, $\gamma(1-3)$, δ , ϵ , θ , π y $\rho(1-3)$, sin embargo, la mayoría de los canales GABA-A están compuestos por 2α , 2β y 1γ (o 1δ) (Jacob, y cols., 2008). Todas las neuronas tienen canales iónicos GABA-A, pero difieren en los distintos subtipos que lo conforman, los que varían durante el desarrollo y las distintas regiones cerebrales (Jin, y cols., 2013). Estos canales pueden encontrarse en la sinapsis o fuera de ella, lo que se denomina canales extrasinápticos.

Luego de sintetizado y liberado al espacio extrasináptico, GABA es transportado al interior de las neuronas y astrocitos en forma pasiva, a favor de un gradiente de concentración, mediante la acción de transportadores de GABA de la familia Scla6a (GAT1-4) para su reciclaje en nuevas vesículas sinápticas o para su degradación metabólica. En este último caso, GABA es convertido a succínico semialdehído por desaminación mediante la acción de la enzima GABA-Transaminasa (GABA-T) y éste es luego transportado a la mitocondria y oxidado a succinato por acción de la enzima succínico semialdehído deshidrogenasa, permitiendo degradar GABA en el ciclo de Krebs a nivel de succinato (Tillakaratne, Medina-Kauwe, & Gibson, 1995) (Buddhala, Hsu, & Wu, 2009).

Se ha demostrado últimamente que existe comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmune (Jin, y cols., 2013) (Bjurstom, y cols., 2008). Estudios recientes han reportado que las células inmunitarias sintetizan y liberan componentes del sistema nervioso, tal como el neurotransmisor GABA (Stuckey, y cols., 2005) (Bhat, y cols., 2010) y que además poseen elementos para la producción, reconocimiento y

transporte de este neurotransmisor, tales como las enzimas biosintéticas GAD-67/GAD-65 (Bhat, y cols., 2010), los canales iónicos GABA-A (Mendu, Bhandage, Jin, & Birnir, 2012), receptores GABA-B (Rane, y cols., 2005) y transportadores de GABA (Jin, y cols., 2013).

Los efectos descritos en los últimos estudios, señalan que GABA tiene un rol inmunomodulador en el sistema inmune innato y adaptativo. Por ejemplo, GABA modula la citotoxicidad por las células inmunocompetentes que expresan canales GABA-A (Bergeret, y cols., 1998). Las enzimas GAD se han encontrado en diferentes tipos de células inmunitarias. GAD-67 ha sido encontrada en monocitos periféricos humanos y GAD-65 en células dendríticas y macrófagos (Bhat, y cols., 2010). A su vez, la secreción de GABA se ha identificado en macrófagos, células dendríticas y células T CD4⁺ en ratón, mientras que en humano se ha identificado en monocitos periféricos, macrófagos y linfocitos (Dionisio, Jose De Rosa, Bouzat, & Esandi Mdel, 2011).

GABA ejerce diversos efectos en el sistema inmune. Por ejemplo, GABA causa la activación o supresión de la secreción de citoquinas, modificación de la proliferación celular y además puede modular la migración de las células (quimiotaxis). Se ha formulado la hipótesis de que el momento en que las células inmunitarias encuentran GABA, será cuando exista liberación por acción autocrina o bien cuando células inmunitarias entran en el sistema nervioso central (Jin, y cols., 2013).

GABA puede ser además encontrado en diversos tejidos y en variadas concentraciones, siendo los tejidos donde más hay detección de GABA los ganglios linfáticos, los islotes de Langerhans, la hipófisis, el tracto gastrointestinal y en sangre, entre otros (Tillakaratne, y cols., 1995). En la sangre, GABA se encuentra en concentraciones suficientes para activar los canales iónicos GABA-A (Bjurstom, y cols., 2008). Según su localización, GABA se puede encontrar en concentraciones elevadas de hasta 1 mM en terminales sinápticos dentro de las regiones cerebrales o encontrarse en rangos que varían entre concentraciones bajas de μM a nM en sitios extrasinápticos (Bjurstom, y cols., 2008). En individuos sanos, GABA puede encontrarse en plasma en una concentración de 100 nM

(Bjork, y cols., 2001). Estas bajas concentraciones fisiológicas de GABA en lugares extrasinápticos, es decir, fuera del sistema nervioso central, induce a la activación de los canales de GABA-A en los linfocitos T y en macrófagos, resultando en una disminución de la proliferación de células T y la liberación de citoquinas; por el contrario, la disminución de los niveles fisiológicos de GABA, estimulan la proliferación de las células T, siendo así un agente inmunomodulador e inmunosupresor (Bjurstom, y cols., 2008).

Debido a que las MSC presentan una potenciación de sus efectos inhibitorios sobre la proliferación de los linfocitos bajo variados estímulos de licenciamiento pro-inflamatorio por una parte, desconociéndose si una señalización GABA estaría involucrada, nuestro trabajo tiene un carácter exploratorio y tiene por objetivo caracterizar los niveles de expresión de las enzimas biosintéticas GAD-67 y GAD-65 en MSC expuestas a citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-1 β *in vitro*, las cuales están presentes en ambientes inflamatorios y se ha descrito que aumentan las propiedades inmunosupresoras de MSC.

Finalmente, se analizó si los cambios en los niveles de GAD-67 y GAD-65 inducidos en estas condiciones, se condicen con un aumento en las capacidades inmunosupresoras de las MSC al término de estos tratamientos. Nuestro objetivo es determinar si existe alguna correlación entre un aumento de los niveles de GAD con un aumento de las propiedades inmunosupresoras de las MSC. Este estudio sentará las bases para evaluar si las MSC utilizan señalización GABA como parte de su maquinaria para causar inmunosupresión *in vitro*, con la presencia de citoquinas IFN- γ e IL-1 β , que licencia estas MSC para ser más inmunosupresoras, presumiblemente vía la secreción de GABA.

CAPÍTULO 3: HIPÓTESIS.

El aumento en los niveles de GAD-67 y/o GAD-65 favorece la actividad inmunosupresora de las MSC.

CAPÍTULO 4: OBJETIVOS.

4.1. Objetivos generales.

Evaluar si el tratamiento de las MSC con citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-1 β causa tanto un aumento en la actividad inmunosupresora, como en los niveles de mRNA y proteína de GAD-67 y/o GAD-65.

4.2. Objetivos específicos.

- I.** Evaluar las capacidades inmunosupresoras de las MSC estimuladas con IFN- γ [25 ng/mL] e IL-1 β [20 ng/mL] por 24 y 48 horas, mediante un ensayo de proliferación de linfocitos T CD4⁺ purificados.
- II.** Determinar los niveles de ARN mensajero de las enzimas GAD-67 y GAD-65, en MSC bajo estímulos con citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-1 β , mediante la técnica de RT-qPCR.
- III.** Determinar los niveles de expresión de las enzimas GAD-67 y GAD-65, en condiciones basales y bajo los estímulos con citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-1 β en las MSC por 24 y 48 horas, utilizando técnica de Western Blot.

CAPÍTULO 5: METODOLOGÍA.

5.1. Tipo de estudio.

La presente unidad de investigación utiliza un modelo de investigación experimental pre-clínico.

5.2. Lugar de realización.

El presente estudio se realizó íntegramente en el Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédicas (CIB) de la Universidad de los Andes, el cual está provisto de áreas especializadas para desarrollar técnicas de cultivo celular en condiciones de esterilidad (campanas de bioseguridad Nivel 2, estufa húmeda con inyectores de CO₂, *visicooler* para la mantención de medios, microscopio invertido Axiovert), áreas destinadas para los estudios de Biología Molecular que utilizan RNA y RT-qPCR (campana de PCR de flujo vertical con filtro HEPA marca BIOBASE), zonas equipadas para los estudios de Western Blot (fuentes de poder (Sigma), cámaras de electroforesis y transferencia (Bio-Rad), agitadores horizontales tipo balancín de mesón y refrigerados). Adicionalmente, el Centro de Investigaciones Biomédicas cuenta con zonas comunes de trabajo equipadas con un Citómetro de Flujo (Beckton Dickinson, modelo FACS CantoII), una sala de revelado fotográfico, sala de PCR equipadas con termocicladores convencionales (Axygen) y de real-time PCR (Stratagene, modelo MxPro3000), y una sala de refrigeradores para almacenaje a -20°C, -40°C y -80°C. El laboratorio está equipado con todos los insumos necesarios para ejecutar a cabalidad los experimentos propuestos.

5.3. Financiamiento.

Fondecyt Regular #1130482 y Proyecto FAI.

5.4. Método estadístico.

Cuando el número de réplicas experimentales lo permitió, se utilizó One way - ANOVA con corrección de Dunnett como método estadístico de elección. Para aquellos ensayos donde las réplicas experimentales eran pequeñas, se realizó test de One way - ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) con corrección de Dunn's. Para los análisis de significancia estadística, se utilizó el software GraphPad Prism® 5.0. En todos los casos, los resultados se representaron como gráficos de barras, mostrando el promedio y el error estándar medido para cada grupo experimental.

5.5. Métodos y procedimientos.

5.5.1. Cultivo celular.

Las MSC de Médula ósea de ratón, cepa C57BL/6, fueron obtenidas desde Invitrogen, GIBCO® Mouse (C57BL/6) Mesenchymal Stem Cells Cat.No S1502-100 y fueron crecidas en condiciones asépticas en medio MSC: Alpha-MEM suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB, Hyclone SH30396.03), 2 mM Glutamina, 10.000 U/mL Penicilina, 100U/mL Streptomycin en una incubadora húmeda a 37°C con 5% CO₂. Estas células son certificadas para su potencial de tri-diferenciación y para la presencia de los marcadores de MSC CD29, CD34, CD44, and Sca-1 (> 70%), y negativo para CD117 (< 5%). Las MSC Invitrogen son comercializadas en pasaje 8, y fueron expandidas a gran escala y luego congeladas en el laboratorio en crioviales con 1 mL de medio de congelamiento (FBS 90% + DMSO 10%) en pasajes 10-12, utilizando protocolos estándar

de cultivo. Las células se mantuvieron en los crio-viales a -80°C durante un tiempo no superior a 6 meses, hasta el momento de su uso.

5.5.2. Descongelamiento de Células Mesenquimales.

Para garantizar que las MSC no superaran un pasaje superior a 18, se descongeló un crio-vial cada vez que el cultivo celular alcanzó pasaje 16, mediante el siguiente protocolo: se colocó 4 mL de medio MSC en una botella T-25 para cultivo celular (SPL Lifesciences) y se dejó equilibrar en la incubadora. Se descongeló un criovial (pasaje 10-12) a temperatura ambiente y, una vez derretido el último fragmento de hielo, se transfirió inmediatamente el contenido del criovial a la botella T-25. Se adhirieron y crecieron las células durante 4 horas, y luego se reemplazó el medio de crecimiento, conteniendo el DMSO, por 4 mL de medio MSC fresco.

5.5.3. Tripsinización de Células Mesenquimales.

El crecimiento de las células se monitoreó todos los días mediante inspección al microscopio, y los cultivos de MSC fueron sub-cultivados mediante tripsinización cuando alcanzaron una confluencia del 70-80%. Para esto, se lavó 2 veces las células con DPBS 1x (Invitrogen) y se despegaron las células enzimáticamente usando 1-3 mL de Solución de Tripsina 1x. Luego de 5 minutos de incubación a 37°C , se despegaron mecánicamente las células por agitación suave, y se pasaron 10 veces por una punta azul. Se detuvo la reacción de la tripsina mediante *quencheo* con 2 volúmenes de medio MSC y las células fueron sedimentadas por centrifugación a $350 \times g$ por 6 minutos. Finalmente, las células fueron resuspendidas y sembradas a una densidad de 5.000 células/cm² para un crecimiento de dos días o 10.000 células/cm² para un crecimiento de tres días.

5.5.4. Tratamiento de Células Mesenquimales con IFN- γ + IL-1 β .

Para los experimentos con citoquinas, se mantuvieron las MSC por un período de 24 y 48 horas en presencia de citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-1 β , evaluando las citoquinas por separado y en conjunto, para probar su acción individual y su acción en conjunto.

Para esto, se realizaron experimentos apilados a tiempo reverso. En breve, el día antes del inicio del tratamiento con citoquinas las MSC fueron sembradas en botellas T-25 a una densidad de 4.800 cél/cm², utilizando un volumen final de 4 mL de medio MSC. Al siguiente día, se removió 1 mL de medio y se suplementó el medio con IFN- γ 25 ng/mL, IL-1 β 20 ng/mL, o ambas citoquinas juntas y se mantuvo el cultivo por 48 horas. Para el tratamiento de 24 horas, el mismo procedimiento se realizó 24 horas después de iniciado el tratamiento de 48 horas.

Al finalizar los tratamientos, las células se tripsinizaron para los ensayos funcionales, o se procesaron para extracción de proteínas o RNA, según correspondiera. La Tabla 1 resume las cantidades de stock de citoquinas añadidos para cada tratamiento. La misma metodología se efectuó con 24 horas de desfase para el tratamiento de 24 horas.

TABLA 1. Tratamiento de MSC con citoquinas pro-inflamatorias			
<i>Flask</i>	<i>Concentración Stock</i>	<i>Volumen utilizado</i>	<i>Concentración utilizada de citoquinas</i>
Control			Sin adición de citoquinas
IL-1 β	2 μ g/mL	30 μ L	Interleuquina-1 β [20 ng/mL]
IFN γ	25 μ g/mL	3 μ L	Interferón- γ [25 ng/mL]
IFN γ + IL-1 β		3 μ L / 30 μ L	Interferón- γ [25 ng/mL]+Interleuquina-1 β [20 ng/mL]

5.5.5. Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA.

Para detener el tratamiento con citoquinas, se colocaron las botellas T-25 sobre hielo, y se lavó cada botella una vez con 3 mL DPBS 1x (Invitrogen) frío. Se descartó el lavado y se despegaron las células mecánicamente en 1 mL de DPBS 1x frío, ayudándose con un rastrillo estéril para cosechar células. Se traspasó la suspensión celular a un tubo Eppendorf de 1,5 mL libre de RNAsas (Axygen) y las células fueron sedimentadas por centrifugación a 400 $\times g$ a 4°C por 10 minutos. El pellet celular fue resuspendido en 1 mL de reactivo Trizol (Invitrogen) y colocado en hielo hasta completar el mismo procedimiento con todas las muestras.

Para efectuar la lisis de las células, se agitaron los tubos vigorosamente utilizando vórtex durante 20 segundos, y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para separar las fases acuosa y orgánica del reactivo Trizol, se agregaron 200 μL de cloroformo, se agitó nuevamente por vórtex durante 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente 3 minutos para facilitar la separación de fases inicial, y se centrifugó a 12.000 $\times g$ a 4°C por 15 minutos. 500 μL de la fase acuosa superior fueron transferidos a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL libre de RNAsas (Axygen).

Para precipitar el RNA, se agregaron 500 μL de Isopropanol, se agitó por vórtex durante 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El pellet de RNA fue luego obtenido por centrifugación a 12.000 $\times g$ a 4°C por 10 minutos, lavado con 1 mL de Etanol 75% libre de RNA preparado con agua DEPC (Sigma), y resuspendido en 12 μL de agua DEPC (Sigma). La cantidad de RNA fue determinada espectrofotométricamente utilizando un equipo NanoDropTM 2000 (Thermos). Los RNA obtenidos regularmente obtenidos tenían una concentración mayor a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y una razón de Absorbancia 260/280 mayor a 1,90, demostrando la idoneidad de nuestro material de partida para la síntesis de cDNA.

2 μg de RNA fueron tratados con 1 U DNAsa I (Fermentas) en un volumen final de 10 μL . Luego de suplementar la muestra con 1 μL de EDTA 50 mM y desactivar la

DNAsa I por incubación a 65°C por 10 minutos, el RNA tratado con DNAsa I fue incubado con 1 µg de Random Primers (Promega) y sometido a denaturación/renaturación por calentamiento 5 minutos a 70°C e incubando inmediatamente en hielo por al menos 5 minutos.

El RNA hibridado a los random primers fue luego transcrito reversamente en un volumen final de 30 µL conteniendo 1.5 µL de transcriptasa reversa Improm II (Promega) y 32 U RNAsin (Promega), según las recomendaciones del fabricante. Los cDNA sintetizados fueron luego diluidos a una proporción 1:3 agregando 60 µL de agua DEPC (Sigma) y guardados a -40°C hasta el momento de su uso.

5.5.6. Cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR.

Para la determinación de los niveles de mRNA, se utilizaron los siguientes partidores previamente validados en nuestro laboratorio: GAD-67 sense: 5'-AAG GAC CAA TAG CCT GGA AGA -3', GAD-67 antisense: 5'-GTT GGA GAA GTC GGT CTC TGT-3', ABAT sense: 5'-AAG AGA GCA GAG GTA ACT ACC T-3', ABAT antisense: 5'-GCT CGC GTT CTG AGG CTG TTG-3', 18S sense: 5'-CGG ACA GGA TTG ACA GAT TG-3', 18S antisense: 5'-CAA ATC GCT CCA CCA ACT AA-3'.

Se utilizó GoTaq MasterMix 2x (Promega) en reacciones de PCR con 2.5 µL de cDNA diluido 1:3 y un volumen final de 12.5 µL. Las condiciones de PCR para estos partidores fueron 600 nM primer, annealing 58°C para GAD-67, y 150 nM primer, annealing 61°C para ABAT y 18S. En todos los casos, las eficiencias fueron de un 90-100% y se detectó un único producto amplificado, por lo que se utilizó directamente el análisis de $2^{-\Delta\Delta ct}$ para la cuantificación de los niveles de mRNA respecto a la condición control (Livak & Schmittgen, 2001).

5.5.7. Obtención de lisado celular proteico.

Para preparar el tampón de lisis, se suplementaron 500 μL PBS 1x/Tritón X-100 1%, con 5 μL Complete Proteinase Inhibitor Cocktail 100x (Roche) y 5 μL PMSF 100 mM, y se mantuvo en hielo. Para detener el tratamiento con citoquinas, se colocaron las botellas T-25 sobre hielo y se obtuvo el pellet celular en forma similar al tratamiento para extracción de RNA. El pellet de células fue luego resuspendido en 120 μL de buffer de lisis e incubado en hielo por 30 minutos para causar la lisis celular. Se realizó una breve homogeneización por vórtex (12 segundos) y se centrifugó la mezcla a 10.000 $\times g$ a 4°C por 10 minutos para eliminar el debris celular. El sobrenadante clarificado fue transferido a un nuevo tubo y congelado a -80°C hasta su uso.

5.5.8. Cuantificación de proteínas (Método de Bradford).

La cuantificación de proteínas se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano marca Runlab. Se obtuvo una curva de calibración, utilizando un patrón de seroalbúmina bovina (BSA 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). La cuantificación se realizó en triplicado para mayor confiabilidad. En la placa se consideraron pocillos para un blanco, cuatro pocillos para patrón BSA (1 μg , 2 μg , 3 μg y 4 μg), un pocillo para un blanco de buffer de lisis (1 μL) y pocillos suficientes para cada muestra (1 μL por muestra). Se preparó el reactivo de Bradford para la determinación de proteínas desde el stock Biorad Protein Assay Dye Reagent Concentrate. Se realizó una dilución 1:4 con H₂O miliQ según indica fabricante.

Luego de aplicadas las muestras en cada pocillo, se agregó 200 μL de reactivo Bradford a todos los pocillos y se dejó incubar por 10 minutos en cámara oscura. Pasado el tiempo de incubación, se realizó lectura colorimétrica utilizando un lector de microplacas de ELISA, INFINITE F50, marca TECAN. La lectura se realizó a 620 nm. Para finalizar la cuantificación se extrapoló los valores obtenidos de las muestras en la curva de calibración.

5.5.9. Inmunodetección de GAD-65, GAD-67 y β -actina mediante Western Blot.

Las proteínas presentes en el lisado celular fueron cuantificadas mediante el reactivo de Bradford (Bio-Rad) utilizando BSA como estándar y un lector de ELISA Infinite F50 (Tecan; lectura a 620 nm). Se realizó el método según se describe en la literatura (Sambrook, 1989), 30 μ g de proteínas fueron hervidas a 100°C por 5 minutos en buffer de carga Laemli 1x, conteniendo β -mercaptoetanol (volumen final 30 μ L), y las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 8%.

Se efectuó la electroforesis a 130V por 1,5 horas y las proteínas fueron inmovilizadas en membranas de PVDF, mediante transferencia húmeda a 300 mA a 4°C por 2 horas. Al término de la transferencia, las proteínas fueron brevemente visualizadas por tinción con Rojo de Ponceau S (0.1 %) con el fin de evidenciar un bandeado y transferencia exitosa, y se realizó bloqueo de la membrana de PVDF con buffer de bloqueo (PBS 1X-Tween 20 al 0,1% (PBST) leche 5%, azida de sodio 0.1%) por 1 hora.

Finalizado el bloqueo, se realizó incubación de 16 horas con los anticuerpos primarios diluidos en buffer de bloqueo: anticuerpo anti-GAD-67 (Thermos PA5-21397, dilución 1:2.000), anticuerpo anti-GAD-65 (Cell Signaling Technologies #3988, dilución 1:1.000) y anticuerpo anti-Actina (AC-15 Sigma, dilución 1:40.000).

Posteriormente, se realizó lavado de las membranas de PVDF, con PBS 1X Tween 0,1%. Se dejó la membrana de PVDF incubando con los respectivos anticuerpos secundarios en una dilución 1:5.000 con PBS 1x Tween 0,1% leche 0,5% por dos horas. Finalizada la incubación de anticuerpo secundario, se procedió a realizar 4 lavados, utilizando PBS 1x Tween 0,1%, y se realizó una incubación final con PBS 1x.

Para revelar las bandas, se expuso la membrana de PVDF al reactivo de Pierce ECL Western Blotting durante dos minutos para generar luminiscencia. Inmediatamente después, en un cuarto oscuro, se utilizaron films y líquidos fotográficos para generar registros permanentes de las bandas. Los resultados obtenidos se analizaron por

densitometría utilizando el software Image J, y representados en gráficos de barras. Brevemente, los film fueron escaneados en modo Color Scan a 300 dpi usando una fotocopiadora multifuncional RICOH modelo Aficio MP 161. Las imágenes digitalizadas fueron convertidas a imágenes de 8-bit y analizadas con software Image J. Los valores de pixeles fueron transformados a una unidad arbitraria, los cuales fueron normalizados con los valores obtenidos de β -Actina, estos resultados fueron posteriormente graficados en un promedio con su error estándar.

5.5.10. Ensayos de inmunosupresión.

Para evaluar las capacidades inmunosupresoras de las MSC, se realizaron ensayos de proliferación de linfocitos T CD4⁺ en co-cultivo con diferentes dosis de MSC, ya sean controles, o pre-tratadas por 48 horas con las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β (20 ng/mL) e IFN- γ (25 ng/mL), como se describió anteriormente.

El día anterior al ensayo de proliferación, se trataron placas de 48 pocillos (Santa Cruz) con 150 μ L de Anti-CD3 1 μ g/mL en DPBS 1x, por 30 minutos a 37°C, seguido por una incubación toda la noche a 4°C.

Para obtener las células T CD4⁺ desde bazo, ratones C57BL/6 saludables de 2-3 meses de edad fueron sacrificados mediante dislocación cervical, el bazo extirpado asépticamente, colocado en un tubo conteniendo PBS con antibióticos, y trasladado inmediatamente a una campana de flujo laminar. Cada bazo se lavó 2 veces con 2 mL de PBS en una placa de 6 pocillos y se realizó *flushing* de esplenocitos haciendo pasar 1 mL de DPBS 1x por 6 veces con una jeringa tuberculina. Luego se pasaron las células eluidas por un Cell Strainer de 70 μ m (BD Biosciences) y se maceró el bazo sobre el mismo Cell Strainer por acción mecánica, ayudado de un vástago de jeringa tuberculina. Las células así disgregadas se sedimentaron por centrifugación a 350 \times g por 8 minutos en un Falcon de 50 mL (BD Biosciences).

Posteriormente, se realizó la lisis de glóbulos rojos utilizando buffer ACK 1x (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM, EDTA 0.1 mM, $\text{pH}=7.15$) durante exactamente 2 minutos sobre hielo. Se centrifugó la mezcla durante 7 minutos y se resuspendieron las células libres de glóbulos rojos en 500 uL de tampón de aislamiento (SFB 2%, EDTA 2 mM en DPBS 1x).

Para determinar la concentración de células viables de la preparación, se realizó una dilución 1:500 en DPBS y luego una dilución 1:2 con la sonda de exclusión viable Azul Tripán 0,4% (Biological Industries) para diferenciar las células vivas que excluyen la tinción, de las células muertas (color azul), y se utilizó una cámara de Neubauer y métodos estándar de conteo celular. En cada experimento, se registró el rendimiento total de esplenocitos vivos obtenidos, el porcentaje de células muertas y la concentración celular (células/mL). Se abortó el protocolo si la preparación de esplenocitos tenía más de un 20% de muerte celular evaluado por Azul Tripán.

Se prosiguió con el aislamiento de los Linfocitos T CD4^+ mediante la tecnología de purificación Dynabeads® Magnetic Beads (Invitrogen) utilizando un kit de selección negativa de linfocitos T CD4^+ de ratón (#11415D), siguiendo la recomendación del fabricante. En breve, los linfocitos T CD4^+ fueron separados de los demás tipos celulares mediante la incubación con un mix de anticuerpos que reconoce todos los tipos celulares, con excepción de los linfocitos T CD4^+ . Luego de retirar el exceso de anticuerpo y lavar las células con tampón de aislamiento en frío, se agregaron los *beads* magnéticos a la suspensión celular. La unión de los *beads* magnéticos a las células que unieron los anticuerpos en su superficie, y la aplicación de la mezcla a un magneto permitió la recolección de los linfocitos T CD4^+ intactos en el sobrenadante. Finalmente, se sedimentaron los linfocitos T CD4^+ , se resuspendieron en 500 uL de DPBS 1x y se determinó la concentración celular.

Posteriormente a la obtención de Linfocitos T CD4^+ , se realizó el marcaje celular con el reactivo CellTrace™ Violet (CTV) (Life Technologies) utilizando las recomendaciones del fabricante. El reactivo CTV difunde dentro de la célula, uniéndose

covalentemente a proteínas intracelulares, lo que resulta en una fluorescencia estable que puede ser medida a través de citometría de flujo. Esta fluorescencia nos permitió detectar el número de ciclos de proliferación linfocitaria, debido a los *peaks* de dilución del reactivo CTV.

Los linfocitos T CD4⁺ marcados con CTV fueron resuspendidos en medio de crecimiento de linfocitos (RPMI 1640 Glutamax, suplementado con 10% SFB, 2 mM L-Glutamina, 2 mM Piruvato de Sodio, Penicilina Streptomycin, 55 μ M β -mercaptoetanol) y llevados a una concentración de 1.000.000/mL. Se sembró 300 μ L de suspensión celular en la placa de 48 pocillos que se preparó el día anterior, previo lavado dos veces con 500 μ L de medio de crecimiento de linfocitos. Inmediatamente después de sembrar los linfocitos, se añadieron 4 μ L de anticuerpo anti-CD28 0.1 μ g/mL para activar la proliferación.

Para determinar la reproducibilidad de nuestros ensayos, se incluyeron siempre los siguientes controles en cada experimento: un control basal de estimulación sin anti-CD3 y sin anti-CD28, un control sólo con anti-CD3, para evaluar la estimulación de la proliferación en ausencia de co-estimulación, y un control con anti-CD3/anti-CD28, correspondiente a la máxima proliferación alcanzada por la preparación de linfocitos T CD4⁺ CTV⁺. Transcurridas 4 horas post sembrado, se tripsinizaron y añadieron diferentes dosis de células madres mesenquimales previamente tratadas con citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ [25 ng/mL] e IL-1 β [20 ng/mL] durante 24 o 48 horas.

Los experimentos fueron diseñados de modo que la tripsinización de las MSC al final del tratamiento con citoquinas ocurriera en forma sincronizada con el cumplimiento de las 4 horas de asentamiento del cultivo de linfocitos T CD4⁺ CTV⁺ al final del día. Finalmente, el cultivo se dejó proceder por 60 horas hasta el análisis por citometría de flujo.

Transcurridas 60 horas del co-cultivo, los linfocitos de cada pocillo fueron resuspendidos cuidadosamente y traspasados a un tubo de citometría. Las células fueron lavadas con 3 mL de DPBS 1x, resuspendidas en 50 μ L de DPBS 1x y marcadas con 3 μ L de anticuerpo PE-CyTM5 Rat Anti-mouse CD4 (Beckton Dickinson) durante 20 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas una vez más con DPBS 1x, resuspendidas en 300 μ L DPBS

1x y analizadas por citometría utilizando el equipo BD FACSCanto™ II (Beckton Dickinson).

5.5.11. Algoritmo para el cálculo del índice de proliferación.

Para cuantificar la proliferación de los T CD4⁺ en los ensayos de inmunosupresión, se utilizó el Índice de proliferación, que determina los eventos mitóticos en toda la población, el cual se analiza ciclo por ciclo o *peak* por *peak*. El índice de proliferación representa la cantidad de biomasa nueva generada que existe respecto a las células originales, y se determina con razón entre la sumatoria de los eventos mitóticos y la sumatoria de las células originales o precursoras. La cantidad de células mitóticas se calculó en cada *peak* de dilución de CTV identificado por citometría de flujo.

Los cálculos de índice de proliferación, utilizados en los experimentos de inmunosupresión, se realizaron según lo descrito en literatura (Ohdan, 2010). Como se observa en la Figura 4, el índice de proliferación se calculó a partir de los valores determinados experimentalmente en porcentaje de cualquiera de los eventos celulares, en este caso, T CD4⁺ en cada ciclo de división o *peak* “N” (A) y el número total de T CD4⁺ vivos al momento de la citometría (B). Las células T hijas, que dividieron “n” cantidad de veces, se calculó como valor absoluto (C). El número absoluto de progenitores para generar esas células T hijas, se extrapolo dividiendo las células T hijas en “n” divisiones por 2^N (D). El número total de eventos mitóticos (F) se calculó restando el número absoluto de células T hijas con el número absoluto de precursores (C-E=F). Para determinar la frecuencia de los precursores (E) se realizó la división del número total de células T hijas sobre la extrapolación de precursores (C/D=E). El índice de proliferación se determinó como la razón (H/G) entre la suma de todos los eventos mitóticos (H) y la suma absoluta de los precursores (G).

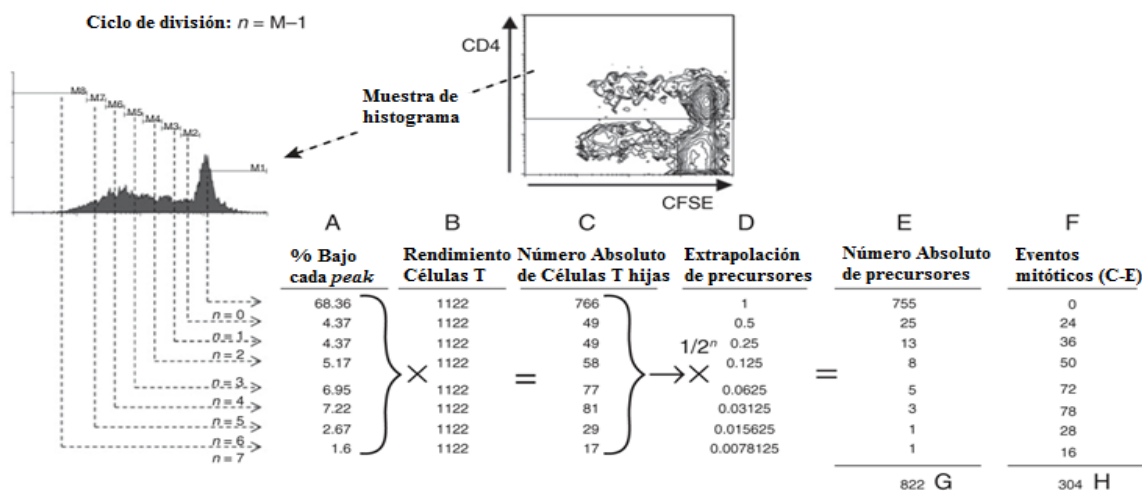


FIGURA 4. Esquema para cálculo de índice de proliferación. En el panel izquierdo se muestra un histograma representativo, donde se identifican los *peaks* de dilución de CTV. Al calcular las células presentes en cada *peak*, se puede operar matemáticamente el número de precursores absolutos correspondientes a esa división celular, dividiendo el número de eventos por 2^n . Luego la diferencia entre precursores y eventos totales corresponde al número de células mitóticas correspondiente a esa división (C-E). El valor final de índice de proliferación corresponde a la razón entre la sumatoria de eventos mitóticos y la sumatoria de precursores totales. *Figura modificada de Ohdan H. Quantification of T-cell proliferation for individualizing immunosuppressive therapy for transplantation patients. Clin Pharmacol Ther 2010;87:23-26.*

Debido a la variación intra-ensayo, siempre se obtienen índices de proliferación distintos frente a una misma estimulación CD3/CD28, por lo tanto se utilizó el “porcentaje del índice de proliferación”, atribuyendo a un 100% al valor máximo de índice de proliferación obtenido con estimulación CD3/CD28 en el set experimental analizado, y calculando así los siguientes valores obtenidos en cada condición.

CAPÍTULO 6: RESULTADOS.

6.1. Ensayos de inmunosupresión.

Se utilizaron MSC de médula ósea de ratón C57BL/6 marca Invitrogen, las que fueron cultivadas en condiciones adecuadas entre pasajes 10 a pasaje 18, con una confluencia no mayor al 70 - 80%, como se muestra en la Figura 5.

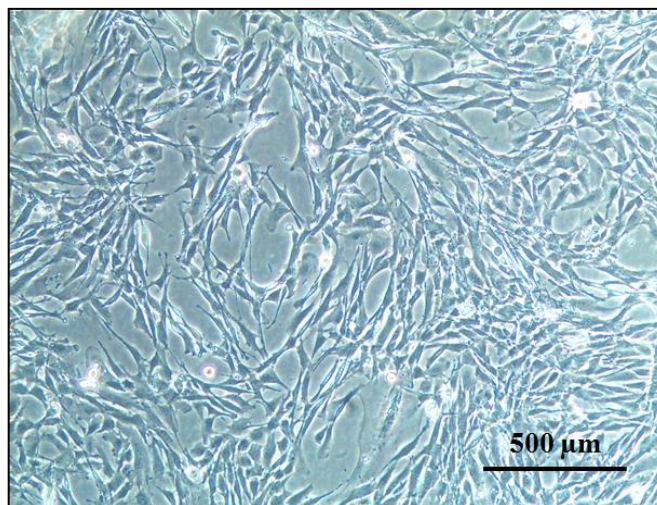


FIGURA 5. *Microfotografía representativa de un cultivo de MSC.* Cultivo de células Invitrogen crecidas a un 80% de confluencia en pasaje 15. Células tomadas con aumento 40X. La morfología fibroblastoide y fusiforme es consistente con un cultivo mesenquimal murino.

Para verificar que nuestras condiciones de cultivo eran consistentes con la mantención de MSC, se realizó la inmunofenotipificación de nuestros cultivos de MSC utilizando marcadores específicos. Como se muestra en la Figura 6, nuestras células fueron negativas para marcadores hematopoyéticos CD34, CD45 y positivas para los marcadores de superficie Sca-1, CD44 y CD29. Estos resultados indican que nuestras condiciones de cultivo y de control del pasaje celular son adecuadas para la mantención de MSC murinas.

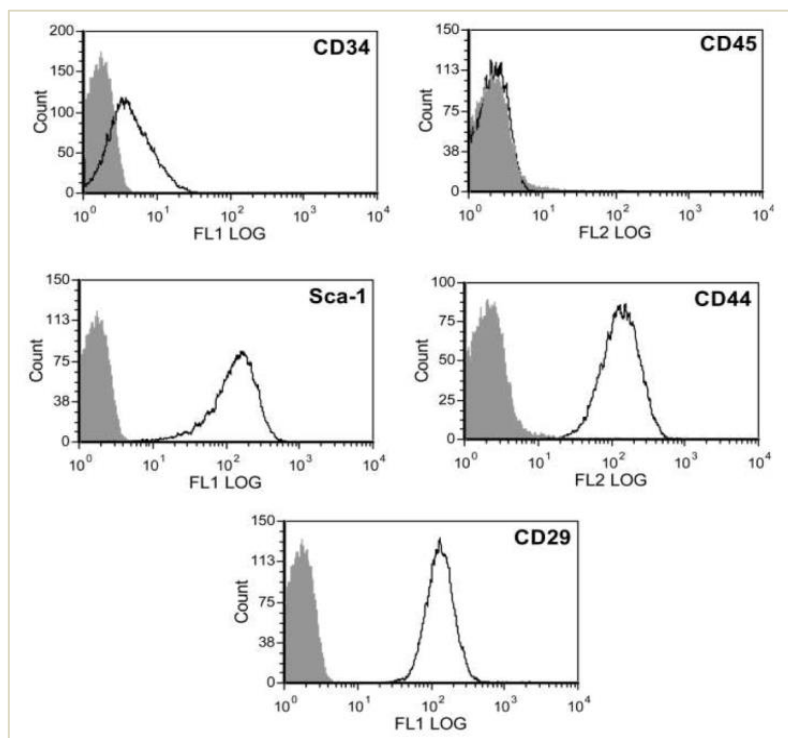


FIGURA 6. *Inmunofenotipo de MSC Invitrogen.* MSC adherentes de C57BL/6, obtenidas de Invitrogen, se muestran positivas para marcadores Sca-1, CD44 y CD29, mientras que se mostraron negativas para marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45. Controles de isotipos negativos fueron marcados con anticuerpos específicos. (IgG2ak-FITC para CD34 y Sca-1; IgG2bk-PE para CD45 y CD44; IgM λ 1-FITC para CD29, superposición gris).

Las MSC Invitrogen han sido previamente caracterizadas para su capacidad de tri-diferenciación a linajes de osteocitos, condrocitos y adipocitos (INVITROGEN, 2009). Sin embargo, se desconoce las propiedades inmunosupresoras de estas células. Para demostrar que las MSC Invitrogen poseen capacidad inmunosupresora, y para encontrar condiciones experimentales de trabajo adecuadas para desarrollar los ensayos de inmunosupresión, se estandarizó condiciones experimentales utilizando un co-cultivo entre MSC tratadas con citoquinas pro-inflamatorias o controles, y linfocitos T CD4⁺ aislados mediante un kit de obtención de células CD4⁺ murinas a partir de esplenocitos.

6.1.1. Control de pureza de T CD4⁺.

Para realizar los ensayos de proliferación, se utilizaron células T CD4⁺ purificadas a partir de bazos de ratones sanos C57BL/6, según lo descrito en Materiales y Métodos. Para verificar que la pureza de nuestros cultivos era la adecuada, se realizaron controles de pureza mediante citometría de flujo, utilizando el anticuerpo PE-Cy[™] 5 Rat Anti-mouse CD4. Para definir los límites de los *gate* donde hacer el análisis del % de pureza (*gate 2*), se realizaron controles negativos de *background* sin anticuerpo, tanto para la mezcla de esplenocitos como para las células T CD4⁺ aisladas. Como se ilustra en la Figura 7, la purificación a través del kit Dynabeads aumenta la proporción de células T CD4⁺ desde un 47.36% hasta un 91.69%.

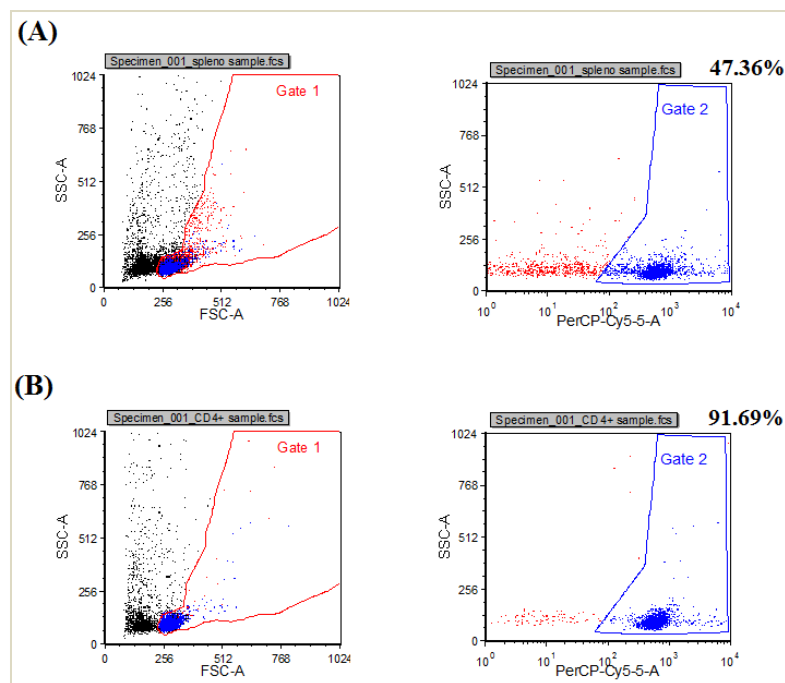


FIGURA 7. Control de pureza T CD4⁺ de un experimento representativo.

La región *gate 2* está definida en base a los controles negativos de células no marcadas con anticuerpo PE-Cy[™] 5 Rat Anti-mouse CD4 (“background”, no mostrado). (A) Muestra de esplenocitos (Gate 1), a la derecha T CD4⁺ de la misma muestra. (B) Muestra de purificación de T CD4⁺ (Gate 1), a la derecha T CD4⁺ purificados (Gate 2).

En la Tabla 2 se indican los porcentajes de células T CD4⁺ presentes en las muestras de esplenocitos y de T CD4⁺ purificadas obtenidos en nuestros 3 experimentos independientes. En promedio, los bazo controles presentan un 46.8%. Se indican las purezas de las muestras de T CD4⁺ purificados, donde se obtuvo un 91.13% promedio.

TABLA 2. Determinación de pureza de las preparaciones de Linfocitos T CD4 ⁺ en los experimentos realizados.		
<i>N</i>	<i>T CD4⁺ en muestra de Esplenocitos</i>	<i>Linfocitos T CD4⁺ Purificados</i>
1	43.59 %	91.75 %
2	47.36 %	91.69 %
3	49.59 %	89.95 %

6.1.2. Determinación del rango dinámico de inmunosupresión de MSC.

Se agregaron pocillos de controles de proliferación, tal como se observa en el panel A de la Figura 8, un pocillo basal sin anticuerpo anti-CD3 donde no hubo proliferación, un pocillo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, donde se obtuvieron las máximas proliferaciones de T CD4⁺, además de un control de auto-fluorescencia al momento de realizar la citometría de flujo. Los índices de proliferación obtenidos en los T CD4⁺ estimulados con anticuerpo anti-CD3/CD28 y sin agregar MSC, es decir, la máxima proliferación de cada experimento, fue de un 6.95, 6.45 y 5.98, por lo que se considera que se obtuvieron índices de proliferación óptimos en cada experimento.

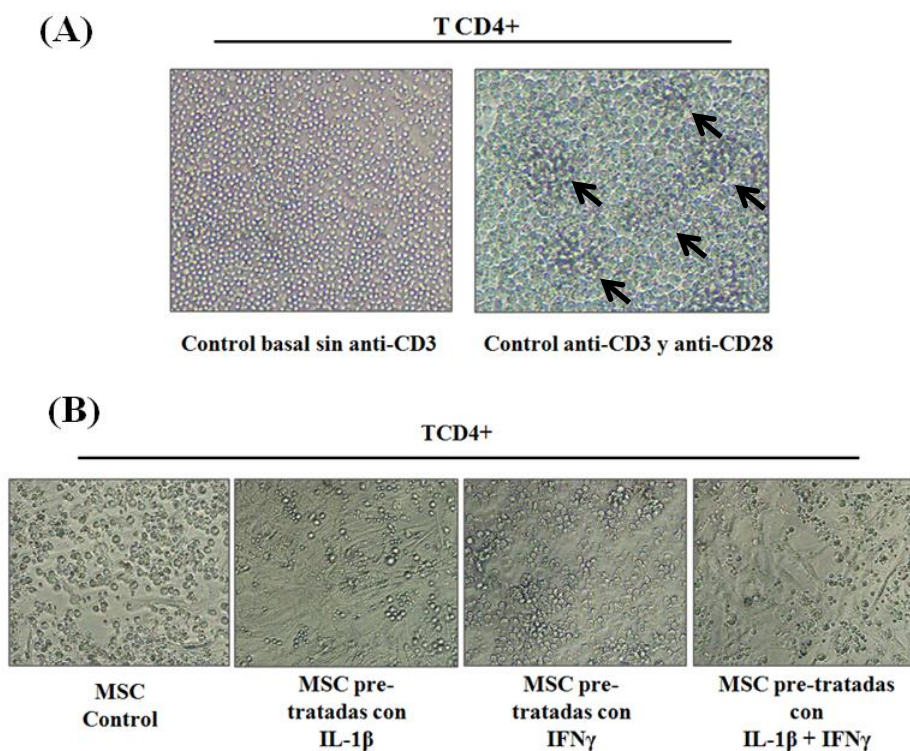


FIGURA 8. Microfotografías de un ensayo de inmunosupresión representativo. (A) Microfotografías de ensayo de co-cultivo en ausencia de MSC. *Panel izquierdo*, 3×10^5 células T CD4⁺ crecidas sin agente estimulador (condición basal). *Panel derecho*, 3×10^5 células T CD4⁺ crecidas en presencia de los agentes estimuladores anti-CD3 y anti-CD28 (control positivo de proliferación). Se observan claramente un aumento del volumen celular y la formación de cúmulos de proliferación (flechas). (B) Microfotografías de co-cultivo de un ensayo de inmunosupresión. Imágenes representativas de Linfocitos T CD4⁺ con MSC pre-tratadas con citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β (20 ng/mL) e IFN- γ (25 ng/mL) al término de las 60 horas del experimento.

Se mantuvo un cultivo de MSC con cuatro diferentes condiciones para el ensayo de inmunosupresión: (1) Control, (2) IL-1 β , (3) IFN- γ , (4) IFN- γ + IL-1 β , durante 24 y 48 horas, según se describió en la metodología. Estas MSC se tripsinizaron y se agregaron al ensayo luego de 4 horas de asentamiento y estimulación de los T CD4⁺ con anti-CD3 y anti-CD28, tal como indica el panel B de la Figura 8.

Se realizaron ensayos de inmunosupresión exploratorios evaluando distintas densidades o ratios de MSC vs T CD4⁺. Dichas cantidades celulares se agregaron con el fin de determinar el rango dinámico de la inmunosupresión en ensayos de co-cultivo. Se evaluaron las cantidades de 3.000, 5.000, 10.000, 20.000 y 30.000 MSC versus 300.000 T CD4⁺ por pocillo, como se ilustra en la Figura 9.

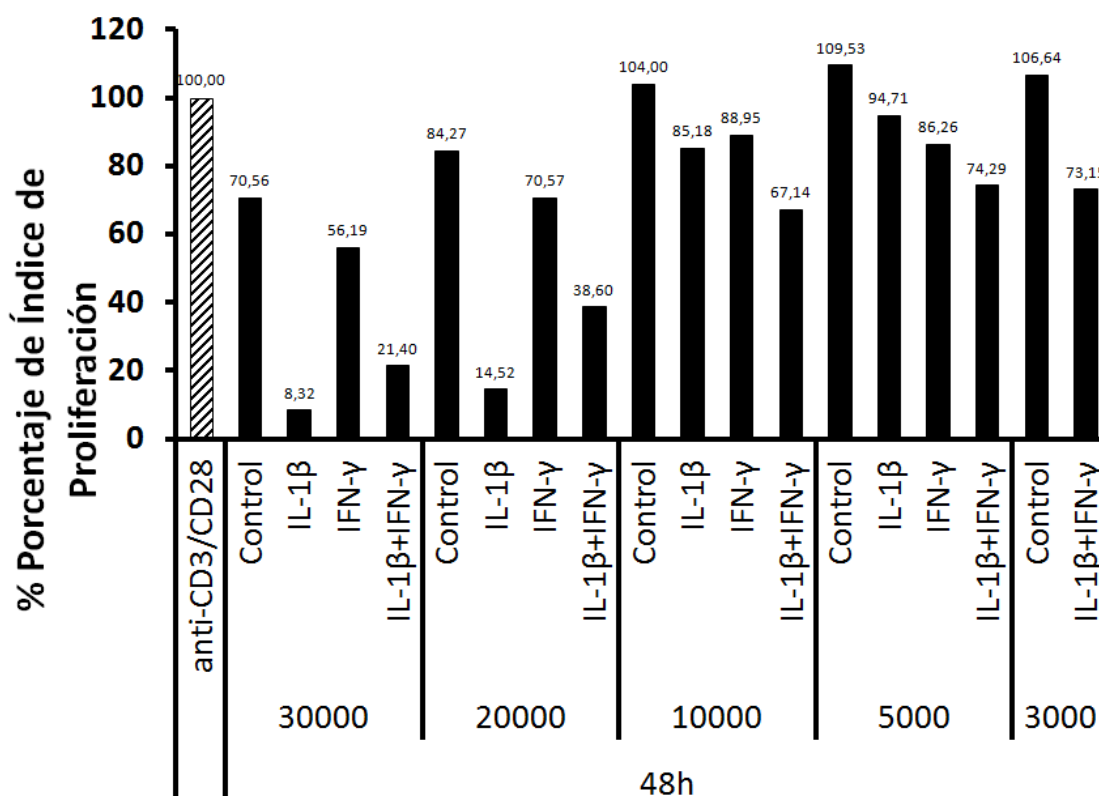


FIGURA 9. Optimización de condiciones para el ensayo de inmunosupresión. Ensayo piloto de inmunosupresión con MSC tratadas con citoquinas pro-inflamatorias durante 48 horas, evaluadas a distintas densidades celulares. Se utilizaron 300.000 células T CD4⁺ purificadas y diferentes dosis de MSC pre-estimuladas con citoquinas IFN-γ (25 ng/mL) e IL-1β (20 ng/mL) durante un periodo de 48 horas. Las razones de MSC:T CD4⁺ 1:10 y 1:15 son óptimas para detectar el licenciamiento de las propiedades inmunosupresoras de las MSC.

En primer lugar, para los experimentos con MSC control, se observó un 29.4% de inmunosupresión al utilizar 30.000 MSC y 300.000 T CD4⁺, vale decir, en un ratio 1:10. Al bajar el ratio desde 1:10 a 1:15, esto es, utilizando 20.000 MSC por cada 300.000 T CD4⁺, se observó sólo un 15.7% de inmunosupresión. A medida que se disminuye la cantidad de MSC agregadas, ya sean 10.000, 5.000 y 3.000 MSC, el efecto de inmunosupresión comienza a perderse e incluso se logra a observar un fenómeno de estimulación de la proliferación de las células T CD4⁺.

El *priming* con 20 ng/mL de IL-1 β por 48 horas muestra un claro aumento de las propiedades inmunosupresoras de las MSC en todas las densidades analizadas. Con 30.000 se observó un 91.7% de inmunosupresión, con 20.000 MSC se observó un 85.5%, y con 10.000 y 5.000, se observó un 14.82% y 5.29% inmunosupresión, respectivamente. En este *priming* con IL-1 β no se observó una co-estimulación en las densidades más bajas.

En el *priming* con IFN- γ , con 30.000 MSC se observó un 43.8% de inmunosupresión, con 20.000 MSC, un 29.4%. Con densidades más bajas de 10.000 y 5.000 MSC, se observaron un 11.05% y un 13.7% de inmunosupresión respectivamente. Si bien el efecto de estimulación no se observó al efectuar el *priming* con IFN- γ , el efecto de esta citoquina en la estimulación de las capacidades inmunosupresoras es mínimo, comparado con el efecto de IL-1 β .

En la combinación de ambas citoquinas, IFN- γ + IL-1 β , con 30.000 MSC se observó 78.6% de inmunosupresión, con 20.000 MSC un 61.4%; con 10.000 y 5.000 MSC, se observó un 32.8% y 25.7% respectivamente.

Se observa una tendencia a que, a bajos ratios de MSC:T CD4⁺, IFN- γ tiene un efecto beneficioso respecto a IL-1 β solo. Sin embargo, en razones de MSC:T CD4⁺ altas, como 30.000 y 20.000, se observa que IFN- γ tiene un efecto negativo sobre los efectos alcanzados con IL-1 β solo.

En resumen, se observó una mayor actividad inmunosupresora de las MSC, en los ratios de 1:10 y 1:15, es decir, con una densidad de 30.000 y 20.000 MSC versus

300.000 T CD4⁺. Sin embargo, con densidades inferiores no se observó mayor efecto de inmunosupresión. En el caso de MSC control, en las densidades inferiores sólo se observó una estimulación de la proliferación de las células T CD4⁺ por sobre el valor del pocillo control. La máxima inmunosupresión se logró observar con una densidad de 30.000 MSC pre-tratadas con IL-1 β , donde el porcentaje de inmunosupresión llega a alcanzar un 91.7% y en menor grado, con 20.000 y 10.000 MSC. Dado estos resultados, se decidió realizar los siguientes experimentos de inmunosupresión utilizando el rango 10.000 - 30.000 MSC en cada uno de los experimentos.

6.1.3. El tratamiento con IL-1 β o con IFN- γ + IL-1 β estimula las capacidades inmunosupresoras de MSC a una razón 1:10 (MSC:T CD4⁺).

Experimentos como los realizados en el ensayo piloto fueron repetidos idénticamente hasta completar un N=3, y se efectuaron ensayos de inmunosupresión como antes. En la Figura 10, se muestran los valores de proliferación de los linfocitos T CD4⁺, expresados como porcentaje respecto a la máxima proliferación en la condición sin MSC (Anti-CD3/CD28). Los valores de inmunosupresión (correspondientes al recíproco de la proliferación alcanzada) fueron de un 26.1% para MSC Control; un 67.1% para MSC pre-tratada con IL-1 β ; un 28.7% para MSC pre-tratada con IFN- γ ; y un 61.6% de inmunosupresión cuando las células fueron pre-tratadas con la combinación de ambas citoquinas.

En los tres experimentos independientes, se observó que con MSC en una relación 1:10, y en las condiciones de *priming* por 48 horas con IL-1 β y la combinación de ambas citoquinas IFN- γ + IL-1 β , fue donde se obtuvo una mayor actividad inmunosupresora de las MSC. Estos efectos son estadísticamente significativos, analizados mediante análisis de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn's, utilizando el grupo sin MSC como punto de comparación (*P < 0.05). Estos resultados demuestran claramente que las MSC Invitrogen poseen capacidad inmunosupresora y

confirman previos reportes indicando que las MSC requieren un pre-estímulo inflamatorio para convertirse en células completamente inmunosupresoras (Ren, y cols., 2008).

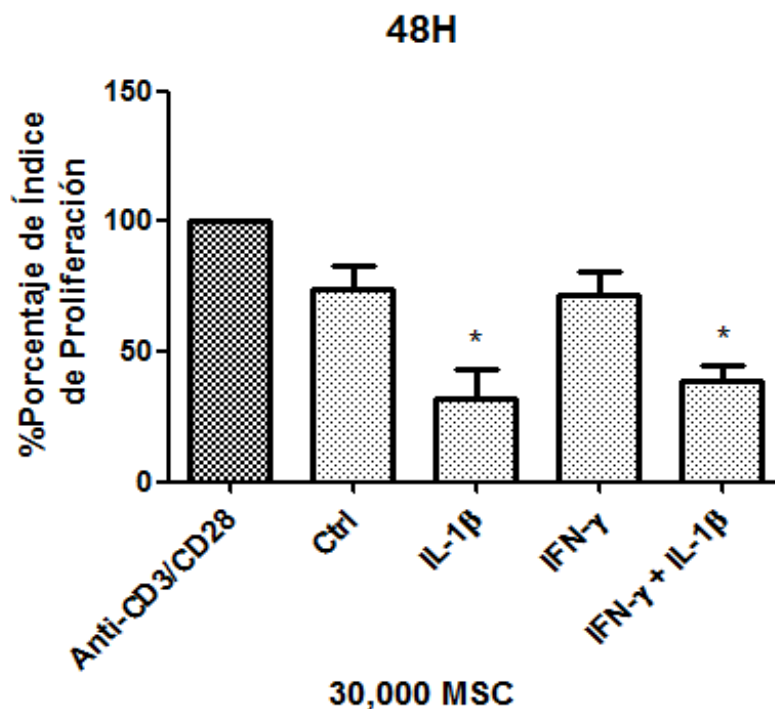


FIGURA 10. Ensayo de inmunosupresión con 30.000 MSC pre-tratadas por 48 horas con IFN- γ e IL-1 β . Se realizaron tres experimentos independientes de inmunosupresión (N=3) en condiciones de co-cultivo con TCD4⁺ purificados y MSC pre-tratadas con citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ 25 ng/mL e IL-1 β 20 ng/mL por 48 horas. El análisis estadístico aplicado fue de ANOVA no paramétrico Kruskal-Wallis, con corrección de Dunn's, utilizando la condición Anti-CD3/CD28 (sin MSC) como control (*P < 0.05). El *priming* con IL-1 β o con IL-1 β + IFN- γ promueve las propiedades inmunosupresoras de MSC.

Se buscó evaluar si el *priming* de las capacidades inmunosupresoras de las MSC podría favorecer también las capacidades inmunosupresoras en aquellas condiciones donde los efectos inmunosupresores no eran tan fuertes, vale decir, en razones MSC:T CD4⁺ de 1:15 y 1:30. Para esto, se repitieron ensayos en esas proporciones celulares y se realizaron ensayos de inmunosupresión en forma similar.

6.1.4. Pérdida gradual de las propiedades inmunosupresoras a razones 1:15 y 1:30 (MSC:T CD4⁺).

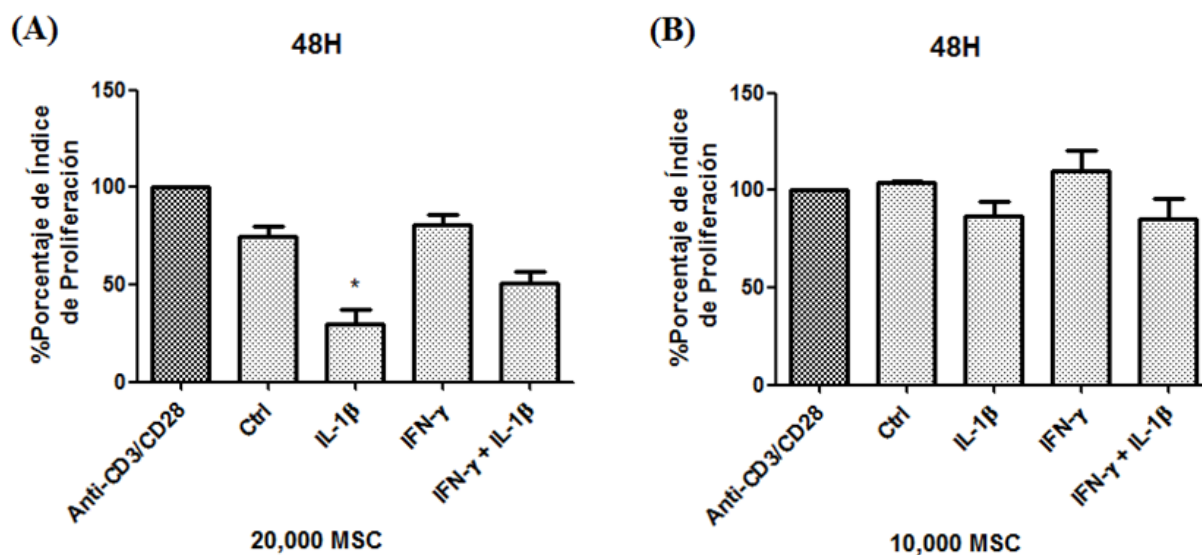


FIGURA 11. *Ensayo de inmunosupresión con 20.000 y 10.000 MSC pre-tratadas por 48 horas con IFN- γ e IL-1 β .* En (A) se observa el análisis estadístico del ensayo de inmunosupresión con 20.000 MSC pre-tratadas por 48 horas. Se realizó el experimento en triplicado biológico (N=3). El test aplicado fue de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn's. (*P < 0.05). En (B) se observa el análisis estadístico del ensayo de inmunosupresión con 10.000 MSC pre-tratadas por 48 horas. Se realizó el experimento en triplicado biológico (N=3). El test aplicado fue de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn's. (*P < 0.05). El pre-tratamiento con IL-1 β previene la pérdida de las capacidades inmunosupresoras de MSC a razones de 1:15 (MSC:T CD4⁺)

En la Figura 11A, se observa que las MSC control generaron una inmunosupresión de sólo un 25.1%, mientras que con las MSC estimuladas con IL-1 β se observa una inmunosupresión de 70.4%, lo cual muestra significancia estadística (*P < 0.05). Por el contrario, las MSC estimuladas con IFN- γ sólo logra un 19.6% de inmunosupresión, mientras que con la combinación de ambas citoquinas se observa un 49.3% de inmunosupresión, pero esta inmunosupresión no tiene significancia estadística.

En la Figura 11B, correspondiente a los ensayos de inmunosupresión con 10.000 MSC, se observa que ningún tratamiento logró causar inmunosupresión, y sólo se observó una leve inmuno-estimulación con las MSC estimuladas con IFN- γ llegando a un 110% de la proliferación alcanzada con las células T CD4⁺ en ausencia de MSC. Estos resultados demuestran que, a medida que uno disminuye la proporción de MSC a T CD4⁺, las capacidades inmunosupresoras van disminuyendo, y enfatizan que el pre-tratamiento con IL-1 β es un estímulo que aumenta las propiedades inmunosupresoras de MSC Invitrogen.

6.1.5. Pre-tratamiento con IL-1 β por 24 horas habilita las propiedades inmunosupresoras de MSC Invitrogen a una proporción 1:10 (MSC:T CD4⁺).

Los resultados obtenidos con las MSC pre-tratadas con citoquinas pro-inflamatorias por 48 horas indican que el pre-tratamiento con IL-1 β sería crítico para promover las propiedades inmunosupresoras de MSC Invitrogen. Se formuló la hipótesis que, de ser esto cierto, probablemente un pre-tratamiento con IL-1 β más corto también sería suficiente para causar un efecto de promover las capacidades inmunosupresoras de MSC. En la Figura 12, se observa que el pre-tratamiento de 24 horas también es capaz de aumentar las capacidades inmunosupresoras de MSC, y que el aumento de las propiedades inmunosupresoras muestra una significancia estadística respecto a las células sin tratamiento con MSC (*P < 0.05%, Kruskal-Wallis con corrección de Dunn's).

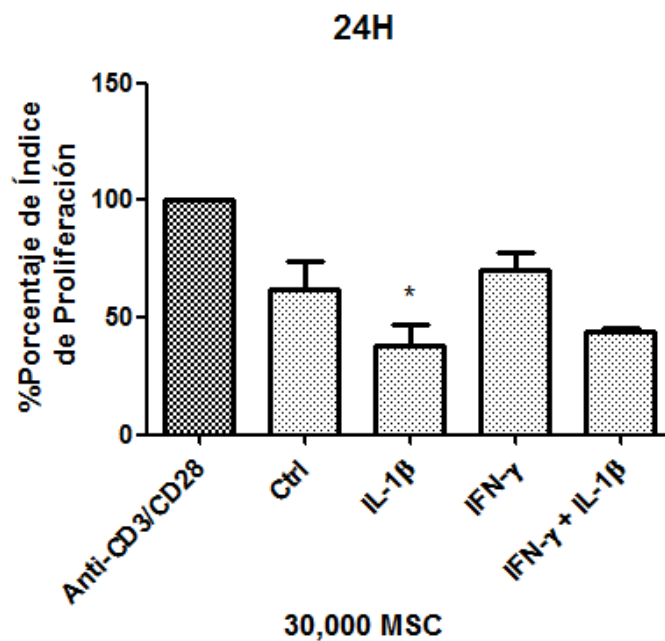


FIGURA 12. Ensayo de inmunosupresión con 30.000 MSC pre-tratadas por 24 horas. Gráfico del porcentaje del índice de proliferación de TCD4⁺ con 30.000 MSC pre-tratadas con citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-1 β durante 24 horas. Se realizó el experimento en triplicado biológico (N=3). El test aplicado fue de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn's. (*P < 0.05).

Colectivamente, nuestros resultados muestran un claro efecto dosis-dependiente para las capacidades inmunosupresoras de MSC, es decir, a mayor cantidad de células añadidas (menores razones MSC:T CD4⁺, 1:10 - 1:15) se obtuvieron mejores efectos en la capacidad inmunosupresora de las MSC, y estas capacidades inmunosupresoras son dependientes de un estímulo previo de las MSC con al menos la citoquina IL-1 β 20 ng/mL, ya sea aplicada por 24 o 48 horas.

6.2. RT-qPCR.

6.2.1. Determinación de los niveles de mRNA de GAD-67 bajo estímulos de citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-1 β por RT-qPCR.

Como una primera aproximación para definir si la señalización GABA podría estar involucrada en los mecanismos efectores de MSC para causar inmunosupresión, decidimos estudiar si existen cambios en los niveles de expresión de las enzimas biosintéticas de GABA, GAD-67 y GAD-65, a nivel de mRNA y proteína, en aquellas condiciones experimentales donde las capacidades inmunosupresoras de MSC *Invitrogen* aumentan. Debido a que la naturaleza del ensayo de inmunosupresión implica un ensayo de co-cultivo donde están presentes tanto MSC como linfocitos T CD4⁺, y dada las limitaciones técnicas para la determinación de mRNA y proteínas en una mezcla de tipos celulares, se decidió estudiar los cambios en GAD-67 y GAD-65 a tiempo final del experimento de licenciamiento con las citoquinas IL-1 β e IFN- γ .

En nuestro laboratorio, hemos demostrado que las MSC presentan niveles casi indetectables de mRNA de GAD-65, ya sea en condiciones basales o estimuladas con ligandos TLR en combinación con IFN- γ , o en presencia de la combinación usada en nuestros experimentos con IFN- γ e IL-1 β (Aguilar, 2012). Debido a ello, nos enfocamos en la detección de GAD-67 a 48 horas de estímulo, condición que aumenta en mayor grado las propiedades inmunosupresoras de MSC.

Se realizaron experimentos idénticos de tratamientos con citoquinas pro-inflamatorias como para los ensayos funcionales, pero se procesaron las células para aislamiento de RNA total, y se preparó cDNA utilizando Random Primers y transcriptasa reversa como se describe en la sección de Métodos. Se realizó cuantificación relativa utilizando SYBR *Green* y PCR en Tiempo Real. Para el gen Normalizador, se escogió el RNA ribosomal 18S, gen que se encuentra expresado en grandes cantidades por ser un gen multicopia y que ha sido ampliamente utilizado como gen constitutivo (o *housekeeping*) en

experimentos de cuantificación de la expresión génica. Previamente en nuestro laboratorio hemos establecido que para las determinaciones de niveles de RNA mensajero, se debe realizar las reacciones de RT-qPCR usando diluciones de 1:3 para la determinación del gen de interés (GAD-67 y ABAT) y diluciones 1:500 para la determinación de 18S.

Los resultados obtenidos de tres experimentos independientes se resumen en la Figura 13 y las Tablas 3 y 4. Se observa un claro adelantamiento en los valores de Ct de aproximadamente 3 unidades, en la amplificación de GAD-67 en presencia de tratamiento con IL-1 β o IL-1 β + IFN- γ . Este aumento en el valor de Ct se traduce en un sustancial aumento en los niveles relativos de mRNA de GAD-67 calculado a partir de los valores de Ct utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Tabla 3).

Notablemente, los niveles de mRNA de ABAT son mucho mayores que los de GAD-67, a juzgar por aparición de señal positiva que cruza el umbral del ruido en ciclos mucho más tempranos que los de GAD-67. Sin embargo, ninguno de los tratamientos con citoquinas pro-inflamatorias causó un cambio importante en los valores de Ct, y por ende, en el valor calculado de niveles de mRNA de ABAT (Tabla 4, Figura 13).

Estos resultados indican que existe una regulación selectiva de GAD-67 por IL-1 β , en presencia o ausencia de IFN- γ , a tiempo 48 horas post-tratamiento con esta citoquina, y que existe un aumento de aproximadamente 10 veces los niveles de mRNA de GAD-67 respecto a los niveles basales en condición control con los tratamientos de IL-1 β (Figura 13).

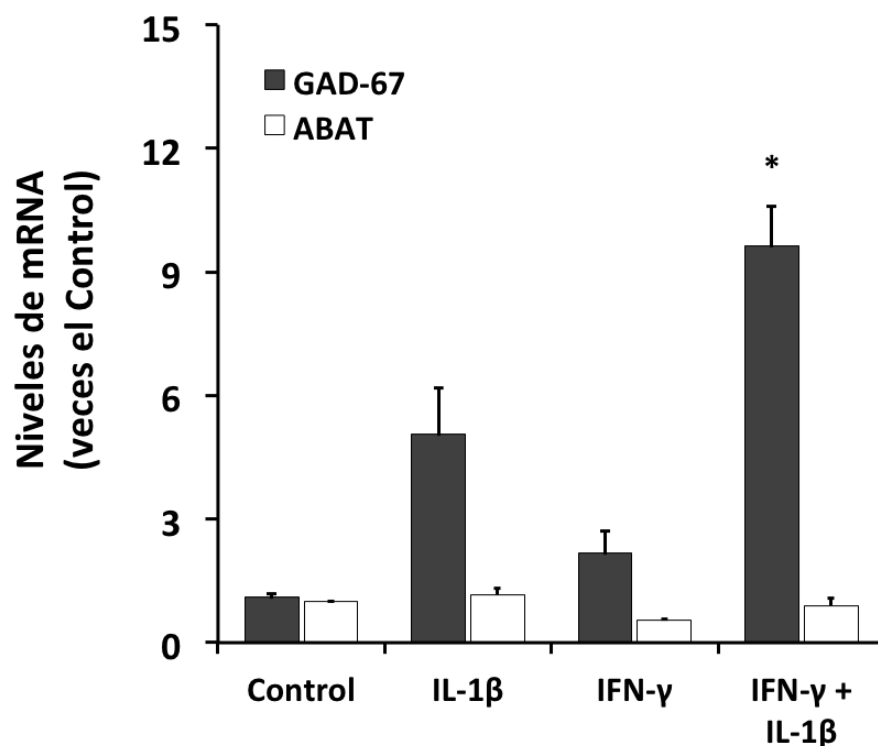


FIGURA 13. Aumento de la expresión relativa de GAD-67 y ABAT en MSC estimuladas con IL-1 β e IFN- γ . Los niveles relativos de mRNA de GAD-67 y ABAT fueron calculados mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ respecto a la condición control basal sin estímulo de citoquinas. El tratamiento con IL-1 β en combinación con IFN- γ causa un aumento selectivo de los niveles de mRNA de GAD-67. El test aplicado fue Kruskal-Wallis con corrección de Dunn's (*P < 0.05).

GAD1					18S				
		i	ii	prom		i	ii	prom	
N = 1	Ctrl	34.68	34.47	34.575	Ctrl	13.25	13.63	13.44	
	IL-1b	32.84	32.83	32.835	IL-1b	13.26	13.38	13.32	
	g	34.81	33.67	34.24	g	13.2	13.25	13.225	
	g+IL-1b	31.29	31.51	31.4	g+IL-1b	13.25	13.37	13.31	
N = 2	Ctrl	34.22	34.06	34.14	Ctrl	13.17	13.27	13.22	
	IL-1b	31.96	31.95	31.955	IL-1b	13.27	13.52	13.395	
	g	33.29	33.22	33.255	g	13.58	13.49	13.535	
	g+IL-1b	31.17	31.43	31.3	g+IL-1b	13.89	13.89	13.89	
N = 3	Ctrl	35.87	34.87	35.37	Ctrl	12.51	13.58	13.045	
	IL-1b	33.1	33.25	33.175	IL-1b	13.89	13.72	13.805	
	g	34.08	34.24	34.16	g	13.5	13.37	13.435	
	g+IL-1b	32.31	32.64	32.475	g+IL-1b	13.3	13.4	13.35	

ddCT							2 ^{ΔΔct}						
		i	ii	i	ii	prom		i	ii	i	ii	prom	
N = 1	Ctrl	0.295	-0.295	0.8151	1.2269	1.021	Ctrl	1.021	3.0769	1.1805	8.258422684		
	IL-1b	-1.555	-1.685	2.9383	3.2154	3.0769	N1	1.0041	5.1546	2.2975	11.43868406		
	g	0.475	-0.715	0.7195	1.6415	1.1805	N2	1.2686	6.9403	3.0468	9.218797579		
	g+IL-1b	-3.095	-2.995	8.5445	7.9723	8.2584	prom	1.0979	5.0572	2.1749	9.638634774		
N = 2	Ctrl	0.13	-0.13	0.9138	1.0943	1.0041	SEM	0.0855	1.1163	0.5422	0.941755994		
	IL-1b	-2.23	-2.49	4.6913	5.6178	5.1546							
	g	-1.21	-1.19	2.3134	2.2815	2.2975							
	g+IL-1b	-3.64	-3.38	12.467	10.411	11.439							
N = 3	Ctrl	1.035	-1.035	0.488	2.0491	1.2686							
	IL-1b	-3.115	-2.795	8.6638	6.9403	7.8021							
	g	-1.745	-1.455	3.3519	2.7416	3.0468							
	g+IL-1b	-3.315	-3.085	9.9521	8.4855	9.2188							

TABLA 3. Valores de Ct y cálculo de veces aumento de los niveles de GAD-67 usando la fórmula $2^{-\Delta\Delta ct}$. Panel superior, valores crudos de Ct de GAD-67 (o GAD1) y 18 S. Panel inferior, cálculo de $\Delta\Delta ct$ y $2^{-\Delta\Delta ct}$. Se indican los 3 experimentos independientes realizados (N=1-3) y los duplicados técnicos (i,ii). Para destacar las diferencias, se representan los valores de Ct en escala arbitraria de colores.

ABAT					18S				
		i	ii	prom		i	ii	prom	
N = 1	Ctrl	24.78	24.68	24.73	Ctrl	13.25	13.63	13.44	
	IL-1b	24.82	24.72	24.77	IL-1b	13.26	13.38	13.32	
	g	25.37	25.42	25.395	g	13.2	13.25	13.225	
	g+IL-1b	25.24	25.32	25.28	g+IL-1b	13.25	13.37	13.31	
N = 2	Ctrl	24.36	24.44	24.4	Ctrl	13.17	13.27	13.22	
	IL-1b	24.36	24.47	24.415	IL-1b	13.27	13.52	13.395	
	g	25.75	25.3	25.525	g	13.58	13.49	13.535	
	g+IL-1b	24.95	24.98	24.965	g+IL-1b	14.28	13.89	14.085	
N = 3	Ctrl	24.52	24.57	24.545	Ctrl	13.51	13.58	13.545	
	IL-1b	24.1	24.16	24.13	IL-1b	13.89	13.72	13.805	
	g	25.31	25.25	25.28	g	13.5	13.37	13.435	
	g+IL-1b	24.59	24.65	24.62	g+IL-1b	13.3	13.4	13.35	

ddCT							2 ^{ΔΔct}						
		i	ii	i	ii	prom		i	ii	i	ii	prom	
N = 1	Ctrl	0.24	-0.24	0.8467	1.181	1.0139	Ctrl	1.0139	0.8976	0.5434	0.624225252		
	IL-1b	0.27	0.05	0.8293	0.9659	0.8976	N1	1	1.1186	0.5748	1.244210189		
	g	0.88	0.88	0.5434	0.5434	0.5434	N2	1	1.4743	0.5569	0.829399237		
	g+IL-1b	0.7	0.66	0.6156	0.6329	0.6242	prom	1.0046	1.1635	0.5584	0.899278226		
N = 2	Ctrl	0.01	-0.01	0.9931	1.007	1	SEM	0.0046	0.168	0.0091	0.182352804		
	IL-1b	-0.09	-0.23	1.0644	1.1728	1.1186							
	g	0.99	0.63	0.5035	0.6462	0.5748							
	g+IL-1b	-0.51	-0.09	1.4241	1.0644	1.2442							
N = 3	Ctrl	0.01	-0.01	0.9931	1.007	1							
	IL-1b	-0.79	-0.56	1.7291	1.4743	1.6017							
	g	0.81	0.88	0.5704	0.5434	0.5569							
	g+IL-1b	0.29	0.25	0.8179	0.8409	0.8294							

TABLA 4: Valores de Ct y cálculo de veces aumento de los niveles de ABAT usando la fórmula $2^{-\Delta\Delta ct}$. Panel superior, valores crudos de Ct de ABAT y 18S. Panel inferior, cálculo de $\Delta\Delta ct$ y $2^{-\Delta\Delta ct}$. Se indican los 3 experimentos independientes realizados (N=1-3) y los duplicados técnicos (i,ii). Para destacar las diferencias, se representan los valores de Ct en escala arbitraria de colores

La presencia de un amplificado único en la reacción de PCR es esencial para la correcta interpretación de RT-qPCR. Una forma de definir la especificidad de la amplificación es el análisis de la Curva de Disociación. En esta, el producto amplificado durante la reacción de PCR es lentamente denaturado, provocando la separación gradual de SYBR *Green* desde el DNA de doble hebra.

La dinámica de pérdida de fluorescencia desde el producto de PCR permite confirmar la presencia de un único producto de PCR, detectado como un único *peak* de fluorescencia en gráficos de segunda derivada de fluorescencia a las distintas temperaturas. La Figura 14 muestra los resultados de análisis de curva de disociación para las cuantificaciones de GAD-67, ABAT y 18S realizados, confirmando la calidad de nuestras reacciones de PCR, validando nuestros cálculos de cambios en los niveles de mRNA por la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

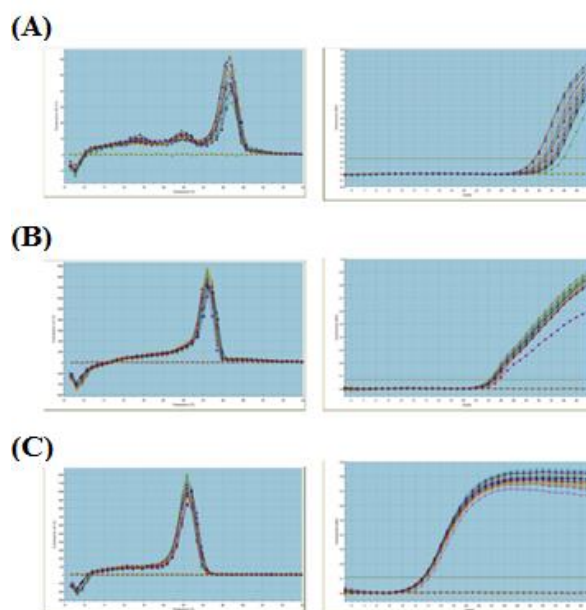


FIGURA 14. *Curvas de disociación y amplificación de los genes GAD-67, ABAT y 18S en experimentos de RT-qPCR.* Curvas entregadas por el software MxPro v4.10 para la amplificación de GAD-67 (A), ABAT (B) y 18S (C). *Panel izquierdo*, Curvas de Disociación, donde el eje Y corresponde a la fluorescencia y el eje X a la Temperatura de *Melting*. *Panel derecho*, Curvas de Amplificación, donde el eje Y corresponde a la fluorescencia (dRn) y el eje X al Número de Ciclo de amplificación. Se observa que GAD-67 cruza el umbral del ruido en ciclos tardíos (31-34), indicando niveles de expresión más bajos de los de ABAT (ciclos 24-25) y 18S (ciclo 13). La presencia de un *peak* principal en las curvas de disociación validan los cálculos de RT-qPCR obtenidos.

Estos resultados demuestran que el tratamiento con IL-1 β , que causa un aumento en las propiedades inmunosupresoras de MSC, también causa un aumento de los niveles de mRNA de GAD-67, y que este aumento en los niveles de GAD-67 ocurre en forma específica.

6.3. Western Blot.

6.3.1. Determinación de los niveles de GAD-67 y GAD-65 bajo estímulos de citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-1 β mediante Western Blot.

Para confirmar si el aumento en los niveles de mRNA se traduce en un aumento de los niveles de proteína GAD-67, y para confirmar la selectividad del fenómeno, se estudiaron los niveles de GAD-67 y GAD-65 en MSC tratadas previamente con citoquinas pro inflamatorias IL-1 β [20 ng/mL] e IFN- γ [25 ng/mL] como se describió anteriormente. Con el fin de explorar si el tiempo de exposición a citoquinas era relevante, se realizaron los estímulos a 24 y 48 horas. Para verificar reproducibilidad de los resultados, el ensayo fue repetido diez veces en experimentos independientes.

En la Figura 15, se puede evidenciar un claro aumento de la expresión de la enzima GAD-67 bajo el tratamiento en conjunto de IFN- γ con IL-1 β por 48 horas. Con tratamiento de IFN- γ por 48 horas sólo se observa un leve aumento de la enzima GAD-67. Sorprendentemente, el tratamiento con IL-1 β no provoca cambios en los niveles proteicos de la enzima GAD-67, ya que estos tienden a mantenerse similares a los encontrados en condición basal sin estímulo. También se puede observar los resultados obtenidos a las 24 horas de estímulo con citoquinas, que al parecer dicho tiempo no es suficiente para causar incremento en los niveles de GAD-67 cuando se encuentra en presencia de IFN- γ , ya que mantiene niveles similares al control basal. Sin embargo, existe un leve aumento de GAD-67 en presencia de IFN- γ e IL-1 β .

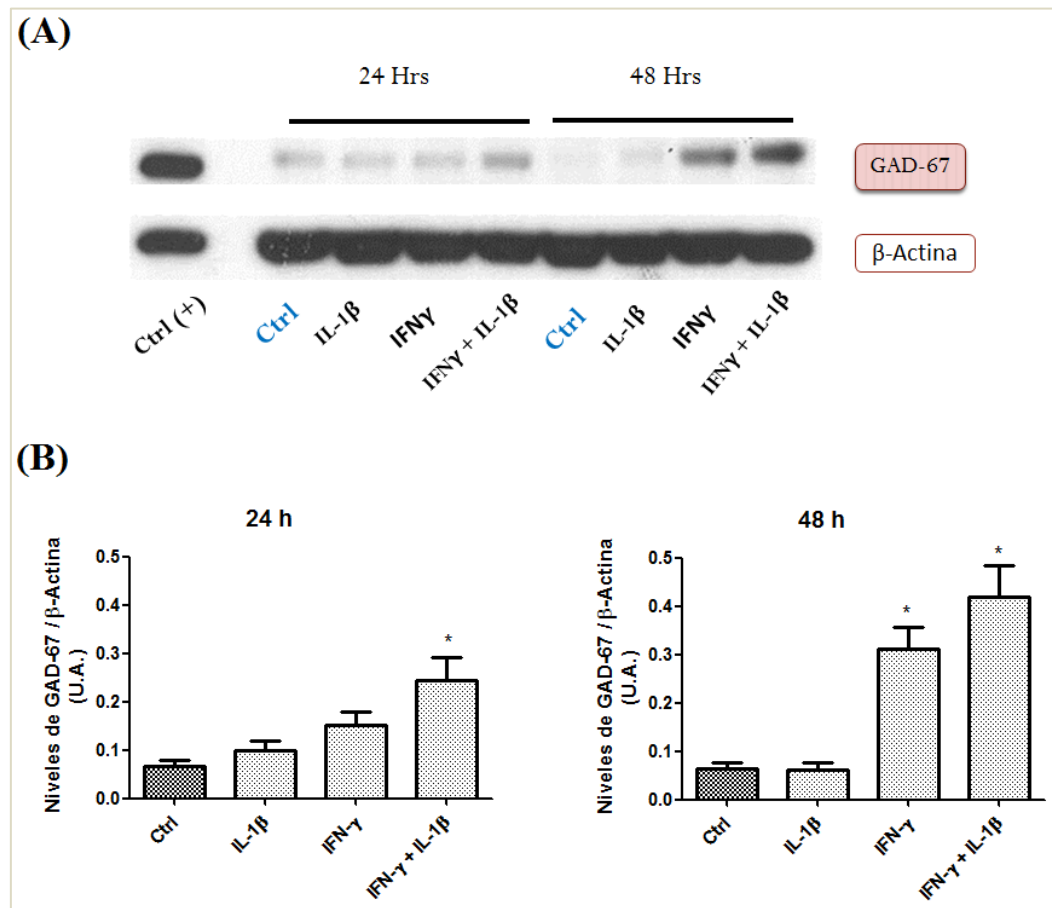


FIGURA 15. Co-tratamiento con IFN- γ e IL-1 β incrementa niveles de GAD-67 en MSC. (A) Los lisados de MSC fueron analizados con técnica Western Blot. Se cargaron 30 μ g de proteína por muestra. Se utilizó gel de SDS – poliacrilamida 8% para electroforesis. La transferencia fue hecha en membrana PVDF. Se utilizó anticuerpo anti-GAD-67 proveniente de conejo, con dilución 1:2000. Para β -Actina (como normalizador) se utilizó anticuerpo anti- β -Actina proveniente de ratón, con dilución 1:40.000. Control positivo fue utilizado lisado de cerebro de ratón y como control basal MSC sin tratamiento de citoquinas. (B) La diferencia entre las densitometrías fue analizada con el método estadístico ANOVA con corrección de Dunnett, usando un control de MSC sin tratamiento de citoquinas en comparación con MSC con tratamiento (*P < 0.05).

Dicho incremento en los niveles de proteína GAD-67 bajo los estímulos de IFN- γ e IL-1 β , tanto por 24 y 48 horas, arrojó significancia estadística. Controversialmente, los resultados bajo estímulo con IFN- γ por 48 horas tuvo significancia estadística, no así durante un tiempo de 24 horas.

Pese a que nuestros estudios anteriores determinaron anteriormente que los niveles de GAD-65 son prácticamente indetectables en MSC, como se observa en la Figura 16, GAD-65 no fue detectada mediante la técnica utilizada bajo ningún estímulo con citoquinas, lo cual es corroborado por la banda marcada que fue proporcionada por el control positivo utilizado.

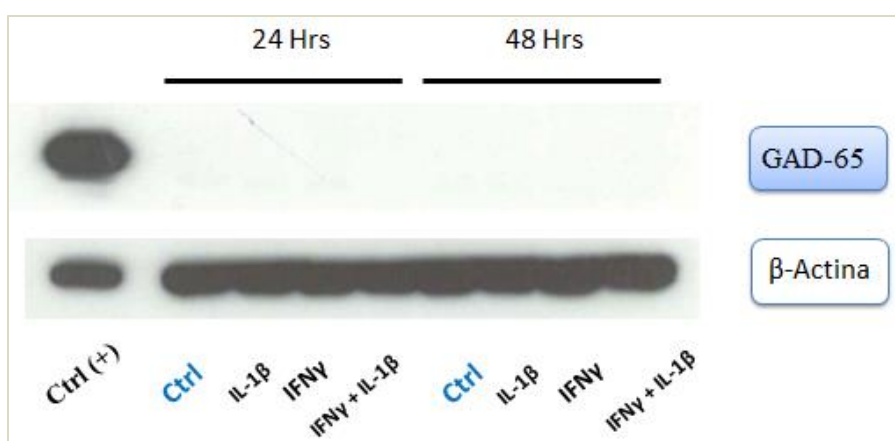


FIGURA 16. Co-tratamiento con IFN- γ e IL-1 β no incrementa niveles de GAD-65 en MSC. Los lisados de MSC fueron analizados con técnica Western Blot. Se cargaron 30 μ g de proteína por muestra. Se utilizó gel de SDS – poliacrilamida 8% para electroforesis. La transferencia fue hecha en membrana PVDF. Se utilizó anticuerpo anti-GAD-65 proveniente de conejo, con dilución 1:2000. Para β -Actina (como normalizador) se utilizó anticuerpo anti- β -Actina proveniente de ratón, con dilución 1:40000. Control positivo fue utilizado lisado de cerebro de ratón y como control basal MSC sin tratamiento de citoquinas.

CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN.

Estudios anteriores han demostrado la capacidad de MSC para interactuar con el sistema inmunológico. Se ha descrito la capacidad que poseen para causar inmunosupresión (Frenette, y cols., 2013) (Chen, Armstrong, & Li, 2006). Dichos estudios apuntan a MSC como una potencial herramienta para combatir enfermedades autoinmunitarias.

Se ha reportado que ciertas condiciones tienen la capacidad de volver inmunosupresoras a clones de MSC (Ren, y cols., 2008). En estos estudios, se utilizaron estímulos por 8 horas con citoquinas en conjunto IFN- γ e IL-1 β , donde MSC fueron capaces de reducir la proliferación de esplenocitos, sin embargo IL-1 β por sí sola era incapaz de hacerlo (Ren, y cols., 2008). En contraste a esto, nuestro estudio demostró que ciertamente IFN- γ e IL-1 β vuelven más inmunosupresoras a MSC, y que además un estímulo con sólo IL-1 β causaba que MSC se volviera aún más inmunosupresora, obteniendo una propiedad anti-proliferativa más efectiva que el conjunto de las citoquinas mencionadas. Cabe destacar que las condiciones experimentales no fueron las mismas utilizadas en otros estudios (Ren, y cols., 2008), ya que en nuestro trabajo se utilizaron cultivos heterogéneos de MSC, con linfocitos T CD4⁺ purificados y con tiempos de estímulos con citoquinas de 24 y 48 horas.

Se obtuvo además, un efecto inmunosupresor que actúa de manera dosis-dependiente, donde se observó que la densidad de MSC con respecto a los linfocitos afecta las propiedades inmunosupresoras. Estudios han develado que la proximidad y contacto celular, entre MSC y células efectoras del sistema inmune, es fundamental para causar inmunosupresión (Shi, y cols., 2010). En base a esto, se vuelve lógico pensar que el efecto inmunosupresor más potente fue obtenido con una densidad de 30.000 MSC, es decir un ratio de 1:10 (MSC:T CD4⁺) y utilizando densidades de 10.000 MSC, es decir, un ratio de 1:30 (MSC:T CD4⁺), prácticamente el efecto inmunosupresor se pierde.

Es de importancia mencionar que estudios anteriores han trabajado con ensayos de inmunosupresión que utilizaron clones de MSC con linfocitos T CD4⁺ activados con antiCD3 (Xu, y cols., 2007). Dichos ensayos han revelado que existen otros elementos esenciales para que MSC causen inmunosupresión, además de los factores solubles que utilizan las MSC, como IL-10, TGF- β y PG-E2 (Maitra, y cols., 2004) (S. H. Yang, y cols., 2009). Ellos postulan que el contacto celular es vital, por lo cual la presencia de MSC en el co-cultivo juega un rol de importancia en este aspecto, ya que con esta condición aumentó drásticamente el nivel de inmunosupresión (Xu, y cols., 2007).

Por otro lado, estudios de inmunosupresión han demostrado que linfocitos T CD4⁺ activados son capaces de generar cantidades elevadas de IFN- γ , del orden de 750 pg/mL (Sheng, y cols., 2008), donde las MSC obtienen una mayor capacidad para causar inmunosupresión, por lo cual nuestro análisis adquiere solidez en cuanto a que el *priming* con citoquinas es una estrategia para brindar una mayor propiedad inmunosupresora a MSC. Otros estudios de inmunosupresión revelaron que las MSC son capaces de ser más inmunosupresoras cuando se encuentran en un co-cultivo con una gran proliferación de linfocitos T activados, donde se encuentran mayores cantidades de señales de activación generados por el incremento de la presentación de antígenos y la actividad proliferativa de estas células T, en comparación con un co-cultivo donde hubo una moderada proliferación y menor cantidad de linfocitos T, lo que se condice con que son necesarias mayores cantidades de IFN- γ presente en el medio para generar una mayor respuesta inmunosupresora de las MSC (Polchert, y cols., 2008) (Krampera, y cols., 2006).

Si bien IFN- γ juega un rol importante, nuestro estudio revela un potente efecto inmunosupresor generado por las MSC bajo el estímulo de IL-1 β en el tratamiento de 24 y 48 horas, obteniéndose incluso una inmunosupresión mayor que con el conjunto de citoquinas. Cabe mencionar que los resultados de RT-qPCR entregan información de gran valor, ya que los niveles de transcritos (RNA mensajero) de la enzima GAD-67 se encuentran elevados bajo el estímulo de IL-1 β , que es la citoquina que tuvo el poder más inmunosupresor dentro de los ensayos. Con estímulos de IFN- γ e IL-1 β también hubo aumento en los transcritos de GAD-67 y coincidentemente también se observó que MSC se

volvió más inmunosupresora. Paradójicamente con estímulo de IFN- γ los niveles de transcritos de GAD-67 se mantuvieron en sus valores basales.

Por técnica de Western Blot se observó un aumento de la enzima GAD-67 solo con estímulo de IFN- γ e IFN- γ + IL-1 β en conjunto. Esta modulación de la enzima en las MSC bajo estos estímulos es muy interesante, ya que estudios han reportado la importancia que adquiere GAD-67 en la supervivencia, ya que la ausencia de GAD-67 se refleja en una reducción de más del 90% de los niveles basales de GABA en el cerebro y provoca diferentes alteraciones como paladar hendido, letalidad neonatal, alteraciones en la corteza visual y ataques epilépticos (Addington, y cols., 2005) (Kanaani, Kolibachuk, Martinez, & Baekkeskov, 2010) (Chattopadhyaya, y cols., 2007).

Otros estudios han evaluado también, ratones knockout para GAD-67, los que no fueron viables, falleciendo al poco tiempo después de nacer (Addington, y cols., 2005) en cambio, ratones knockout para GAD-65 mantuvieron niveles normales de GABA (Addington, y cols., 2005) (Kash, y cols., 1997) (Asada, y cols., 1996) (Asada, y cols., 1997) . Esto da a entender que la isoforma GAD-67 juega un rol de importancia en la síntesis de GABA y el funcionamiento normal del sistema GABAérgico.

En nuestros estudios encontramos condiciones óptimas en las cuales existe una modulación de esta enzima. Cabe mencionar que, en conjunto a lo anterior, autores han demostrado que el tratamiento con GABA en forma oral, en un modelo murino de diabetes, inhibió el desarrollo de Diabetes tipo 1 (Tian, y cols., 2004), además se ha descrito que el tratamiento con agonistas o ligandos del receptor GABA-A mejora la encefalitis autoinmune en modelos murinos de encefalitis autoinmune experimental (EAE) (Bhat, y cols., 2010). En otros modelos murinos de artritis reumatoide, se redujo la incidencia de artritis inducida por colágeno (Tian, Yong, Dang, & Kaufman, 2011), donde las células T juegan un rol principal en el desarrollo y progresión de la enfermedad y donde GABA logró disminuir la autoinmunidad de estas células T y la actividad de células presentadoras de antígenos (Tian, y cols., 2011) (Y. Yang, Luo, Cheng, & Liu, 2013). Esto reafirma que GABA juega un rol importante en otros sistemas y no solo a nivel de sistema nervioso

central y da luces de que GABA puede estar siendo utilizado por MSC dentro de alguno de sus mecanismos celulares de inmunosupresión.

Es evidente que existe un correlato entre los análisis realizados. Estímulos con IL-1 β aumentan los niveles de transcritos de GAD-67 y las propiedades inmunosupresoras de MSC. Estímulos con IFN- γ sólo, aumentan los niveles de GAD-67. En estímulos con IFN- γ + IL1 β en conjunto se observan aumentos de transcritos, de proteína GAD-67 y también un aumento de las propiedades inmunosupresoras de MSC. Dicha correlación abre nuevos caminos de estudio, es posible que IL-1 β sea necesaria para generar transcritos de GAD-67 e IFN- γ juegue un rol para estabilizar dicha proteína.

La proteína GAD-65 y sus transcritos no fueron detectados en los análisis realizados. Cabe mencionar que esta enzima se encuentra mayoritariamente a nivel de vesículas sinápticas en el sistema nervioso central, mientras que GAD-67 se encuentra a nivel citoplasmático (Jin, y cols., 2013). Esto hace pensar que GAD-65, al tener una regulación más compleja, es exclusiva de sistema nervioso central. Sin embargo, ambas isoformas son capaces de sintetizar GABA, la isoforma GAD-67 preferentemente sintetiza GABA citoplasmático siendo más ampliamente distribuido, mientras que la isoforma GAD-65 está ubicada en membrana y terminaciones nerviosas y sintetiza GABA para ser liberado por vesículas sinápticas en sistema nervioso central (Soghomonian & Martin, 1998) (Addington, y cols., 2005), lo cual explica el hecho de que solo haya sido detectado la isoforma GAD-67 en nuestros estudios, pensando que GAD-65 trabaja exclusivamente a nivel de sistema nervioso.

También, se ha descrito que GAD-67 se encuentra constitutivamente activa al encontrarse como holoenzima, es decir, mantener una unión estable con su cofactor piridoxal 5'- fosfato (PLP), mientras que GAD-65 es transitoriamente activada, es decir, oscila entre apoenzima y holoenzima, aumentando los niveles de GABA para una rápida y fina modulación de la sinapsis inhibitoria (Battaglioli, Liu, & Martin, 2003) (Kanaani, y cols., 2010), lo que reafirma que GAD-65 posee una regulación estricta y específica dentro del sistema nervioso central.

Se hace inevitable pensar en los próximos pasos a seguir, dentro de los cuales están:

- Medir la concentración de GABA en medios condicionados.
- Realizar *knockdown* o pérdida de función de la enzima GAD-67 y comprobar que MSC pierden sus propiedades inmunosupresoras en presencia de estímulos con citoquinas.
- Determinar los niveles de GAD-67 en las MSC dentro del ensayo de inmunosupresión, transcurridas las 60 horas del experimento.

CAPÍTULO 8: CONCLUSIÓN.

I.- Existe un *priming* de MSC con la citoquina IL-1 β y con citoquinas en conjunto IFN- γ [25 ng/mL] e IL-1 β [20 ng/mL], con el cual las MSC aumentan sorprendentemente sus cualidades inmunosupresoras respecto a MSC control sin adición de citoquinas. Este *priming* actúa de manera tiempo-dependiente, el cual muestra ser más favorable a las 48 horas de tratamiento.

II. La actividad inmunosupresora de las MSC se ve afectada por el contacto celular, resultando así, en una actividad dosis-dependiente, siendo el ratio de 1:10 MSC:T CD4⁺ el que muestra mayor capacidad de inmunosupresión de las MSC pre-tratadas y las MSC control.

III.- Bajo condiciones de estímulo con citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-1 β , se encontró un incremento de los niveles de RNA mensajero de la isoforma GAD-67, e incluso con el estímulo de IL-1 β existe la misma tendencia de aumento de RNA mensajero de GAD-67.

IV.- MSC estimuladas con IFN- γ e IL-1 β generan un aumento en la producción de la isoforma GAD-67, siendo más favorable el pre-tratamiento por un tiempo de 48 horas, a pesar de que a las 24 horas también se puede evidenciar un aumento significativo de esta enzima bajo el conjunto de citoquinas.

V.- El estímulo con el conjunto de citoquinas IFN- γ e IL-1 β genera un aumento en la actividad inmunosupresora, aumento de RNA mensajero de GAD-67 y a la vez, aumento en los niveles de la enzima GAD-67.

En base a estos resultados, es sugerente pensar que la señalización GABA podría estar siendo utilizada como una vía para causar aumento en las propiedades inmunosupresoras de MSC y a su vez sientan base para poder realizar experimentos de inmunosupresión con MSC *knockdown* para GAD-67 a futuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Addington, A. M., Gornick, M., Duckworth, J., Sporn, A., Gogtay, N., Bobb, A., y cols. (2005). GAD1 (2q31.1), which encodes glutamic acid decarboxylase (GAD67), is associated with childhood-onset schizophrenia and cortical gray matter volume loss. *Mol Psychiatry*, 10(6), 581-588.
- Aguilar, M., Sardá, A (2012). *Caracterización de GAD2 en Células Madre Mesenquimales de Medula Ósea de ratón (mBMMSCs) polarizadas hacia un fenotipo inmuno-supresor o inmuno-estimulador*. Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.
- Akiyama, K., Chen, C., Wang, D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T., y cols. (2012). Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell*, 10(5), 544-555.
- Alam, S., Laughton, D. L., Walding, A., & Wolstenholme, A. J. (2006). Human peripheral blood mononuclear cells express GABAA receptor subunits. *Mol Immunol*, 43(9), 1432-1442.
- Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R., Ji, F. Y., y cols. (1996). Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochem Biophys Res Commun*, 229(3), 891-895.
- Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R. G., Kanbara, N., y cols. (1997). Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(12), 6496-6499.
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., y cols. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*, 30(1), 42-48.
- Battaglioli, G., Liu, H., & Martin, D. L. (2003). Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis. *J Neurochem*, 86(4), 879-887.

- Bergeret, M., Khrestchatsky, M., Tremblay, E., Bernard, A., Gregoire, A., & Chany, C. (1998). GABA modulates cytotoxicity of immunocompetent cells expressing GABAA receptor subunits. *Biomed Pharmacother*, 52(5), 214-219.
- Bhat, R., Axtell, R., Mitra, A., Miranda, M., Lock, C., Tsien, R. W., y cols. (2010). Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(6), 2580-2585.
- Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2(4), 313-319.
- Bjork, J. M., Moeller, F. G., Kramer, G. L., Kram, M., Suris, A., Rush, A. J., y cols. (2001). Plasma GABA levels correlate with aggressiveness in relatives of patients with unipolar depressive disorder. *Psychiatry Res*, 101(2), 131-136.
- Bjurstom, H., Wang, J., Ericsson, I., Bengtsson, M., Liu, Y., Kumar-Mendu, S., y cols. (2008). GABA, a natural immunomodulator of T lymphocytes. *J Neuroimmunol*, 205(1-2), 44-50.
- Bosma, P. T., Blazquez, M., Collins, M. A., Bishop, J. D., Drouin, G., Priede, I. G., y cols. (1999). Multiplicity of glutamic acid decarboxylases (GAD) in vertebrates: molecular phylogeny and evidence for a new GAD paralog. *Mol Biol Evol*, 16(3), 397-404.
- Bu, D. F., & Tobin, A. J. (1994). The exon-intron organization of the genes (GAD1 and GAD2) encoding two human glutamate decarboxylases (GAD67 and GAD65) suggests that they derive from a common ancestral GAD. *Genomics*, 21(1), 222-228.
- Buddhala, C., Hsu, C. C., & Wu, J. Y. (2009). A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles. *Neurochem Int*, 55(1-3), 9-12.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5), 641-650.
- Couve, A., Moss, S. J., & Pangalos, M. N. (2000). GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci*, 16(4), 296-312.
- Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Wu, C. Z., Knott, G., Kuhlman, S., Fu, Y., y cols. (2007). GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. *Neuron*, 54(6), 889-903.

- Chen, X., Armstrong, M. A., & Li, G. (2006). Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Biol*, 84(5), 413-421.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., y cols. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838-3843.
- Dionisio, L., Jose De Rosa, M., Bouzat, C., & Esandi Mdel, C. (2011). An intrinsic GABAergic system in human lymphocytes. *Neuropharmacology*, 60(2-3), 513-519.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., y cols. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Frenette, P. S., Pinho, S., Lucas, D., & Scheiermann, C. (2013). Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol*, 31, 285-316.
- G. J. Siegel, R. W. A., S C. Brody, and D. L. Price, Eds. (2006). *Basic Neurochemistry* (7th edition ed.). London, UK.
- INVITROGEN (2009). *GIBCO® Mouse (C57BL/6) Mesenchymal Stem Cells* (Vol. Catalog n°. S1502-100, manual n°. A11563).
- Jacob, T. C., Moss, S. J., & Jurd, R. (2008). GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci*, 9(5), 331-343.
- Jin, Z., Mendu, S. K., & Birnir, B. (2013). GABA is an effective immunomodulatory molecule. *Amino Acids*, 45(1), 87-94.
- Kanaani, J., Kolibachuk, J., Martinez, H., & Baekkeskov, S. (2010). Two distinct mechanisms target GAD67 to vesicular pathways and presynaptic clusters. *J Cell Biol*, 190(5), 911-925.
- Karp, J. M., & Leng Teo, G. S. (2009). Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*, 4(3), 206-216.

- Kash, S. F., Johnson, R. S., Tecott, L. H., Noebels, J. L., Mayfield, R. D., Hanahan, D., y cols. (1997). Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25), 14060-14065.
- Krampera, M. (2011). Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia*, 25(9), 1408-1414.
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., y cols. (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24(2), 386-398.
- Lariviere, K., MacEachern, L., Greco, V., Majchrzak, G., Chiu, S., Drouin, G., y cols. (2002). GAD(65) and GAD(67) isoforms of the glutamic acid decarboxylase gene originated before the divergence of cartilaginous fishes. *Mol Biol Evol*, 19(12), 2325-2329.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Maitra, B., Szekely, E., Gjini, K., Laughlin, M. J., Dennis, J., Haynesworth, S. E., y cols. (2004). Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant*, 33(6), 597-604.
- Martin, D. L., Liu, H., Martin, S. B., & Wu, S. J. (2000). Structural features and regulatory properties of the brain glutamate decarboxylases. *Neurochem Int*, 37(2-3), 111-119.
- Mendu, S. K., Bhandage, A., Jin, Z., & Birnir, B. (2012). Different subtypes of GABA-A receptors are expressed in human, mouse and rat T lymphocytes. *PLoS One*, 7(8), e42959.
- Murphy, M. B., Moncivais, K., & Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*, 45, e54.
- Ohdan, H. (2010). Quantification of T-cell proliferation for individualizing immunosuppressive therapy for transplantation patients. *Clin Pharmacol Ther*, 87(1), 23-26.

- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., y cols. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147.
- Polchert, D., Sobinsky, J., Douglas, G., Kidd, M., Moadsiri, A., Reina, E., y cols. (2008). IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*, 38(6), 1745-1755.
- Rane, M. J., Gozal, D., Butt, W., Gozal, E., Pierce, W. M., Jr., Guo, S. Z., y cols. (2005). Gamma-amino butyric acid type B receptors stimulate neutrophil chemotaxis during ischemia-reperfusion. *J Immunol*, 174(11), 7242-7249.
- Ren, G., Chen, X., Dong, F., Li, W., Ren, X., Zhang, Y., y cols. (2012). Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med*, 1(1), 51-58.
- Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L'Huillie, A., y cols. (2009). Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*, 27(8), 1954-1962.
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., y cols. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, 2(2), 141-150.
- Roberts, E. (2000). *Adventures with GABA: Fifty Years On. In: GABA in the nervous system: the view at fifty years*. Philadelphia.: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sambrook, J., Maniatis, T., & Fritsch, E. F. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., y cols. (2008). A critical role of IFN-gamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res*, 18(8), 846-857.
- Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., y cols. (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*, 20(5), 510-518.
- Soghomonian, J. J., & Martin, D. L. (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci*, 19(12), 500-505.

- Stuckey, D. J., Anthony, D. C., Lowe, J. P., Miller, J., Palm, W. M., Styles, P., y cols. (2005). Detection of the inhibitory neurotransmitter GABA in macrophages by magnetic resonance spectroscopy. *J Leukoc Biol*, 78(2), 393-400.
- Tantrawatpan, C., Manochantr, S., Kheolamai, P., Y, U. P., Supokawej, A., & Issaragrisil, S. (2013). Pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly and their differentiation potential to neural-like cells. *J Med Assoc Thai*, 96(9), 1208-1217.
- Tian, J., Lu, Y., Zhang, H., Chau, C. H., Dang, H. N., & Kaufman, D. L. (2004). Gamma-aminobutyric acid inhibits T cell autoimmunity and the development of inflammatory responses in a mouse type 1 diabetes model. *J Immunol*, 173(8), 5298-5304.
- Tian, J., Yong, J., Dang, H., & Kaufman, D. L. (2011). Oral GABA treatment downregulates inflammatory responses in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*, 44(6), 465-470.
- Tillakaratne, N. J., Medina-Kauwe, L., & Gibson, K. M. (1995). gamma-Aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 112(2), 247-263.
- Xu, G., Zhang, L., Ren, G., Yuan, Z., Zhang, Y., Zhao, R. C., y cols. (2007). Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Res*, 17(3), 240-248.
- Yang, S. H., Park, M. J., Yoon, I. H., Kim, S. Y., Hong, S. H., Shin, J. Y., y cols. (2009). Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med*, 41(5), 315-324.
- Yang, Y., Luo, H., Cheng, L. X., & Liu, K. (2013). Inhibitory role for GABA in atherosclerosis. *Med Hypotheses*, 81(5), 803-804.

ANEXOS.

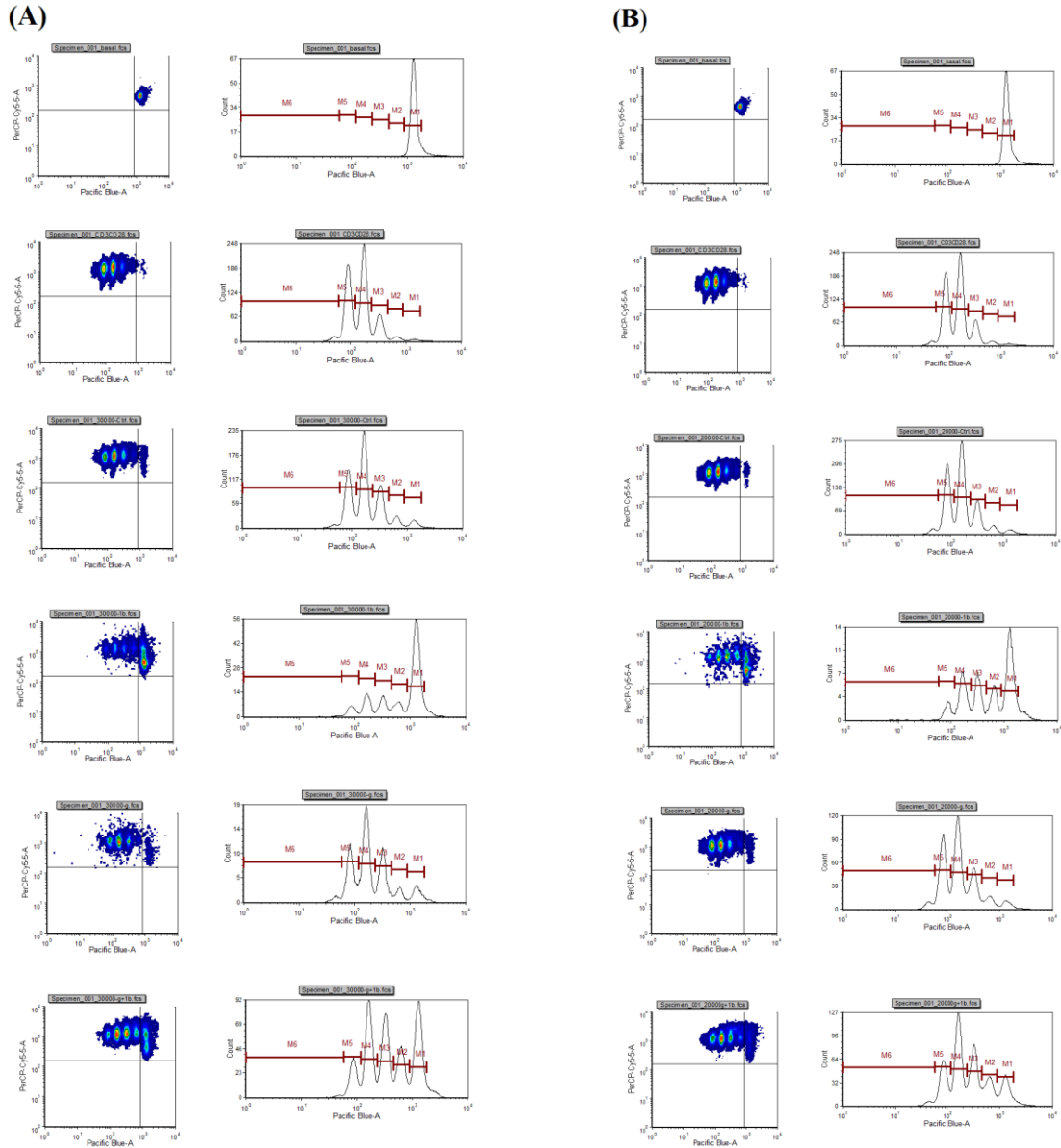


FIGURA 1. Análisis por citometría de flujo de ensayo de inmunosupresión.

En (A) se observa el análisis realizado al experimento de inmunosupresión en el cual se utilizaron 30.000 MSC pre-estimuladas por 48 horas en co-cultivo con T CD4⁺ purificados. En (B) se observa el análisis del ensayo utilizando 20.000 MSC pre-estimuladas por 48 horas en co-cultivo con T CD4⁺. Se utilizó el anticuerpo PE-CyTM5 Rat Anti-mouse CD4.

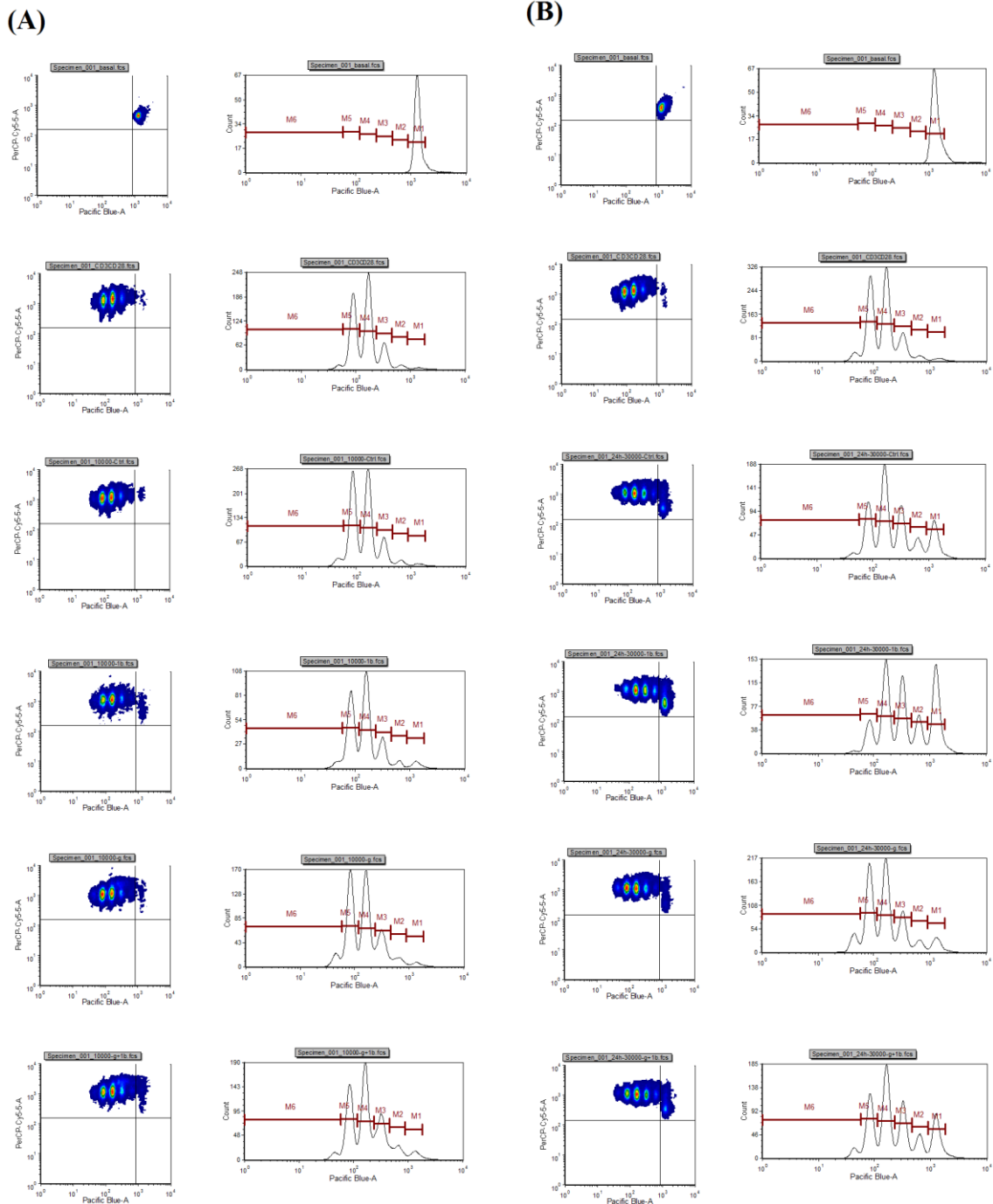


FIGURA 2. Análisis por citometría de flujo de ensayo de inmunosupresión.

En (A) se observa el análisis realizado al experimento de inmunosupresión en el cual se utilizaron 10.000 MSC pre-estimuladas por 48 horas en co-cultivo con T CD4⁺ purificados. En (B) se observa el análisis del ensayo con 30.000 MSC pre-estimuladas en un co-cultivo con T CD4⁺ purificados. Se utilizó el anticuerpo PE-CyTM5 Rat Anti-mouse CD4.

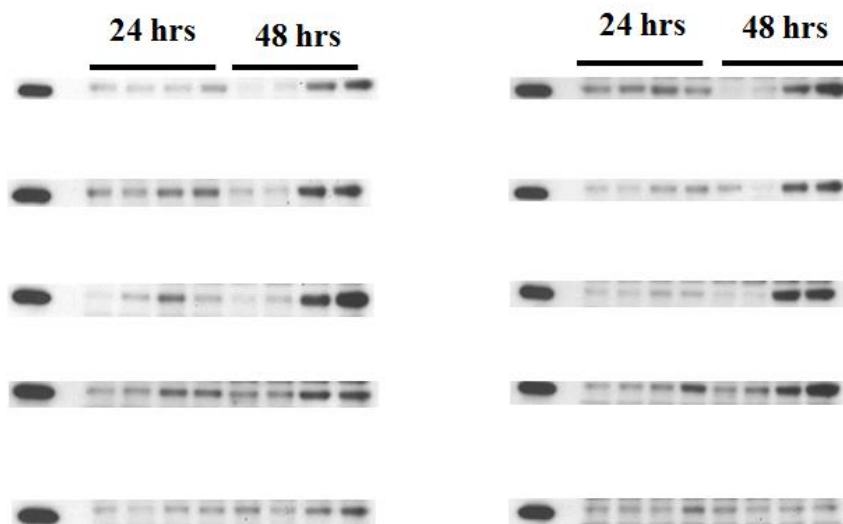


FIGURA 3. *Los niveles de GAD-67 fueron cuantificados mediante método de densitometría y demuestran el análisis de diez experimentos diferentes. (N=10).* Se cargaron 30 μ g de proteína por muestra. Se utilizó gel de SDS – poliacrilamida 8% para electroforesis. La transferencia fue hecha en membrana PVDF. Se utilizó anticuerpo anti-GAD-67 proveniente de conejo, con dilución 1:2000. Para β -Actina (como normalizador) se utilizó anticuerpo anti Actina proveniente de ratón, con dilución 1:40.000. Control positivo fue utilizado lisado de cerebro de ratón y como control basal MSC sin tratamiento de citoquinas.

Datos estadísticos: Ensayo de inmunosupresión con 30.000 MSC pre-tratadas por 48 horas.		
<i>Test de Comparación Múltiple de Dunn's</i>	<i>Diferencia en la suma de rangos</i>	<i>¿Es significativo P < 0.05?</i>
Anti-CD3/CD28 vs Ctrl	5,75	No
Anti-CD3/CD28 vs IL-1 β	14,25	Sí
Anti-CD3/CD28 vs IFN- γ	6,25	No
Anti-CD3/CD28 vs IFN- γ + IL-1 β	13,75	Sí
Ctrl vs IL-1 β	8,50	No
Ctrl vs IFN- γ	0,50	No
Ctrl vs IFN- γ + IL-1 β	8,00	No
IL-1 β vs IFN- γ	-8,00	No
IL-1 β vs IFN- γ + IL-1 β	-0,50	No
IFN- γ vs IFN- γ + IL-1 β	7,50	No

TABLA 1: Datos estadísticos de ensayo de inmunosupresión con 30.000 MSC pre-tratadas por 48 horas. Se analizaron los datos obtenidos mediante el software GraphPad Prism®, utilizando One-way ANOVA con corrección de Dunn's (*P < 0.05).

Datos estadísticos: Ensayo de inmunosupresión con 20.000 MSC pre-tratadas 48 horas.		
<i>Test de Comparación Múltiple de Dunn's</i>	<i>Diferencia en la suma de rangos</i>	<i>¿Es significativo P < 0.05?</i>
Anti-CD3/CD28 vs Ctrl	5,00	No
Anti-CD3/CD28 vs IL-1 β	11,67	Sí
Anti-CD3/CD28 vs IFN- γ	4,00	No
Anti-CD3/CD28 vs IFN- γ + IL-1 β	9,33	No
Ctrl vs IL-1 β	6,67	No
Ctrl vs IFN- γ	-1,00	No
Ctrl vs IFN- γ + IL-1 β	4,33	No
IL-1 β vs IFN- γ	-7,67	No
IL-1 β vs IFN- γ + IL-1 β	-2,33	No
IFN- γ vs IFN- γ + IL-1 β	5,33	No

TABLA 2: Datos estadísticos de ensayo de inmunosupresión con 20.000 MSC pre-tratadas por 48 horas. Se analizaron los datos obtenidos mediante el software GraphPad Prism®, utilizando One-way ANOVA con corrección de Dunn's (*P < 0.05).

Datos estadísticos: Ensayo de inmunosupresión con 10.000 MSC pre-tratadas 48 horas		
<i>Test de Comparación Múltiple de Dunn's</i>	<i>Diferencia en la suma de rangos</i>	<i>¿Es significativo P < 0.05?</i>
Anti-CD3/CD28 vs Ctrl	-5,00	No
Anti-CD3/CD28 vs IL-1 β	2,33	No
Anti-CD3/CD28 vs IFN- γ	-4,33	No
Anti-CD3/CD28 vs IFN- γ + IL-1 β	2,00	No
Ctrl vs IL-1 β	7,33	No
Ctrl vs IFN- γ	0,67	No
Ctrl vs IFN- γ + IL-1 β	7,00	No
IL-1 β vs IFN- γ	-6,67	No
IL-1 β vs IFN- γ + IL-1 β	-0,33	No
IFN- γ vs IFN- γ + IL-1 β	6,33	No

TABLA 3: Datos estadísticos de ensayo de inmunosupresión con 10.000 MSC pre-tratadas por 48 horas. Se analizaron los datos obtenidos mediante el software GraphPad Prism®, utilizando One-way ANOVA con corrección de Dunn's (*P < 0.05).

Datos estadísticos: Ensayo de inmunosupresión con 30.000 MSC pre-tratadas por 24 horas.		
<i>Test de Comparación Múltiple de Dunn's</i>	<i>Diferencia en la suma de rangos</i>	<i>¿Es significativo P < 0.05?</i>
Anti-CD3/CD28 vs Ctrl	5,67	No
Anti-CD3/CD28 vs IL-1 β	10,67	Sí
Anti-CD3/CD28 vs IFN- γ	4,33	No
Anti-CD3/CD28 vs IFN- γ + IL-1 β	9,33	No
Ctrl vs IL-1 β	5,00	No
Ctrl vs IFN- γ	-1,33	No
Ctrl vs IFN- γ + IL-1 β	3,67	No
IL-1 β vs IFN- γ	-6,33	No
IL-1 β vs IFN- γ + IL-1 β	-1,33	No
IFN- γ vs IFN- γ + IL-1 β	5,00	No

TABLA 4: Datos estadísticos de ensayo de inmunosupresión con 30.000 MSC pre-tratadas por 24 horas. Se analizaron los datos obtenidos mediante el software GraphPad Prism®, utilizando One-way ANOVA con corrección de Dunn's (*P < 0.05).