

Programa de Doctorado en Biomedicina

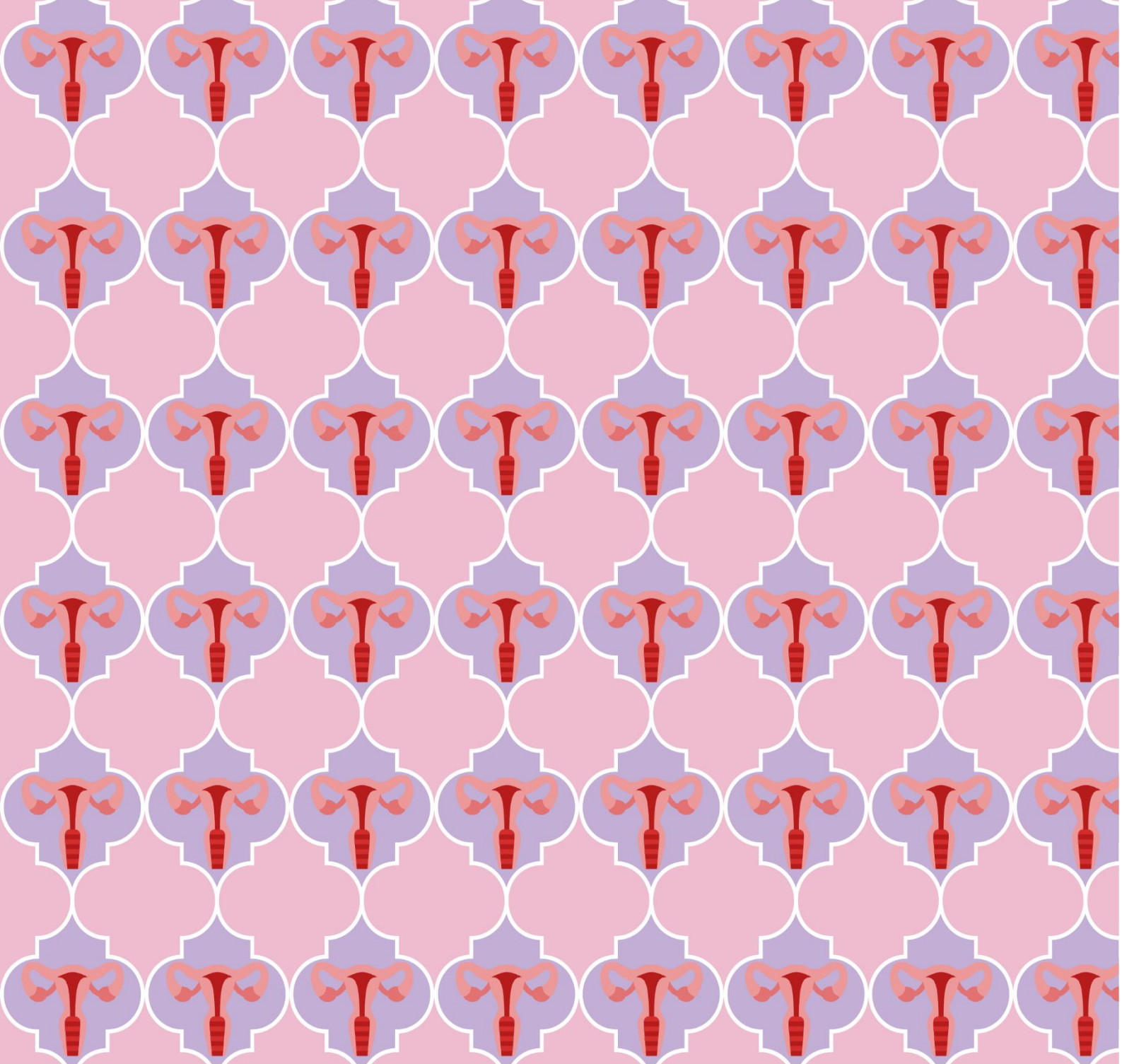


**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Efecto inmunomodulador de las células endometriales estromales procedentes de sangre menstrual en distintos modelos murinos de inflamación

Memoria presentada por **Rocío Martínez Aguilar** para optar al
título de Doctora por la Universidad de Granada

Granada, 2020



Efecto inmunomodulador de las células endometriales estromales procedentes de sangre menstrual en distintos modelos murinos de inflamación

TESIS DOCTORAL

Bajo la dirección de Ana C. Abadía Molina
y Carmen Ruiz Ruiz

Rocío Martínez Aguilar



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Rocío Martínez Aguilar
ISBN: 978-84-1306-775-9
URI: <http://hdl.handle.net/10481/66696>

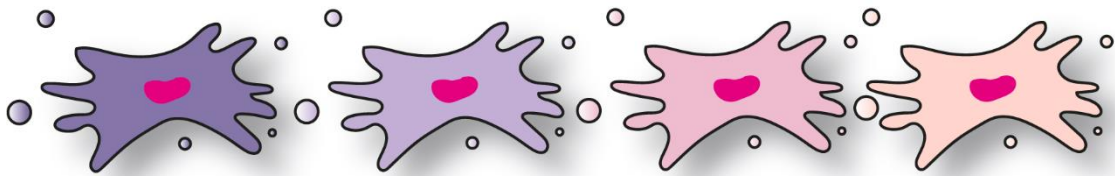
“Not all who menstruate are women, and not all women menstruate”

Esta tesis va dedicada a todas aquellas personas que menstrúan

Índice de contenidos

Resumen	V
Summary.....	VIII
Introducción.....	XI
Hipótesis.....	45
Objetivos	47
Material y métodos.....	49
Resultados	84
Discusión	131
Conclusiones	144
Conclusions	146
Índice tablas y figuras.....	148
Abreviaturas	153
Bibliografía	161

Resumen



Desde que en 2007 se aislaron por primera vez células estromales mesenquimales multipotentes (MSCs) procedentes de sangre menstrual, el interés en el estudio de sus propiedades y potenciales aplicaciones terapéuticas ha ido en aumento. Al igual que las MSCs procedentes de otras fuentes, las células endometriales estromales derivadas de sangre menstrual (o MenSCs) son capaces de diferenciarse, *in vitro*, a distintos linajes celulares procedentes de las tres capas germinales. Además, poseen propiedades regenerativas e inmunomoduladoras cuando se administran en modelos animales preclínicos.

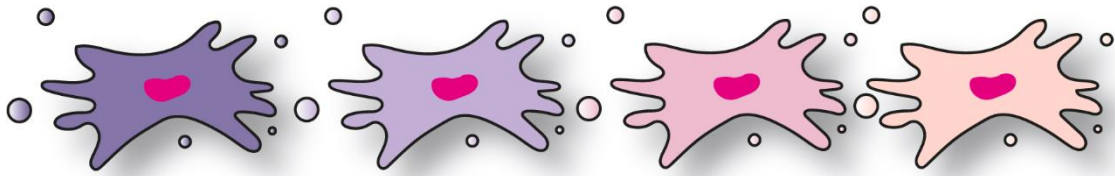
En los últimos años, los estudios con MenSCs se han centrado en su potencial terapéutico para el tratamiento de trastornos autoinmunes o el rechazo alógeno de trasplantes, donde el sistema inmunológico adaptativo juega un papel crucial. Sin embargo, la interacción de las MenSCs con el sistema inmunológico innato sigue estando poco caracterizada. Dado que esta rama del sistema inmunológico es clave en el inicio y mantenimiento de procesos inflamatorios, es indispensable caracterizar la posible interacción entre las poblaciones inmunológicas innatas y las MenSCs si deseamos facilitar su transición al ámbito clínico.

En la presente Tesis doctoral, hemos evaluado el impacto que la administración de MenSCs tiene sobre dos modelos murinos de inflamación aguda: el modelo de peritonitis inducida por tioglicolato (TGC) y el modelo de sepsis inducida por la administración de distintas cepas de *Salmonella Typhimurium*. En el modelo de peritonitis, la inyección intraperitoneal de MenSCs alteró el patrón de reclutamiento local de macrófagos, neutrófilos y otras poblaciones inmunológicas. Además, el número y porcentaje de las poblaciones peritoneales presentes era dependiente del momento de administración de las MenSCs. Las MenSCs administradas en el momento de reclutamiento de macrófagos tras la inyección de TGC, fueron capaces de migrar a órganos distantes y, cerca de la zona de inyección, promovieron la generación de agregados peritoneales compuestos por las propias células, macrófagos y neutrófilos. En ensayos *in vitro*, la estimulación de las MenSCs con TGC alteró su perfil de expresión, potenciando la transcripción de mediadores quimioatrayentes y antiinflamatorios.

En el modelo de sepsis, por otro lado, la administración de MenSCs redujo el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos al foco de infección, afectando a sus capacidades microbicidas y favoreciendo la diseminación bacteriana hacia otros órganos. Mediante ensayos *in vitro* de cocultivo con macrófagos humanos, confirmamos que las MenSCs alteraban el perfil fenotípico de estas células y afectaban a sus propiedades bactericidas. A pesar de incrementar la capacidad fagocítica de los macrófagos, el cocultivo con MenSCs redujo el grado de eliminación bacteriana y la producción de especies reactivas de oxígeno.

En conclusión, estos hallazgos ponen de manifiesto cómo las MenSCs mantienen un «diálogo» con el microambiente que las rodea, modulando así propiedades funcionales y fenotípicas de las poblaciones inmunológicas innatas, principalmente macrófagos. Dada la enorme influencia que los macrófagos poseen sobre el contexto inflamatorio, es indispensable tener en cuenta esta interacción entre macrófagos y MenSCs si queremos asegurar la eficacia terapéutica de estas últimas en un entorno clínico. Por otro lado, los modelos experimentales descritos en esta Tesis son herramientas útiles para analizar los efectos moduladores de las MenSCs, y otras fuentes de MSCs, en patologías severas específicas.

Summary



In 2007, a particular type of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) was successfully isolated from menstrual fluid. Similar to MSCs from other tissues, menstrual blood-derived stromal cells (MenSCs) possess the ability to differentiate, *in vitro*, into different cell lineages derived from the three germ layers. They also display regenerative and immunomodulatory properties when administered in animal pre-clinical models.

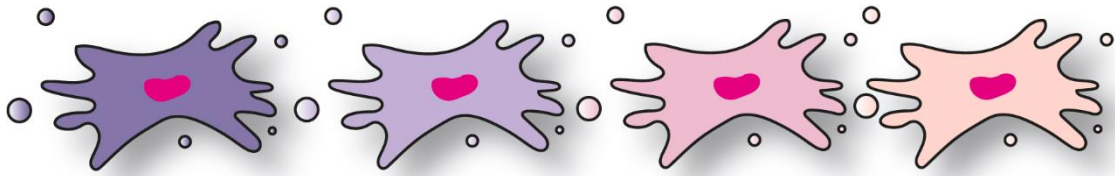
In recent years, MenSCs studies have focused on their therapeutic potential the treatment of autoimmune disorders or graft-versus-host disease complications, where the adaptive immune system plays a key role. However, the interaction between MenSCs and the innate immune system remains elusive. Since this system plays a key role in the onset and development of inflammation, understanding its crosstalk with MenSCs is required to refine their potential therapeutic effects and facilitate their transition to the clinic.

In this dissertation, we assessed the impact that MenSCs administration had in two mouse models of acute inflammation: a thioglycollate (TGC)-elicited peritonitis model and the *Salmonella* Typhimurium sepsis model. We found that in the TGC model, MenSCs intraperitoneal injection altered the local recruitment of macrophages, neutrophils and other innate immune cells. Moreover, this variation in the number and percentage of peritoneal populations was dependent on MenSCs administration timepoint. MenSCs administered at the onset of macrophage recruitment migrated to distant organs and promoted, locally, the formation of peritoneal aggregates. These aggregates harboured macrophages, neutrophils and the injected MenSCs. *In vitro*, the stimulation of MenSCs with TGC altered their expression profile enhancing the transcription of both chemoattracting and anti-inflammatory mediators.

In the *Salmonella* sepsis model, MenSCs exacerbated infection by diminishing the recruitment of macrophages and neutrophils to the site of injection and prevented bacterial clearance. Additional *in vitro* studies confirmed that co-culture of MenSCs with human macrophages reshaped their phenotype and impaired their bactericidal properties, affecting macrophage bacterial killing and the production of reactive oxygen intermediates.

In conclusion, our findings highlight that MenSCs maintain a crosstalk with the physiologic environment, where their impact might modulate phenotypic and functional properties of innate immune populations –primarily macrophages–. Given the influence of the latter in the inflammatory context, MenSCs effects over macrophages must be taken into consideration when aiming to translate MenSCs to a clinical setting. On the other hand, the experimental models first described in this study are elegant work tools to analyse distinct aspects of MenSCs effects, and in general of MSCs, on specific severe pathologies.

Introducción



Introducción

Células estromales mesenquimales multipotentes (MSCs)	1
1. ¿Qué son las MSCs?.....	1
2. ¿Qué relevancia clínica presentan las MSCs?.....	3
a. Propiedades regenerativas	4
b. Propiedades inmunomoduladoras.....	6
I. MSCs y el sistema inmunitario adaptativo.....	6
II. MSCs y el sistema inmunitario innato	9
3. Distintos orígenes: ¿Son todas las MSCs equivalentes?.....	12
Células endometriales estromales derivadas de sangre menstrual (MenSCs)	14
1. Características de las MenSCs.....	14
2. Origen de las MenSCs	19
3. Aplicaciones terapéuticas	22
a. Potencial de diferenciación.....	22
b. Propiedades regenerativas	25
I. Propiedades de migración.....	26
II. Efecto paracrino.....	26
III. Propiedades proangiogénicas	27
IV. Propiedades antifibróticas.....	28
V. Potencial antiapoptótico.....	28
c. MenSCs en ensayos clínicos	29
4. Propiedades inmunomoduladoras	33
a. MenSCs y el sistema inmunitario adaptativo	33
b. MenSCs y el sistema inmunitario innato	37
5. Papel de las MenSCs en modelos de endotoxemia y sepsis	40
a. ¿Son las MenSCs una potencial opción terapéutica para el tratamiento de la sepsis?	43

Células estromales mesenquimales multipotentes (MSCs)

1. ¿Qué son las MSCs?

Las células estromales mesenquimales multipotentes (MSCs), tradicionalmente denominadas células madre mesenquimales, constituyen una población heterogénea de células precursoras con capacidad de autorrenovación y potencial para diferenciarse a distintos tipos celulares especializados^{1,2}. Estas células, de apariencia fibroblástica y origen mesenquimal, pueden ser aisladas tanto de tejidos adultos como de fuentes perinatales^{3,4}. El motivo de su omnipresencia reside en su función: el mantenimiento de la homeostasis tisular a través de la renovación del repertorio celular³.

Hasta la fecha, no existe ningún marcador fenotípico único y exclusivo que identifique al conjunto de MSCs. Sin embargo, la Sociedad Internacional de Terapia génica y Celular (ISCT) propuso en 2006 una serie de criterios fenotípicos y funcionales que todas MSCs humanas debían cumplir para ser consideradas como tales⁵.

Esto es:

- **Adherencia al plástico.** Las MSCs son células adherentes al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar.
- **Fenotipo antigénico específico caracterizado mediante citometría de flujo:**
 - Expresión (>95%) de los marcadores CD73, CD90 y CD105.
 - Ausencia ($\leq 2\%$) de:
 - I. CD45 y CD34, marcadores de progenie hematopoyética y células endoteliales.
 - II. CD14 o CD11b, marcadores de linaje monocítico y macrófagos.
 - III. CD79 α o CD19, marcadores de células B.

IV. HLA de clase II en condiciones basales, normalmente HLA-DR.

- **Potencial de diferenciación mesenquimal.** Las MSCs son capaces de diferenciarse *in vitro* a osteoblastos, condroblastos y adipocitos bajo condiciones de cultivo de diferenciación estándar. Tras el proceso de diferenciación *in vitro*, las MSCs son teñidas con distintos colorantes para confirmar su multipotencia. Los más característicos son *Oil Red O* para diferenciación adipogénica, *Alcian Blue* o tinción para colágeno II en el caso de condroblastos, y *Alizarin Redo Von Kossa* para osteoblastos.

Es importante destacar que, generalmente, tanto la habilidad proliferativa de las MSCs como su potencial de diferenciación y características fenotípicas se pierden gradualmente con largos tiempos de cultivo.

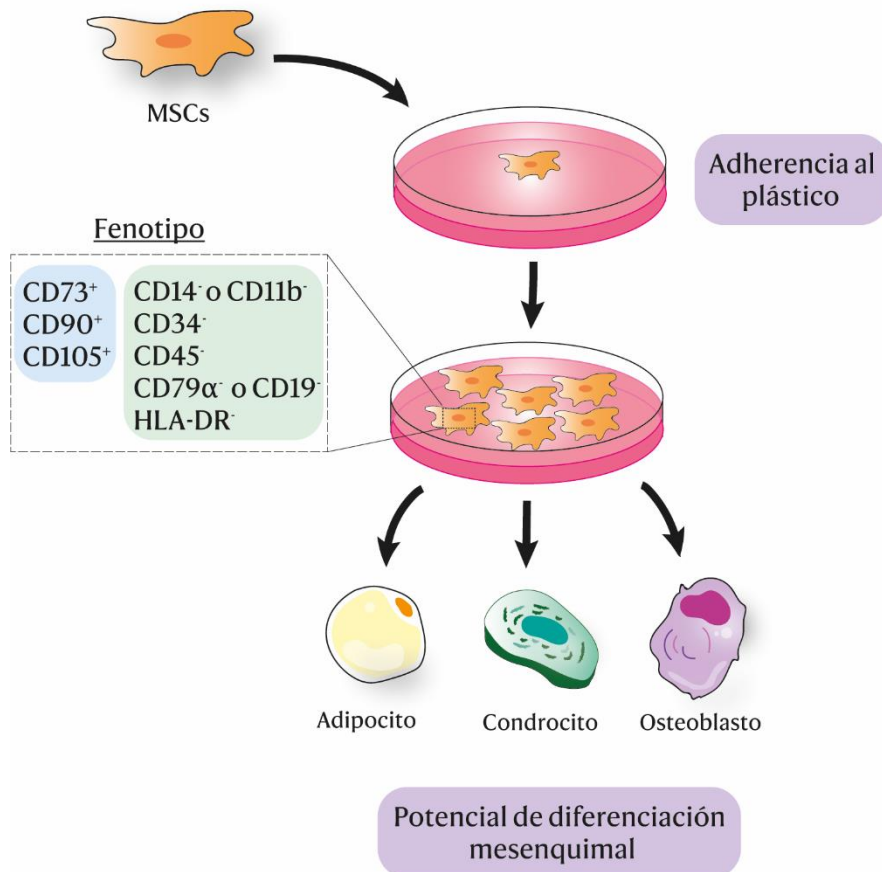


Ilustración 1. Criterios fenotípicos y funcionales que deben cumplir las MSCs humanas para ser consideradas como tales. Adaptado de Le Blanc, K. & Mougiakakos, D *Nat. Rev. Immunol* (2012)¹ y Dominici, M. et al. *Cytherapy*(2006)⁵.

¿Células madre mesenquimales o células estromales mesenquimales?

De forma histórica, las células fibroblásticas de tipo mesenquimal con características multipotentes han sido denominadas «células madre mesenquimales» (*mesenchymal stem cells*, MSCs). Sin embargo, ya en 2005, la ISCT se posicionaba⁶ con respecto al uso erróneo de dicha nomenclatura, justificando la inexactitud científica de la misma y alentando a la comunidad investigadora a utilizar la alternativa «células estromales mesenquimales multipotentes» (*multipotent mesenchymal stromal cells*, MSCs).

El descriptor «madre» (troncal o *stem*) presenta una connotación funcional específica: hace referencia a aquellas células con capacidad de autorrenovación que son capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares especializados *in vivo* con el fin de repoblar un tejido (ej. células madre hematopoyéticas). A pesar de que existen indicios de la multipotencialidad de las MSCs *in vitro*, incluso hacia linajes de otras capas germinales, la evidencia de su diferenciación *in vivo* es insuficiente para considerarlas células «madre»⁶.

No obstante, y a pesar de los esfuerzos de la ISCT por uniformizar la terminología, el uso de la nomenclatura «células madre mesenquimales» sigue persistiendo a día de hoy, estando firmemente arraigada en el ámbito biomédico.

Cuadro de texto 1. ¿Células madre mesenquimales o células estromales mesenquimales?

2. ¿Qué relevancia clínica presentan las MSCs?

Desde que Pittenger y colaboradores (col.) publicaran por primera vez el aislamiento, expansión y diferenciación exitosa de MSCs adultas en cultivo⁷, estas han suscitado gran interés en el ámbito de la terapia regenerativa.

Cuando se iniciaron los ensayos para evaluar la efectividad de las MSCs, las expectativas preliminares recaían en la regeneración de los tejidos gracias a la diferenciación de las células trasplantadas. Sin embargo, aunque está descrita su habilidad para diferenciarse *in vivo* y contribuir directamente a la regeneración⁸⁻¹¹,

esta contribución es bastante baja y no es el principal mecanismo responsable de la mejora funcional observada en los órganos en los que se emplea^{12,13}.

Dos décadas después de esa primera publicación, se acepta que la reparación tisular observada es consecuencia de un efecto paracrino y pleiotrópico mediado por la secreción de un gran número de mediadores solubles^{14,15}, así como del contacto directo entre MSCs y distintas poblaciones celulares presentes localmente.

a. Propiedades regenerativas

Una vez administradas, las MSCs son capaces de migrar de forma deliberada a tejidos dañados, donde ejercen sus efectos terapéuticos. Esta propiedad intrínseca de las MSCs parece depender, en gran medida, de la expresión de determinados receptores de quimioquinas y moléculas de adhesión en su superficie^{16,17}. En el caso de los receptores de quimioquinas, tanto receptores CC (CCR1, CCR7 y CCR9) como CXC (CXCR4, CXCR5 y CXCR6) han sido detectados a nivel proteico en MSCs¹⁸.

De entre todas ellas, el eje quimioquina/receptor que juega un papel crucial es el formado por CXCL12 (o SDF-1)/CXCR4. Esto se ha demostrado en ensayos *in vivo*, donde la sobreexpresión de CXCR4 favorecía la capacidad de migración de MSCs¹⁹⁻²¹, mientras que su bloqueo haciendo uso de anticuerpos neutralizantes tenía como resultado la ausencia de reclutamiento de MSCs en la zona dañada²⁰. Además, este eje también parece participar —junto con otras señales de daño²²— en el tropismo natural que las MSCs presentan por los tumores²³.

La habilidad regenerativa de las MSCs no solo depende de su capacidad de migración, sino también de su interacción con el microambiente local. Los datos procedentes de los distintos ensayos clínicos con MSCs, confirman que la mejora terapéutica observada (en distintas patologías) depende fundamentalmente de su capacidad de secreción de distintos factores de crecimiento y mediadores inmunorreguladores, más que de su potencial de diferenciación²⁴.

De forma general, los factores secretados por las MSCs suelen clasificarse en varias categorías: mediadores angiogénicos y antiapoptóticos, mediadores antifibróticos

y mediadores inmunomoduladores (Tabla 1). Dichas categorías son orientativas ya que, en muchas ocasiones, un mismo factor puede ejercer simultáneamente numerosos efectos. Es el caso, por ejemplo, del factor de crecimiento (HGF), que posee potencial proangiogénico, antifibrótico e inmunomodulador (Tabla 1). Por otro lado, el estudio del perfil de secreción de las MSCs sigue activo, por lo que cada vez son más los factores que se suman a la lista como responsables de las propiedades regenerativas de las MSCs.

Factores secretados por las MSCs		
Tipo de mediador	Molécula	Referencias
Angiogénico y/o antiapoptótico	VEGF	25-28
	HGF	25,28,29
	KGF	30
	TGF- β	25,31
	CCL2	26
	IL-6	26
Antifibrótico	FGF-2	32
	HGF	29,32
Inmunomodulador	PGE ₂	33-41
	HLA-Gs	42,43
	IL-6	37,44-46
	CCL2	47-49
	TGF- β	34,35,38,50,51
	HGF	38,44,50
	IDO	52-56

Tabla 1. Recopilación de los factores paracrinós más representativos secretados por las MSCs. Adaptado de da Silva Meirelles, L., Fontes, A. M., Covas, D. T. & Caplan, A. *Cytokine Growth Factor Rev* (2009)¹⁵.

b. Propiedades inmunomoduladoras

Junto con la capacidad de promover la angiogénesis y reducir la fibrosis, la capacidad de las MSCs de modular al sistema inmunológico es una de sus propiedades más versátiles en cuanto a potencial terapéutico. Las MSCs pueden interactuar con el sistema inmunológico tanto en su vertiente innata como adaptativa, modulando así distintas funciones efectoras.

I. MSCs y el sistema inmunitario adaptativo

A raíz de los efectos beneficiosos observados tras la administración de MSCs para el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD)⁵⁷, el estudio de las propiedades inmunorreguladoras de las MSCs se centró inicialmente en la posible interacción entre MSCs y linfocitos T.

Numerosa bibliografía describe la capacidad de las MSCs de inhibir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ citotóxicos tanto en cultivos mixtos de linfocitos^{50,58,59} como tras la estimulación con agentes mitógenos^{35,50,58,60}. Este efecto antiproliferativo sobre las poblaciones celulares T está mediado por distintos factores solubles como HGF^{38,50}, el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1)^{38,50}, la indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO)⁵², la hemooxigenasa 1 (HO-1)⁶¹, el óxido nítrico (NO)⁶², la prostaglandina E2 (PGE₂)^{35,38}, el ligando de muerte programada 1 (PD-1L)⁶³ o el HLA-G soluble (HLA-Gs)⁴³, aunque no se descarta la implicación del contacto célula-célula^{60,64,65}. Prueba de ello es la inmunosupresión mediada por las moléculas de adhesión vascular (VCAM) e intercelular (ICAM)⁶⁶ o la molécula coestimuladora B7-H4⁶⁷.

Además de su actividad antiproliferativa, las MSCs son capaces de alterar el perfil de secreción de citoquinas de los linfocitos T CD4⁺ efectores induciendo un fenotipo de tipo tolerogénico. Esto se traduce en una disminución de la producción de interferón gamma (IFN-γ)^{35,60} en linfocitos T cooperadores de tipo 1 (Th1) en favor de un aumento en la producción de interleuquina (IL)-4 en linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th2)³⁵, es decir, una transición de fenotipo proinflamatorio

Th1 a antiinflamatorio Th2. En el caso de los linfocitos T CD8⁺, sin embargo, una vez entran en fase efectora citotóxica, no pueden ser modulados por las MSCs⁶⁸

Por otra parte, se ha demostrado que las MSCs inhiben la diferenciación de células T *naïve* a linfocitos T cooperadores tipo (Th17). Y, sobre estas ya diferenciadas, pueden inhibir la producción de las citoquinas inflamatorias IL-17 e IL-22 y potenciar la secreción de IL-10, favoreciendo el viraje hacia un fenotipo T regulador (Treg)^{35,59}. Este aumento en la proporción de Treg parece estar mediado por un efecto combinado del contacto célula- célula y la secreción de HLA-Gs⁴², PGE₂³⁹ y TGF-β⁵¹.

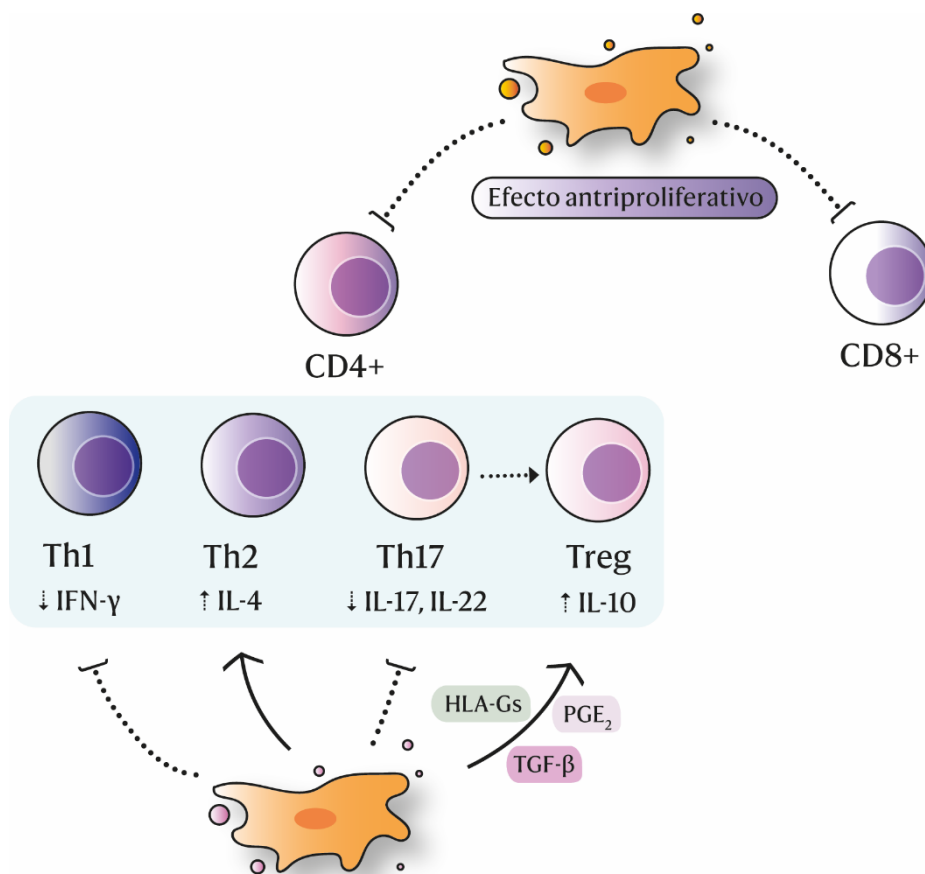


Ilustración 2. Efecto de las MSCs sobre la población celular T. *Treg: células T reguladoras.*

Las MSCs también ejercen actividad antiproliferativa sobre los linfocitos B^{69,70} e inhiben su diferenciación hacia células plasmáticas. Esta inhibición en la proliferación está mediada por factores solubles pero también es consecuencia indirecta del efecto inmunosupresor de las MSCs sobre los linfocitos T⁷¹. Ambas vías reducen los niveles de factores esenciales para la diferenciación de células B, como el factor activador de células B (BAFF) o el ligando inductor de la proliferación (APRIL)⁷², e inhabilitan la producción de distintas inmunoglobulinas (Ig) (IgM, IgA, IgG) y mediadores quimiotácticos por parte de dichas células^{69,70}.

Además, la reducción en la diferenciación a células plasmáticas viene acompañada de un incremento en la inducción de células B reguladoras (Breg)^{40,73}. Aunque los mediadores responsables de estos efectos no están del todo claros en humanos, la inducción de Breg parece estar mediada tanto por contacto célula-célula⁴⁰ como por factores solubles como IDO^{53,54} y PGE₂⁴⁰.

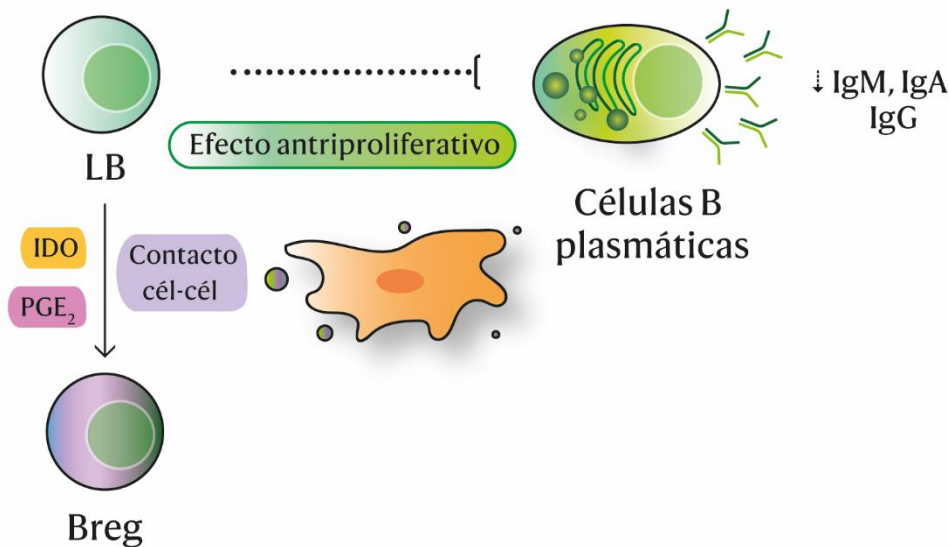


Ilustración 3. Efecto de las MSCs sobre la población celular B. *LB: linfocitos B. Breg: células B reguladoras. Cél-cél: célula-célula.*

II. MSCs y el sistema inmunitario innato

El estudio de la interacción de las MSCs con otras poblaciones, como células *natural killer* (NK) y neutrófilos, presenta menor recorrido y, por tanto, es más propenso a la controversia.

Algunas publicaciones aseguran que las MSCs ejercen un efecto antiproliferativo sobre células NK estimuladas con IL-2 o IL-15⁵⁵, disminuyen su secreción de IFN- γ ^{35,42} así como su actividad citotóxica⁴². Todo ello mediante la secreción de factores como HLA-Gs⁴², TGF- β 1 y PGE₂³⁴ o IDO⁵⁵. Otras publicaciones, sin embargo, describen la capacidad de las MSCs de promover, mediante CCL2 (MCP-1), la secreción de IFN- γ por parte de las células NK⁴⁹.

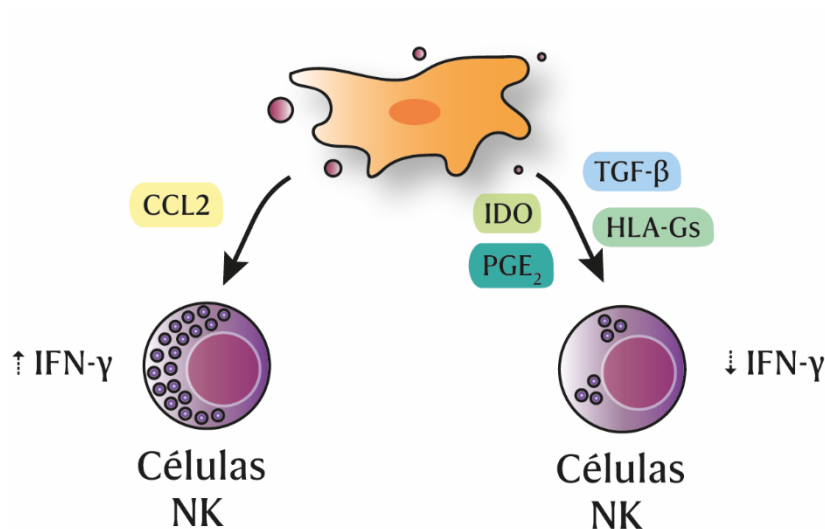


Ilustración 4. Controversia acerca del efecto de las MSCs sobre las células NK.

En relación a los neutrófilos, componentes del sistema inmunológico innato con una vida media de apenas 72h⁷⁴, se ha demostrado que las MSCs son capaces de inhibir su apoptosis mediante un mecanismo dependiente de IL-6⁴⁵. También estimulan su reclutamiento mediante la secreción de IL-8 y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)⁷⁵ y reducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)⁴⁵, el principal mecanismo de eliminación de patógenos de los neutrófilos, también ligado a daño tisular⁷⁴.

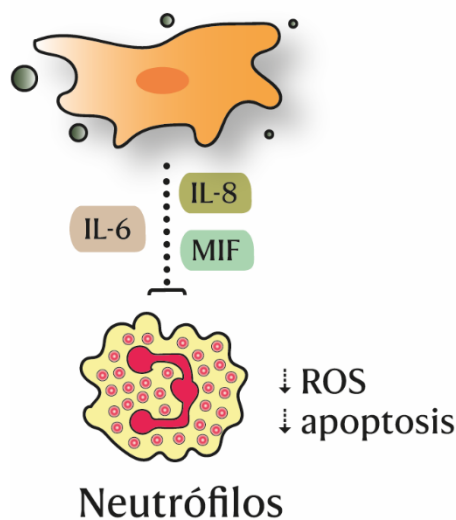


Ilustración 5. Efecto de las MSCs sobre los neutrófilos.

Las células dendríticas, células presentadoras de antígeno (APCs) por excelencia, dependen de forma esencial de su estado madurativo para llevar a cabo sus funciones⁷⁶. Cuando las células dendríticas alcanzan su madurez, son capaces de presentar antígenos a los linfocitos T, favoreciendo su estimulación e inmunogenicidad. Si esta maduración no se produce, la presentación de antígenos está destinada a inducir tolerancia, no a favorecer la activación y polarización de linfocitos T⁷⁷.

En contacto con las MSCs, las células dendríticas inmaduras derivadas tanto de progenitores CD34⁺⁷⁷ como de monocitos de sangre periférica^{41,65,76,78} son incapaces de diferenciarse a células dendríticas maduras, debido a la acción de PGE₂⁴¹. En células dendríticas ya maduras, las MSCs favorecen la diferenciación de las llamadas proinflamatorias o de tipo I (DC1) a células dendríticas antiinflamatorias o de tipo II (DC2)⁵⁹, inhibiendo la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)^{35 65} e IL-12⁷⁹ y favoreciendo la secreción de IL-10³⁵. Este efecto también parece ser mediado por PGE₂³⁵ y la quimioquina GRO- γ (CXCL1)⁸⁰.

En el caso de las células dendríticas plasmacitoides (pDC), células dendríticas no convencionales encargadas de la producción de interferón de tipo I en respuesta a

estímulos microbianos³, la incubación con MSCs incrementa la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10³⁵.

Los monocitos aislados de sangre periférica, en contacto con MSCs, también pueden ser polarizados a macrófagos de tipo antiinflamatorio (M2), caracterizados por la expresión de CD206 y CD163 en su superficie y la secreción de IL-10 e IL-6, así como por la reducción en la producción de TNF- α e IL-12⁸¹⁻⁸³. Esta polarización parece ser mediada por la secreción de IL-6, PGE₂ e IDO por parte de las propias MSCs^{36,46,56}.

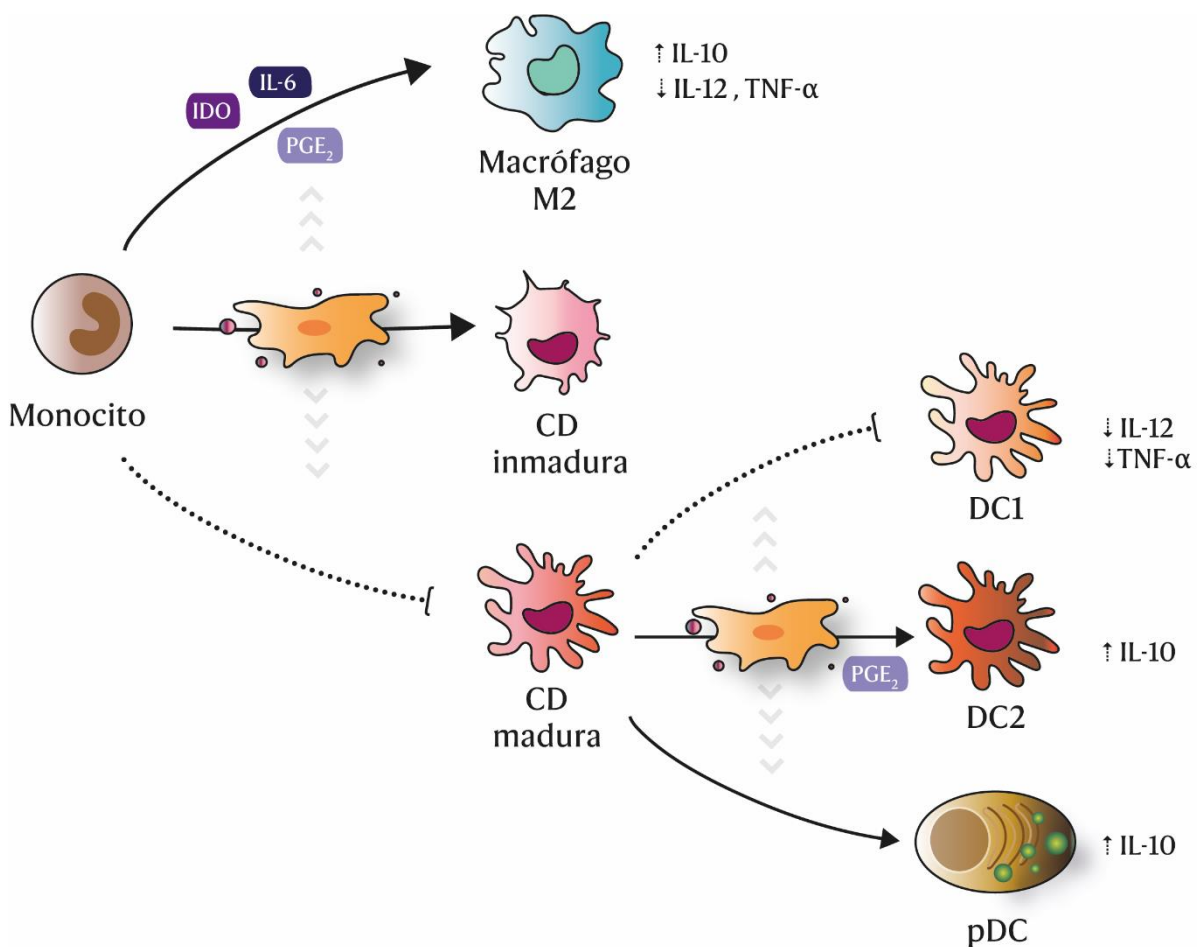


Ilustración 6. Efecto de las MSCs sobre la diferenciación de monocitos a macrófagos y células dendríticas. *CD*: célula dendrítica, *DC1*: células dendríticas proinflamatorias, *DC2*: células dendríticas antiinflamatorias, *pDC*: células dendríticas plasmacitoides.

A grandes rasgos, las interacciones de las MSCs con el sistema inmunológico resultan en la inhibición o limitación de respuestas inflamatorias y/o en la promoción de señalización antiinflamatoria para mitigar así dichas respuestas.

3. Distintos orígenes: ¿Son todas las MSCs equivalentes?

A pesar de que las MSCs fueron aisladas por primera vez de médula ósea procedente de la cresta ilíaca (BM-MSCs)⁷, su localización no se limita a dicha región. A día de hoy, se han detectado MSCs en todos los tejidos adultos (hígado, cerebro, bazo, pulmón, páncreas, timo, riñones, corazón, músculos, piel)⁸⁴, algunos tan llamativos como el tejido adiposo (AD-MSCs)⁸⁵, la pulpa dental (DP-MSCs)⁸⁶ o los folículos pilosos⁸⁷. Las MSCs también están presentes en tejidos perinatales como la decidua⁸⁸, placenta (tanto materna como fetal)⁸⁹, el cordón umbilical (UC-MSCs)⁹⁰ y el fluido amniótico⁹¹, además de encontrarse en fluidos como la sangre periférica⁹², menstrual^{93,94}, sangre de cordón umbilical⁹⁵ o la leche materna⁹⁶. En definitiva, todos los tejidos presentan en su compartimento estromal reservorios de MSCs, generalmente localizadas en el nicho perivascular⁸⁴.

Más allá de las limitaciones prácticas que pueden presentar los distintos tipos de MSCs –su biodisponibilidad o el grado de invasividad de la técnica empleada para su extracción–, su omnipresencia rápidamente planteó el debate de si las MSCs procedentes de distintos tejidos serían equivalentes en sus propiedades tanto fenotípicas como funcionales.

Aunque esta cuestión sigue siendo objeto de estudio, cada vez existe un mayor grado de evidencia respecto a la hipótesis de que las MSCs poseen diferencias tejido-dependientes⁹⁷⁻¹⁰⁰. Estas diferencias abarcan variaciones en:

- **La expresión de marcadores de superficie.** A pesar de compartir los marcadores fenotípicos indispensables para ser consideradas MSCs⁵, las MSCs procedentes de distintas fuentes son capaces de expresar (o no) determinados marcadores de superficie de forma tejido-específica. Es el caso de la integrina CD49d, presente en AD-MSCs pero no en BM-MSCs⁹⁸. O la proteína de adhesión CD106, presente en BM-MSCs y ausente en AD-MSCs⁹⁸.
- **El potencial de diferenciación.** A modo de ejemplo, las DP-MSCs poseen mayor potencial de diferenciación osteogénico que las BM-MSCs¹⁰¹. Del

mismo modo, MSCs procedentes del tejido amniótico poseen mayor potencial condrogénico que las AD-MSCs¹⁰².

- **El perfil de secreción de factores paracrinos.** Uno de los estudios más controvertidos de la literatura expuso la capacidad de las AD-MSCs de promover la proliferación tumoral en un modelo *in vivo* de glioblastoma, mientras que las UC-MSCs inhibían dicha proliferación¹⁰³. Estos resultados antagónicos tienen su origen en las diferencias en los niveles de expresión de factores proangiogénicos expresados por las MSCs. Así pues, la mayor secreción de factores proangiogénicos por parte de las AD-MSCs tenía como resultado una mayor vascularización tumoral y un efecto antiapoptótico sobre las células de glioblastoma¹⁰³.
- **Sus propiedades inmunomoduladoras.** Por ejemplo, BM-MSCs y AD-MSCs difieren en su habilidad para suprimir la producción de anticuerpos por parte de células B, siendo estas últimas las que ejercen un mayor efecto supresor tras la estimulación de las células B con un agente mitógeno¹⁰⁴. Por otra parte, estudios comparativos entre BM-MSCs, AD-MSCs y UC-MSCs revelan que, a pesar de que los tres tipos celulares son capaces de evitar la activación de células T CD4⁺ y CD8⁺ tras el estímulo con fitohemaglutinina (PHA), son las AD-MSCs las que presentan un mayor efecto inhibitorio¹⁰⁵. Incluso comparando MSCs obtenidas de placenta y cordón umbilical del mismo donante, las MSCs procedentes de placenta exhiben una mayor actividad antiproliferativa sobre linfocitos T que las procedentes de cordón umbilical¹⁰⁶.

Los ejemplos aquí presentados ponen de manifiesto la inexactitud científica que supone extrapolar resultados entre MSCs de distintos orígenes. En algunos casos, incluso, reflejan el potencial riesgo de trasladar a la clínica distintos tipos de MSCs sin un estudio exhaustivo previo de sus propiedades. Desde un enfoque más optimista, estas diferencias son una oportunidad para diseñar terapias personalizadas, donde cada tipo de MSCs puede aplicarse a condiciones patológicas específicas en simbiosis con sus propiedades intrínsecas.

Células endometriales estromales derivadas de sangre menstrual (MenSCs)

En febrero de 2007, Cui y col. describieron por primera vez el aislamiento de una población de células adherentes de morfología fibroblástica procedente de sangre menstrual⁹⁴. Su caracterización fenotípica reveló la expresión de marcadores mesenquimales típicos de MSCs, y su capacidad *in vitro* para diferenciarse a músculo esquelético sugería una potencial inclusión en la categoría de MSCs⁹⁴. Meses más tarde, en noviembre de 2007, Meng y col. publicaron el trabajo más citado hasta la fecha sobre MSCs derivadas de sangre menstrual: “*Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population*”⁹³. En él, se confirmó el perfil fenotípico de MSCs previamente descrito por Cui y col.⁹⁴ y se analizó la tasa proliferativa, normalidad cariotípica y capacidad de diferenciación a distintos linajes⁹³. Dichas células procedentes de sangre menstrual, acuñadas como «células regeneradoras del endometrio»⁹³, demostraron tener una elevada tasa proliferativa sin perder la normalidad cariotípica o desarrollar potencial tumorigénico. Además, podían diferenciarse *in vitro* a distintos linajes de las tres capas germinales: mesodermo, ectodermo y endodermo⁹³.

Desde entonces, los estudios centrados en definir las propiedades fenotípicas y funcionales de las células endometriales estromales derivadas de sangre menstrual (MenSCs) para su aplicación en medicina regenerativa se han incrementado de forma exponencial.

1. Características de las MenSCs

Fenotípicamente hablando, las MenSCs son positivas para los marcadores típicos de MSCs (CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺) y negativas para marcadores hematopoyéticos y endoteliales (CD45⁻, CD34⁻, CD133⁻). La expresión del marcador pluripotente factor de transcripción de unión a octámero 4 (OCT-4) las diferencia frente a otras fuentes de MSCs, como la médula ósea, a pesar de que dicha expresión

se pierde con largos tiempos de cultivo¹⁰⁷. Otra característica distintiva es la ausencia del marcador mesenquimal STRO-1, cuya positividad es característica en BM-MSCs y biopsia de endometrio⁹³. Con respecto a la expresión de otros marcadores embrionarios y pluripotentes como NANOG, c-kit (CD117) o el antígeno embrionario específico de etapa (SSEA-4) existe cierta controversia (Tabla 2), a pesar de que en varias publicaciones este tipo de marcadores se utilizan para purificar la población de MenSCs mediante selección positiva¹⁰⁸⁻¹¹⁰. En la Tabla 2 se recogen todos los marcadores fenotípicos estudiados en la bibliografía sobre MenSCs existente hasta la fecha.

Con respecto a otras fuentes de MSCs, las MenSCs poseen determinadas características que refuerzan su idoneidad en estrategias de terapia celular dentro del espectro de MSCs disponibles:

- **Mayor tasa de rendimiento en su aislamiento.** En comparación con las BM-MSCs, la proporción de células mesenquimales multipotentes aisladas del mismo volumen de muestra es mucho mayor (0.02% frente a 0.004%)¹¹¹.
- **Facilidad en la expansión.** La elevada tasa proliferativa de las MenSCs^{93,108,112-115} facilita su expansión *in vitro* con respecto a otras fuentes como médula ósea o tejido adiposo. Su tiempo de duplicación oscila entre las 20-27h^{93,108,112,114-116}, mientras que el tiempo de duplicación de las BM-MSCs asciende a 40h^{114,115}. Además, este alto grado de proliferación no va acompañado de pérdida en la normalidad cariotípica o desarrollo del potencial tumorigénico^{93,107,108,112,117-121} asegurando una administración segura en modelos preclínicos y ensayos clínicos. Tampoco pierden su integridad fenotípica en pases avanzados^{111,122} y mantienen la actividad telomerasa más tiempo que las BM-MSCs¹⁰⁸, reduciendo así el grado de senescencia a menos pases.

Sin embargo, es importante mencionar que la edad de las personas donantes también afecta a su capacidad proliferativa, de modo que la tasa de duplicación entre los 40-50 años es mayor que en el rango de edad comprendido entre los 30-40 años^{119,122}.

Estas dos ventajas son muy relevantes en relación a la aplicación clínica de las MenSCs, ya que una mayor tasa de expansión puede acortar el tiempo de cultivo necesario para obtener el volumen de células adecuado para su administración terapéutica. De este modo, la inyección de las células a fases tempranas podría ayudar a evitar que sus propiedades funcionales se vean mermadas o se produzca una senescencia que limite el efecto terapéutico en los pacientes.

- **Adquisición periódica de forma no invasiva.** El hecho de ser obtenidas a partir de un «producto de desecho» de forma sencilla y económica periódicamente es una de sus mayores ventajas frente a otras fuentes de MSCs. Además, el uso de tratamiento anticonceptivo hormonal oral no parece influenciar el número de células aisladas, su grado de proliferación, viabilidad y capacidad de diferenciación¹²³, aunque sería necesario evaluar otras propiedades funcionales.
- **Posibilidad de trasplante autólogo.** Al igual que el resto de MSCs, las MenSCs son células tolerogénicas cuyo trasplante no genera ningún tipo de inmunorreactividad¹¹⁷. Aun así, la posibilidad de su empleo de forma autóloga reduce aún más cualquier posibilidad de rechazo.

	Marcador fenotípico	Positivo	Negativo		Marcador fenotípico
Marcadores positivos definidos por la ISCT	CD73	93,94,118,121,124-131,107,132-141,110,142-146,111-116		Marcadores de migración o quimiotácticos	CD73
	CD90	8,20,22-25,27-29,31,34-38,41,42,45-53,55,59,60,62,64-68			CD90
	CD105	93,94,116-118,122,124-129,107,130-139,108,140-147,150,151,110-115			CD105
Marcadores negativos definidos por la ISCT	CD14		93,94,101,111,116,117,133,136,138,148		CD14
	CD19		136,138		CD19
	CD34	108,118,150	93,94,121,122,124,126-129,131-133,101,134-140,144-146,110,147-149,151,111-113,115,119,120		CD34
	CD45	118,127,150	93,94,120,121,124-126,128-132,101,134-143,108,144-146,148,149,151,152,110-113,115,116		CD45
	HLA-DR		94,108,132-140,144,111,145,149,152,112,116,118,120,126,127,131		HLA-DR
Marcadores embrionarios y multipotentes	c-kit (CD117)	108-110,120	94,111,149,150,112,125-127,134,135,137,148		CD117
	NANOG	109,139,141	93,114,117,153		NANOG
	OCT-4	21,23,24,26,27,30-33,40,43,44,53,56,61,63		OCT-4	
	SOX2	131		SOX2	
	SSEA-3		111	SSEA-3	
	SSEA-4	108,110,116,131,139,141	93,111,112,114,124,129,130,146,153	SSEA-4	
	TRA-1-60		111	TRA-1-60	

Tabla 2. Caracterización fenotípica de las MenSCs en la literatura.

	Marcador fenotípico	Positivo	Negativo		Marcador fenotípico
Otros	c-Myc	131,141		Otros	CD86
	CD9	93,108,113,128,129,146			CD106
	CD10	107,113,115,129,143,146,148			CD133
	CD13	94,112,131			CD146
	CD29	93,94,120,124,126-129,131-134,101,135,137,139,141,143,146-150,107,154,108,110,112,113,115,118			CD166
	CD31		94,111,116,138,148,152		CD271
	CD38		93,108,113,115,128-130,140,146		CD309
	CD40		133		EpCAM
	CD41a	93			GFAP
	CD49a	111			HLA-ABC
	CD49f	108,121			hTERT
	CD50		94		Nestina
	CD54	94			STRO-1
	CD55	94,148			Vimentina
	CD56	116			
	CD59	93,94,148			
CD80		139			
CD83		133			

Tabla 2. Caracterización fenotípica de las MenSCs en la literatura (continuación).

2. Origen de las MenSCs

El endometrio humano es uno de los tejidos más dinámicos del organismo. Bajo la influencia de hormonas ováricas como la progesterona o el estradiol, es capaz de regenerarse en cada ciclo menstrual sin presentar cicatrices ni signos de fibrosis. Este proceso se repite durante toda la vida reproductiva de una mujer, con una estimación de más de 400 ciclos de desprendimiento/regeneración¹⁵⁶. En estas particulares condiciones, donde existe una exigente demanda proliferativa, no es descabellado pensar que este tejido pueda albergar una población de células estromales multipotentes con elevada tasa de división celular.

En 2004, Cho y col. fueron los primeros en demostrar la presencia de marcadores de células multipotentes en la zona basal del endometrio¹⁵⁷, cuya expresión era independiente de la regulación hormonal ovárica del ciclo. Años más tarde, Gargett y col. consiguieron aislar dicha población y comprobar su capacidad de proliferación y diferenciación *in vitro*¹⁵⁸.

En todos los estudios mencionados previamente se emplearon biopsias de endometrio como fuente primaria de células, por lo que la comunidad científica empezó a cuestionarse si la sangre menstrual mostraría total homología con las poblaciones celulares presentes en el endometrio o si por el contrario albergaría una heterogeneidad celular particular. En la década de los 80, se creía que las células contenidas en la sangre menstrual no eran viables y por ese motivo eran expulsadas del organismo¹⁵⁹. A día de hoy, se sabe que el fluido menstrual, más allá de células muertas, contiene fragmentos glandulares uterinos, fibroblastos endometriales, MenSCs y MSCs endometriales (eMSCs) procedentes de fragmentos de endometrio desprendido¹⁶⁰.

El hecho de que el fluido menstrual esté conformado por sangre periférica también abrió el debate acerca de la posibilidad de encontrar BM-MSCs en sangre menstrual. Sin embargo, el número de BM-MSCs circulantes en sangre periférica es tan bajo (0–1 por cada $4 \cdot 10^7$ células con núcleo¹⁶¹) que la descarta como una de las fuentes principales de MSCs. Por otra parte, ciertos estudios en modelos murinos sugieren

que las BM-MSCs pueden contribuir a la repoblación del tejido endometrial¹⁶² aunque publicaciones más recientes parecen desmentir dicha concepción¹⁶³.

Una de las interpretaciones más aceptadas sobre el origen de las MenSCs es que simplemente sean eMSCs desprendidas durante la fase menstrual¹⁰⁸. Sin embargo, diferencias en su perfil fenotípico, como la ausencia de expresión de STRO-1 por parte de las MenSCs^{93,164}, generan dudas sobre su total equivalencia. En la actualidad, la jerarquía e interrelación entre BM-MSC, eMSCs y MenSCs en el contexto uterino sigue siendo un tema de intensa controversia y estudio.

Al igual que su origen, la nomenclatura para referirse a las MSCs procedentes de sangre menstrual es controvertida y heterogénea, siendo **MenSCs** el acrónimo más usado (**Tabla 3**).

Nomenclatura	Acrónimo	Referencia	Nomenclatura
<i>Endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood</i>	<i>EDT-MSC</i>	116	<i>Menstrual blood-derived endometrial stem cells</i>
<i>Endometrial mesenchymal stem cells</i>	<i>EnSCs</i>	120,165	<i>Menstrual blood-derived mesenchymal cells</i>
<i>Endometrial mesenchymal stem cells derived from menstrual blood</i>	<i>MenSCs</i>	168	<i>Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells</i>
<i>Endometrial regenerative cells</i>	<i>ERC</i>	93,151,176,153,169-175	<i>Menstrual blood-derived mesenchymal stem/stromal cells</i>
<i>Endometrial stem cells</i>	<i>EnSCs</i>	150	<i>Menstrual blood-derived stem cells</i>
<i>Human endometrial stem cells</i>	<i>HuMenSCs</i>	147	<i>Menstrual blood-derived stromal cells</i>
<i>Human menstrual blood-derived stem cells</i>	<i>hMBSCs</i>	139	<i>Menstrual blood-derived stromal/stem cells</i>
<i>Menstrual blood cells</i>	-	109	<i>Menstrual derived mesenchymal stem cells</i>
<i>Menstrual blood derived mesenchymal stem cells</i>	<i>MMCs</i>	180	<i>Menstrual fluid mesenchymal stem cells</i>
<i>Menstrual blood mesenchymal stem cells</i>	<i>MB-MSCs/-MenSCs</i>	101/122,144	<i>Menstrual-derived stem cells</i>
<i>Menstrual blood progenitor cells</i>	<i>MBPCs</i>	112	
<i>Menstrual blood stem cells</i>	<i>MenSCs</i>	141,154,155	
<i>Menstrual blood stromal stem cells</i>	<i>MenSCs/MBSCs</i>	108,129,181,128	
<i>Menstrual blood-derived cells</i>	-	94	

Tabla 3. Heterogeneidad en la nomenclatura de las MenSCs.

3. Aplicaciones terapéuticas

a. Potencial de diferenciación

Inicialmente, y como venía siendo tradición para el resto de fuentes de MSCs, los estudios sobre la caracterización de las propiedades funcionales de las MenSCs se centraban en su capacidad para diferenciarse a otros linajes tanto *in vitro* como *in vivo*, contribuyendo así a la regeneración de tejidos o a contrarrestar patologías degenerativas.

Más tarde, el estudio del potencial de diferenciación de las MenSCs derivó en el concepto de plasticidad¹⁸², cuya definición recoge tres premisas: (i) que una célula sea capaz de diferenciarse a múltiples linajes celulares, (ii) que dicha diferenciación sea funcional tanto *in vitro* como *in vivo* y (iii) que la implantación de las células trasplantadas sea robusta. En general, esta plasticidad comprende tanto fenómenos de transdiferenciación, como desdiferenciación y fusión célula-célula¹⁸².

Bajo esta definición, las MenSCs han demostrado ser capaces de diferenciarse a múltiples linajes de las tres capas germinales *in vitro* (Tabla 4), entendiendo como éxito en la diferenciación la expresión de determinados marcadores fenotípicos. Sin embargo, si restringimos los estudios de diferenciación a aquellos que vienen acompañados de ensayos funcionales *in vitro*, el grado de evidencia es mucho más limitado. Como ejemplos ilustrativos destacan:

- La capacidad de las MenSCs diferenciadas a cardiomiocitos de presentar contracciones y ciclos de latido de forma sincrónica^{93,148,166}.
- La capacidad de las MenSCs diferenciadas a hepatocitos de acumular glucógeno, sintetizar albúmina y urea^{117,125}.
- La capacidad de las MenSCs diferenciadas a neuronas para generar un potencial de acción¹⁵⁴.
- La capacidad de las MenSCs diferenciadas a ovocitos de producir estrógeno y progesterona, además de adquirir morfología embrionaria mediante partenogénesis¹⁶⁵.

En relación a fenómenos de desdiferenciación, las MenSCs han demostrado presentar una eficiencia de reprogramación a células pluripotentes inducidas (iPSCs) 500 veces superior a otras fuentes celulares¹⁶⁷, siendo capaces de formar cuerpos embrionarios y generar teratomas tras su inyección en ratones inmunodeprimidos¹⁴⁰.

Un factor muy importante a tener en cuenta es que la plasticidad no sólo está sujeta al potencial de la propia célula, sino también a la regulación que el nicho ambiental en el que se encuentra ejerce sobre ella¹⁸². Por este motivo, los ensayos *in vitro* en 2D no ofrecen una reproducción del todo fidedigna de los fenómenos que tienen lugar *in vivo* y pueden enmascarar el auténtico potencial de diferenciación de las células de estudio. Prueba de ello son los ensayos empleando *scaffold* biomiméticos que asemejan a la matriz extracelular¹¹³, donde se obtienen mejores resultados de diferenciación que en cultivos clásicos, posiblemente por un contacto célula-célula y célula-matriz mucho más fisiológico.

Además, la presunción de que una única fuente de MSCs sea superior a las demás en su capacidad de diferenciación a todos los linajes de estudio es poco plausible. Tal y como se ha mencionado con anterioridad, no todas las MSCs son equivalentes en sus propiedades, y la plasticidad es una de ellas. De hecho, es posible que la fuente de MSCs dicte el compromiso con ciertos linajes. Esto podría explicar, por ejemplo, por qué las DP-MSCs presentan una mejor diferenciación osteogénica que las derivadas de UC-MSCs o las MenSCs¹⁰¹. Asimismo, las células derivadas de glándulas endometriales son las que presentan un mayor potencial de diferenciación cardiomiogénico frente a las de placenta, UC-MSCs, BM-MSCs o MenSCs¹⁴⁸. Centrándonos en las MenSCs, estas poseen menor capacidad de diferenciación adipogénica^{107,111,117,122,125,146} y neuronal¹⁵⁵ que las BM-MSCs.

Por otra parte, los resultados obtenidos en modelos *in vivo* no son muy alentadores con respecto al potencial de diferenciación de las MenSCs. Únicamente dos estudios en toda la bibliografía existente (Tabla 5) mencionan fenómenos de transdiferenciación o fusión celular. Uno de ellos es el de Cui y col., donde empleando un modelo murino de distrofia muscular de Duchenne, demuestran que las MenSCs trasplantadas se fusionan con los miocitos del huésped, generando así

distrofina⁹⁴. El otro estudio en el que se menciona transdiferenciación *in situ* es el publicado por Hida y col.¹⁴⁸ donde, en un modelo murino de infarto de miocardio, las células trasplantadas reducen la zona infartada y expresan marcadores cardiomiocíticos, incluyendo el patrón de estriación característico de este tipo celular. Sin embargo, estudios posteriores empleando el mismo modelo rechazan la posibilidad de diferenciación a cardiomiocitos^{150,180} y postulan que la regeneración miocárdica observada se debe al reclutamiento de progenitores endógenos propiciado por las MenSCs¹⁵⁰. Este *modus operandi* por parte de las MenSCs se ve reflejado también en otros modelos, como el modelo murino de diabetes¹¹², donde activan la diferenciación de progenitores pancreáticos a células β , o los modelos de fallo ovárico prematuro, donde se reestablece la función ovárica gracias al mantenimiento de las células de la granulosa (células de soporte del ovocito), evitando así la pérdida de células madre germinales ováricas^{120,121,147}. Estudios en modelos murinos de derrame cerebral isquémico¹⁰⁹ y fibrosis hepática¹²⁷ también concluyen que la plasticidad no es el mecanismo responsable de los efectos terapéuticos observados.

Capa germinal	Linaje celular	Referencia
Mesodermo	Adipocitos	93,101,121,123-125,129,131-133,136,137,107,138,139,142,144-146,149,178,108,111,112,116-118,120
	Condrocitos/Condroblastos	108,111,124,125,129,131-133,136,138,145,146,112-114,116-118,120,123
	Osteocitos/Osteoblastos	93,101,120,121,123-125,129,131-133,136,108,137,139,142,144-146,149,178,111,112,115-119
	Cardiomiocitos	93,108,131,148,166
	Miocitos	93,94
	Endotelio	93
	Células del núcleo pulposos	177
	Células endometriales	152
Endodermo	Epitelio respiratorio	93,135
	Células pancreáticas	93
	Hepatocitos	93,117,118,125
Ectodermo	Células gliales y neuronales	93,108,109,131,132,154,155
	Ovocitos	165
	Queratinocitos	141,143

Tabla 4. Potencial de diferenciación de las MenSCs.

b. Propiedades regenerativas

A pesar de que la mejora observada no se debe a procesos de plasticidad, la administración de MenSCs en distintos modelos preclínicos ha demostrado que genera numerosos efectos terapéuticos (Tabla 5). Aunque a día de hoy siguen sin conocerse con exactitud los mecanismos de acción responsables de sus propiedades regenerativas, una de las hipótesis más extendidas es que la reparación tisular observada es consecuencia tanto de la capacidad de migración de las MenSCs ante señales de daño como de la secreción de diversos mediadores con efecto paracrino¹³⁶.

I. Propiedades de migración

Al igual que el resto de MSCs, las MenSCs presentan un tropismo natural por los tejidos dañados, donde migran y son capaces de ejercer un potencial efecto terapéutico. Podemos encontrar evidencias de dicha capacidad migratoria en distintos modelos *in vivo*: por ejemplo, tras la administración intraesplénica de las MenSCs, estas son capaces de migrar al hígado dañado en un modelo murino de fallo hepático agudo¹¹⁸. Lo mismo ocurre con la administración intravenosa o intraperitoneal en modelos murinos de fibrosis hepática¹²⁷, diabetes¹¹², derrame cerebral isquémico¹⁰⁹, fallo ovárico prematuro^{120,121,147} e incluso lesión pulmonar aguda, donde las MenSCs migran a hígado, páncreas, cerebro, estroma ovárico y pulmón, respectivamente. Además, estudios de tropismo comparativos entre ratones sanos y enfermos demuestran que tanto el grado de retención como de supervivencia de las MenSCs migrantes es mucho mayor en ratones enfermos^{112,127,145}.

Las MenSCs expresan numerosos receptores que podrían ser responsables de la migración observada, como son CCR4, CD221 (IGF-1R), CD140b (PDGFR- β), CD44 y CXCR4. Entre ellos, el eje CXCL12/CXCR4 ha sido el más estudiado como posible mecanismo de acción. Dicha hipótesis deriva de estudios en modelos de daño hepático y cerebral, donde se produce un aumento de la expresión de CXCL12 en los tejidos dañados que podría originar la señal quimiotáctica de reclutamiento de las MenSCs mediante la interacción con su receptor CXCR4^{109,118}. Por otra parte, tanto ensayos *in vitro* como *in vivo* han demostrado que las MenSCs poseen una mayor capacidad de migración que las BM-MSCs^{111,144} y este efecto puede deberse, al menos en parte, a su mayor porcentaje de positividad en CXCR4¹⁴⁴.

II. Efecto paracrino

Las MenSCs son capaces de secretar multitud de factores con efecto local, contribuyendo a la regulación del microambiente y facilitando así fenómenos de reclutamiento de progenitores, proliferación, supervivencia y angiogénesis que, en última instancia, favorecen la reparación y regeneración tisular.

III. Propiedades proangiogénicas

La caracterización proteómica del secretoma de las MenSCs ha revelado que, en comparación con MSCs como las procedentes de sangre de cordón umbilical, producen niveles más elevados tanto de metaloproteinasas de la matriz como de factores angiogénicos⁹³. Esta peculiaridad cobra mayor sentido si tenemos en cuenta que el endometrio sufre un alto grado de remodelación tisular, donde fenómenos como la vasculogénesis son cruciales para asegurar la supervivencia del tejido tras la pérdida de dos tercios de su estructura.

El potencial proangiogénico de las MenSCs se ha demostrado en ensayos *in vitro* donde el cocultivo de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVECs) con MenSCs favorece la formación de estructuras capilares por parte de dichas células^{150,169} incluso en mayor medida que cuando son cocultivadas con BM-MSCs¹¹¹. Si comparamos perfil de expresión génica entre BM-MSCs y MenSCs en cuanto a factores proangiogénicos, estas últimas expresan menores niveles de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)¹⁵³ pero poseen una mayor expresión de angiopoyetina (Ang) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)^{150,153}, sugiriendo así que ambas fuentes apoyan el proceso de angiogénesis pero mediante distintas vías. Sin embargo, en condiciones de hipoxia, las MenSCs incrementan la expresión de PDGF, Ang e incluso VEGF a niveles más altos que otras MSCs^{136,150}, corroborando su capacidad de detectar el microambiente local y actuar en consecuencia. Estos cambios han sido observados no solo a nivel génico sino también a nivel de proteína^{146,150}.

Asimismo, se ha demostrado que las MenSCs presentan potencial angiogénico *in vivo* tanto en ratones inmunocomprometidos¹¹¹ como en un modelo murino de isquemia femoral¹⁶⁹, donde la administración de MenSCs prevenía la necrosis observada en las extremidades del grupo con isquemia. Curiosamente, en el modelo de glioma de rata, la administración de MenSCs produce una reducción del tumor asociada a la inhibición de la angiogénesis¹⁷⁰. Este hallazgo abrió el debate,

todavía inconcluso, en torno a si las MenSCs serían capaces de estimular selectivamente la angiogénesis fisiológica e inhibir la angiogénesis en el tumor.

IV. Propiedades antifibróticas

Además de sus propiedades proangiogénicas, las MenSCs son capaces de reducir *in vivo* el grado de fibrosis en modelos murinos de infarto de miocardio¹⁸⁰, fibrosis hepática¹²⁷ y fallo ovárico prematuro¹²¹. Este efecto antifibrótico se produce como consecuencia de la reducción en la deposición de colágeno y de los niveles de TGF- β , impidiendo así la proliferación del *poo*/de fibroblastos que contribuyen a la fibrosis del tejido^{127,180}. También se plantea la participación de distintos factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2), cuyo silenciamiento en MenSCs reduce el grado de mejora clínica en el modelo de fallo ovárico¹²¹.

En el contexto de la regeneración cutánea¹³⁶, donde convergen fenómenos proangiogénicos y antifibróticos para una óptima curación de las heridas, se ha descrito que las MenSCs presentan una mayor expresión de genes implicados en angiogénesis, neovascularización y antifibrosis que las UC-MSCs. Además, esta expresión diferencial se incrementa aún más en condiciones inflamatorias, donde se simula de forma más fisiológica el proceso de cicatrización. Estos resultados de expresión diferencial génica se ven respaldados por los datos a nivel de proteína, donde en condiciones proinflamatorias se observa un incremento en la secreción de moléculas proangiogénicas como HGF, VEGF y PDGF¹³⁶.

V. Potencial antiapoptótico

La protección frente a la muerte celular por apoptosis es otro de los mecanismos por los que las MenSCs podrían asegurar la viabilidad y regeneración de los tejidos. A pesar de no conocerse con exactitud los mecanismos de este potencial antiapoptótico, ensayos *in vitro* han demostrado su capacidad para reducir el grado de apoptosis celular inducida por estímulos como el

lipopolisacárido (LPS)¹³⁵, la privación de glucosa¹⁰⁹ y de oxígeno¹⁵⁰. *In vivo*, la reducción de la apoptosis en modelo murinos de infarto de miocardio, lesión pulmonar aguda y sepsis se han asociado con un incremento en la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-xL¹⁵⁰ y Bcl-2¹⁷⁶ así como del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)^{135,176}, la reducción del factor proapoptótico Bax¹⁷⁶ y de la caspasa-3^{135,150}.

c. MenSCs en ensayos clínicos

A pesar de que los mecanismos de acción responsables del efecto terapéutico de las MenSCs no se han dilucidado por completo, su administración se ha probado en algunos casos y ensayos clínicos de fase I/II.

En referencia a los casos clínicos presentes en la bibliografía, en 2010 se publicó un artículo que describía la administración intravenosa e intramuscular de MenSCs para el tratamiento de un paciente con distrofia muscular de Duchenne¹⁸³. Además de MenSCs, el tratamiento incluía la inyección de células CD34⁺ procedentes de sangre de cordón umbilical y MSCs procedentes de placenta. En conjunto, el tratamiento con distintas MSCs mejoró el tono muscular, la función respiratoria y el nivel de actividad general del paciente¹⁸³. El segundo caso clínico publicado hace referencia a un paciente con insuficiencia cardíaca congestiva¹⁸⁴. En él, la administración de MenSCs y células CD34⁺ procedentes de sangre de cordón umbilical mejoró la fracción de eyección cardíaca sin provocar efectos secundarios adversos¹⁸⁴.

El primer ensayo clínico con MenSCs, publicado en 2009¹⁷², consistió en el trasplante alogénico de forma intratecal y/o intravenosa de MenSCs en 4 pacientes con esclerosis múltiple. No se observó ningún efecto adverso, sugiriendo así la viabilidad de su administración clínica. En junio de 2012, se puso en marcha un ensayo clínico para evaluar la seguridad y eficacia de las MenSCs en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva¹⁸⁵. Este ensayo clínico de fase II, pretendía incluir a 60 pacientes divididos en 2 grupos: placebo y tratados con MenSCs mediante administración intramiocárdica. Sin embargo, la última actualización sobre el

estado de este ensayo clínico fue en marzo de 2013, donde solo se habían reclutado 17 pacientes¹⁸⁵.

En 2012, también se presentaron ensayos de fase I/II para la evaluación de la eficacia y seguridad del trasplante de MenSCs en pacientes con cirrosis hepática (ID: NCT01483248), diabetes tipo I (ID: NCT01496339) e isquemia femoral (ID: NCT01558908). Además, se inició el reclutamiento en un ensayo destinado a estudiar la capacidad de las MenSCs de mejorar la receptividad endometrial en técnicas de reproducción asistida como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (ID: NCT01649752). Desafortunadamente, y a pesar de que la fecha estimada de su finalización ha sido ampliamente sobrepasada, no existe información alguna de sus hallazgos. Con la misma suerte, en 2014 se intentó evaluar la efectividad de las MenSCs en el tratamiento de la lesión pulmonar aguda ocasionada por el virus de la gripe aviar H7N9 (ID: NCT02095444).

De forma más reciente, en 2016, se empleó el trasplante autólogo de MenSCs en 7 pacientes con síndrome de Asherman severo, causado por adherencias en la cavidad uterina que provocan infertilidad y pérdida gestacional recurrente¹³⁰. La administración transvaginal de las MenSCs provocó un incremento del grosor endometrial suficiente para asegurar una implantación viable en 5 de las 7 pacientes. De hecho, tres de ellas fueron capaces de concebir, bien mediante transferencia de embriones o de forma espontánea. Estos datos preliminares afianzan el trasplante de MenSCs autólogas como una opción plausible para favorecer el embarazo.

En la actualidad, la validación de la producción clínica de MenSCs a gran escala es un asunto pendiente que debe ser resuelto si se quiere avanzar en su aplicabilidad terapéutica.

Tipos de trastornos	Modelo animal	Vía de administración	Efectos observados
Enfermedades arteriales periféricas	Modelo murino de isquemia femoral	IM	Efecto proangiogénico que promueve la formación de vasos en la zona de isquemia de la extremidad
Trastornos neurológicos/ neurodegenerativos	Modelo murino de derrame cerebral isquémico	IV/ICB	Mejora motora y neurológica en la zona isquémica mediante la secreción de factores neurotróficos
	Modelo murino de Alzheimer	IC	Mejora del declive cognitivo y reducción de la deposición de placas amiloides. Efecto alternativo de la microglía y neuroprotección
	Modelo murino de hemisección de médula espinal	IVB	Mejora de la función motora en la zona de lesión gracias a factores neurotróficos. Reducción de la respuesta inflamatoria
	Modelo murino de lesión del nervio ciático	Embebidas en un conducto nervioso artificial	Regeneración del nervio ciático mediante un autoinjerto. Posible neuroprotección por factores neurotróficos y proangiogénicos
Trastornos cardiacos	Modelo murino de infarto de miocardio	IC	Restauración de la función cardíaca y reducción de la zona de infarto. Transdiferenciación de células madre inyectadas ¹⁴⁸ vs reclutamiento de células madre endógenas
Trastornos musculares	Modelo murino de distrofia muscular de Duchenne	IM	Restauración de la expresión de la proteína de la distrofia y consecuencia de la fusión de las células madre con las células musculares
Trastornos hepáticos	Modelo murino de fallo hepático fulminante	IE	Supresión de la actividad transaminasas y aumento de albúmina mediante administración de células madre diferenciadas <i>in vivo</i>

Tabla 5. Recopilación sobre el uso de MenSCs en modelos animales preclínicos. *IM: intramuscular, IV: intravenosa, ICB: Intracerebral, IC: Intracerebral, IVB: Intravertebral, IE: intraesplénica.*

Introducción

Tipos de trastornos	Modelo animal	Vía de administración	Efectos observados
Trastornos hepáticos	Modelo murino de fibrosis hepática	IV	Mejora de la función hepática de las células estrelladas hepáticas y reducción de la deposición de colágeno
Trastornos renales	Modelo murino de daño renal agudo	IV	Mejora de la función renal y reducción de la inflamación indistinguible
Trastornos cutáneos	Modelo murino de lesión excisional	ID	Agilización del proceso de cicatrización y formación de una red de colágeno
Trastornos ginecológicos	Modelo murino de fallo ovárico prematuro	IV/IP	Recuperación de la homeostasis hormonal y restauración de la fertilidad y preservación de las células germinales
Cáncer	Modelo murino de glioma	ICB/IV	Reducción del volumen de tumor y reducción de la angiogénesis tumoral y reducción de la supervivencia cancerígena
Trastornos autoinmunes	Modelo murino de Diabetes Mellitus de tipo I	IV	Reversión de la hiperglicemia y de la resistencia a la insulina. Recuperación de la masa de islotes e incremento en el número de células pancreáticas gracias a la acción de las células endógenas
	Modelo murino de colitis ulcerosa	IV	Incremento de la supervivencia y reducción del grado de severidad de la enfermedad, acortamiento del colon y reducción de la inflamación de las criptas e intestinales
	Modelo murino de artritis	IV	No se produce artritis
	Modelo murino de enfermedad del injerto contra el huésped	IP	Reversión de la pérdida de peso y aumento de la supervivencia. Menor inflamación
	Modelo murino de trasplante cardíaco allogénico	IV	Prolongación de la supervivencia y reducción de la infiltración inmune

Tabla 5. Recopilación sobre el uso de MenSCs en modelos animales preclínicos (continuación). *IV: intravenosa, ID: intradérmica, ICB: intracerebral.*

4. Propiedades inmunomoduladoras

De forma más reciente, los estudios en torno al posible diálogo entre el sistema inmunológico y las MenSCs han cobrado fuerza, proponiendo a esta interacción como uno de los mecanismos responsables de los efectos terapéuticos observados tanto en ensayos *in vitro* como en modelos preclínicos.

a. MenSCs y el sistema inmunitario adaptativo

El efecto de las MenSCs sobre las poblaciones de linfocitos T es uno de los fenómenos más estudiados en la bibliografía. A pesar de ello, los mecanismos de acción por los que se rigen dichos efectos todavía necesitan de una caracterización más exhaustiva.

Ensayos *in vitro* han demostrado que el cocultivo de MenSCs con poblaciones celulares T presenta un efecto dual dosis-dependiente del ratio de MenSCs^{128,144}. Tanto en cultivos mixtos de linfocitos (MLR)^{110,128,169} como en ensayos de estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) con PHA^{136,144}, la adición de MenSCs al cultivo suprime la proliferación de las PBMCs a ratios altos (1:1-1:10), mientras que a ratios bajos (1:32-1:64) se estimula su capacidad proliferativa.

El efecto antiproliferativo observado es más potente que el descrito en BM-MSCs¹⁵³ o UC-MSCs¹³⁶ en las mismas condiciones experimentales. A pesar de no conocerse en detalle los agentes mediadores, la capacidad antiproliferativa de las MenSCs se ve comprometida mediante el uso de cámara Transwell¹⁴⁴, así como de antagonistas de CXCL12¹⁷³, sugiriendo que tanto el contacto celular directo como la secreción de factores paracrinos juegan un papel determinante en el mecanismo de acción de las MenSCs.

Además de presentar este efecto antiproliferativo, las MenSCs cocultivadas a altos ratios reducen la producción de IFN- γ y estimulan la producción de IL-4 en MLR¹⁶⁹. Si atendemos a la frecuencia de las subpoblaciones celulares T en los cocultivos con PBMCs, se ha descrito una reducción de las subpoblaciones CD8⁺ (CD8⁺IFN- γ ⁺) Th1 (CD4⁺IFN- γ ⁺) y Th17 (CD4⁺ROR- γ T⁺Il-17⁺) a la par que un aumento en la frecuencia de

la subpoblación Treg ($CD4^+IL4^+IL10^+$)¹⁴⁴. Este incremento en el número de células Treg ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) también se ha observado en cocultivos de MenSCs con esplenocitos de ratón¹⁷³, donde el bloqueo de CXCL12 anula el incremento de dicha población T antiinflamatoria.

Los resultados derivados de modelos murinos *in vivo* parecen respaldar los efectos observados *in vitro*. En modelos murinos de colitis ulcerosa, la administración de MenSCs reduce el número de células T $CD8^+$ ^{151,171}, Th1 ($CD4^+IFN-\gamma^+$)¹⁵¹ y Th17 ($CD4^+IL-17^+$)¹⁵¹ en bazo, mientras que se observa un incremento en el número de células T reguladoras ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)^{151,171}, cruciales para la reversión o el control de enfermedades intestinales inflamatorias. Además, este cambio en las poblaciones se ve acompañado de variaciones en los niveles de citoquinas, con una disminución en los niveles de IL-2 y un aumento de IL-4 e IL-10 que podrían reflejar ese balance hacia poblaciones efectoras Th2 y Treg¹⁷¹. En un modelo murino de artritis inducida por colágeno¹⁴⁴, también se describe la reducción de poblaciones $CD8^+$ y Th1 ($CD4^+IFN-\gamma^+$) tanto en bazo como en ganglios linfáticos, mientras que no ocurre lo mismo con las Th17 ($CD4^+ROR-\gamma^+IL-17^+$), no observándose reducción de esta subpoblación¹⁴⁴. Por otra parte, tanto los modelos murinos de daño renal agudo¹⁷⁴ como de rechazo de trasplante alogénico¹⁷³, describen una reducción en el infiltrado inflamatorio T ($CD4^+$ y $CD8^+$) en riñón y órgano trasplantado, respectivamente, así como un aumento en el porcentaje de células Treg en bazo ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$). Además, en el modelo de rechazo, el tratamiento con un inhibidor de CXCL12 revierte el incremento en la población Treg, sugiriendo un papel importante de este factor en la modulación de la población Treg por parte de las MenSCs¹⁷³.

Así pues, las MenSCs parecen jugar un papel en la inhibición de la respuesta celular T citotóxica, Th1 y Th17, así como en el mantenimiento y la expansión del *pool* de células Treg

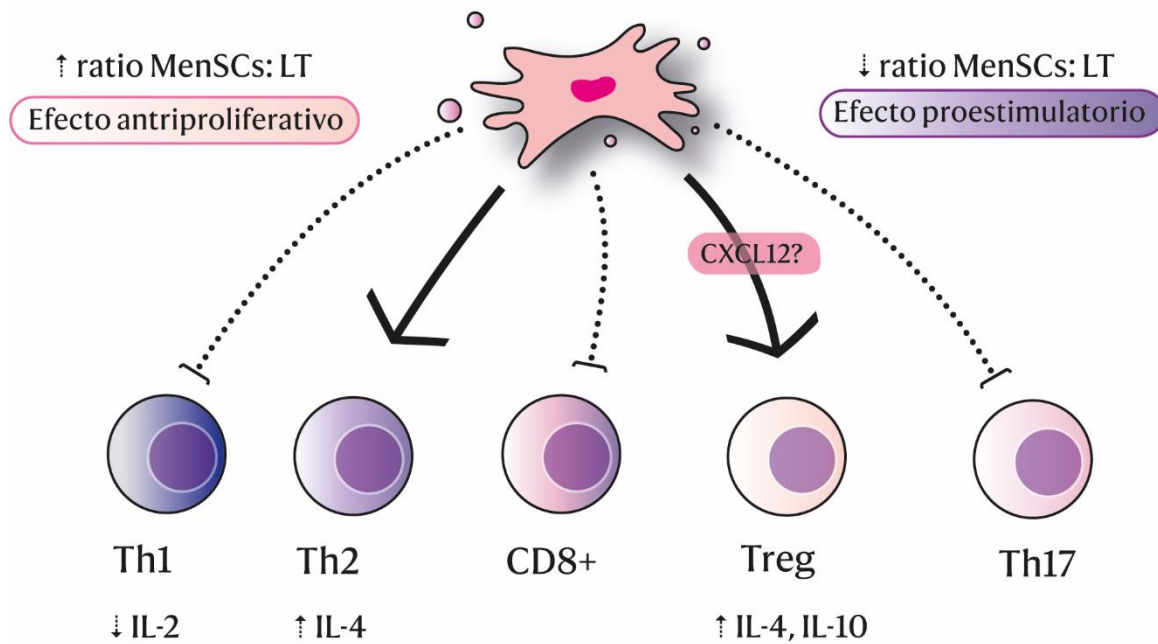


Ilustración 7. Efecto de las MenSCs sobre la población celular T. *LT:* linfocitos T. *Treg:* células T reguladoras.

De forma similar a lo observado en células T, se ha demostrado que el cocultivo de MenSCs con linfocitos CD19⁺ murinos inhibe su proliferación celular tras el estímulo con LPS^{151,175}. Esta inhibición es dosis dependiente, siendo más efectiva a un mayor ratio MenSCs:CD19⁺^{151,175}. Además, dicho cocultivo aumenta la proporción de B reguladoras (CD19⁺CD1d^{hi}CD5⁺) y células B IL-10⁺¹⁵¹, reduce la expresión de moléculas coestimuladoras y los niveles de IgG e IgM en los sobrenadantes¹⁷⁵, sugiriendo un efecto inhibitorio sobre la diferenciación B terminal.

De igual forma, los modelos *in vivo* reflejan las propiedades descritas *in vitro*. En un modelo murino de colitis ulcerosa¹⁵¹, la administración de MenSCs reduce el *pool* de células B activadas (CD19⁺CD83⁺) en bazo, con una disminución de células plasmáticas productoras de anticuerpos (CD19⁺CD138⁺) y un incremento de células Breg productoras de IL-10 (CD19⁺CD1d^{hi}CD5⁺IL-10⁺). Esta expansión de células Breg mediada por las MenSCs parece ser sistémica, detectándose un aumento de la subpoblación no solo en bazo sino también en la cavidad peritoneal y en ganglios mesentéricos¹⁵¹. Además, la transferencia adoptiva de estas células Breg generadas por la administración de MenSCs en ratones colíticos presenta efectos terapéuticos¹⁵¹.

De forma similar, en un modelo murino de trasplante cardiaco alogénico^{173,175}, la administración de MenSCs reduce los depósitos de IgM e IgG en el órgano trasplantado, así como el número de anticuerpos circulantes antidonante. En bazo, la frecuencia de células Breg productoras de IL-10 (CD19⁺CD1d^{high}CD5^{high}CD83^{low}IL-10^{high}) se ve aumentada¹⁷³, mientras que las células B productoras de anticuerpos antidonante experimentan una reducción¹⁷⁵. La expansión del *pool* de células Breg se ve revertido con el tratamiento con un antagonista de CXCL12, sugiriendo que dicho efecto es mediado, al menos en parte, por este factor¹⁷³. Además, si las células B productoras de anticuerpos frente al donante son aisladas y estimuladas con LPS *in vitro*, poseen una menor capacidad proliferativa y productora de anticuerpos que aisladas de ratones sin MenSCs. Estos resultados se replican en un modelo murino de inmunización con ovoalbúmina (OVA)¹⁷⁵, donde la administración de MenSCs en ratones inmunizados con OVA-hidróxido de aluminio reduce los niveles de células B esplénicas productoras de IgG anti-OVA así como los anticuerpos anti-OVA circulantes.

Por tanto, los ensayos *in vitro* e *in vivo* parecen indicar un papel de las MenSCs en la expansión del *pool* de células Breg y la inhibición de la respuesta humoral.

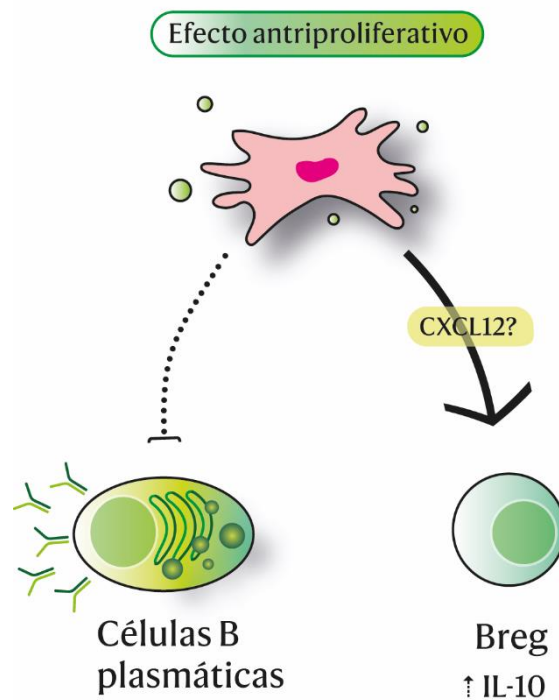


Ilustración 8. Efecto de las MenSCs sobre la población celular B. *Breg*: células B reguladoras.

b. MenSCs y el sistema inmunitario innato

A pesar de la escasez de estudios acerca del efecto de las MenSCs sobre las poblaciones celulares dendríticas, existen indicios *in vitro* sobre su papel inhibitorio en la diferenciación de estas poblaciones¹⁸¹. Durante el proceso de diferenciación de monocitos de sangre periférica a células dendríticas maduras, el cocultivo con MenSCs genera una población dendrítica «semimadura» que se caracteriza por la reducción en la expresión de ciertas moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86) y la producción de IL-10¹⁸¹. Estas células dendríticas «semimaduras» recuerdan a las células dendríticas de tipo II, caracterizadas por presentar un fenotipo más tolerogénico que de presentación antigénica⁵⁹. Dicho fenotipo tolerogénico también se observa en cocultivos de esplenocitos murinos con MenSCs¹⁷³. El incremento de IL-6 en los cocultivos sugiere que esta citoquina podría ser uno de los factores responsables de esta inhibición¹⁸¹, pero la confirmación de esta hipótesis requiere de más estudios.

Por otra parte, en el modelo murino de trasplante alógeno descrito anteriormente¹⁷³, se observó un incremento de células dendríticas tolerogénicas en bazo tras la administración de MenSCs. La expansión de estas células «semimaduras» se ve revertida con el uso de un antagonista de CXCL12¹⁷³, haciendo a este factor participe del mecanismo regulador de las MenSCs.

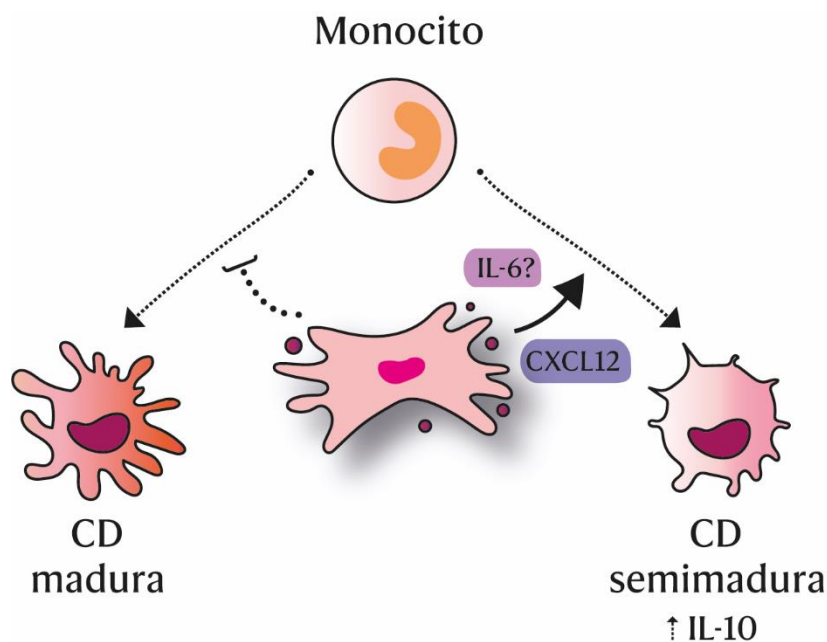


Ilustración 9. Efecto de las MenSCs sobre la diferenciación de monocitos a células dendríticas. CD: células dendríticas.

Con respecto a los macrófagos, este es el único estudio que describe *in vitro* los posibles efectos de las MenSCs sobre esta población celular¹⁷³. En él, el cocultivo de esplenocitos murinos con MenSCs reduce el porcentaje de macrófagos totales (F4/80⁺) pero aumenta la frecuencia de macrófagos M2 (CD86⁺ CD206⁺). Además, esta polarización se ve revertida con el bloqueo del receptor CXCR4 (inhibe la unión de CXCL12)¹⁷³, responsabilizando a CXCL12 del cambio fenotípico al menos de forma parcial.

Tanto en los modelos de colitis¹⁷¹, como de trasplante alogénico¹⁷³, regeneración cutánea¹³⁶ y daño renal agudo¹⁷⁴, se aprecia una reducción del infiltrado de macrófagos en los órganos o regiones de interés. Además, en estos dos últimos modelos, la reducción de macrófagos totales se acompaña de un incremento del porcentaje de macrófagos M2 infiltrantes^{173,174}.

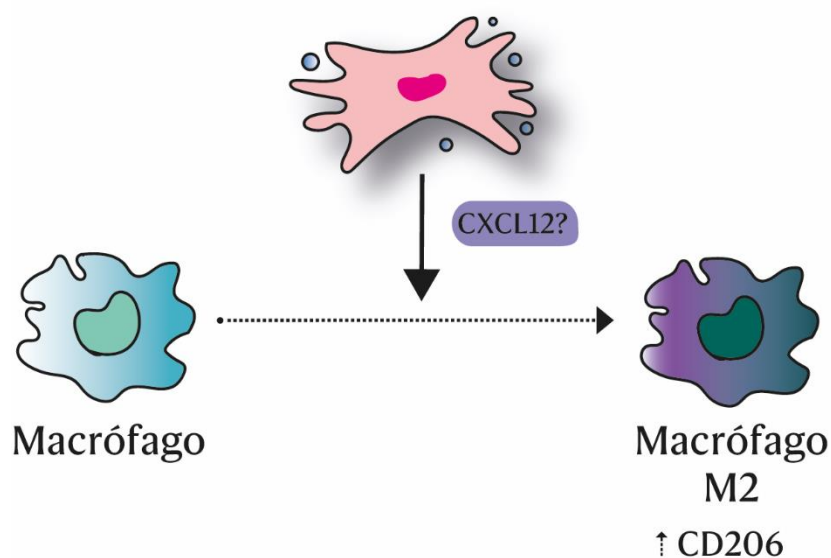


Ilustración 10. Efecto de las MenSCs sobre la polarización de macrófagos.

En conjunto, los estudios realizados hasta el momento sugieren que las MenSCs podrían afectar tanto el proceso de diferenciación de monocitos a células dendríticas maduras como a la polarización de macrófagos hacia un fenotipo más antiinflamatorio.

Las únicas evidencias acerca del efecto de las MenSCs sobre poblaciones de neutrófilos proceden de modelos *in vivo*, donde se describe la reducción del infiltrado de este tipo celular en distintos órganos de interés. Es el caso de los modelos murinos de lesión pulmonar aguda¹³⁵, daño renal agudo¹⁷⁴ y colitis¹⁷¹, donde además también se describe una reducción de células NK en el infiltrado intracolónico.

Con respecto a las células NK, también se ha demostrado que las MenSCs ejercen un efecto dual sobre ellas en ensayos de cocultivo *in vitro*¹⁴⁶. Si las MenSCs se cocultivan de forma directa o mediante cámara Transwell con células NK, inducen la proliferación de las células NK de forma dosis-dependiente así como el aumento de su actividad citotóxica¹⁴⁶. Sin embargo, si previamente al cocultivo las MenSCs son estimuladas con citoquinas proinflamatorias (IFN- γ e IL-1 β), este efecto queda totalmente invertido, resultando en una inhibición tanto de la proliferación como de la actividad citotóxica, mediante la reducción de los niveles de expresión de perforinas y granzimas. Esta inhibición de la proliferación, ejercida por las MenSCs previamente estimuladas, está mediada por IL-6 y TGF- β ¹⁴⁶.

Estos resultados sugieren que las MenSCs son capaces de modular a la población de células NK tanto a nivel proliferativo como de su capacidad citotóxica, con efectos antagónicos dependiendo de su estado inflamatorio.

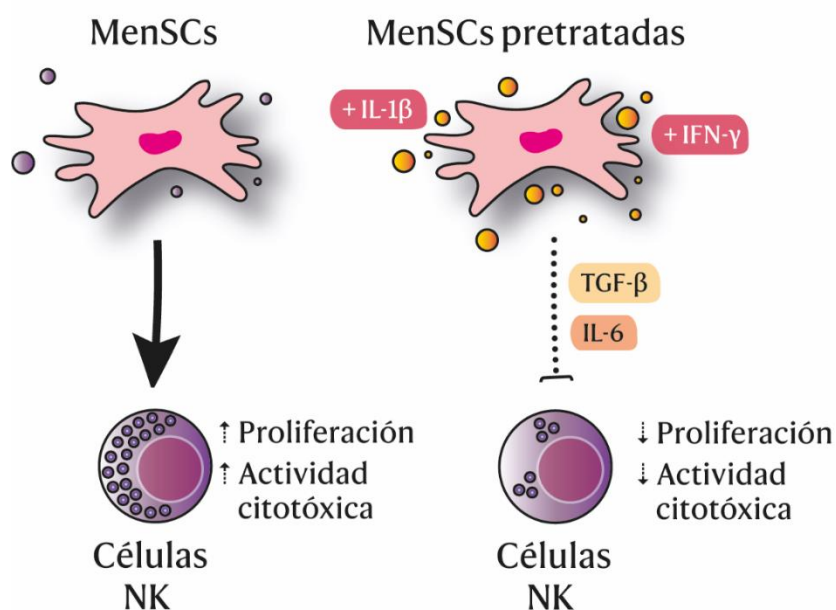


Ilustración 11. Efecto de las MenSCs sobre las células NK.

5. Papel de las MenSCs en modelos de endotoxemia y sepsis

La sepsis es un síndrome clínico complejo que se produce como consecuencia de una infección^{145,186}. En ella, la interacción entre el sistema inmunológico del huésped y el agente patogénico genera un estado inflamatorio sistémico que puede conducir a un daño orgánico severo e incluso la muerte¹⁸⁶. En 2017, el número de casos mundiales de sepsis se estimaba en 48.9 millones, de los cuales 11 millones terminaron en muerte –casi el 20% de la mortalidad mundial¹⁸⁷. Desde ese mismo año, la Organización Mundial de la Salud (OMS) inició una campaña para «mejorar la prevención, el diagnóstico y la gestión clínica de la sepsis», considerando a este síndrome una amenaza para la salud pública¹⁸⁸.

La sepsis se desarrolla cuando la respuesta inmunológica inicial para combatir una infección se produce de una forma tan exacerbada que, en lugar de ejercer un efecto protector sobre el huésped, ocasiona una gran infiltración inflamatoria nociva y su consiguiente daño celular y tisular^{145,186}. La respuesta inflamatoria sistémica va seguida de una fase de inmunosupresión para tratar de reestablecer el equilibrio homeostático. Si el agente patógeno no ha sido eliminado de forma efectiva en la fase proinflamatoria, la fase de inmunosupresión puede favorecer su proliferación, agravando el proceso infeccioso y aumentando la susceptibilidad frente a una futura infección¹⁸⁹.

Ante la necesidad de comprender en mayor detalle los mecanismos moleculares y celulares responsables tanto del proceso de sepsis como de la respuesta inflamatoria exacerbada e inmunosupresora asociadas, se han desarrollado numerosos modelos animales experimentales que intentan imitar los cambios fisiopatológicos observados en pacientes. Estos modelos presentan ciertas limitaciones¹⁹⁰⁻¹⁹² (Tabla 6) pero son la mejor opción para ahondar en el mecanismo de acción de este síndrome y encontrar así posibles dianas terapéuticas.

Los modelos animales se basan comúnmente en tres estrategias (Tabla 6):

1. La administración de toxinas exógenas, generando fenómenos de endotoxemia (o presencia sistémica de toxinas).
2. La administración de patógenos viables, generalmente bacterias.
3. La generación de modelos que afectan a la integridad de la barrera intestinal, como el modelo de punción y ligación cecal (CLP) considerado el modelo de referencia en sepsis experimental en roedores^{190,193}.

Modelo experimental	Protocolo	Ventajas	Limitaciones
Endotoxemia	Peritonitis estéril inducida por la administración IP de: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Zymosan</i>: glucano procedente de la levadura • Tioglicolato: producto final de glicación avanzada 	Protocolo sencillo y reproducible	Se trata de una inflamación autorresolutiva que no llega a generar un cuadro de septicemia, sino un proceso de inflamación hiperaguda correspondiente a la fase inicial de la sepsis.
	Endotoxemia inducida por la administración IV o IP de LPS		Se produce un incremento en la liberación de citoquinas proinflamatorias mucho más potente y rápido que lo observado en pacientes con sepsis. No reflejan en toda su complejidad la respuesta observada en pacientes con sepsis, ya que limita la respuesta a componentes individuales presentes en microorganismos patógenos.
Administración de patógenos viables	Administración IV o IP de bacterias como: <i>Escherichia coli</i> <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	La presencia del organismo completo y no sus componentes inmunogénicos permite el estudio con mayor fidelidad de la interacción patógeno-huésped.	Los pacientes sépticos no suelen presentar una carga bacteriana excesiva, sino un foco infeccioso que libera agentes microbianos de forma intermitente. No reproducen de forma precisa las dinámicas observadas en pacientes con sepsis
Modelo de punción y ligación cecal (CLP)	Ligadura de la válvula ileocecal seguida de una punción del ciego mediante una aguja	Permite ajustar el grado de severidad de la sepsis. Los agentes patógenos provienen del propio huésped. Alto grado de similitud con la progresión de la sepsis en humanos.	Sutiles diferencias en el procedimiento experimental pueden afectar a la reproducibilidad del modelo (compleja estandarización).

Tabla 6. Ventajas y limitaciones de los principales modelos experimentales de sepsis. Basado en la información obtenida de ¹⁹⁰⁻¹⁹². *IV: intravenosa, IP: intraperitoneal, LPS: lipopolisacárido.*

a. ¿Son las MenSCs una potencial opción terapéutica para el tratamiento de la sepsis?

Tal y como se ha descrito en secciones anteriores, el potencial terapéutico de las MenSCs radica fundamentalmente en la secreción de mediadores proangiogénicos e inmunomoduladores que, de forma general, presentan un efecto inmunosupresor y antiinflamatorio. Estas propiedades son manifiestamente beneficiosas en afecciones en las que se produce una situación inflamatoria aguda o mantenida en el tiempo. Sin embargo, en situaciones como la sepsis, donde se produce una sobreestimulación de la respuesta inmunológica innata seguida de una fase de inmunosupresión, la administración de MenSCs podría tener un efecto más complejo.

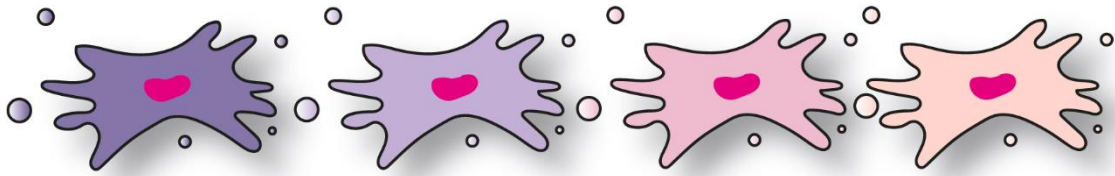
Aunque pocos, existen en la bibliografía estudios que describen el uso de MenSCs en modelos experimentales de endotoxemia y sepsis. Es el caso del modelo de endotoxemia inducida por LPS para la generación de una lesión pulmonar aguda, donde la administración de MenSCs reduce el infiltrado pulmonar inflamatorio y, por consiguiente, el edema pulmonar¹³⁵. Esta reducción en el infiltrado inflamatorio también se aprecia en el modelo de endotoxemia inducida por LPS inyectado IP¹⁷⁶, donde la administración de MenSCs mejora la supervivencia y revierte los signos clínicos de la sepsis. Además, todos estos efectos terapéuticos cesan con el bloqueo de la acción de CXCL12¹⁷⁶, reseñando a esta quimioquina como uno de los principales mediadores de sus efectos.

También encontramos modelos más complejos, como el modelo de sepsis polimicrobiana inducido por CLP. En él, la administración de MenSCs en sinergia con antibióticos aumenta la supervivencia y revierte el fallo metabólico multiorgánico, reduciendo el daño renal, hepático, pulmonar y pancreático. Curiosamente, también se observa una reducción en el recuento bacteriano tanto en fluido peritoneal como en sangre¹⁴⁵.

Puesto que se había descrito con anterioridad la posible actividad antimicrobiana de BM-MSCs¹⁹⁴, el grupo liderado por Alcayaga-Miranda decidió explorar la capacidad microbicida de las MenSCs *in vitro*. Mediante ensayos directos e indirectos, concretaron que la inhibición del crecimiento bacteriano ejercida por las MenSCs estaba asociada a factores solubles y que, entre ellos, el péptido antimicrobiano hepcidina podría ser un mediador microbicida crucial¹⁴⁵.

Con estos datos preliminares, el estudio del papel dual «inmunosupresor-microbicida» de las MenSCs se postula como un área de estudio atractiva y con mucho potencial para el desarrollo de estrategias terapéuticas frente a fenómenos de sepsis.

Hipótesis

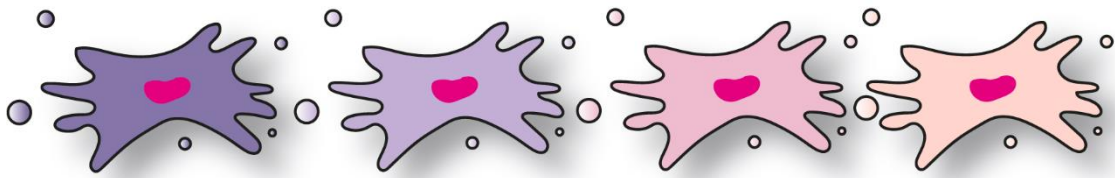


La revisión de los estudios más recientes sobre las células estromales mesenquimales multipotentes muestra que, al igual que existen diferencias fenotípicas entre ellas en función de su procedencia, también se han observado ciertas diferencias en sus propiedades funcionales. De modo que, los resultados obtenidos en diseños experimentales con un tipo particular de MSCs no tienen que ser necesariamente extrapolables al resto de MSCs procedentes de otros tejidos.

Si nos centramos en las propiedades inmunomoduladoras, nuestra hipótesis es que estas diferencias pueden ser todavía más significativas puesto que la interacción de las MSCs con el sistema inmunitario parece ser sensible al contexto.

Así pues, dado i) el interés desde el punto de vista clínico que ofrecen las células endometriales estromales derivadas de sangre menstrual, ii) la escasez de estudios específicos acerca de sus propiedades inmunomoduladoras y de los mecanismos de acción por los que se rigen dichas propiedades y iii) la enorme disponibilidad que ofrece un recurso como es la sangre menstrual, nuestro estudio se ha centrado en este tipo de células.

Objetivos



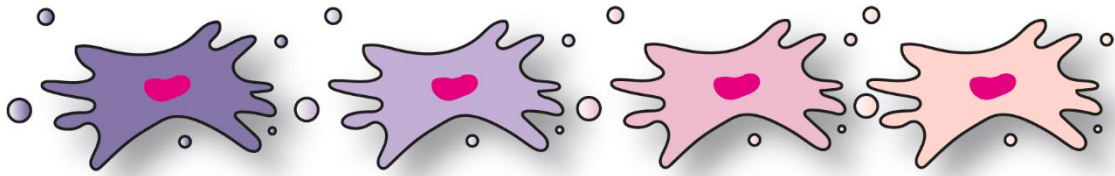
Objetivo general

Esta tesis doctoral tiene por objetivo general **evaluar la capacidad inmunomoduladora** de un tipo concreto de células estromales mesenquimales multipotentes: las **células endometriales estromales derivadas de sangre menstrual (MenSCs)**. Para ello, se ha hecho uso de dos modelos murinos de inflamación *in vivo*: el modelo de peritonitis inducida por TGC y el modelo de sepsis inducida por *Salmonella* Typhimurium. Adicionalmente, se ha estudiado el efecto de las MenSCs sobre macrófagos humanos.

Objetivos específicos

1. Caracterización fenotípica de las poblaciones inmunitarias procedentes del lavado peritoneal tras la generación del contexto inflamatorio en el modelo de peritonitis inducida por TGC y la administración de las MenSCs en ratón.
2. Análisis del patrón de migración de las células administradas hacia los distintos órganos del ratón, incluyendo aquellos agregados peritoneales que puedan generarse tras la interacción con las MenSCs.
3. Caracterización fenotípica de las poblaciones inmunitarias del lavado peritoneal de ratón en el modelo de sepsis inducida por *Salmonella* Typhimurium tras la inoculación bacteriana y la administración de las MenSCs en ratón.
4. Comparación de los distintos parámetros indicativos de septicemia en ratones tratados con o sin MenSCs tras la inducción de sepsis por *Salmonella* Typhimurium.
5. Análisis del efecto que las MenSCs ejercen sobre fenotipo, perfil de expresión y propiedades bactericidas de macrófagos humanos en ensayos de cocultivo.

Material y métodos



Material y métodos

CULTIVOS CELULARES	52
Células endometriales estromales procedentes de sangre menstrual (MenSCs)	52
Obtención y cultivo de MenSCs	52
Tratamiento de MenSCs con LPS y TGC	53
Línea celular THP-1	53
Cultivo, diferenciación y polarización de THP-1	53
Cocultivo de THP-1 y MenSCs	55
CULTIVOS BACTERIANOS	56
MODELOS ANIMALES	57
Modelo de peritonitis inducida por tioglicolato	57
Modelo de sepsis monobacteriana	59
CITOMETRÍA DE FLUJO	62
Análisis de fenotipo de las MenSCs	62
Análisis de fenotipo de las poblaciones peritoneales murinas	63
Análisis de fenotipo de THP-1 _{PMA}	65
Ensayo de proliferación celular mediante CFSE	65
INMUNOHISTOQUÍMICA Y MICROSCOPIA CONFOCAL	68
Estudio de los agregados peritoneales	68
Análisis de células THP-1 _{PMA}	69
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	71
Extracción de ADN total	71
Extracción de ARN	72
Retrotranscripción	72
PCR	74
PCR cualitativa	74
Análisis del ADN total procedente de órganos de ratón	74
Análisis de ADN complementario (ADNc)	75

Visualización del producto de PCR en gel de agarosa	77
PCR cuantitativa.....	77
ENSAYOS FUNCIONALES <i>IN VITRO</i>.....	81
Ensayo de fagocitosis.....	81
Ensayo de aclaramiento de bacterias con gentamicina	81
Detección intracelular de ROS	82
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	83

CULTIVOS CELULARES

Células endometriales estromales procedentes de sangre menstrual (MenSCs)

Obtención y cultivo de MenSCs

Las muestras de sangre menstrual fueron obtenidas de 15 mujeres voluntarias con un rango de edad comprendido entre 20 y 35 años. Todas ellas presentaban un ciclo menstrual regular, no padecían ningún trastorno ginecológico o autoinmune y no estaban sujetas a tratamiento hormonal anticonceptivo durante el periodo de donación (criterios de exclusión). Las muestras se obtuvieron previo consentimiento informado de todas las donantes (Nº referencia del comité de ética para la obtención de muestras humanas: 186/CEIH/2016).

En la mayoría de los casos, la muestra se correspondía con los dos primeros días de la fase menstrual, momento óptimo para lograr el mayor volumen de sangre haciendo uso de la copa menstrual o tampones. Una vez obtenida, la sangre se resuspendió en tampón fosfato salino (PBS) (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EEUU) hasta obtener una mezcla de mayor fluidez y homogeneidad. Dicha mezcla se sometió a un gradiente de densidad con *Ficoll-Paque* (*Merck KGaA*, Darmstadt, Alemania) a razón de 4 mL de reactivo por cada 10 mL de muestra diluida. Tras una centrifugación a 2000 rpm (20 min a 20°C), se recogió la interfase y se centrifugó en PBS a 1500 rpm (5 min a 20°C). El *pellet* celular obtenido se resuspendió en medio Opti-MEM (*Invitrogen*) suplementado con 100 U·mL⁻¹ de penicilina/estreptomicina, 0,25 µg·mL⁻¹ de anfotericina B y un 3% de suero bovino fetal (FBS) descomplementado (todo de *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) y se sembró en un frasco de cultivo T-25. Para permitir la adherencia de las células al frasco, estas se mantuvieron durante toda la noche (*overnight* o/n) a 37 °C. A la mañana siguiente, tras un lavado con PBS, el sobrenadante se descartó y el cultivo se mantuvo hasta alcanzar una confluencia del 75%. En ese momento, la muestra se escaló a un frasco de

cultivo T-75 donde se mantuvo de forma rutinaria. La pureza de las MenSCs obtenidas se confirmó mediante determinación, por citometría de flujo, de la coexpresión de CD10 y CD29 (95-100% de células positivas) y la ausencia de CD45 y citoqueratina.

Las MenSCs en cultivo permanecieron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de dióxido de carbono (CO₂) con cambios de medio y tripsinizaciones cada 3-4 días. Todos los experimentos fueron realizados usando MenSCs con número de pases bajo (P2-P6) para asegurar la preservación de su fenotipo original.

Tratamiento de MenSCs con LPS y TGC

Las MenSCs fueron sembradas en placas de 6 pocillos a razón de $1 \cdot 10^5$ células/pocillo y tratadas con tioglicolato (TGC) fluido (*Becton, Dickinson and Company (BD)*, Franklin Lakes, NJ, EEUU) al 0,8% durante 4 h y 24 h, o con $1 \cdot 10^{-3}$ µg/µl de LPS puro (*E. coli*, *Merck KGaA*) durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las MenSCs fueron resuspendidas y preservadas en TRIzol® (*Thermo Fisher Scientific*) a -80 °C para la posterior extracción de su ARN y análisis mediante retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cualitativa y cuantitativa.

Línea celular THP-1

Cultivo, diferenciación y polarización de THP-1

La línea celular inmortalizada THP-1, derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda¹⁹⁵, se empleó como modelo *in vitro* de monocitos humanos.

Las células THP-1 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (*GE Healthcare*, Chicago, IL, EEUU) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, tampón HEPES 25 mM y un 10% de FBS descomplementado (todo de *Thermo Fisher Scientific*) y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera

humidificada al 5% de CO₂ con cambios de medio cada 2-3 días. Al tratarse de células en suspensión, la confluencia del cultivo nunca excedió 1·10⁶ células/mL, tal y como recomienda la *American Type Culture Collection* (ATCC). Todos los experimentos fueron realizados usando THP-1 con un máximo de 12-14 pases, momento en el que empiezan a perder su turgencia y forma redondeada.

Con el fin de diferenciar la línea monocítica a macrófagos (THP-1_{PMA}), las células THP-1 fueron incubadas con 10 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, *Merck KGaA*) durante 24h. Pasado este tiempo, las células adquieren morfología adherente y pueden ser fácilmente lavadas con PBS para retirar el exceso de PMA. Una vez realizado un doble lavado, las células fueron cultivadas durante 24 h adicionales en medio Opti-MEM suplementado con 100 U·mL⁻¹ de penicilina/estreptomicina, 0,25 µg·mL⁻¹ de anfotericina B y un 3% de FBS descomplementado. En el caso de los ensayos de fagocitosis, aclaramiento de bacterias con gentamicina y medición intracelular de ROS, este medio se preparó sin antibióticos.

Para la polarización de THP-1_{PMA} a macrófagos proinflamatorios (M1) (THP-1_{M1}), las células fueron tratadas con 100 ng/mL de LPS y 20 ng/mL IFN-γ (*recombinant human IFN-γ, Thermo Fisher Scientific*) durante 48h en medio Opti-MEM suplementado con 100 U·mL⁻¹ de penicilina/estreptomicina, 0,25 µg·mL⁻¹ de anfotericina B y un 3% de FBS descomplementado.

Por otra parte, para la polarización de THP-1_{PMA} a macrófagos M2 (THP-1_{M2}), las células fueron tratadas con IL-4 (*recombinant human IL-4, Thermo Fisher Scientific*) durante 48 h en medio Opti-MEM suplementado con 100 U·mL⁻¹ de penicilina/estreptomicina, 0,25 µg·mL⁻¹ de anfotericina B y un 3% de FBS descomplementado.

Cocultivo de THP-1 y MenSCs

Las células THP-1_{PMA} fueron sembradas en placas de 6 pocillos a razón de $4 \cdot 10^5$ células/pocillo y cocultivadas durante 48 h o 72 h con $1 \cdot 10^5$ de MenSCs mediante cámara *Transwell* (Merck KGaA) con un inserto de $0,4 \mu\text{m}$ (ratio 4:1). El medio empleado durante el cocultivo fue Opti-MEM suplementado con $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ de penicilina/estreptomicina, $0,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de anfotericina B y un 3% de FBS descomplementado. En el caso de los ensayos funcionales *in vitro*, este medio se preparó sin antibióticos.

Tras el cocultivo, el inserto superior que contenía las MenSCs fue descartado y las THP-1_{PMA} fueron resuspendidas y procesadas para ser sometidas a distintos análisis mediante citometría de flujo, microscopía confocal o pruebas funcionales como los ensayos de fagocitosis y aclaramiento de bacterias con gentamicina. Para el análisis de la expresión génica, las THP-1_{PMA} fueron tratadas con $1 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de LPS puro (*E. coli*, Merck KGaA) durante 24 h adicionales o directamente preservadas en TRIzol® a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para la posterior extracción de su ARN y análisis mediante retrotranscripción y PCR cualitativa y cuantitativa.

CULTIVOS BACTERIANOS

La cepa silvestre (ST) *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (NCTC 12023) y la cepa atenuada (*SseB*) *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *SseB* (MvP643, p3232)¹⁹⁶ fueron cultivadas, bajo condiciones de esterilidad y en agitación (300 rpm, 37°C), en 5 mL de medio líquido Luria-Bertani (LB) y LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina (*Merck KGaA*) respectivamente. Ambas cepas bacterianas fueron amablemente cedidas por el Dr. Michael Hensel (Osnabrück Universität, Alemania).

En todos los experimentos se partió del mismo *stock* de glicerol, realizando una dilución 1:1000 en el correspondiente medio LB. El empleo experimental de ambas cepas se produjo en fase de crecimiento exponencial (12 h-16 h) y la estimación de la concentración bacteriana se determinó mediante espectrofotometría a una longitud de onda (γ) de 600 nm.

Para medir la concentración de bacteria, el cultivo se centrifugó a 3500 rpm (15 min a 4°C) y fue vigorosamente resuspendido en 10 mL de PBS. Una vez obtenida una fase homogénea, se realizó una dilución 1:100 de la muestra en PBS y se midió en un espectrofotómetro (*Spectronic® Genesys 8™*, *Spectronic CamSpec Ltd*, Leeds, Reino Unido). La medición de la absorbancia se realizó por triplicado, tomando como valor la media resultante de las tres mediciones. El PBS fue empleado como blanco.

La concentración de bacteria se calculó aplicando la siguiente equivalencia:

$$0,1 \text{ densidad óptica (DO)} \rightarrow 10^8 \text{ bacterias/mL}$$

Esta fórmula fue empleada tanto para ajustar la dosis de bacteria inyectada en el modelo murino de sepsis monobacteriana como para calcular la multiplicidad de infección (MOI) en los ensayos funcionales *in vitro*.

MODELOS ANIMALES

Para los estudios animales se emplearon ratones hembra BALB/c de 8 a 10 semanas de edad. Todos los procedimientos previos al sacrificio de los animales se llevaron a cabo en el animalario ubicado en el Centro de Investigación Biomédica (Universidad de Granada (UGR)). Sus instalaciones cuentan con condiciones estables de humedad y temperatura y ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas, donde los animales disponen de agua y alimento *ad libitum*.

Los métodos descritos a continuación se rigen por las directrices y reglamentos pertinentes de la UGR y fueron aprobados por el Comité de Investigación y Ética de la misma institución (Nº referencia comité de ética para experimentación animal: 186/CEIH/2016 12/12/2016-179/143-CEEA-OH-2015 y 12/12/2016-179 JJAA).

Modelo de peritonitis inducida por tioglicolato

Con el fin de generar peritonitis estéril aguda en los ratones, se administró vía IP 1 mL de medio TGC fluido al 4% en PBS. Cuatro o 24 h más tarde, se administraron también de forma IP $2 \cdot 10^6$ de MenSCs. Como tratamientos control se administraron de forma exclusiva de 1 mL de PBS, 1 mL TGC o $2 \cdot 10^6$ de MenSCs sin previo estímulo inflamatorio. Por tanto, los grupos experimentales pertenecientes a este modelo son: administración única de PBS (**PBS**), administración única de TGC (**TGC**), administración de TGC y MenSCs a las 4 h (**T-MenSCs-4h**), administración de TGC y MenSCs a las 24 h (**T-MenSCs-24h**) y administración única de MenSCs (**MenSCs**).

Los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ 4 días después de la administración inicial de TGC para la obtención del fluido peritoneal. Tras el sacrificio, el peritoneo de los ratones quedó expuesto mediante la realización de una incisión en las capas cutánea, grasa y muscular abdominal. A continuación, se administraron IP 8 mL de PBS frío evitando seccionar los

órganos internos del ratón. Una vez inyectado el PBS, el peritoneo del ratón fue masajeados vigorosamente durante un minuto y el contenido del lavado peritoneal fue aspirado y preservado en hielo. La administración del volumen de PBS frío se repitió tres veces, recogiendo hasta un volumen total de 24 mL por ratón.

Los exudados peritoneales se centrifugaron a 1500 rpm (5min a 4°C) y el *pellet* celular obtenido fue resuspendido en 5 mL de PBS para realizar el recuento celular con ayuda de un hemocitómetro *Neubauer*. La viabilidad celular fue evaluada mediante tinción con azul tripán al 0,4%.

Una vez realizado el recuento, por cada ratón se transfirieron $2,5 \cdot 10^6$ de células peritoneales a un nuevo vial, donde fueron nuevamente centrifugadas a 1500 rpm (5min a 4°C) y resuspendidas en 1 mL de PBS suplementado con 0,5% de albúmina sérica bovina (BSA) y EDTA 2 mM para su caracterización fenotípica mediante citometría de flujo.

El resto de células peritoneales se reservaron en TRIzol® a -80 °C para la posterior extracción de su ARN y análisis transcriptómico mediante PCR cuantitativa.

La cavidad torácica y abdominal de los ratones fue rigurosamente examinada para advertir la presencia de posibles anomalías generadas como consecuencia de los distintos tratamientos. En el caso de los ratones tratados con MenSCs 24 h después de la administración de TGC (T-MenSCs -24h) se detectaron agregados peritoneales que fueron embebidos en parafina, congelados en nitrógeno líquido y preservados en TRIzol® a -80 °C para su caracterización mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y PCR cualitativa respectivamente.

Por último, tanto el hígado como bazo, placas de Peyer, ganglios mesentéricos y cuernos uterinos de los ratones fueron extirpados para determinar la presencia de ADN total humano (de MenSCs) mediante PCR cualitativa.

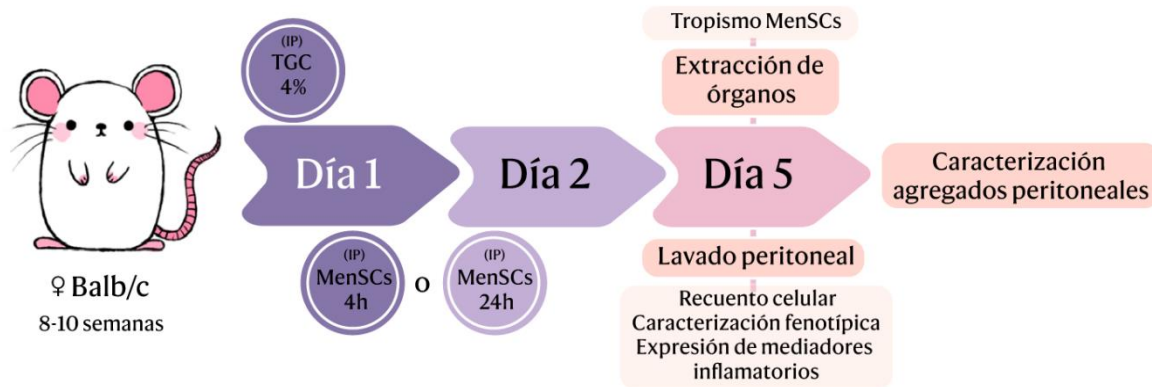


Ilustración 12. Esquema resumen del modelo murino de peritonitis inducida por TGC.

Modelo de sepsis monobacteriana

En este modelo, los ratones fueron inyectados con dos cepas de *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*Salmonella*): la cepa ST, que no puede ser eliminada por los ratones, y la cepa atenuada *SseB*, resistente a ampicilina y con un déficit en el loci que codifica para la isla de patogenicidad 2. Este déficit genera un fenotipo bacteriano de virulencia atenuada y una supervivencia intracelular defectuosa¹⁹⁶. De este modo, la coadministración de ambas cepas permite la monitorización del curso de la infección y su posible resolución.

Por cada ratón, se inyectaron IP 100 μ l de PBS con $2,5 \cdot 10^4$ bacterias de la cepa ST + $2,5 \cdot 10^4$ bacterias de la cepa *SseB*. Cuatro horas después, coincidiendo con la fase aguda de la enfermedad, se administraron $2 \cdot 10^6$ de MenSCs IP. La administración única de ambas cepas de *Salmonella* fue empleada como grupo experimental control.

Los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO_2 24 h después de la infección con ambas cepas de *Salmonella*. Tal y como se detalló en el modelo de peritonitis inducida por TGC, se realizó el recuento celular de los exudados obtenidos tras el lavado peritoneal, así como su preparación para la

caracterización fenotípica de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo. Parte del exudado peritoneal se reservó en TRIzol® a -80 °C para la posterior extracción de su ARN y análisis transcriptómico mediante PCR cuantitativa.

Tanto el bazo como los ganglios mesentéricos de cada ratón fueron homogenizados en 1 mL de PBS estéril con ayuda del émbolo de una jeringa para el análisis de la carga bacteriana. Una vez obtenida una solución relativamente homogénea de cada órgano, esta se resuspendió en un volumen final de 15 mL de PBS estéril. Para el recuento de las unidades formadoras de colonias (CFU), se realizaron dos diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2}) de cada homogenizado y se plaquearon, por triplicado y en condiciones de esterilidad, 50 μ l de cada dilución en placas de agar con LB y LB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina (donde solo crece la cepa *SseB*). Tras la incubación de las placas durante 12 h o 24 h a 37° C, se realizó el recuento de colonias y se calculó el número de CFU totales empleando la siguiente fórmula:

$$\text{CFU totales} = \frac{n^{\circ} \text{ colonias}}{\text{mL sembrados} \times \text{dilución}} \times \text{mL del homogenizado}$$

El número de CFU de la cepa ST fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{CFU ST} = \text{CFU}_{\text{LB}} - \text{CFU}_{\text{LB+Ampicilina}}$$

Parte del exudado peritoneal fue también destinado al análisis de la carga bacteriana empleando el mismo procedimiento.

Con el propósito de monitorizar parámetros generales indicativos de septicemia, se realizó un seguimiento del peso de los ratones, representado gráficamente como el porcentaje de pérdida de peso en relación al peso inicial, anterior a la infección con *Salmonella*. De forma previa a su homogenización, el bazo fue pesado y relativizado con respecto al peso total del ratón como medida del grado de inflamación esplénica.

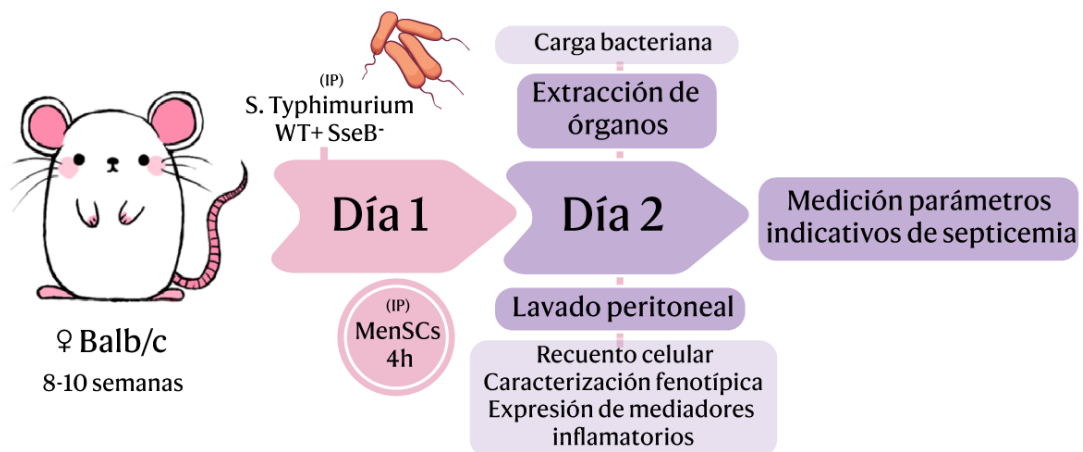


Ilustración 13. Esquema resumen del modelo murino de sepsis monobacteriana

CITOMETRÍA DE FLUJO

Análisis de fenotipo de las MenSCs

Las líneas frescas de MenSCs fueron analizadas para confirmar su fenotipo y pureza. Para esto, $3 \cdot 10^4$ de MenSCs/tubo de citometría fueron tripsinizadas (*Trypsin-EDTA* 1x *Biowest*, Nuaille, Francia), centrifugadas a 1500 rpm (5 min a 20 °C) y resuspendidas en PBS suplementado con 0,5% de BSA y EDTA 2mM. Tras una incubación de 30 min a 4 °C con distintos anticuerpos directos, indirectos y controles de isotipo (dilución 1/50, **Tabla 7**), las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm (5 min a 4 °C), resuspendidas en 200 µl de PBS/tubo y analizadas en el citómetro de flujo FACSCalibur (*BD*). El marcaje indirecto requirió una segunda incubación de 30 min a 4 °C con el anticuerpo secundario (dilución 1/500).

Durante la adquisición de las muestras, los parámetros *forward scatter* y *side scatter* fueron empleados para excluir regiones de restos celulares. El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo usando el *software FlowJo* (v.10, *FlowJo LLC, BD*).

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Casa comercial
Anti-human CD9	FITC	HI9a	Biolegend
Anti-human CD14	FITC	HCD14	Biolegend
Anti-human CD29	APC	TS2/16	Biolegend
Anti-human CD34	FITC	581	Biolegend
Anti-human CD38	FITC	HIT2	Biolegend
Anti-human CD44	FITC	BJ18	Biolegend
Anti-human CD45	PE	HI30	Biolegend
Anti-human CD73	APC	AD2	Miltenyi Biotec
Anti-human CD105	-	P4A4	Cedido por Dr. F.J. Blanco
Anti-human CD117 (c-kit)	PE	104D2	Biolegend
Anti-human CD133	APC	REA816	Miltenyi Biotec
Anti-human HLA-DR	FITC	REA805	Miltenyi Biotec
Mouse IgG1, κ Isotype	APC	P1H12	Biolegend
Mouse IgG1, κ Isotype	FITC	MOPC-21	Biolegend
Mouse IgG1, κ Isotype	PE	MOPC-21	Biolegend
F(ab') ₂ goat Anti-mouse IgG	AF 488	Policlonal	Invitrogen

Tabla 7. Listado de anticuerpos empleados para la caracterización fenotípica de las MenSCs mediante citometría de flujo. FITC: isotiocianato de fluoresceína, APC: aloficocianina, PE: ficoeritrina, AF: alexa flúor.

Análisis de fenotipo de las poblaciones peritoneales murinas

Tras la obtención del lavado peritoneal, $2,5 \cdot 10^4$ de células peritoneales/tubo de citometría fueron resuspendidas en 1 mL de PBS suplementado con 0,5% de BSA y EDTA 2mM e incubadas con *Fc-block* (anti-CD16/CD32, BD) a una dilución 1/100 durante 15 min a 4 °C para evitar uniones inespecíficas. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con un panel de anticuerpos directos (dilución 1/25) o los respectivos isotipos (dilución 1/25) durante 30 min a 4 °C (Tabla 8). Tras la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm (5 min a 4 °C), resuspendidas en 200 μ l de PBS/tubo para su adquisición en el citómetro de flujo *FACSCanto II* (BD) y analizadas usando el *software FACSDiva* (v.6.1.2., BD).

Durante la adquisición de las muestras, los parámetros *forward scatter* y *side scatter* fueron empleados para excluir regiones de restos celulares. Las poblaciones celulares quedaron fenotípicamente definidas por marcaje simple o doble de la siguiente forma: macrófagos (F4-80⁺/CD11b⁺), neutrófilos (Ly-6G⁺/CD11b⁺), monocitos inflamatorios (Ly-6C⁺/CD11b⁺), células dendríticas (CD11c⁺/CD11b⁺), linfocitos B (B220⁺) y linfocitos T (CD3⁺).

El número de células positivas de cada población celular se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ células positivas} = \frac{\% \text{ células positivas} \times \text{recuento celular total}}{100}$$

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Casa comercial
Anti-mouse B220	PerCP-Cy5.5	RA3-6B2	eBioscience
Anti-mouse CD3e	FITC	145-2C11	eBioscience
Anti-mouse/human CD11b	APC/Cy7	M1/70	Biolegend
Anti-mouse CD11c	FITC	N418	eBioscience
Anti-mouse F4/80	APC	BM8	Biolegend
Anti-mouse Ly-6G (Gr-1)	PE	RB6-8C5	eBioscience
Anti-mouse Ly-6C	FITC	AL-21	BD Biosciences
Rat IgM, κ Isotype Control	FITC	R4-22	BD Pharmingen
Rat IgG2a, κ Isotype	PE	KLH/G2a-1-1	Southern Biotech
Rat IgG2b, κ Isotype	APC	RTK4530	Biolegend
Rat IgG2b, κ Isotype	APC/Cy7	RTK4530	Biolegend
Rat IgG2a, κ Isotype	PerCP-Cy5.5	eBR2A	eBioscience

Tabla 8. Listado de anticuerpos empleados para la caracterización fenotípica de las poblaciones peritoneales de ratón mediante citometría de flujo. *PerCP-Cy5.5*: complejo proteína peridínina-clorofila-cianina 5.5, *FITC*: isotiocianato de fluoresceína, *PE*: ficoeritrina, *APC*: alofocianina, *APC/Cy7*: Alofocianina-cianina 7.

Análisis de fenotipo de THP-1_{PMA}

Las THP-1_{PMA} fueron tripsinizadas cuidadosamente con ayuda de un *scraper*, centrifugadas a 1500 rpm (5 min a 20 °C) y resuspendidas en PBS suplementado con 0,5% de BSA y EDTA 2mM. Tras una incubación de 15 min a 4 °C con *Fc-block* (anti-CD16/CD32, dilución 1/100) para evitar uniones inespecíficas, las muestras fueron incubadas con un panel de anticuerpos directos (dilución 1/50) o sus respectivos isotipos (dilución 1/50) durante 30 min a 4 °C (Tabla 9). Tras la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm (5 min a 4 °C), resuspendidas en 200 µl de PBS/tubo para su adquisición en el citómetro de flujo FACSCalibur (BD) y analizadas usando el software *FlowJo* (v.10, *FlowJo LLC, BD*).

Durante la adquisición de las muestras, los parámetros *forward scatter* y *side scatter* fueron empleados para excluir regiones de restos celulares.

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Casa comercial
Anti-human CD11b	FITC	ICRF44	Biolegend
Anti-human CD14	APC	M5E2	Biolegend
Anti-human CD16*	PE	3G8	Biolegend
Anti-human CD80	PE	2D10	Biolegend
Anti-human CD86	APC	IT2.2	Biolegend
Anti-human CD163	AF647	RM3/1	Biolegend
Anti-human CD206	APC	15-2	Biolegend
Anti-human DC-SIGN	FITC	120507	R&D systems
Anti-human HLA-DR	FITC	REA805	Miltenyi Biotec
Mouse IgG1, κ Isotype	APC	P1H12	Biolegend
Mouse IgG1, κ Isotype	FITC	MOPC-21	Biolegend
Mouse IgG1, κ Isotype	PE	MOPC-21	Biolegend

Tabla 9. Listado de anticuerpos empleados para la caracterización de la plasticidad fenotípica de las células THP-1_{PMA} mediante citometría de flujo. FITC: isotiocianato de fluoresceína, APC: alofococianina, PE: ficoeritrina, AF: alexa flúor. *La muestra incubada con anti-CD16 estuvo exenta de incubación con *Fc-block*.

Ensayo de proliferación celular mediante CFSE

Las células THP-1 fueron marcadas con el compuesto fluorescente éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE, *CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Thermo Fisher Scientific*), sembradas en placas de 6 pocillos a razón de $4 \cdot 10^5$ células/pocillo, diferenciadas con PMA y cocultivadas o no con MenSCs durante 48 h y 72 h mediante cámara *Transwell* con un inserto de $0,4 \mu\text{m}$ (ratio 4:1). Las THP-1_{PMA} sin cocultivo fueron empleadas como control.

De forma más detallada, el marcaje con CFSE se realizó a una concentración de trabajo de $5 \mu\text{M}$ en PBS, donde las células THP-1 se resuspendieron a razón de $1 \cdot 10^6$ células/mL de solución de CFSE. Tras una incubación de 20 min a 37°C , se añadieron 5 mL de RPMI completo (suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, tampón HEPES 25 mM y un 10% de FBS descomplementado) por mL de solución de CFSE y se incubaron a 37°C durante 5 min. Pasado este tiempo, las células se centrifugaron a 1500 rpm (5 min a 20°C), se resuspendieron en 5 mL de RPMI completo por mL de solución de CFSE y se incubaron a 37°C durante 10 min. Tras una nueva centrifugación a 1500 rpm (5 min a 20°C), las células fueron resuspendidas en 5 mL de PBS y centrifugadas a 1500 rpm (5 min a 20°C). El *pellet* de células fue resuspendido entonces en medio Opti-MEM suplementado con $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ de penicilina/estreptomicina y $0,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de anfotericina B para su sembrado en placas de 6 pocillos y posterior cocultivo. Una parte de las células fueron lavadas con PBS y analizadas mediante citometría de flujo para establecer el grado de fluorescencia a tiempo cero. También se analizaron por citometría células sin marcaje que fueron sometidas al protocolo de centrifugaciones y adiciones de medio descrito (controles negativos de fluorescencia).

Tras la activación con PMA y el cocultivo durante 48 o 72h, el inserto superior que contenía a las MenSCs fue descartado y las THP-1_{PMA} fueron tripsinizadas cuidadosamente con ayuda de un *scraper*, centrifugadas a 1500 rpm (5 min a 20°C), resuspendidas en 200 μl de PBS/tubo, adquiridas en el citómetro de flujo FACSCalibur (BD) y analizadas usando el *software FlowJo* (v.10, *FlowJo LLC, BD*).

Durante la adquisición de las muestras, los parámetros *forward scatter* y *side scatter* fueron empleados para excluir regiones de restos celulares.

INMUNOHISTOQUÍMICA Y MICROSCOPIA

CONFOCAL

Estudio de los agregados peritoneales

Para el análisis histopatológico de los agregados peritoneales, estos fueron embebidos en parafina, seccionados con microtomo y teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) en el departamento de Anatomía Patológica e Historia de la Ciencia (Facultad de Medicina, UGR). El análisis histológico se hizo en colaboración con el Dr. F.J. O'Valle Ravassa, patólogo de la UGR. Además, se encargó de la tinción inmunohistoquímica con el marcador mesenquimal humano queratina CAM5.2 (marcaje asociado a peroxidasa).

Otra parte de los agregados peritoneales fueron acomodados en un molde con compuesto O.C.T (*Tissue-Tek O.C.T Compound, Sakura SI Co. Ltd., Tokio, Japón*) y congelados de forma instantánea tras su inmersión en isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Tras la congelación, los agregados fueron almacenados a -80°C hasta su crioseccionamiento.

Para el análisis de las poblaciones celulares de los agregados mediante microscopía confocal, se realizaron cortes de 7-10 μm de grosor con un criotomo (*Leica CM1510, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemania*). Los cortes fueron fijados en paraformaldehído (PFA) (*Merck KGaA*) al 3,7% durante 7 min a temperatura ambiente (TA) y posteriormente rehidratados con PBS frío durante 15 min. Tras la rehidratación, los cortes fueron bloqueados en PBS-Tween 20 (0,1%) suplementado con suero de cabra (5%) y Tritón X-100 (0,2%) durante 45 min (TA). La posterior incubación con los anticuerpos primarios (dilución 1/100, **Tabla 10**) se llevó a cabo o/n en cámara fría húmeda (4°C). Al día siguiente, tras la realización de tres lavados con PBS-Tween 20 (0,1%), los cortes fueron incubados con sus respectivos anticuerpos secundarios (dilución 1/1000, **Tabla 10**) durante 2 h (TA). Finalmente, tras tres lavados con PBS-Tween 20 (0,1%), los cortes fueron teñidos con Hoechst 33258 (*Merck KGaA*) a una dilución 1/200 y sellados con medio de montaje (*Fluoroshield*,

Merck KGaA). La adquisición de imágenes fue llevada cabo en el microscopio confocal *Nikon A1* (*Nikon Instruments Inc.*, Tokio, Japón) con ayuda técnica del servicio de microscopía del Centro de Instrumentación Científica (CIC-CIBM) y las imágenes obtenidas fueron procesadas con el *software* de imagen *Elements AR 3.2* (*Nikon Instruments Inc.*).

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Casa comercial
Anti-Mouse F4/80	-	Cl:A3-1	Bio-Rad Laboratories
Anti-Mouse Ly-6G	-	1A8	BD Pharmingen
Anti-Human nuclei	AF488	235-1	Merck
Goat Anti-Rat IgG (H+L)	AF488	Policlonal	Thermo Fisher
Goat Anti-Rat IgG (H+L)	AF594	Policlonal	Thermo Fisher

Tabla 10. Listado de anticuerpos empleados para el análisis de los agregados peritoneales mediante microscopía confocal. AF: alexa flúor.

Análisis de células THP-1_{PMA}

Las células THP-1_{PMA} fueron tripsinizadas cuidadosamente con ayuda de un *scraper*, centrifugadas a 1500 rpm (5 min a TA) y resuspendidas lentamente en PFA al 3,7%. Una vez disgregado el *pellet*, se plaquearon 100 µl de células en cada pocillo de una placa *chamber* (*Nunc® Lab-Tek® II Chamber Slide™ system*, *Merck KGaA*) previamente tratada con Poli-D-lisina ([35 µg/mL], *Thermo Fisher Scientific*). A continuación, la placa *chamber* fue colocada en un soporte helado durante 30 min para permitir la precipitación y adhesión de las células al fondo del pocillo. Tras dos lavados con 200 µl de PBS por pocillo, las células fueron incubadas en una solución de PBS-Tween 20 (0,1%) suplementado con suero de cabra (5%) y Tritón X-100 (0,2%) durante 45 min (TA). La posterior incubación con los anticuerpos directos (dilución 1/100, **Tabla 11**) se llevó a cabo o/n en cámara fría húmeda (4 °C). Al día siguiente, tras la realización de dos lavados con PBS-Tween 20 (0,1%), las células fueron teñidas con Hoechst 33258 (*Merck KGaA*) a una dilución 1/200 y las placas selladas con medio de montaje (*Fluoroshield*, *Merck KGaA*). La adquisición de imágenes fue llevada cabo en el microscopio confocal *Nikon A1* (*Nikon Instruments Inc.*, Tokio,

Japón) con ayuda técnica del servicio de microscopía del CIC-CIBM y las imágenes obtenidas fueron procesadas con el *software* de imagen *Elements AR 3.2* (*Nikon Instruments Inc.*).

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Casa comercial
Anti-human CD14	FITC	M5E2	Biologend
Anti-human CD163	AF647	RM3/1	Biologend
Anti-human CD206	APC	15-2	Biologend
Mouse IgG1, κ Isotype	APC	P1H12	Biologend
Mouse IgG1, κ Isotype	FITC	MOPC-21	Biologend
Mouse IgG1, κ Isotype	AF647	MOPC-21	Biologend

Tabla 11. Listado de anticuerpos empleados para la caracterización de la plasticidad fenotípica de las células THP-1_{PMA} mediante microscopía confocal. *FITC*: isotiocianato de fluoresceína, *AF*: alexa flúor, *APC*: alofocianina.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Extracción de ADN total

Los órganos de ratón extirpados durante el estudio del modelo de peritonitis inducida por TGC fueron disgregados con bisturí y pinzas e incubados con 300 µl de *Tail Tip Buffer* (EDTA 0,1 M pH=8, Tris 50 mM pH=8, 0,5% SDS) y 200 µl de proteinasa K (2,5 mg/ml, *Hoffmann-La Roche*, Basilea, Suiza) por muestra durante 12 h a 55 °C. En el caso del hígado y los cuernos uterinos, el tejido disgregado se dividió en distintos tubos. Pasadas las 12 h, se añadieron 2,5 µl de RNAsa (10mg/mL, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, EEUU) y se incubó durante 30 min a 60 °C. Tras la incubación, se agregaron 50 µl de acetato sódico (3M pH=7).

La separación de los ácidos nucleicos de otros componentes celulares se realizó por adición de 250 µl de la mezcla fenol:cloroformo (1:2) (ambos de *Merck KGaA*) por muestra, donde, tras la centrifugación a 12 000 rpm (5 min a 4 °C), se obtiene una fase superior acuosa que contiene el ADN. Dicha fase fue transferida a un nuevo tubo en el que se agregaron 350 µl de isopropanol para la precipitación del ADN.

A partir de este punto, las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol (70%, 100%) con ciclos de centrifugación de 5 min a 12 000 rpm (4 °C). Tras la última centrifugación con etanol absoluto, el sobrenadante fue retirado y las muestras permanecieron abiertas durante 2-3 min para la evaporación de cualquier resto de alcohol. Pasado este tiempo, las muestras fueron reconstituidas en 50 µl de agua libre de nucleasas (NFW) (*Promega*, Madison, WI, EEUU) e incubadas durante 12 h a 55 °C. Una vez reconstituidas, las muestras fueron cuantificadas mediante espectrofotometría (*NanoDrop™ 2000*, *Thermo Fisher Scientific*) y permanecieron a -20 °C hasta su análisis mediante PCR cualitativa.

Extracción de ARN

Para la extracción de ARN total, las muestras preservadas en TRIzol® (-80 °C) fueron descongeladas en frío y mantenidas a TA durante 5 min. Pasado este tiempo, se añadieron 200 µl de cloroformo (*Merck KGaA*) por mL de TRIzol®, con la consiguiente inversión de los tubos 15-20 veces. Tras una centrifugación a 12 500 rpm (15 min a 4 °C), se obtiene una fase superior acuosa que contiene los ácidos nucleicos. Dicha fase fue transferida a un nuevo tubo en el que se agregaron 500 µl de isopropanol. Esta solución se mantuvo toda la noche a -20 °C para favorecer la precipitación de los ácidos nucleicos. Al día siguiente, tras una centrifugación a 12 500 rpm (10 min a 4 °C), el sobrenadante fue descartado y el *pellet* lavado con 500 µl de etanol al 75% en agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC) (*Merck KGaA*) para ser nuevamente centrifugado a 12 500 rpm (5 min a 4 °C). Tras esta última centrifugación, el sobrenadante fue retirado y las muestras permanecieron abiertas durante 2-3 min para la evaporación de cualquier resto de alcohol. Pasado este tiempo, las muestras fueron reconstituidas en 20 µl de agua tratada con DEPC e incubadas durante 10 min a 55-60 °C.

Una vez reconstituidas, las muestras fueron cuantificadas mediante espectrofotometría (*NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific*) y permanecieron a -80 °C hasta la síntesis de ADN complementario (ADNc) y posterior análisis mediante PCR cualitativa o cuantitativa.

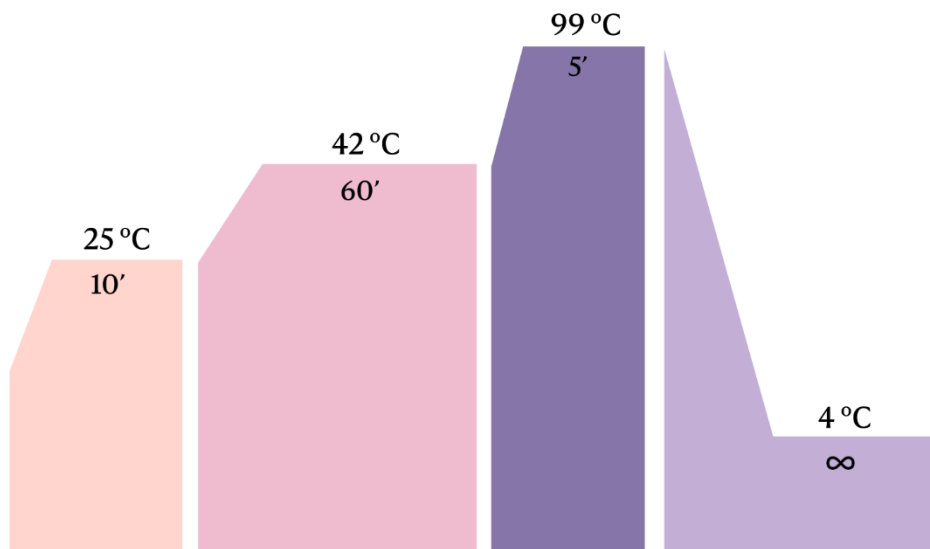
Retrotranscripción

Para la síntesis de ADNc, las muestras de ARN fueron previamente tratadas con DNasa I (*DNaseI RNase-free, Thermo Scientific*) con el fin de eliminar el ADN genómico. Para ello, partiendo de diluciones de un 1 µg de ARN en 13 µl de NFW, se añadió 1 µl de DNasa I + 1 µl de tampón de reacción. Tras una incubación de 30 min a 37 °C, se adicionó 1 µl de EDTA por muestra con la consiguiente incubación a 65 °C durante 10-15 min.

En este punto, la retrotranscripción fue llevada a cabo mediante el kit *Access RT-PCR System (Promega)* usando los siguientes volúmenes de reacción:

Mezcla de Retrotranscripción	
Tampón de retrotranscripción 10x	2 μ l
MgCl ₂	4 μ l
<i>dNTP mix</i> (10 mM)	2 μ l
<i>Oligo(dT)₁₅</i> (0,5 mg/mL)	1 μ l
Inhibidor de RNAsas (rRNasin®)	0,5 μ l
Retrotranscriptasa AMV	0,6 μ l
NFW	1,9 μ l
Muestra de ARN (0,5 μ g) o NFW	8 μ l
Volumen final de reacción	20 μ l

Una vez preparada la mezcla de retrotranscripción, la reacción se llevó a cabo en un termociclador (*2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems*) usando los siguientes parámetros:



Las muestras de ADNc resultantes permanecieron a -20 °C hasta su análisis mediante PCR cualitativa o cuantitativa.

PCR

PCR cualitativa

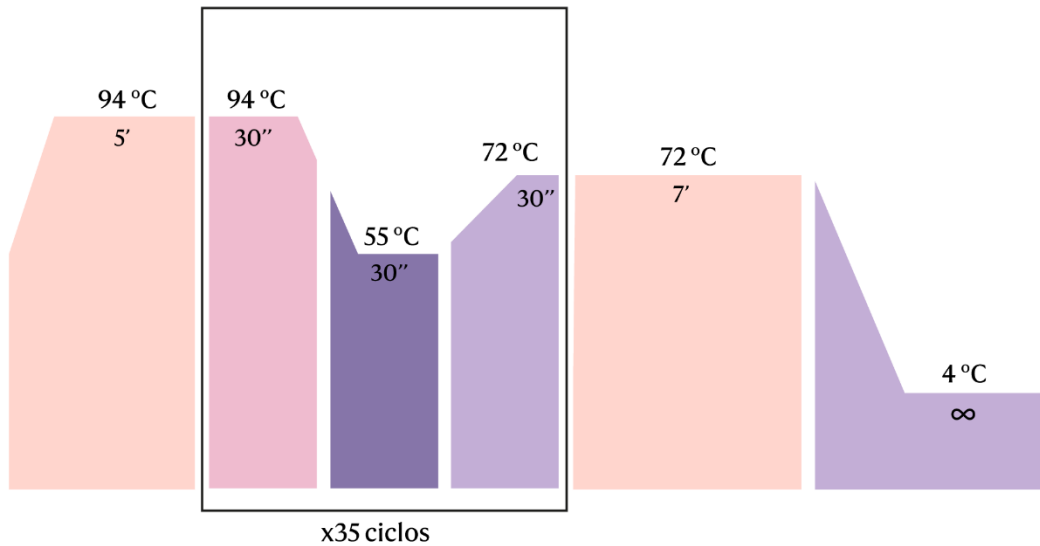
Análisis del ADN total procedente de órganos de ratón

Partiendo de 1 µg de ADN, la amplificación se llevó a cabo mediante el kit *PCR Master Mix* (*Promega*) usando los siguientes volúmenes de reacción:

Mezcla de amplificación ADN total	
Tampón <i>PCR Master Mix</i> 2x	25 µl
Oligonucleótido 5' (10µM)	1 µl
Oligonucleótido 3' (10µM)	1 µl
NFW	22 µl
Muestra de ADN (1 µg) o NFW	1 µl
Volumen final de reacción	50 µl

Para la detección de ADN humano, las muestras fueron amplificadas usando oligonucleótidos que reconocían el gen del citocromo b humano (*MT-CYB*): 5'-CCCATACATTGGGACAGACC-3', 5'-GACGGATCGGAGAATTGTGT-3'; amplicón 394 pares de bases (pb). Como control positivo se empleó un *pool* de ADN total procedente de distintas líneas de MenSCs. Para asegurar la presencia de ADN en las muestras, también fueron amplificadas usando oligonucleótidos que reconocían el gen del citocromo b de ratón (*Mt-Cytb*): 5'-TCGCGGCCCTAGCAATCGTT-3', 5'-TGGTTGGCCCCCAATTCAGGT-3'; amplicón 461 pb.

Una vez preparada la mezcla de amplificación, la reacción se llevó a cabo en un termociclador usando los siguientes parámetros:

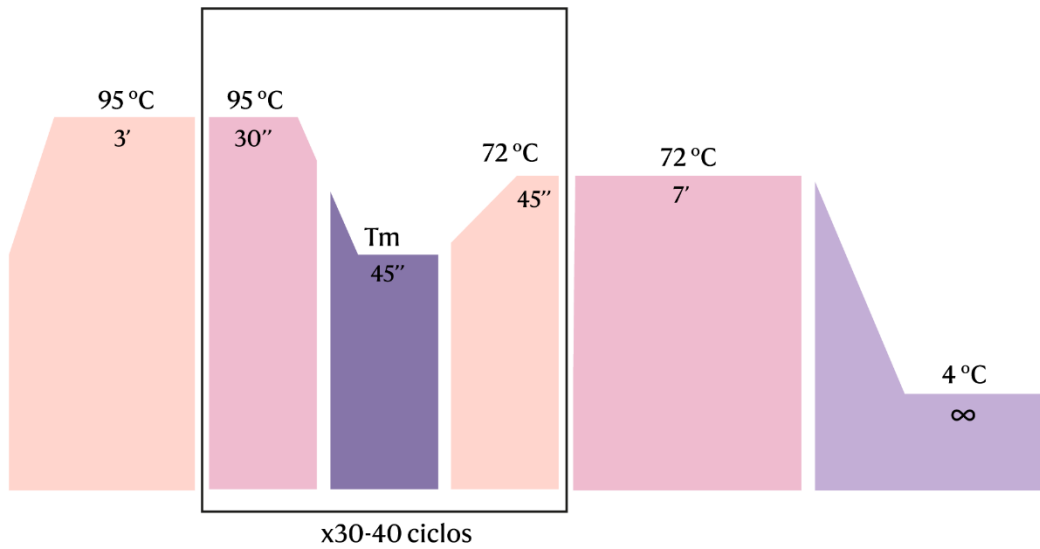


Análisis de ADN complementario (ADNc)

Tras la extracción de ARN y consiguiente retrotranscripción, las muestras de ADNc fueron amplificadas mediante el kit *PCR Master Mix* (*Promega*) usando los siguientes volúmenes de reacción:

Mezcla de amplificación ADNc	
Tampón <i>PCR Master Mix 2x</i>	12,5 µl
Oligonucleótido 5' (10µM)	0,5 µl
Oligonucleótido 3' (10µM)	0,5 µl
NFW	10,5 µl
Muestra de ADNc o NFW	1 µl
Volumen final de reacción	25 µl

Una vez preparada la mezcla de amplificación, la reacción se llevó a cabo en un termociclador usando los siguientes parámetros:



Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados aparecen detalladas en la **Tabla 12**.

Gen de interés	Secuencia	Tm	Ciclos	Amplicón (pb)	C ⁺
<i>CCL19</i>	5'-ACCAGCCCTGGGTAGAACGCA-3'	65 °C	40	202/292	Amígdala
	5'-CTGGCTGGTCAGGTCTGGTGC-3'				
<i>CCL21</i>	5'-TCCATCCCAGCTATCCTGTT-3'	59 °C	40	71	Amígdala
	5'-AGCTCCTTTGGGTCTGCAC-3'				
<i>CXCL13</i>	5'-GCCCCGTGGGAATGGTTGTCC-3'	65 °C	40	325	Amígdala
	5'-TGCCCCATCAGCTTCTGCAAGG-3'				
<i>CCL5</i>	5'-AAGGAGTATTTCTACACC-3'	45 °C	35	124/206	Amígdala
	5'-CCAAAGAGTTGATGTACT-3'				
<i>CCL2</i>	5'-AGCAGCAAGTGTCCAAA-3'	55 °C	35	124/506	Amígdala
	5'-GAGTTTGGGTTTGCTTGTC-3'				
<i>CXCL8</i> (IL-8)	5'-CCCAAATTTATCAAAGAACTGA-3'	53 °C	30	207	Amígdala
	5'-GCATCTTCACTGATTCTTGG-3'				
<i>PTGES2</i>	5'-CTTCCTTTTCCTGGGCTTCG-3'	55 °C	35	76	Amígdala
	5'-GAAGACCAGGAAGTGCATCCA-3'				
<i>TNFAIP6</i> (TSG-6)	5'-TTTCTCTTGCTATGGGAAGACAC-3'	55 °C	35	126	Amígdala
	5'-GAGCTTGTATTTGCCAGACCG-3'				
<i>IL6</i>	5'-GTAGCCGCCCCACACAGA-3'	59 °C	30	101	Amígdala
	5'-CATGTCTCCTTTCTCAGGGCTG-3'				
<i>IL10</i>	5'-TGCCTTCAGCAGAGTGAAGA-3'	55.5 °C	30	103	THP-1 M ₂
	5'-GCAACCCAGGTAACCCCTAAA-3'				
<i>GAPDH</i>	5'-GCACCACCAACTGCTTAGC-3'	59 °C	30	87	-
	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'				

Tabla 12. Lista de oligonucleótidos utilizados para el análisis transcriptómico mediante PCR cualitativa. *Tm*: temperatura de «melting» o fusión del ADN, *C⁺*: control positivo, *THP-1 M₂*: *THP-1* polarizadas a macrófagos antiinflamatorios.

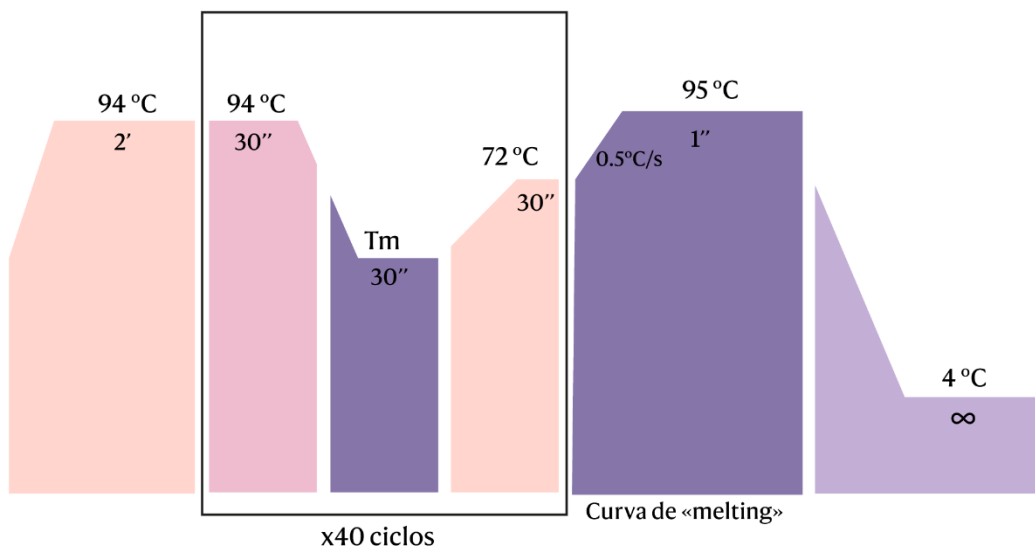
Visualización del producto de PCR en gel de agarosa

Los productos de PCR, separados por tamaño en un gel de agarosa al 2% (*Seakem LE Agarose for gel electrophoresis, Lonza Group, Basilea, Suiza*) a un voltaje de 180 voltios, se visualizaron mediante tinción con GelRed® (*GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, Biotium Inc., Fremont, CA, EEUU*) en un revelador de geles (*ChemiDoc XRS+, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU*). En cada gel se incluyó un marcador de peso molecular (*BenchTop 1000bp DNA Ladder, Promega*) y los correspondientes controles positivos y negativos del gen de interés.

PCR cuantitativa

Para el análisis cuantitativo del perfil de expresión génica, las distintas muestras de ADNc fueron amplificadas mediante PCR a tiempo real (*Quantstudio 3 Real-time PCR system, Applied Biosystems*) en placas de 96 pocillos (*MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Thermo Fisher Scientific*) usando *FastStart Universal SYBR Green Master (Merck KGaA)* con los siguientes volúmenes y parámetros de reacción:

Mezcla de amplificación ADNc a tiempo real	
Tampón <i>SYBR Green 2x</i>	12,5 µl
Oligonucleótido 5' (10µM)	0,75 µl
Oligonucleótido 3' (10µM)	0,75 µl
NFW	8,5 µl
Muestra de ADNc (dilución 1/10) o NFW	2,5 µl
Volumen final de reacción	25 µl



Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados aparecen detalladas en la

Tabla 13.

Los niveles de expresión de actina (*Actb*) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) fueron utilizados como controles de expresión

constitutiva para ARN/ADNc murino y humano, respectivamente. Los valores resultantes fueron representados de dos formas:

- (i) Como $2^{-\Delta\Delta CT}$ o incremento (Δ) de expresión en tanto por uno, donde se aplica una normalización frente a la muestra control y frente a los controles de expresión constitutiva (doble normalización).
- (ii) como $2^{-\Delta CT}$, donde únicamente se normaliza frente a los controles de expresión constitutiva (normalización simple).

Siendo CT el *cycle threshold* o ciclo umbral.

Material y

Gen de interés	Secuencia	Tm	Amplicón (pb)	C ⁺	Gen de interés	Secuencia
<i>Actb</i>	5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'	59 °C	165	-	<i>IL10</i>	5'-TGCCTTCAGCAGAGTG
	5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'					5'-GCAACCCAGGTAACCCT
<i>Cxcl15</i>	5'-TGCTCAAGGCTGGTCCAT-3'	59 °C	86	Bazo	<i>PTGER2</i> (EP2)	5'-GACCGCTTACCTGCAGC
	5'-GACATCGTAGCTCTTGAGTGTCA-3'					5'-TGAAGTTGCAGGCCA
<i>Il10</i>	5'-GAAGACCCTCAGGATGCCG-3'	60 °C	77	Bazo	<i>PTGES2</i>	5'-CTTCCTTTCTCTGGGC
	5'-CCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'					5'-GAAGACCAGGAAGTGC
<i>Nos2</i> (iNOS)	5'-AATCTTGGAGCGAGTTGTGG-3'	55 °C	139	Bazo	<i>PTGS2</i> (COX-2)	5'-GAATCATTACCAGGCA
	5'-CAGGAAGTAGGTGAGGGCTTG-3'					5'-TCTGTACTGCGGGTGG
<i>Tgfb1</i>	5'-TGACGTCCTGGAGTTGTACGG-3'	60 °C	170	Bazo	<i>TLR2</i>	5'-CTGTGCTCTGTTCTCTG
	5'-GGTTCATGTCATGGATGGTGC-3'					5'-GATGTTCTGCTGGGA
<i>Tnfa</i>	5'-CACAAGATGCTGGGACAGTGA-3'	56 °C	58	Bazo	<i>TLR4</i>	5'-CCTGCGTGGAGGTGG
	5'-TCCTTGATGGTGGTGCATGA-3'					5'-GCCTAAATGCCTCAGG
<i>CCL18</i>	5'-CCCAGGAGGGAACAGGAG-3'	60 °C	85	Amígdala	<i>TLR6</i>	5'-GCAGGGGACAATCCAT
	5'-GGCATAGCAGATGGGACTCTT-3'					5'-AGAATCAGGCCAGCCC
<i>CD14</i>	5'-ACAGGTGCCTAAAGGACTGC-3'	59 °C	122	Amígdala	<i>TNFA</i>	5'-CCCAGGGACCTCTCTCT
	5'-GATTCCCGTCCAGTGCAGG-3'					5'-GCTACAGGCTTGTCAC
<i>CD163</i>	5'-GTCGCTCATCCCGTCAGTCATCC-3'	60 °C	114	Amígdala	<i>TNFAIP6</i> (TSG-6)	5'-TTTCTTTGCTATGGGAA
	5'-GCCGCTGTCTGTCTTTCGC-3'					5'-GAGCTTGATTTGCCAG
<i>CXCL8</i> (IL-8)	5'-CCCAAATTTATCAAAGAAGTGA-3'	53 °C	207	Amígdala		
	5'-GCATCTTCACTGATTCTTGG-3'					
<i>CXCL10</i>	5'-GAAAGCAGTTAGCAAGGAAAGGTC-3'	60 °C	120	Amígdala		
	5'-ATGTAGGGAAGTATGGGAGAGG-3'					
<i>GAPDH</i>	5'-GCACCACCAACTGCTTAGC-3'	59 °C	87	-		
	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'					
<i>IL6</i>	5'-GTAGCCGCCACACAGA-3'	59 °C	101	Amígdala		
	5'-CATGTCTCCTTTCTCAGGGCTG-3'					

Tabla 13. Lista de oligonucleótidos utilizados para el análisis transcriptómico mediante PCR cuantitativa. *Tm*: temperatura de fusión, *THP-1M2*: THP-1 polarizadas a macrófagos antiinflamatorios.

ENSAYOS FUNCIONALES *IN VITRO*

Ensayo de fagocitosis

Con el fin de evaluar la capacidad fagocítica de las THP-1_{PMA} tras el cocultivo, la cepa *SseB* de *Salmonella* fue añadida a un MOI de 25. Las placas fueron centrifugadas durante 1 min a 3500 rpm (TA), para sincronizar la captación de bacteria, e incubadas a 37 °C durante 30 y 60 min. Pasado este tiempo, los pocillos fueron lavados tres veces con PBS para eliminar la bacteria extracelular y las células fueron lisadas con 1 mL de Tritón X-100 (0,5% en agua miliQ®) durante 10 min (TA). Para el recuento de las CFU, se realizaron diluciones de cada lisado celular (dilución 1/41) y se plaquearon, por cuadruplicado y en condiciones de esterilidad, 50 µl de la dilución en placas de agar con LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Tras la incubación de las placas durante 12 h o 24 h a 37 °C, se realizó el recuento de colonias y se calculó el número de CFU totales tal y como se describe en la sección del modelo de sepsis monobacteriana. Como control negativo, algunos pocillos fueron fijados con PFA al 3,7% con anterioridad a la adición de la bacteria.

Ensayo de aclaramiento de bacterias con gentamicina

Al igual que en el ensayo de fagocitosis, la cepa *SseB* de *Salmonella* se añadió a la monocapa de THP-1_{PMA} a un MOI de 25. Para sincronizar la captación de bacteria, las placas fueron centrifugadas durante 1 min a 3500 rpm (TA) y posteriormente incubadas a 37 °C durante 1 h. Pasado este tiempo, los pocillos fueron lavados dos veces con PBS y el medio fue suplementado con 100 µg/mL gentamicina (*Thermo Fisher Scientific*) durante 1 h para eliminar la bacteria extracelular. A continuación, el medio fue reemplazado con medio Opti-MEM fresco suplementado con 3% de FBS descomplementado y 10 µg/mL de gentamicina para su cultivo a 37°C durante 6, 24 y 48 h. A los tiempos indicados, las células fueron lisadas con 1 mL de Tritón X-100 (0,5% en agua miliQ®) durante 10 minutos (TA). Para el recuento de las CFU, se realizaron

diluciones de cada lisado celular (dilución 1/121, 1/363 y 1/250 respectivamente) y se plaquearon, por cuadruplicado y en condiciones de esterilidad, 50 µl de la dilución en placas de agar con LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Tras la incubación de las placas durante 12 o 24 h a 37 °C, se realizó el recuento de colonias y se calculó el número de CFU totales tal y como se describe en la sección del modelo de sepsis monobacteriana. Como control negativo, algunos pocillos fueron fijados con PFA al 3,7% con anterioridad a la adición de la bacteria.

Detección intracelular de ROS

La generación intracelular de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por parte de las THP-1_{PMA} cocultivadas con MenSCs fue analizada empleando el compuesto diacetato de 2',7'- diclorofluoresceína (DCFDA, *Merck KGaA*). En presencia de H₂O₂, este compuesto es oxidado a diclorofluoresceína (DCF) emitiendo así fluorescencia. De este modo, la fluorescencia generada es directamente proporcional a la cantidad de H₂O₂ presente en la muestra.

Para realizar la medición, las células THP-1 fueron sembradas en una placa opaca de 96 pocillos con fondo transparente (*Merck KGaA*) a razón de 5·10⁴ células/pocillo, diferenciadas con PMA, y cocultivadas de forma directa con 1,25·10⁴ MenSCs durante 48 h adicionales. Tanto las THP-1_{PMA} como las MenSCs sin cocultivo fueron empleadas como control. Tras el cocultivo, la placa fue tratada con DCFDA (3 µM en medio Opti-MEM (3% FBS)) a razón de 200 µl/pocillo e incubada en oscuridad durante 1 h a 37 °C. Pasado este tiempo, la placa fue lavada dos veces con PBS y se añadió medio Opti-MEM (3% FBS) fresco a razón de 150 µl/pocillo. Tras una medición inicial, las células fueron estimuladas con 50 µl/pocillo de la cepa *SseB* a un MOI de 100 y la fluorescencia emitida fue medida ininterrumpidamente durante 8 h usando un lector de placas (*Synergy Neo2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EEUU*) ajustado a una λ de excitación y emisión de 485 nm y 535 nm respectivamente. Los resultados aparecen expresados como unidades relativas (UR) de fluorescencia tras la sustracción del blanco (células tratadas con DCFDA no estimuladas con bacteria).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

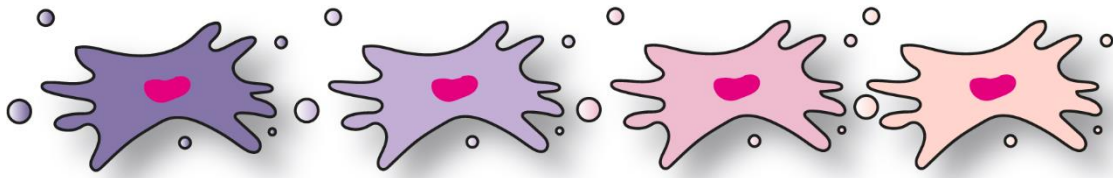
Todos los resultados aparecen representados como la media \pm el error estándar de la media (SEM).

En el modelo de peritonitis inducida por TGC, las diferencias estadísticas en el número total de células y el fenotipo de las poblaciones peritoneales fueron estudiadas aplicando el test de Tukey para comparaciones múltiples. El número de replicados biológicos por condición experimental (n) osciló entre 4-9 ratones. por, las diferencias en los niveles de expresión de las citoquinas peritoneales fueron analizadas aplicando el test de Sidak para comparaciones múltiples (n=3). En el estudio de las diferencias en el perfil de expresión de las MenSCs tratadas con TGC, se aplicó el test de Mann-Whitney (n=3).

En el modelo de sepsis monobacteriana, se utilizó el test t de Student pareado para analizar las diferencias en la pérdida de peso, el peso del bazo y el número total de células peritoneales (n=12-13). Las diferencias en el fenotipo de las poblaciones peritoneales (n=12-13), el número de CFU (n=4) y el perfil de expresión de citoquinas peritoneales (n=2-3), en cambio, fueron analizadas aplicando el test de Sidak para comparaciones múltiples. Para los ensayos *in vitro* (n=3-10), las diferencias estadísticas se analizaron aplicando los test de Tukey (fagocitosis, producción de ROS) y Sidak (fenotipo de las THP-1 mediante citometría y ARNm, ensayo de aclaramiento de bacterias con gentamicina) para comparaciones múltiples. Las diferencias en el perfil de expresión de THP-1 y MenSCs tratadas con LPS fueron estudiadas aplicando el test de Mann-Whitney.

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el *software GraphPad Prism 7* (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU). Un p-valor inferior a 0,05 fue interpretado como estadísticamente significativo y representado de la siguiente forma: *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001, ****p<0,0001.

Resultados



Resultados

Caracterización fenotípica de las MenSCs.....	86
Efecto de las MenSCs en un modelo de peritonitis inducida por TGC ..	88
Efecto de las MenSCs sobre el número de células reclutadas al peritoneo .	89
Efecto de las MenSCs sobre el perfil de las poblaciones reclutadas al peritoneo.....	90
Caracterización de los agregados peritoneales generados tras la administración de MenSCs	96
Caracterización histológica de los agregados peritoneales.....	96
Caracterización fenotípica de los agregados peritoneales	99
Expresión de mediadores procedentes de las MenSCs en los agregados peritoneales	106
Estudio del tropismo de las MenSCs hacia distintos órganos del ratón	108
Ensayos <i>in vitro</i> : efecto directo del TGC sobre las MenSCs	110
Efecto de las MenSCs en un modelo de sepsis inducida por <i>Salmonella Typhimurium</i>	112
Efecto de las MenSCs sobre las poblaciones inmunitarias del ratón en respuesta a <i>Salmonella</i>	113
Efecto de las MenSCs sobre diversos parámetros indicativos de septicemia	116
Ensayos <i>in vitro</i> : efecto de las MenSCs sobre las propiedades funcionales del macrófago	119
Efecto de las MenSCs sobre el fenotipo de las THP-1 _{PMA} en condiciones de inflamación	125
Efecto de las MenSCs sobre las propiedades bactericidas de las THP-1 _{PMA} .	128

Caracterización fenotípica de las MenSCs

En primer lugar, se confirmó que las MenSCs aisladas en nuestro laboratorio eran equivalentes a aquellas descritas en la bibliografía^{93,108,197}. Para ello, se realizó una caracterización tanto morfológica como fenotípica de la población celular obtenida de sangre menstrual.

Las MenSCs aisladas exhibieron una morfología adherente de tipo fibroblástico (Figura 1a, b) y mostraron un fenotipo característico de MSCs. Todas las MenSCs procedentes de distintas donantes fueron positivas para los marcadores típicos de MSCs CD73 y CD105, además de expresar CD9, CD29 y CD44 (Figura 1c). Por el contrario, carecían de expresión de marcadores hematopoyéticos y endoteliales como CD14, CD34, CD38, CD45, CD133 y HLA-DR (Figura 1c). Particularmente, las MenSCs obtenidas presentaron expresión, aunque baja, del marcador pluripotente CD117 (Figura 1c).

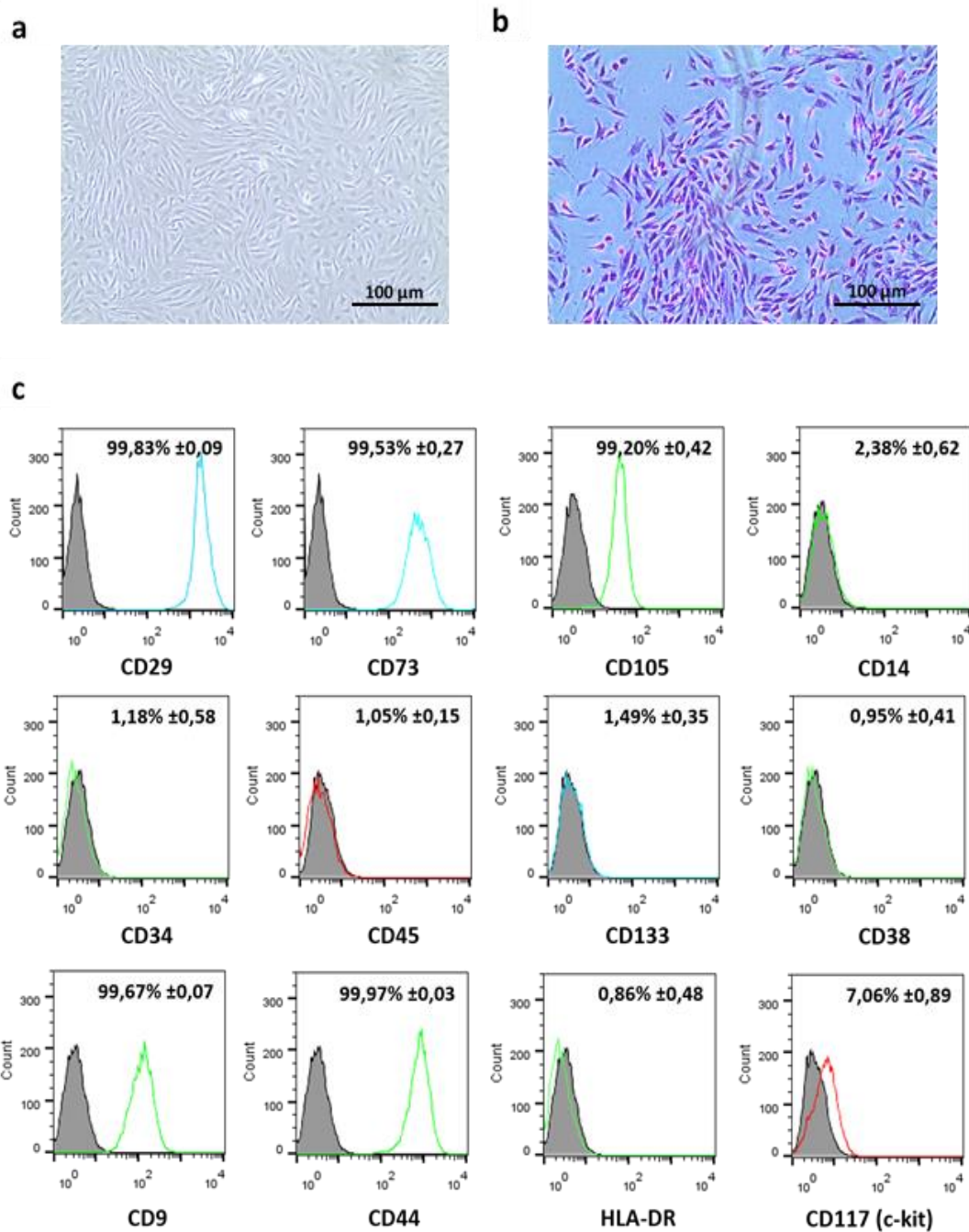


Figura 1. Caracterización morfológica e inmunofenotípica de las MenSCs.

Fotogramas de MenSCs recién aisladas (a) y teñidas con el colorante cristal violeta (b) en las que se observa su morfología fibroblástica. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de magnificación 4x. (c) Caracterización fenotípica de MenSCs mediante citometría de flujo. Los valores indicados corresponden a la media (\pm SEM) de expresión de los marcadores indicados en MenSCs procedentes de tres donantes. Los histogramas en gris corresponden a los controles de isotipo de cada marcaje.

Efecto de las MenSCs en un modelo de peritonitis inducida por TGC

El modelo murino de peritonitis inducida por TGC se considera uno de los modelos de referencia para el estudio del reclutamiento de leucocitos en respuesta a la producción de mediadores inflamatorios¹⁹⁸⁻²⁰³. En condiciones basales, el fluido peritoneal del ratón alberga en torno a $2\cdot 4\cdot 10^6$ células e incluye poblaciones celulares residentes tales como macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B, proporcionando una vigilancia inmunológica constante. En este contexto fisiológico, la inyección intraperitoneal de TGC, empleado como agente proinflamatorio, es responsable del reclutamiento de un gran número de células inmunitarias en el lugar de inyección. Tras la administración de este agente, la primera ola de reclutamiento está íntegramente formada por neutrófilos, alcanzando niveles máximos en el peritoneo entre 4h y 24h después del estímulo¹⁹⁹. Los macrófagos, en cambio, inician su reclutamiento pasadas 24h tras la administración de TGC y constituyen la principal población inmunitaria peritoneal a los 4 días de inyección¹⁹⁹, llegando a ser reclutadas hasta $1\cdot 2\cdot 10^7$ células. Con el fin de evaluar el efecto de las MenSCs sobre este reclutamiento leucocitario rígidamente pautado, dichas células fueron administradas vía intraperitoneal 4h o 24h tras la inyección de TGC. Los tratamientos exclusivos con PBS, TGC o MenSCs fueron empleados como grupos control. A día 5 tras el estímulo inflamatorio, se recuperó el fluido peritoneal de los ratones para caracterizar el número y fenotipo de las poblaciones celulares reclutadas (**Ilustración 12**).

Efecto de las MenSCs sobre el número de células reclutadas al peritoneo

Tal y como se describe en la bibliografía, la administración de TGC indujo un reclutamiento intenso de células hacia la zona de inyección¹⁹⁹, obteniendo un recuento peritoneal de $\sim 1,1 \cdot 10^7$ células (Figura 2). Este grado de reclutamiento observado se mantuvo con la administración de MenSCs tras 4h del tratamiento con TGC (T-MenSCs-4h), (Figura 2). Sin embargo, la administración de MenSCs a las 24h tras el tratamiento con TGC (T-MenSCs-24h) sí reflejó una reducción significativa del número de células reclutadas hacia el peritoneo en comparación con el grupo experimental tratado únicamente con TGC (Figura 2). Si atendemos a la administración única de MenSCs, este grupo experimental presentó un recuento celular peritoneal similar al grupo control (PBS), indicando así que las MenSCs por sí solas no inducen una respuesta quimioatrayente y proinflamatoria (Figura 2).

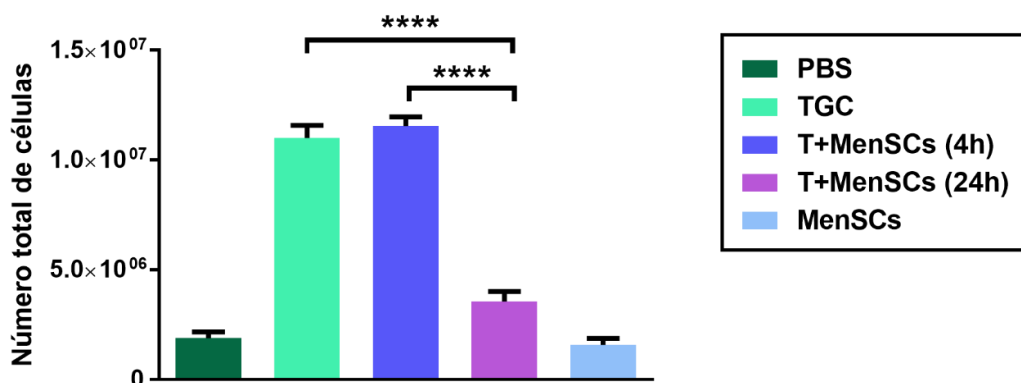


Figura 2. Recuento de células en el lavado peritoneal

El histograma representa el número total de células reclutadas en la cavidad peritoneal 4 días después de la administración IP de TGC. Los resultados aparecen representados como la media \pm SEM (n= 4-9 ratones por grupo experimental). ****p<0.0001. *T+MenSCs: grupo experimental tratado con TGC y MenSCs.*

Efecto de las MenSCs sobre el perfil de las poblaciones reclutadas al peritoneo

Con el fin de caracterizar las poblaciones celulares reclutadas, analizamos su fenotipo mediante citometría de flujo. Cuatro días después de la administración de TGC, y en consonancia con la bibliografía¹⁹⁹, la principal población de células reclutada fueron macrófagos (F4-80⁺/CD11b⁺) (Figura 3a). Sin embargo, en el grupo experimental **T-MenSCs-4h**, el número de macrófagos reclutados se redujo significativamente en comparación con el grupo tratado exclusivamente con TGC (Figura 3a). Esta reducción presentó un efecto más dramático en el grupo experimental **T-MenSCs-24h**, siendo significativa frente a los dos grupos anteriores, TGC y T-MenSCs-4h (Figura 3a).

El reclutamiento de neutrófilos (Ly-6G⁺/CD11b⁺) también se vio afectado en el grupo experimental **T-MenSCs-4h**, donde se aprecia un incremento significativo de neutrófilos en comparación con el grupo al que se le administró exclusivamente TGC (Figura 3a). En cambio, el número de neutrófilos reclutados en el grupo experimental **T-MenSCs-24h** no mostró diferencias con el grupo tratado únicamente con TGC (Figura 3a).

Por otra parte, el número de linfocitos B (B220⁺) reclutados peritonealmente también se vio significativamente reducido en los grupos experimentales **T-MenSCs-4h** y **T-MenSCs-24h** en comparación con el grupo tratado únicamente con TGC (Figura 3b). Otras poblaciones inmunológicas tales como monocitos inflamatorios (Ly-6C⁺/CD11b⁺) (Figura 3a), células dendríticas (CD11c⁺/CD11b⁺) y linfocitos T (CD3⁺) no presentaron diferencias entre los distintos grupos experimentales objeto de estudio (Figura 3b).

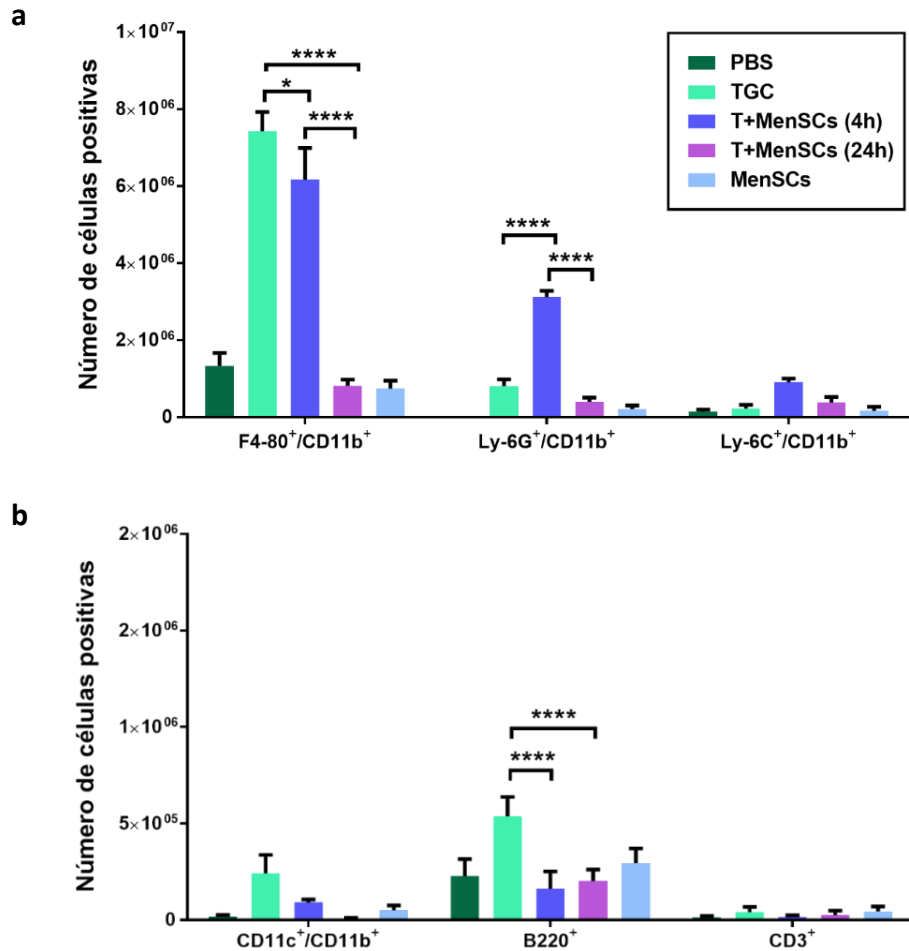


Figura 3. Fenotipo de las células presentes en el lavado peritoneal (I)

Representación gráfica del número de células positivas para diferentes marcadores inmunológicos reclutadas en la cavidad peritoneal 4 días después de la administración IP de TGC. **(a)** La población de macrófagos queda fenotípicamente definida como F4-80⁺/CD11b⁺, los neutrófilos como Ly-6G⁺/CD11b⁺, los monocitos inflamatorios como Ly-6C⁺/CD11b⁺, **(b)** las células dendríticas como CD11c⁺/CD11b⁺, los linfocitos B como B220⁺ y los linfocitos T como CD3⁺. El número de células positivas se calcula como [(%) células positivas × n° células totales]/100. Los resultados aparecen representados como la media ± SEM (n= 4-9 ratones por grupo experimental). *p<0.05, ****p<0.0001. *T+MenSCs*: grupo experimental tratado con TGC y MenSCs.

Para determinar si la administración de MenSCs afectaba a las poblaciones inmunológicas reclutadas al peritoneo no solo en número sino también en proporción, se analizó el porcentaje de cada una de ellas.

Tras la administración de TGC, y de acuerdo con la bibliografía, los macrófagos conformaron un ~85% de la población total de células peritoneales (**Figura 4a, b**). Este porcentaje se encontró reducido tanto en **T-MenSCs-4h** como en **T-MenSCs-24h** en comparación con el grupo tratado únicamente con TGC (**Figura 4a, b**).

Si nos centramos en el porcentaje peritoneal de neutrófilos, este mostró una tendencia totalmente opuesta, observándose un incremento significativo de dicha población tanto en **T-MenSCs-4h** como en **T-MenSCs-24h** cuando se compara con el grupo experimental tratado únicamente con TGC (**Figura 4a, b**). En cuanto al porcentaje de monocitos inflamatorios, el grupo experimental **T+MenSCs-4h** reflejó una tendencia al incremento que se volvió significativamente relevante para el caso de **T+MenSCs-24h** al comparar con el grupo tratado únicamente con TGC (**Figura 4a, b**).

Por último, el porcentaje de linfocitos B mostró una reducción significativa solamente en el grupo experimental **T-MenSCs-4h** si se compara con el tratamiento exclusivo con TGC (**Figura 4c**). Otras poblaciones inmunológicas tales como células dendríticas y linfocitos T no presentaron diferencias, en cuanto a porcentaje de expresión, entre los distintos grupos experimentales de estudio (**Figura 4c**).

De forma llamativa, la administración de MenSCs en ausencia de estímulo proinflamatorio redujo significativamente el porcentaje de macrófagos presentes de forma fisiológica en el peritoneo (**Figura 4b**) e incrementó el porcentaje de linfocitos B en comparación con el grupo control (PBS) (**Figura 4c**).

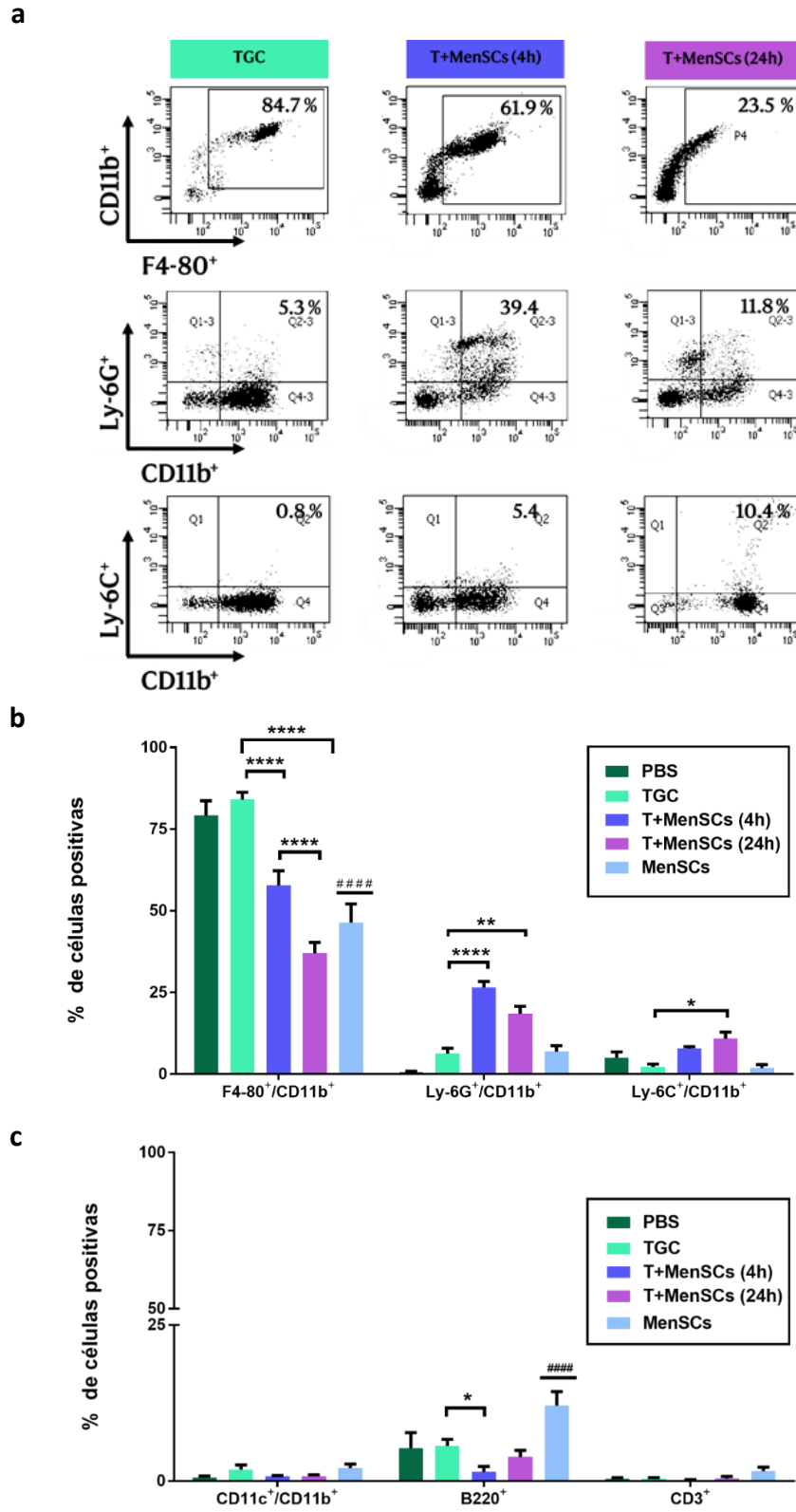


Figura 4. Fenotipo de las células presentes en el lavado peritoneal (II)

Figura 4. Fenotipo de las células presentes en el lavado peritoneal (II)

(a) Selección representativa de citogramas correspondientes a las poblaciones peritoneales de macrófagos (F4-80⁺/CD11b⁺), neutrófilos (Ly-6G⁺/CD11b⁺) y monocitos inflamatorios (Ly-6C⁺/CD11b⁺) en los grupos experimentales TGC, T-MenSCs-4h y T-MenSCs-24h. (b, c) Representación gráfica del porcentaje de células positivas para distintas poblaciones inmunológicas. La población de células dendríticas queda fenotípicamente definida como CD11c⁺/CD11b⁺, los linfocitos B como B220⁺ y los linfocitos T como CD3⁺. Los resultados aparecen representados como la media \pm SEM (n= 4-9 ratones por grupo experimental). *p< 0.05, **p< 0.01, ****p<0.0001. (#) Significación estadística comparada con el grupo experimental PBS. *T+MenSCs: grupo experimental tratado con TGC y MenSCs.*

Con el propósito de perfilar mejor el contexto inflamatorio se analizaron, mediante PCR cuantitativa, los niveles de expresión de distintas citoquinas y mediadores inmunosupresores en las células aisladas de peritoneo del grupo experimental **T-MenSCs-24h** y se compararon con los niveles de expresión del grupo experimental únicamente tratado con TGC (**Figura 5**).

La administración de MenSCs tras el estímulo inflamatorio incrementó de forma significativa la expresión de IL-8 murino (CXCL15), el principal agente quimiotáctico responsable del reclutamiento y la activación de neutrófilos^{204,205}. En cambio, los niveles de expresión murinos de las principales citoquinas pro (TNF- α) y antiinflamatorias (IL-10) no presentaron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales. Si atendemos a la expresión humana de la prostaglandina E2 sintasa 2 (PTGES2), enzima responsable de la síntesis del mediador inmunosupresor PGE₂ en MSCs y otros tipos celulares^{35,206}, esta tampoco mostró variaciones de expresión entre ambos grupos (**Figura 5**).

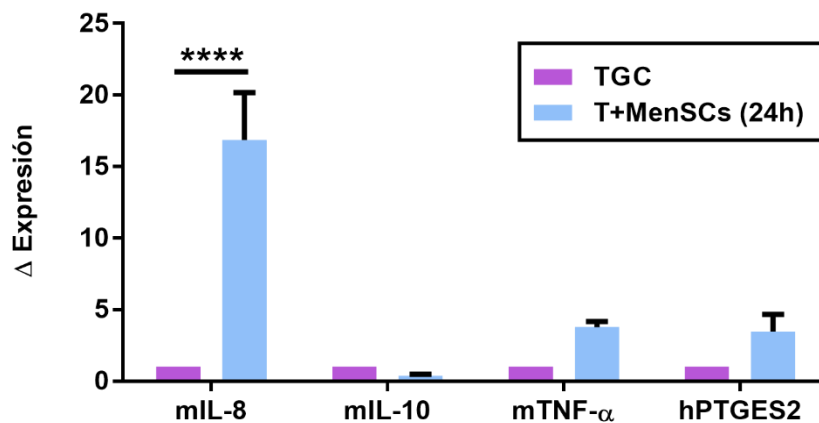


Figura 5. Niveles de expresión de citoquinas en el fluido peritoneal

Niveles de expresión de ARNm de distintas citoquinas y mediadores inmunosupresores en el fluido peritoneal de los grupos experimentales TGC y T-MenSCs-24h. Los resultados aparecen representados como incremento de expresión (en tanto por uno), donde los valores obtenidos en los ratones tratados con TGC y MenSCs se relativizan frente al grupo control (TGC) aplicando la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los niveles de expresión de actina y GAPDH fueron utilizados como controles de expresión constitutiva para ARN murino y humano respectivamente. Representación de la media \pm SEM (n= 2-4 ratones por grupo experimental). ****p<0.0001. *T+MenSCs: grupo experimental tratado con TGC y MenSCs, m: murino, h: humano.*

Caracterización de los agregados peritoneales generados tras la administración de MenSCs

Durante la realización de los lavados peritoneales, se advirtió la presencia de unos agregados en el grupo experimental **T-MenSCs-24h**. Estas estructuras fueron extraídas del peritoneo para su análisis y caracterización.

Caracterización histológica de los agregados peritoneales

Los agregados peritoneales presentes en el grupo experimental **T-MenSCs-24h** fueron sometidos a evaluación macroscópica e histológica con el fin de determinar su origen y composición.

Macroscópicamente, se podrían definir como estructuras compactas de tamaño considerable (0,5-1 cm), textura elástica y color blanquecino (**Figura 6a**). Aunque en ocasiones estas estructuras han sido localizadas cerca de la zona inferior del hígado (**Figura 6b**), su ubicación más frecuente fue en las regiones laterales de la cavidad abdominal (**Figura 6c**) próximas a la zona de inyección y adheridas a la grasa circundante.

El análisis histopatológico determinó que se trata de estructuras de aspecto nodular que no presentan necrosis y albergan una población mixta (**Figura 6d-e**). En particular, la tinción con H&E permitió definir dos regiones: una región periférica y una central (**Figura 6d-e, Figura 7a-f**). En la región periférica (**Figura 7a, e**), se pudieron apreciar algunas células sin atipia nuclear y con un citoplasma prominente que podrían corresponder con acúmulos histiocitarios (macrófagos residentes). A mayor aumento (**Figura 7b, f**), se observó que el límite entre células adyacentes se encontraba mal definido y no había eventos mitóticos. A este nivel (**Figura 7b, f**), se pudo determinar la presencia de leucocitos polimorfonucleares y células con citoplasma vacuolizado que, como se ha mencionado previamente, encajarían con la descripción de las células histiocitarias. La zona central estaba formada por un

estroma laxo (Figura 7c). A mayor detalle (Figura 7d), se pudo observar que este estroma con tractos conectivos escasamente colagenizados (grasa) también presentaba células de hábito fusiforme.

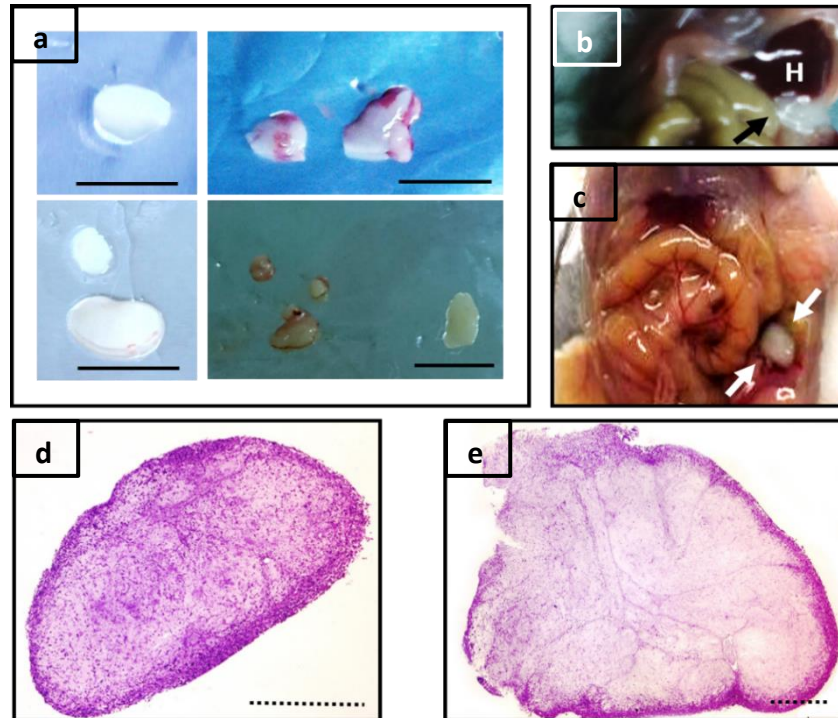


Figura 6. Localización y morfología de los agregados peritoneales

Observación macroscópica de los agregados peritoneales mostrando su tamaño y forma variable (a), su localización debajo del hígado (b) y mayoritariamente en la región lateral de la cavidad abdominal, donde se encuentran adheridos a la grasa circundante (c). Sección longitudinal (d) y transversal (e) de la estructura teñida con H&E. H: hígado. — 1cm --- 500 μ m.

Con el objeto de determinar si las células de aspecto fusiforme se correspondían con las MenSCs inyectadas, se realizó una tinción inmunohistoquímica frente al marcador mesenquimal queratina CAM5.2 haciendo uso de anticuerpos humanos específicos asociados a peroxidasa (Figura 7g). Dicho marcaje reveló la correspondencia entre el marcador mesenquimal y las células fusiformes de amplio citoplasma, confirmando así que se trataba de células humanas.

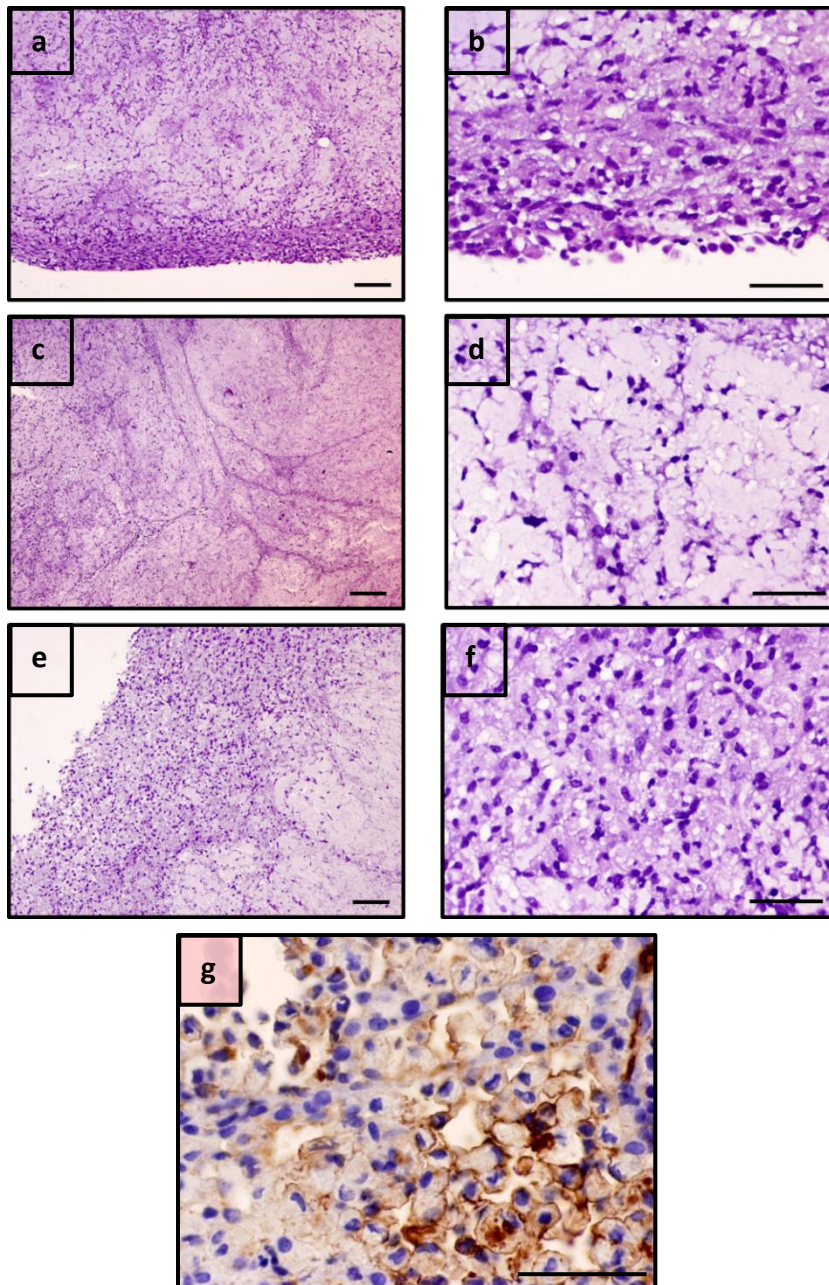


Figura 7. Tinción histológica de los agregados peritoneales

Aumento de las secciones teñidas con H&E en las que se observa una población mixta: células de tipo inflamatorio en la región periférica (a-b, e-f) y un estroma laxo con acúmulo aparentemente histiocitario en la región central (c, d). Detección inmunohistoquímica de células humanas en el interior de los agregados peritoneales mediante el uso del marcador mesenquimal queratina CAM5.2 (g). Los acúmulos de agente cromógeno definen las células positivas. — 30 μ m.

Caracterización fenotípica de los agregados peritoneales

Para caracterizar con mayor profundidad los distintos componentes celulares que conforman la estructura, los agregados peritoneales fueron analizados mediante microscopía confocal.

En virtud de la información obtenida mediante el análisis histopatológico, se empleó el marcaje con los anticuerpos CD31 y CD34 murinos como primera aproximación para confirmar la presencia y distribución de leucocitos en los agregados peritoneales (Figura 8). A pesar de ser un marcaje genérico compartido por todas las poblaciones leucocitarias y las células endoteliales, el resultado obtenido está en consonancia con lo observado mediante la tinción con H&E (Figura 6d). Existe una clara compartimentalización espacial en la que los leucocitos se acumulan fundamentalmente en la región periférica (Figura 8), dando paso a algunos acúmulos esporádicos en el interior de la estructura.

Una vez confirmada la presencia de leucocitos en los agregados peritoneales, se llevó a cabo una caracterización fenotípica de las poblaciones inmunológicas detectables en dichas estructuras.

En primer lugar, se evaluó la presencia y distribución de macrófagos haciendo uso del anticuerpo murino F4-80 (Figura 9). Dicho marcaje identificó a los macrófagos como principal componente celular de los agregados peritoneales y perfiló un patrón de distribución dual. Esta población podía formar agrupaciones en el interior de la estructura (Figura 9a, b) o localizarse de forma periférica conformando el límite externo de los agregados (Figura 9c, d). A mayor aumento pudo apreciarse cómo algunos macrófagos de la zona interior se situaban rodeando a vasos sanguíneos (Figura 9c, e). Dicha localización sugiere que los macrófagos podrían ser reclutados tanto localmente (distribución periférica) como a través del torrente sanguíneo (distribución central).

La presencia y distribución de los neutrófilos fue analizada mediante el marcaje con Ly-6G murino, que reveló su localización exclusivamente periférica (**Figura 10**). Por otra parte, la ausencia de marcaje para los marcadores murinos B220 (linfocitos B) y CD3 (linfocitos T) determinó que los linfocitos no están presentes en los agregados peritoneales (**Figura 11**).

De forma complementaria a los resultados obtenidos por inmunohistoquímica tradicional, se evaluó mediante microscopía confocal la presencia de células humanas en la estructura utilizando un anticuerpo nuclear específico humano (anti-H nucleí) cuyo marcaje reveló una distribución relativamente uniforme de células humanas en el interior de los agregados peritoneales (**Figura 12**).

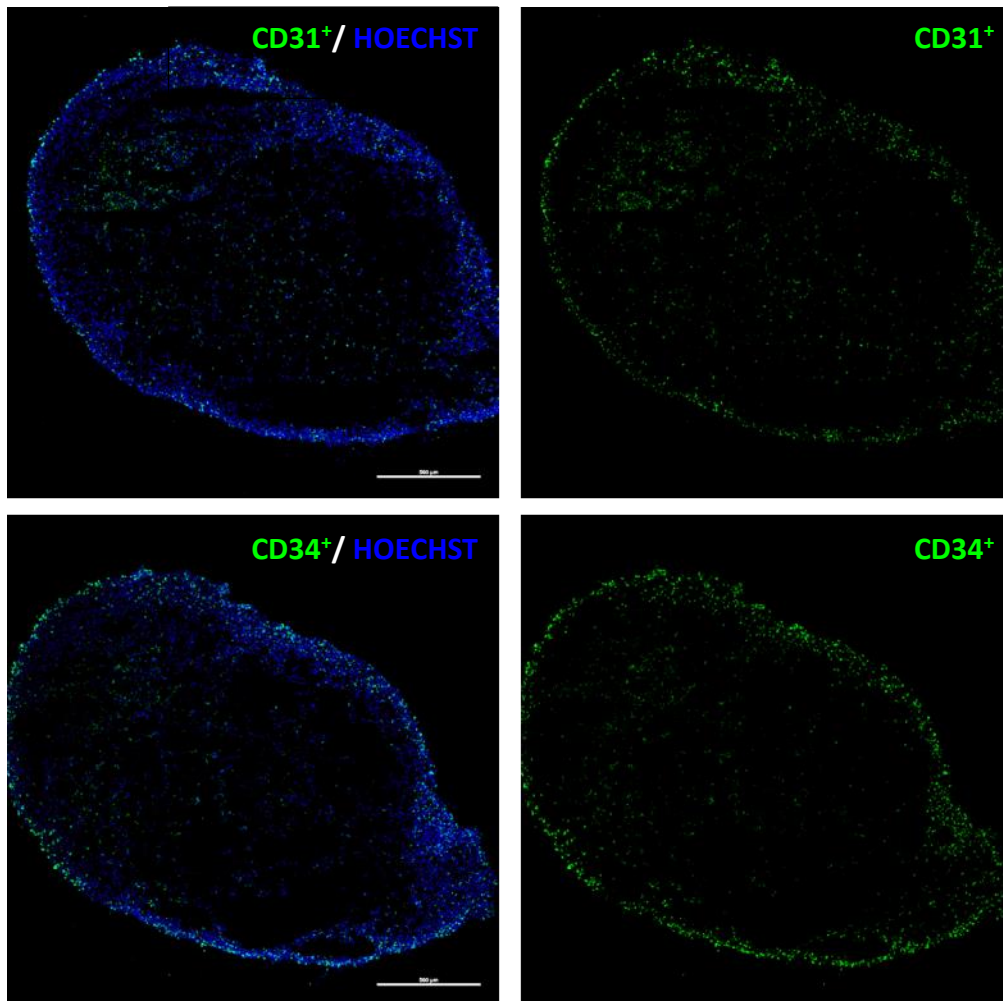


Figura 8. Presencia y distribución de leucocitos en los agregados peritoneales

Los agregados peritoneales fueron crioseccionados y marcados con anticuerpos FITC-CD31 y FITC-CD34 murinos para determinar la presencia y el perfil de distribución de los acúmulos leucocitarios mediante microscopía confocal (n=5 nódulos, imágenes representativas). La tinción nuclear con Hoechst 33258 fue empleada como marcaje de contraste. — 500 μ m.

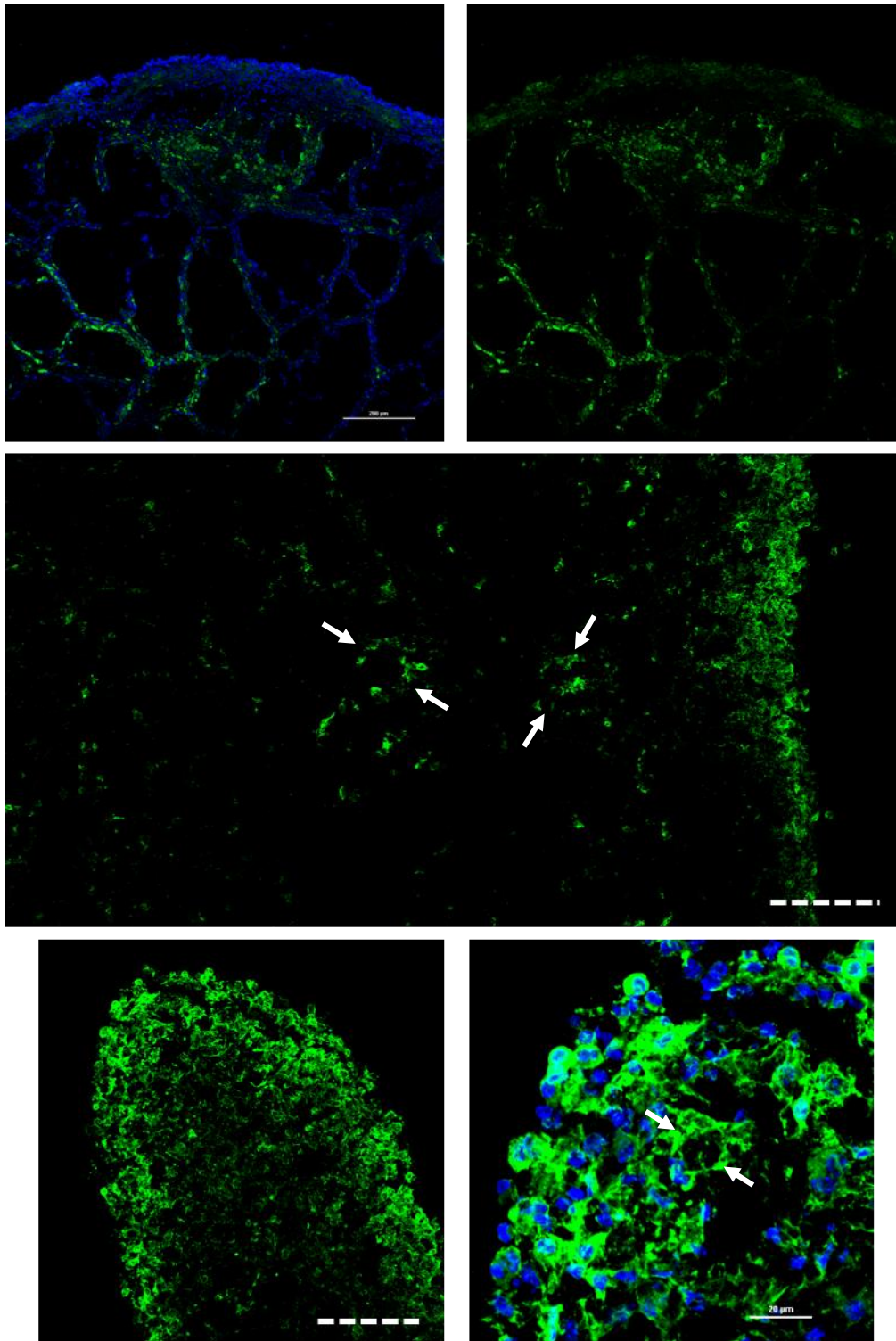


Figura 9. Presencia y distribución de macrófagos en los agregados peritoneales

Los agregados peritoneales fueron crioseccionados y marcados con el anticuerpo murino F4-80+AF488 para determinar la presencia y el perfil de distribución de los macrófagos mediante microscopía confocal (n=5 nódulos, imágenes representativas). Las flechas señalan la localización de macrófagos alrededor de los vasos sanguíneos. La tinción nuclear con Hoechst 33258 fue empleada como marcaje de contraste. (a, b) — 200 µm, (c, d) ---100 µm, (e) — 20 µm.

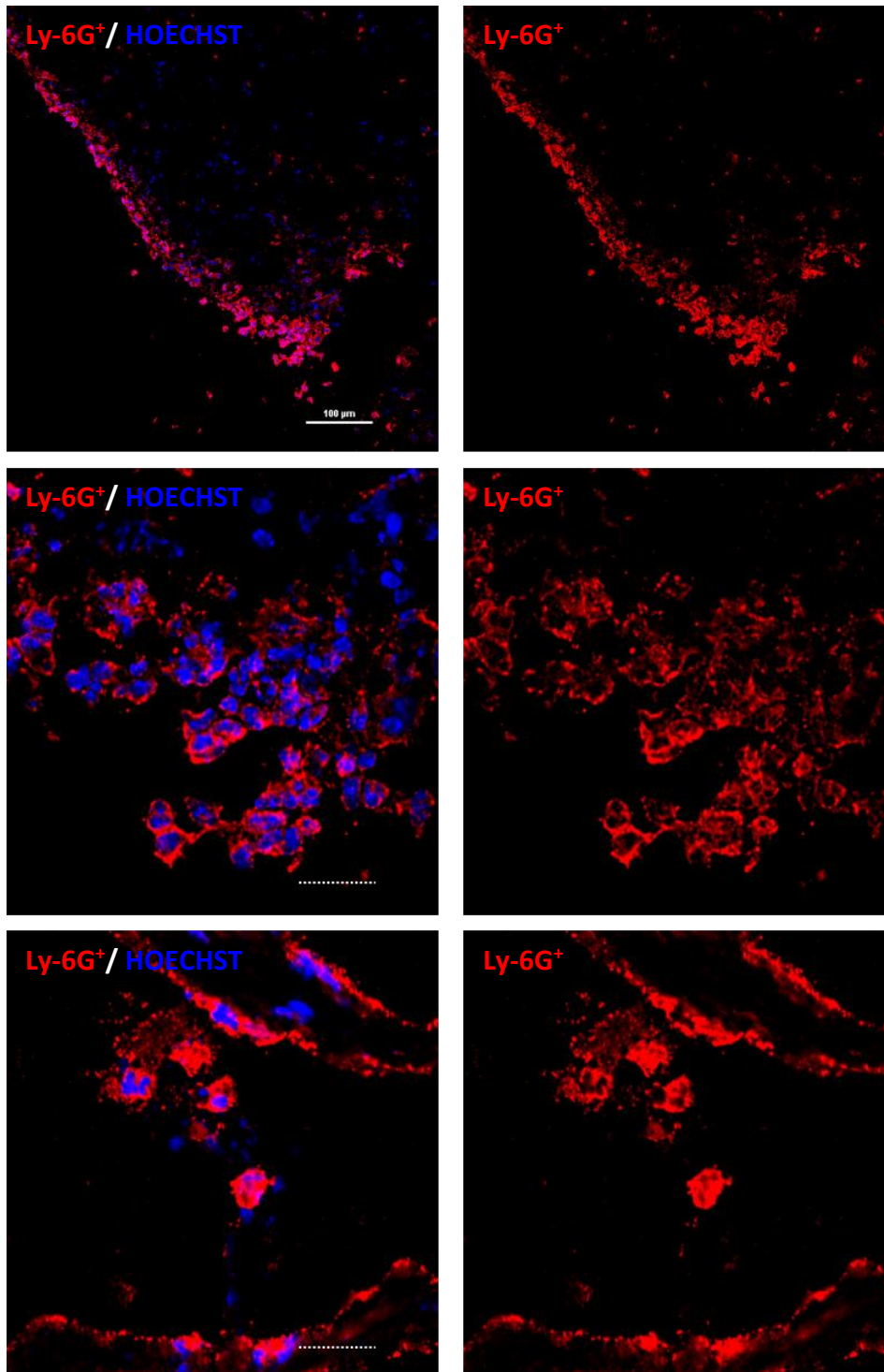


Figura 10. Presencia y distribución de neutrófilos en los agregados peritoneales

Los agregados peritoneales fueron crioseccionados y marcados con el anticuerpo murino Ly-6G+AF594 para determinar la presencia y el perfil de distribución de los neutrófilos mediante microscopía confocal (n=5 nódulos, imágenes representativas). La morfología del núcleo y el patrón de marcaje confirman la detección específica de poblaciones de neutrófilos. La tinción nuclear con Hoechst 33258 fue empleada como marcaje de contraste. — 100 µm -- 20 µm.

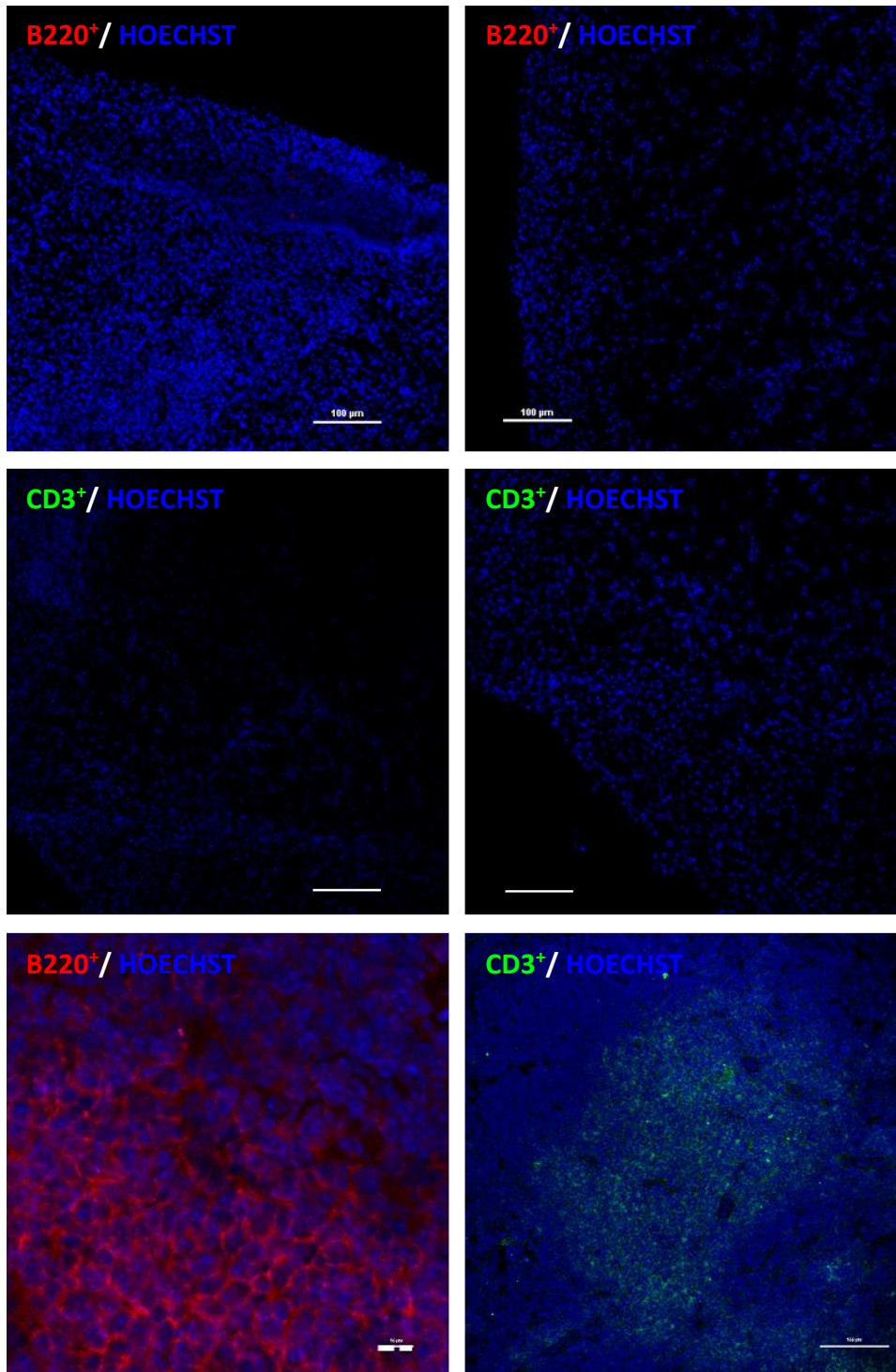


Figura 11. Presencia y distribución de linfocitos en los agregados peritoneales

Los agregados peritoneales fueron crioseccionados y marcados con los anticuerpos murinos PerCP-B220 y FITC-CD3 para determinar la presencia y el perfil de distribución de los linfocitos B y T (respectivamente) mediante microscopía confocal (n=5 nódulos, imágenes representativas). Las imágenes inferiores pertenecen a secciones de bazo de ratón (control positivo). La tinción nuclear con Hoechst 33258 fue empleada como marcaje de contraste. 100 μm -- 10 μm .

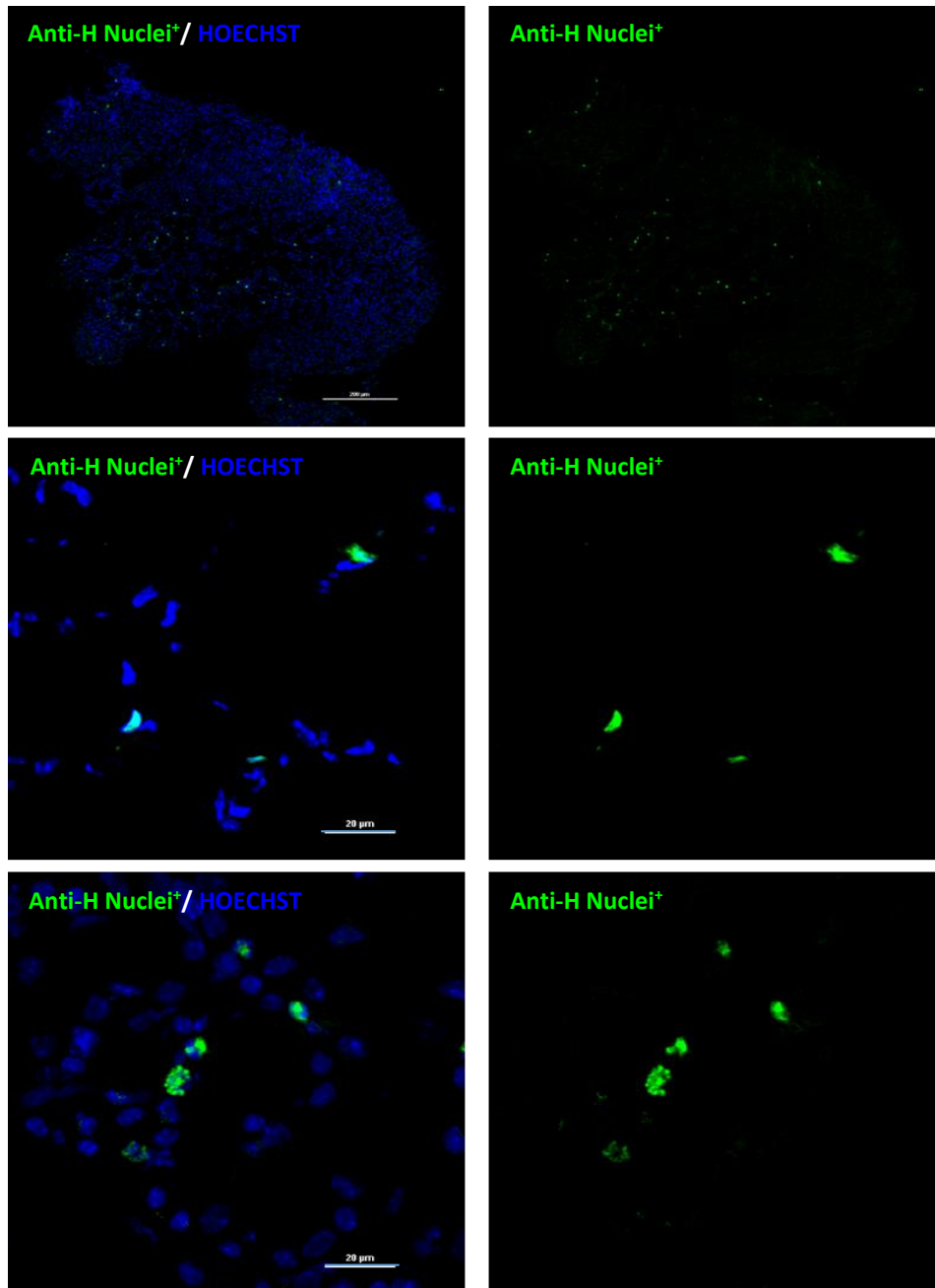


Figura 12. Presencia y distribución de células humanas en los agregados peritoneales

Los agregados peritoneales fueron crioseccionados y marcados con el anticuerpo nuclear humano AF488-Anti-H Nuclei para determinar la presencia y el perfil de distribución de células humanas mediante microscopía confocal (n=5 nódulos, imágenes representativas). La tinción nuclear con Hoechst 33258 fue empleada como marcaje de contraste. $\times 200 \mu\text{m}$, $\times 20 \mu\text{m}$.

Expresión de mediadores procedentes de las MenSCs en los agregados peritoneales

Una vez caracterizadas las distintas poblaciones celulares presentes en los agregados peritoneales, se analizó, mediante PCR cualitativa, qué posibles mediadores expresados por las MenSCs podrían ser responsables del ensamblaje de dichas estructuras (**Figura 13**).

En primer lugar, con el objetivo de determinar si la expresión de factores quimiotácticos para macrófagos y neutrófilos podrían ser los responsables del reclutamiento y la presencia de los mismos en los agregados, se analizó la expresión de CCL2, CCL5 e IL-8. Para el caso de CCL2 y CCL5, factores quimioatrayentes de monocitos y macrófagos, estos presentaron un perfil de expresión dispar: mientras que CCL2 estaba presente en todos los agregados peritoneales analizados, CCL5 fue detectado en una sola ocasión. Por otra parte, la expresión del factor quimiotáctico de neutrófilos IL-8 fue detectada en 3 de las 4 estructuras (**Figura 13**).

A continuación, puesto que los agregados peritoneales conforman una estructura semi-organizada que podría recordar ligeramente a estructuras linfoides terciarias (TLS)^{207,208}, las quimioquinas linfoides CCL19, CCL21 y CXCL13 fueron objeto de estudio. En ninguno de los agregados peritoneales estudiados se detectó ARNm de CCL19 y CXCL13 y solamente 1 de los 4 expresó CCL21 (**Figura 13**), sugiriendo que estas quimioquinas no son esenciales para la generación de la estructura, y en concordancia con la falta de reclutamiento de linfocitos T y B en las mismas.

A pesar de que existe numerosa bibliografía enmarcando a PGE₂ y TSG-6 como los principales mediadores de los efectos inmunosupresores ejercidos por las MSCs^{35,36,209,210}, su expresión en MenSCs ha sido poco caracterizada hasta la fecha^{136,150}. En los agregados peritoneales, la enzima responsable de la síntesis de PGE₂ (PTGES2) fue detectada en todas las muestras de estudio. Por otra parte, TSG-6 estaba presente en la mitad de las estructuras analizadas (**Figura 13**).

Por último, los niveles de expresión de IL-6 e IL-10, principales citoquinas pro- y antiinflamatorias respectivamente, también fueron analizados. Mientras que IL-6 fue detectada en la mitad de las estructuras caracterizadas, el transcrito de IL-10 no se expresó en ninguno de los casos de estudio (Figura 13).

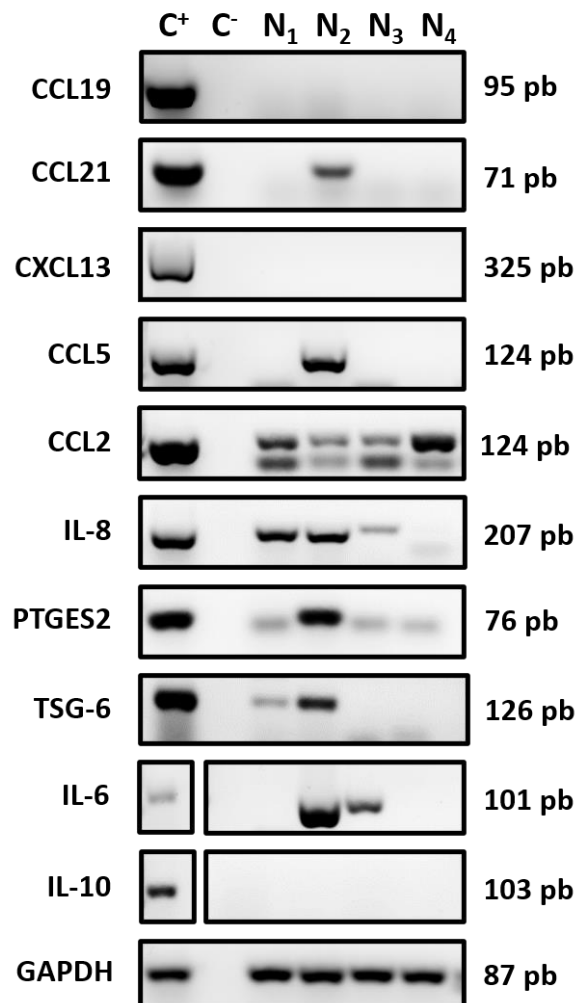


Figura 13. Perfil de expresión de mediadores en los agregados peritoneales

Estudio de los niveles de ARNm de distintos factores quimiotácticos y mediadores pro- y antiinflamatorios humanos mediante PCR cualitativa. Una muestra de ARN de amígdala se empleó como control positivo (C⁺) en todos los casos excepto para IL-10, donde se utilizó ARN de células THP-1 polarizadas a macrófagos M2. Para este análisis fueron empleados 4 agregados peritoneales (N₁-N₄) procedentes de 4 experimentos independientes. Los niveles de GAPDH fueron utilizados como control de expresión constitutiva. C⁻: control negativo.

Estudio del tropismo de las MenSCs hacia distintos órganos del ratón

La caracterización de los agregados peritoneales permitió confirmar la presencia de MenSCs en dicha estructura, pero también es de interés averiguar si estas células presentan tropismo por otros órganos del ratón en los que ejercer un posible efecto local.

Con este objetivo, distintos órganos de los ratones tratados con **T-MenSCs-24h** fueron obtenidos para la extracción del ADN total y análisis mediante amplificación del gen del citocromo b humano por PCR convencional (**Figura 14**). Tras el estudio de hígado, bazo, placas de Peyer, ganglios mesentéricos y cuernos uterinos, se pudo determinar que la localización predominante de las MenSCs es el aparato reproductor. El tropismo por los ganglios mesentéricos también quedó parcialmente reflejado, aunque de forma muy esporádica (**Figura 14**).

Siguiendo el mismo análisis, los agregados peritoneales también fueron sometidos a la amplificación del citocromo b humano (**Figura 14**). En todos los casos analizados el resultado fue positivo, confirmando una vez más la presencia de células humanas en dichas estructuras.

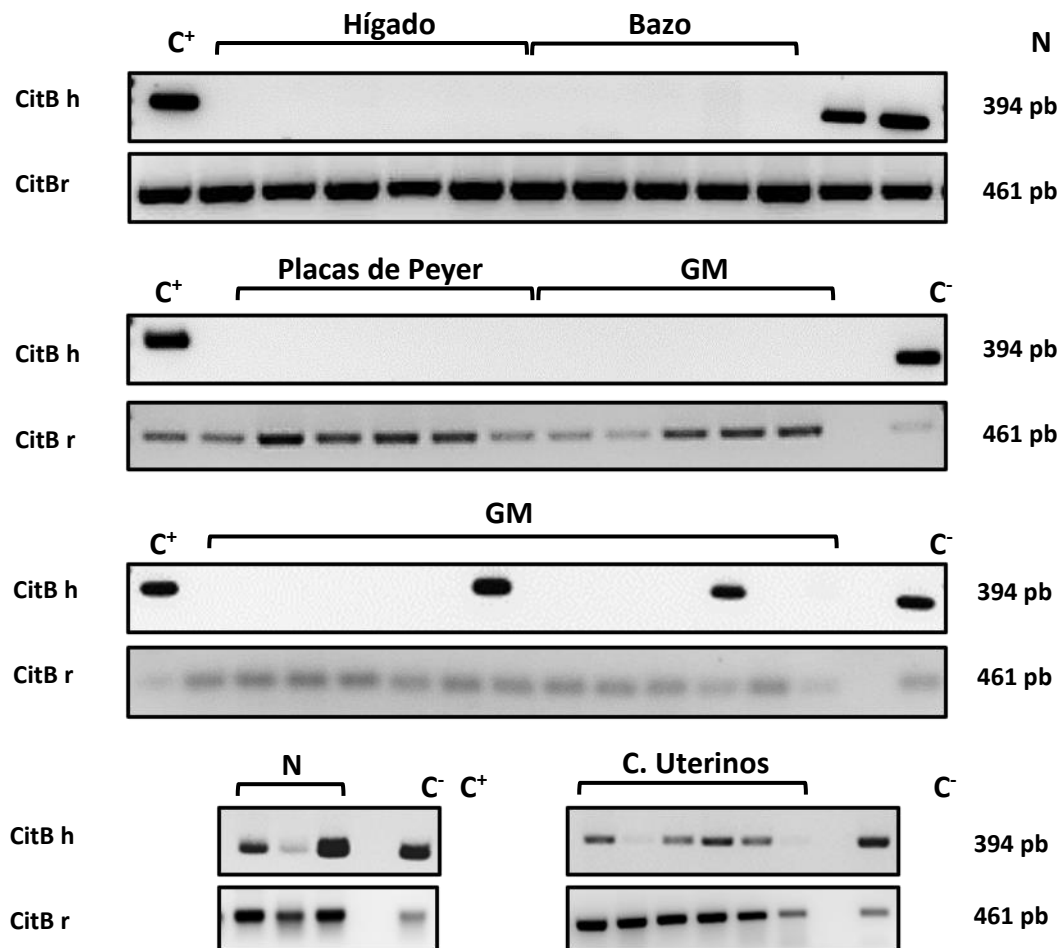


Figura 14. Presencia de citocromo b humano en distintos órganos de interés

Batería de geles representativos en los que se analiza la presencia de MenSCs en distintos órganos de interés mediante la detección de ADN humano (CitB h). Las muestras seleccionadas, procedentes del grupo experimental T+MenSCs (24h), corresponden a 3 experimentos independientes. Como control positivo (C⁺) se empleó un *pool* de ADN total procedente de distintas líneas de MenSCs. Para asegurar la presencia de ADN en las muestras, también fueron amplificadas usando oligonucleótidos que reconocían el gen del citocromo b de ratón (CitB r). C: control negativo, GM: ganglios mesentéricos, C. Uterinos: cuernos uterinos, N: agregados peritoneales.

Ensayos *in vitro*: efecto directo del TGC sobre las MenSCs

Una vez analizados los efectos de las MenSCs sobre el grado de reclutamiento y fenotipo de distintas poblaciones inmunológicas en este modelo de peritonitis inducida por TGC, se indagó *in vitro* acerca del posible efecto directo que el agente inductor TGC podría tener sobre las MenSCs.

Para ello, distintas líneas de MenSCs fueron tratadas con TGC durante 4 y 24h. Transcurrido este tiempo, los niveles de expresión de distintos factores quimiotácticos e inmunorreguladores fueron analizados (**Figura 15**).

El análisis por PCR cuantitativa mostró que la expresión de la citoquina atrayente de neutrófilos IL-8 se ve estimulada por el tratamiento con TGC y que dicha expresión es significativamente mayor a 24h que a 4h. La expresión de la citoquina proinflamatoria IL-6, por el contrario, presentó su pico de expresión a 4h (**Figura 15**) volviendo a valores casi basales a las 24h.

En relación a los factores inmunosupresores TSG-6 y la expresión de la enzima PTGES2, estos mostraron una tendencia al alza a las 24h, que solamente presentó significación estadística para el caso de TSG-6 (**Figura 15**). Por último, y en concordancia con los datos de expresión derivados del análisis de los agregados peritoneales (**Figura 13**), la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10 no se detectó en respuesta al tratamiento con TGC confirmando el hecho de que no parece intervenir como agente mediador responsable de los efectos inmunorreguladores de las MenSCs (**Figura 15**).

A pesar de que la sensibilidad de la PCR convencional únicamente permite proporcionar resultados orientativos, la expresión de los factores quimioatrayentes de monocitos y macrófagos CCL2 y CCL5 también fue analizada mediante esta técnica (**Figura 15**). Ambas quimioquinas revelaron un patrón de expresión opuesto: mientras CCL2 parece disminuir tras el tratamiento con TGC de forma tiempo-dependiente, la expresión de CCL5 mostró un incremento a 24h en relación tanto a los controles como al tratamiento con TGC durante 4h (**Figura 15**).

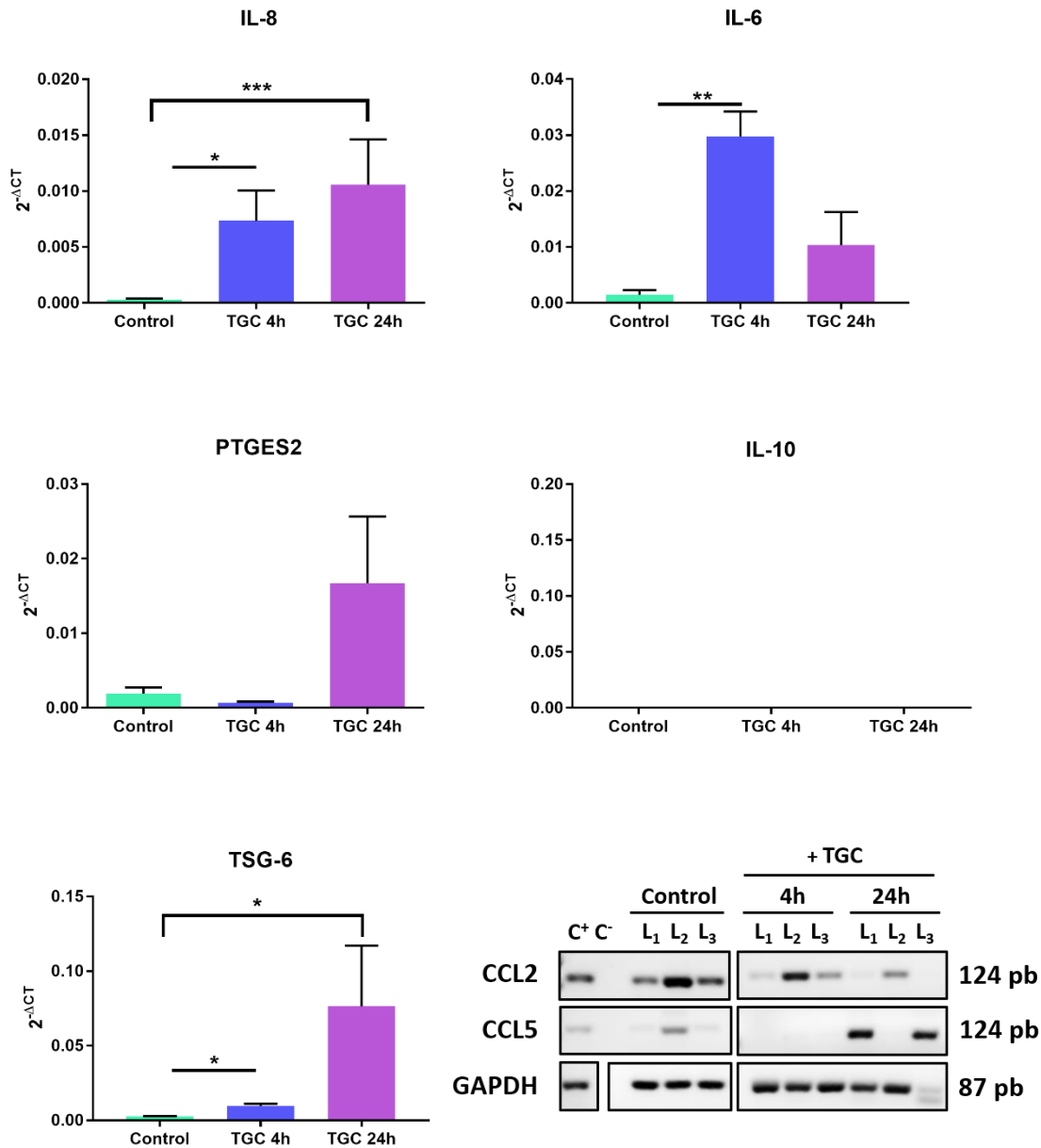


Figura 15. Niveles de expresión de factores quimiotácticos e inmunorreguladores por parte de las MenSCs tras el tratamiento con TGC

Tres líneas distintas de MenSCs fueron tratadas con TGC a una dilución 1/5 de la concentración empleada en el modelo *in vivo* durante 4 y 24h. Las células en cultivo durante 24h en ausencia de TGC fueron usadas como control. Pasado este tiempo, los niveles de mRNA de distintos factores fueron analizados mediante PCR cuantitativa y convencional. En el caso de la PCR cuantitativa, la expresión relativa se representa usando el método $2^{-\Delta CT}$. Los niveles de expresión de actina fueron utilizados como controles de expresión constitutiva para ARN humano (n= 3 replicados por condición experimental). Para la PCR convencional, se empleó como control positivo (C⁺) una muestra de ARN de amígdala. Los niveles de GAPDH fueron utilizados como control de expresión constitutiva. *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001. C: control negativo, L: línea de MenSCs.

Efecto de las MenSCs en un modelo de sepsis inducida por *Salmonella Typhimurium*

Tras observar cómo la presencia de MenSCs afectaba al reclutamiento de leucocitos en el modelo de peritonitis, decidimos estudiar las propiedades inmunorreguladoras de las MenSCs en un modelo con mayor grado de similitud a una inflamación aguda patológica real, el modelo de sepsis inducida por *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*Salmonella*). Además, este modelo supone un avance con respecto a una posible extrapolación de los resultados al ámbito clínico.

La administración de distintas cepas de *Salmonella* genera, en ratones susceptibles, una patología sistémica similar a la fiebre tifoidea²¹¹. Mediante la coinyección IP de *Salmonella* silvestre (ST) y atenuada (*SseB*) es posible investigar cómo de efectivos son los mecanismos de defensa del ratón para combatir la infección generada. La cepa ST nos informa, en este caso, sobre control en la capacidad de proliferación de *Salmonella* y la cepa *SseB*, que posee un menor grado de virulencia a causa de un déficit en el loci que codifica para la isla de patogenicidad 2, proporciona información más efectiva acerca de la capacidad para controlar la infección.

En este modelo animal, las MenSCs fueron administradas vía IP 4h después de la coinyección de las dos cepas de *Salmonella*. Esta ventana de administración coincide con el inicio de la septicemia, en la que tiene lugar una fase inflamatoria hiperaguda que puede conducir a la muerte del ratón²¹². A las 24h de la inducción del modelo, se recuperó el fluido peritoneal de los ratones para caracterizar el número y fenotipo de las poblaciones celulares reclutadas (Ilustración 13). De forma adicional, y con el propósito de obtener una visión global de las implicaciones del modelo, el curso de la infección fue monitorizado mediante la medición de distintos parámetros indicativos del grado de septicemia.

Efecto de las MenSCs sobre las poblaciones inmunitarias del ratón en respuesta a *Salmonella*

El análisis del recuento de células del fluido peritoneal mostró que, 24h tras la generación de la infección, el grupo experimental tratado con MenSCs (S+MenSCs) mostraba un número significativamente inferior de células reclutadas hacia el peritoneo en comparación con el grupo sometido a la administración única de *Salmonella*, pasando de $\sim 9.7 \cdot 10^6$ a $\sim 6.1 \cdot 10^6$ células reclutadas (Figura 16a).

Dada la significativa reducción en el número de células peritoneales obtenidas al inyectar las MenSCs, las poblaciones peritoneales presentes fueron [analizadas del mismo modo que en el modelo previo](#). En el grupo S+MenSCs el recuento de neutrófilos y macrófagos fue similar, viéndose ambas poblaciones significativamente reducidas en comparación con el grupo sometido a la administración única de *Salmonella*, donde mayoritariamente se reclutaron neutrófilos (Ly-6G⁺/CD11b⁺) y macrófagos en menor cantidad (F4-80⁺/CD11b⁺) (Figura 16b). Respecto a otras poblaciones inmunológicas tales como monocitos inflamatorios (Ly-6C⁺/CD11b⁺), células dendríticas (CD11c⁺/CD11b⁺), linfocitos T (CD3⁺) y B (B220⁺), estas no presentaron diferencias en número entre los distintos grupos experimentales objeto de estudio (Figura 16b, c).

Por otra parte, el análisis del porcentaje de las distintas poblaciones celulares mostró una reducción significativa tanto en el porcentaje de neutrófilos como de macrófagos en el grupo experimental S+MenSCs comparado con la administración única de *Salmonella* (Figura 17a, b). Por último, y en concordancia con los resultados obtenidos en el análisis del número absoluto de células correspondientes a otras poblaciones, no se observaron cambios significativos en el porcentaje de monocitos inflamatorios, células dendríticas, linfocitos T o B entre ambos grupos experimentales (Figura 17b, c). Además, a diferencia del modelo de peritonitis inducida por TGC, en este caso no se observó la formación de agregados peritoneales.

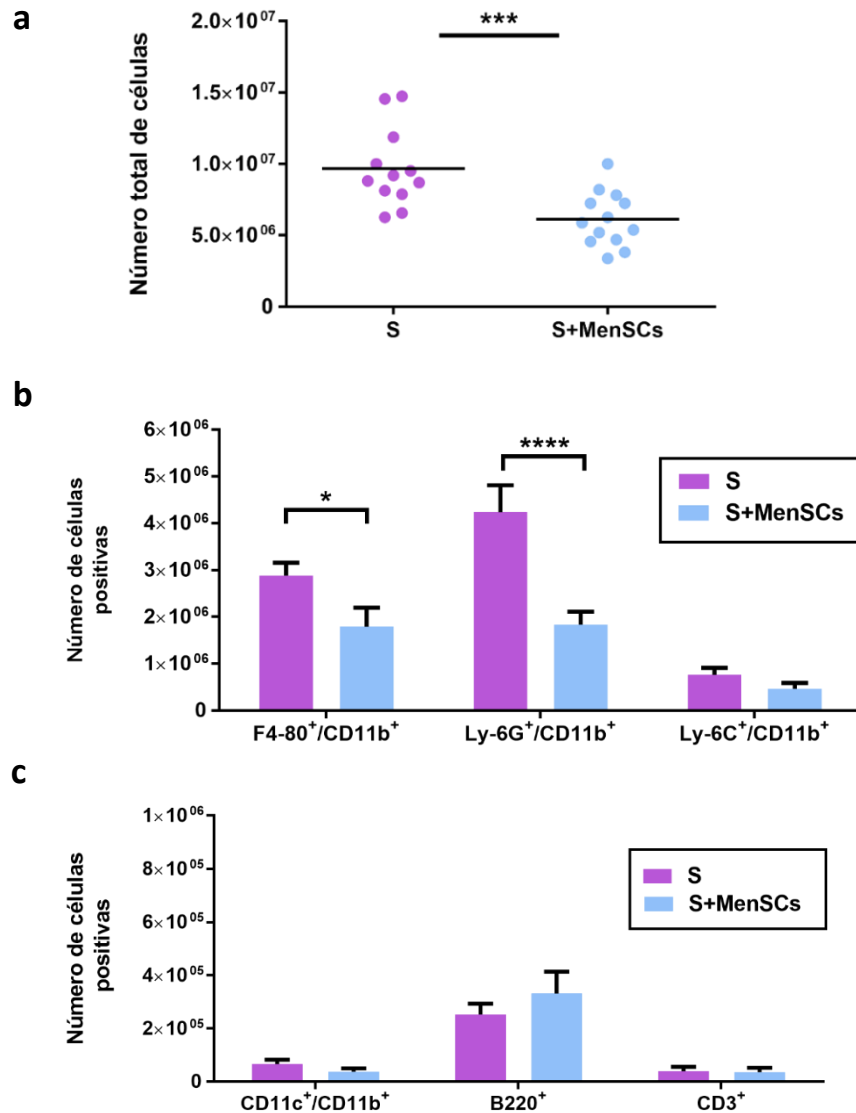


Figura 16. Recuento celular y fenotipo de las poblaciones presentes en el lavado peritoneal

(a) Número total de células reclutadas en la cavidad peritoneal 24h después de la administración IP de las MenSCs. Representación de cada replicado biológico y la media (barra horizontal) por grupo experimental. (b, c) Caracterización fenotípica de las células reclutadas en la cavidad peritoneal. El número de células positivas se calcula como [(%) células positivas x n° células totales]/100. (b) La población de macrófagos queda fenotípicamente definida como F4-80⁺/CD11b⁺, los neutrófilos como Ly-6G⁺/CD11b⁺, los monocitos inflamatorios como Ly-6C⁺/CD11b⁺, (c) las células dendríticas como CD11c⁺/CD11b⁺, los linfocitos B como B220⁺ y los linfocitos T como CD3⁺. Los resultados aparecen representados como la media ± SEM (n= 12-13 ratones por grupo experimental). *p< 0.05, ***p< 0.001, ****p<0.0001. *S*: grupo experimental coinfectado con *Salmonella* ST y *SseB*. *S+MenSCs*: grupo experimental coinfectado con ambas cepas de *Salmonella* y tratado con MenSCs.

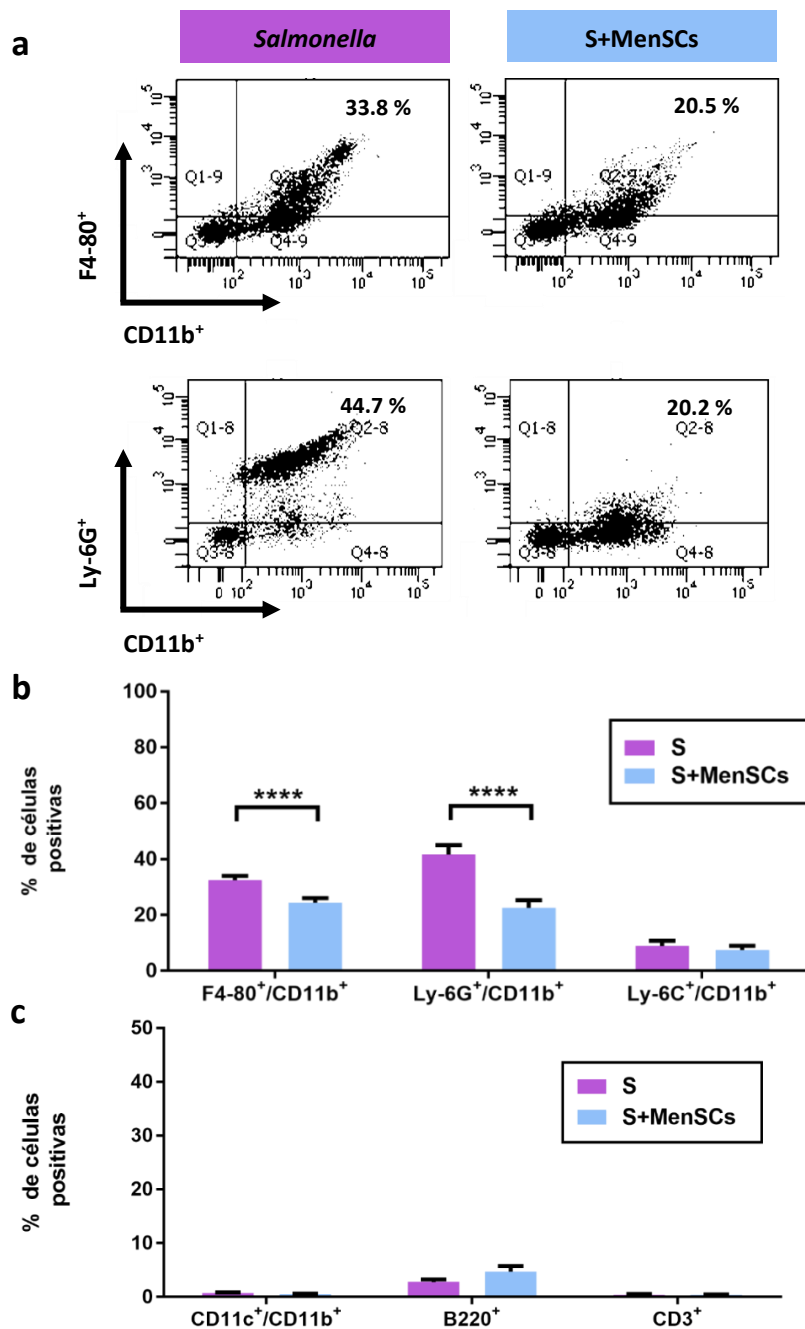


Figura 17. Proporción de las poblaciones presentes en el lavado peritoneal

(a) Selección representativa de citogramas correspondientes a los porcentajes peritoneales de macrófagos (F4-80⁺/CD11b⁺) y neutrófilos (Ly-6G⁺/CD11b⁺) en los grupos experimentales *Salmonella* y S+MenSCs. (b, c) Representación gráfica del porcentaje de células positivas para distintas poblaciones inmunológicas. La población de monocitos queda fenotípicamente definida como Ly-6C⁺/CD11b⁺, las células dendríticas como CD11c⁺/CD11b⁺, los linfocitos B como B220⁺ y los linfocitos T como CD3⁺. Los resultados aparecen representados como la media ± SEM (n= 12-13 ratones por grupo experimental). ****p<0.0001. *S*: grupo experimental coinfectado con *Salmonella* ST y SseB. *S+MenSCs*: grupo experimental coinfectado con ambas cepas de *Salmonella* y tratado con MenSCs.

Efecto de las MenSCs sobre diversos parámetros indicativos de septicemia

Esta descrito que en las fases tempranas de septicemia, existe una intensa producción de citoquinas proinflamatorias que puede conducir a fallo multiorgánico y, en casos extremos, incluso la muerte¹⁸⁹. Para comprender el efecto de las MenSCs sobre el contexto inflamatorio peritoneal presente en esta fase hiperaguda, se analizaron por PCR cuantitativa los niveles de expresión de distintos mediadores pro y antiinflamatorios en el fluido peritoneal del grupo experimental **S+MenSCs**, y se compararon con los del grupo experimental únicamente tratado con *Salmonella* (Figura 18a).

El nivel de expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), considerada un factor proinflamatorio, se triplicó en el fluido peritoneal de los ratones **S+MenSCs** en comparación con los sometidos a la administración única de *Salmonella* (Figura 18a). De forma llamativa, la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10 también mostró un patrón de expresión similar, duplicando los niveles con respecto al grupo experimental no tratado con MenSCs (Figura 18a). Otros mediadores como TNF- α o TGF- β , pro y antiinflamatorios respectivamente, no mostraron diferencias en sus niveles de expresión.

En el modelo de sepsis inducida por *Salmonella* se genera una patología sistémica, por lo que la medición de parámetros indicativos de septicemia no puede limitarse únicamente al ámbito local del peritoneo. Con el propósito de monitorizar el curso de la infección de forma más global, parámetros como la pérdida de peso, el grado de inflamación del bazo o la carga bacteriana en distintos órganos de interés fueron evaluados (Figura 18b-d).

El porcentaje de pérdida de peso o el grado de inflamación del bazo no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales, aun cuando eran inferiores en el grupo control inyectado solo con *Salmonella* (Figura 18b, c). No obstante, la carga bacteriana de ambas cepas se vio significativamente incrementada en bazo en el grupo experimental **S+MenSCs**, comparada con el grupo de *Salmonella* (Figura 18d). Este patrón también fue observado en fluido peritoneal y ganglios mesentéricos (Figura 18d), sugiriendo no solo un menor grado de eliminación bacteriana, sino también un incremento en la actividad proliferativa de ambas cepas en el grupo experimental **S+MenSCs**.

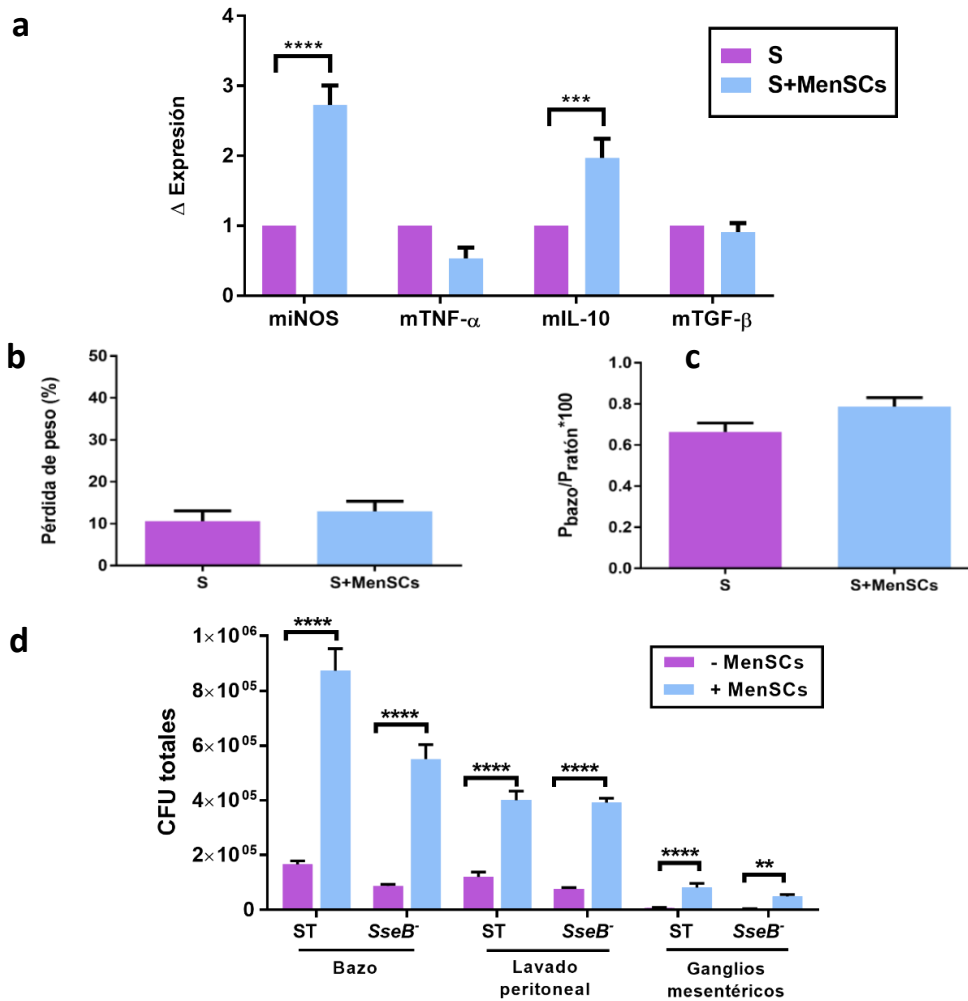


Figura 18. Parámetros indicativos de septicemia

(a) Niveles de expresión de ARNm de distintos mediadores pro- y antiinflamatorios en el fluido peritoneal de los grupos experimentales S y S+MenSCs. Los resultados aparecen representados como incremento de expresión (en tanto por uno), donde los valores obtenidos en los ratones tratados con *Salmonella* y MenSCs se relativizan frente al grupo control (S) aplicando la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los niveles de expresión de actina fueron utilizados como controles de expresión constitutiva para ARN murino. Representación de la media \pm SEM (n= 2-3 ratones por grupo experimental). (b) Porcentaje de pérdida de peso desde la inoculación de las cepas de *Salmonella* hasta el momento del sacrificio, 24h después. (c) Peso del bazo relativizado frente al peso del ratón en el momento del sacrificio como medida del grado de esplenomegalia. Los resultados aparecen representados como la media \pm SEM (n= 12-13 ratones por grupo experimental). (d) Carga bacteriana de las cepas ST y *SseB* en bazo, lavado peritoneal y ganglios mesentéricos de ratones tratados y no tratados con MenSCs. Los cálculos del número de unidades formadoras de colonias (CFU) proceden de 4 experimentos independientes. **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. S: grupo experimental coinfectado con *Salmonella* ST y *SseB*. S+MenSCs: grupo experimental coinfectado con ambas cepas de *Salmonella* y tratado con MenSCs, m: murino.

Ensayos *in vitro*: efecto de las MenSCs sobre las propiedades funcionales del macrófago

El género *Salmonella* necesita invadir distintos tipos celulares para asegurar su replicación²¹³. Entre ellos, el macrófago es una de las células diana preferentes, donde un bloqueo efectivo de la multiplicación intracelular puede determinar el grado de patogenicidad de la bacteria²¹⁴.

Los resultados derivados del modelo de septicemia sugieren que la función de los macrófagos durante la infección bacteriana por *Salmonella* podría verse afectada por la presencia de MenSCs. Con el fin de explorar esta hipótesis en mayor detalle, se evaluaron *in vitro* los efectos de las MenSCs sobre el fenotipo, capacidad fagocítica y capacidad bactericida de la línea monocítica humana THP-1. De forma previa a los ensayos, estas células THP-1 fueron incubadas con PMA (THP-1_{PMA}) para inducir su diferenciación de monocito a macrófago, simulando así condiciones similares al modelo *in vivo*.

Efecto de las MenSCs sobre el fenotipo de las THP-1_{PMA} en condiciones basales

En primer lugar, con el objetivo de conocer el efecto de las MenSCs sobre la proliferación de las THP-1_{PMA}, estas fueron marcadas con CFSE y cocultivadas o no con MenSCs durante 48 y 72h (**Figura 19**). Durante las primeras 48h, no se pudo apreciar ninguna diferencia en el grado de proliferación de las THP-1_{PMA} tratadas o no con MenSCs, mientras que a 72h se observó un ligero desplazamiento hacia la izquierda en la fluorescencia de THP-1_{PMA} cocultivadas con MenSCs, sugiriendo así un incremento en el grado de proliferación (**Figura 19**).

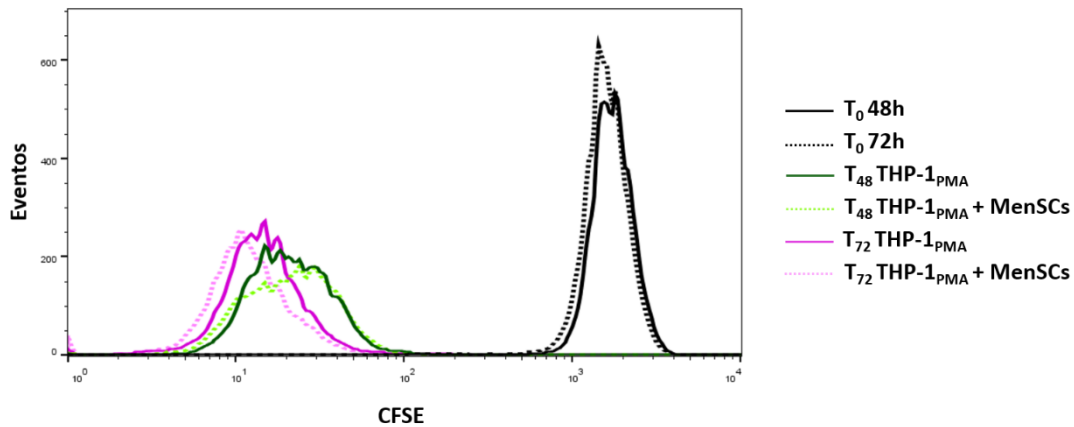


Figura 19. Efecto de las MenSCs sobre el grado de proliferación de THP-1_{PMA}

Experimento representativo del grado de proliferación de THP-1_{PMA} tras el tratamiento o no con MenSCs durante 48h (T₄₈) y 72h (T₇₂).

A continuación, con el propósito de determinar el impacto de las MenSCs sobre la plasticidad fenotípica de los macrófagos, las células THP-1_{PMA} fueron cocultivadas con MenSCs mediante cámara *Transwell* durante 72h. Pasado este tiempo se caracterizó, por citometría de flujo, la expresión de distintos marcadores clave para definir la transición fenotípica entre macrófagos M₀, M₁ y M₂ (Figura 20b, c). Como control de diferenciación, las células THP-1_{PMA} fueron incubadas con LPS+IFN- γ o IL-4, dirigiendo así su transición a macrófagos clásicamente definidos como M₁ proinflamatorios y M₂ antiinflamatorios, respectivamente.

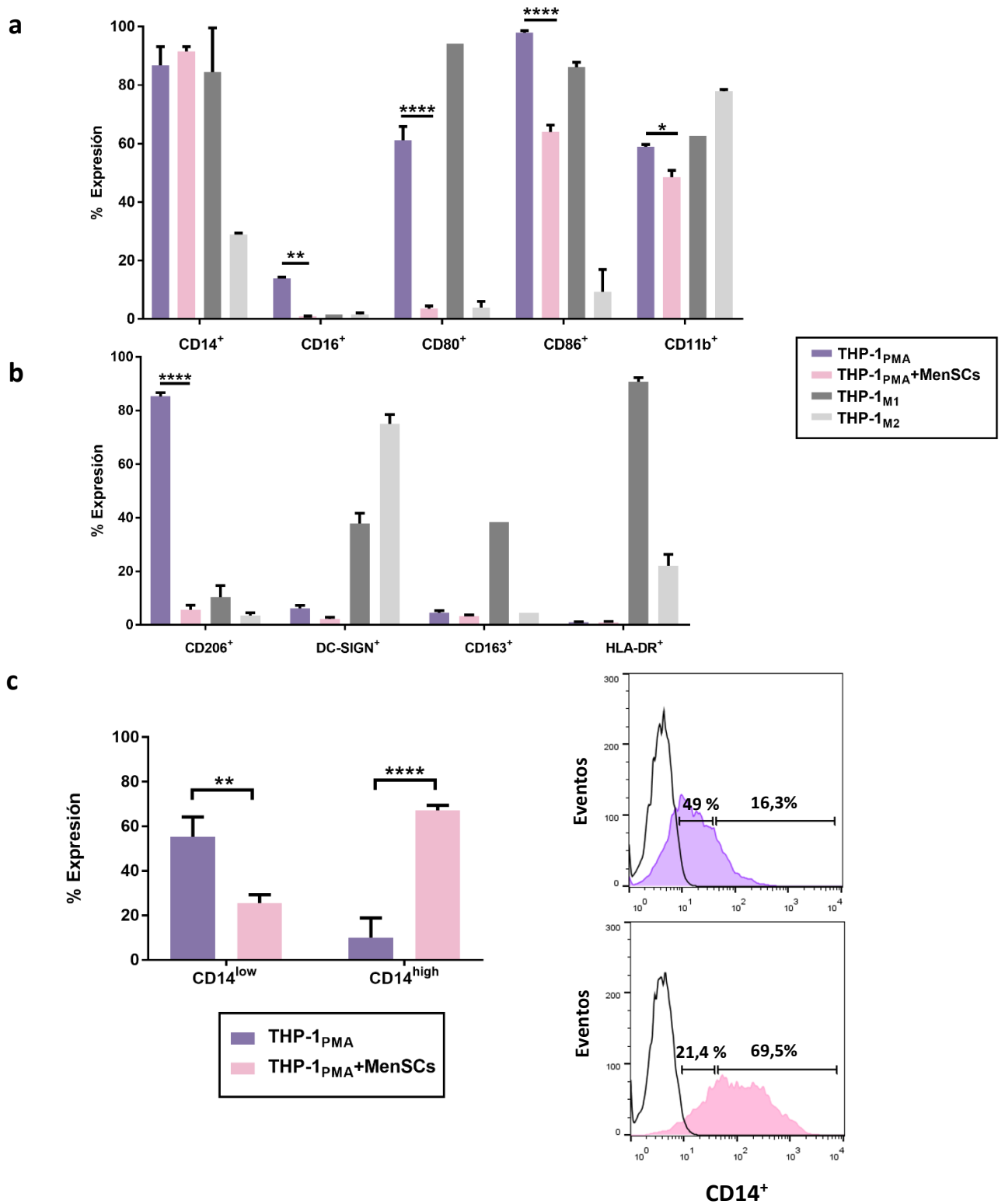


Figura 20. Caracterización fenotípica de THP1_{PMA} cocultivadas con MenSCs

Figura 20. Caracterización fenotípica de THP1_{PMA} cocultivadas con MenSCs

(a, b) Porcentaje de expresión de diferentes marcadores M₀, M₁ y M₂ en THP-1_{PMA} cultivadas (o no) con MenSCs durante 72h (ratio 4:1) mediante cámara *Transwell* o incubadas con LPS+IFN- γ (THP-1_{M1}) o con IL-4 (THP-1_{M2}). (c) Patrón de expresión y citogramas de flujo representativos de los niveles de CD14 en THP-1 cocultivadas (THP-1_{PMA} + MenSCs) o no (THP-1_{PMA}) con MenSCs durante 72h mediante cámara *Transwell*. Los histogramas de la derecha reflejan la distinción entre células con baja (CD14^{low}) y alta intensidad de fluorescencia (CD14^{high}) para el marcaje de CD14. Todos los resultados aparecen representados como la media \pm SEM (n= 2-3 por condición experimental). La condición experimental de cocultivo con MenSCs (THP-1_{PMA} + MenSCs) fue repetida con 3 líneas de MenSCs distintas. *p< 0.05, **p< 0.01, ****p<0.0001. *Línea negra: control de isotipo.*

Por una parte, el análisis por citometría de las células cocultivadas con MenSCs mostró una reducción significativa en la expresión de las moléculas coestimuladoras, y marcadores de M1, CD80 y CD86 (Figura 20a). Igualmente se observó reducción del marcador de transición de monocito a macrófago CD11b y del marcador de monocitos inflamatorios CD16 (Figura 20a). En relación al correceptor CD14, no se encontraron diferencias en el porcentaje total de células positivas (Figura 20a), pero sí en la intensidad de fluorescencia (Figura 20c). Así pues, al distinguir entre células con alta (CD14^{high}) y baja expresión de CD14 (CD14^{low}), se observó que el tratamiento con MenSCs reducía significativamente la proporción de células CD14^{low} a la par que incrementaba de forma significativa la proporción de células CD14^{high} (Figura 20c).

En cuanto a los marcadores fenotípicos M2 (CD206, DC-SIGN, CD163) no se apreció ningún incremento en su grado de expresión en THP-1_{PMA} + MenSCs, descartando, a *priori*, la transición a un fenotipo antiinflamatorio clásico (Figura 20b). Es importante mencionar que tanto CD206 como CD163 no presentaron el perfil de expresión esperado en macrófagos diferenciados a M2, dificultando la interpretación de los resultados con respecto a la transición hacia M2 (Figura 20b). De hecho, la expresión de CD206⁺ en las células THP-1_{PMA} (Figura 20b) contradice la bibliografía existente al respecto^{215,216}.

A modo confirmatorio, la expresión de CD206 y CD163 fue analizada mediante microscopía confocal, revelando su ausencia en las THP-1_{PMA} independientemente de su cocultivo o no con MenSCs (Figura 21). De igual forma, la expresión de CD14⁺ fue analizada, observándose de nuevo el incremento en su expresión tras el cocultivo con MenSCs, como ya se había apreciado por citometría de flujo (Figura 20c).

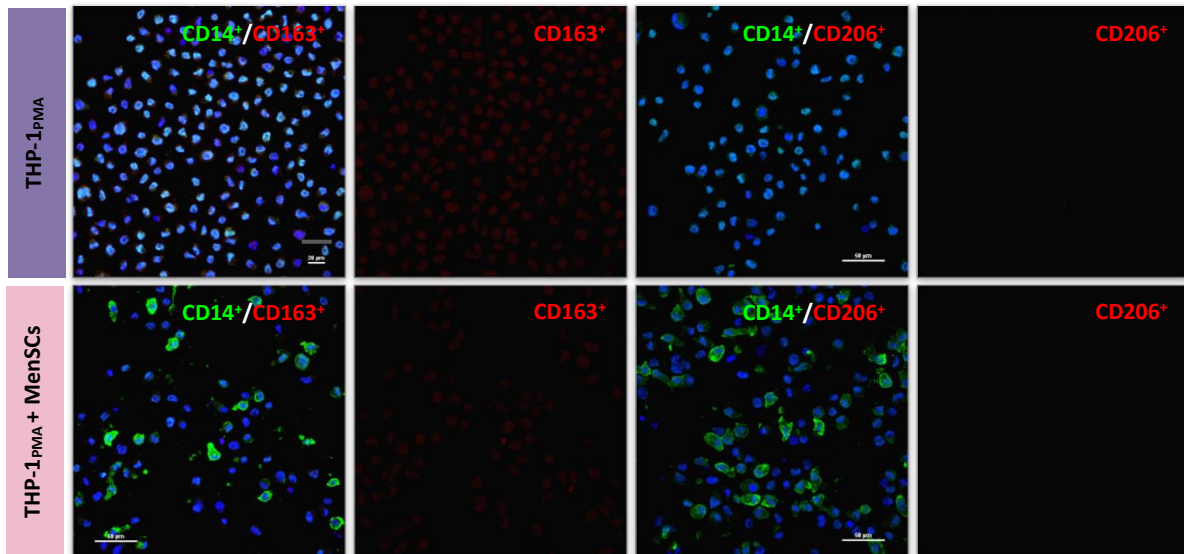


Figura 21. Caracterización, en THP1_{PMA}, de los marcadores CD14, CD163 y CD206 mediante microscopía confocal

Las células THP1_{PMA} fueron cultivadas (o no) con MenSCs durante 72h (ratio 4:1) mediante cámara *Transwell*. Pasado este tiempo, fueron transferidas a una *chamber slide* para su tinción y observación mediante microscopía confocal. (Izquierda) Imágenes representativas del doble marcaje FITC-CD14/AF647-CD163 y FITC-CD14/APC-CD206. (Derecha) Canal para la visualización del marcaje APC/AF647 (CD163 y CD206). La tinción nuclear con Hoechst 33258 fue empleada como marcaje de contraste. — 20 μ m — 50 μ m.

Por último, y volviendo a los resultados de citometría de flujo, el bajo nivel de expresión de la molécula del complejo principal de histocompatibilidad de clase II HLA-DR en THP-1_{PMA} se mantuvo tras el cocultivo con MenSCs (Figura 20b)

De forma adicional, también se analizaron los niveles de ARNm de distintos marcadores asociados a macrófagos M1 (CD14, CXCL10) y M2 (CCL18, CD163) en THP-1_{PMA} cocultivadas o no con MenSCs durante 48h (Figura 22). Nuevamente, se observó un incremento en los niveles de mensajero de CD14 que, junto con el aumento de la quimioquina proinflamatoria CXCL10, sugerirían un fenotipo M1 (Figura 22). Igualmente, se encontró un aumento a nivel transcripcional del marcador CD163, mientras que la quimioquina CCL18 no presentó cambios a nivel de mensajero (Figura 22). El marcador CD206 también fue analizado, no detectándose ARNm en ninguna de las muestras (*dato no mostrado*). Las citoquinas IL-6 e IL-10, por su parte, no presentaron cambios tras el cocultivo con MenSCs (Figura 22).

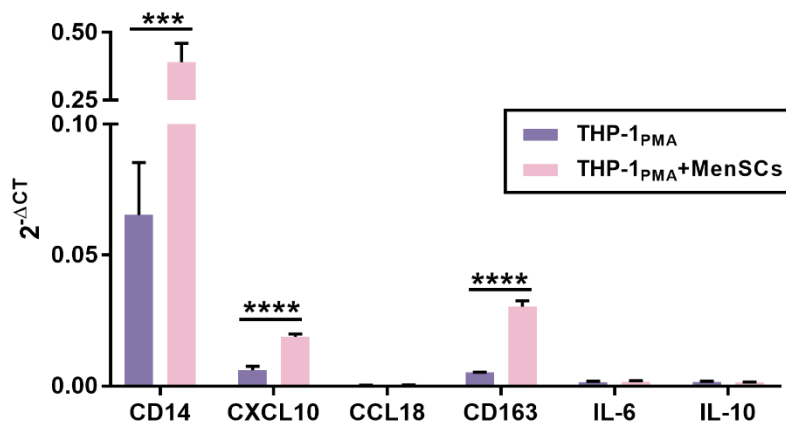


Figura 22. Expresión relativa de ARNm de distintos marcadores en THP1_{PMA} cocultivadas con MenSCs

Las células THP1_{PMA} fueron cultivadas (o no) con MenSCs durante 48h (ratio 4:1) mediante cámara *Transwell*. Pasado este tiempo se analizó la expresión relativa de ARNm para distintos marcadores de macrófagos M1, M2 y citoquinas pro (IL-6) y antiinflamatorias (IL-10). Los niveles de expresión de GAPDH fueron utilizados como controles de expresión constitutiva para ARN. La condición experimental de cocultivo con MenSCs fue repetida con 3 líneas de MenSCs distintas. Representación de la media \pm SEM (n=3-4 por grupo experimental). **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Efecto de las MenSCs sobre el fenotipo de las THP-1_{PMA} en condiciones de inflamación

Todos los efectos de las MenSCs sobre las células THP-1 descritos hasta el momento se observan en condiciones basales, donde no existen señales de daño o proinflamatorias generadas por la presencia de agentes patógenos. Para determinar el impacto de las MenSCs sobre los macrófagos en condiciones inflamatorias, las células THP-1_{PMA} cocultivadas o no con MenSCs durante 72h, fueron estimuladas durante 24h adicionales con lipopolisacárido (LPS), componente bacteriano conocido por su capacidad para inducir inflamación (Figura 23a).

En relación a los niveles de expresión de los receptores responsables del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), fueron objeto de estudio algunos miembros de la familia de receptores *Toll-Like* (TLRs). De los TLRs estudiados, solamente TLR-2 mostró una reducción significativa tras el tratamiento con MenSCs (Figura 23a), manteniéndose TLR-4 y TLR-6 sin cambios aparentes como resultado del cocultivo. En cuanto a la expresión de los mediadores proinflamatorios IL-6 y TNF- α , estos tampoco se vieron afectados a nivel transcripcional por la presencia de MenSCs. La expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10, sin embargo, sufrió un incremento significativo tras el tratamiento con MenSCs y el posterior estímulo con LPS (Figura 23a).

Por otra parte, con objeto de determinar si las MenSCs pueden verse afectadas por factores bacterianos, como podría ocurrir en el modelo *in vivo*, se estimularon con LPS y se analizó la expresión de receptores y factores inflamatorios (Figura 23b). La estimulación durante 24h con LPS de las MenSCs reveló un cambio en el patrón de expresión de receptores de PAMPs opuesto a lo observado en THP-1: mientras que TLR-2 no se veía afectado por el tratamiento, los niveles TLR-4 y TLR-6 incrementaron de forma significativa tras la estimulación con LPS (Figura 23b). Este incremento en los niveles de ARNm también se observó en las citoquinas IL-6 e IL-8, así como en TSG-6,

factor candidato responsable de los efectos inmunomoduladores de las MenSCs y en la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) (**Figura 23b**). Esta enzima está implicada en la ruta de síntesis de PGE₂, también factor candidato responsable de las propiedades inmunomoduladoras de las MenSCs. Sin embargo, los niveles de PTGES2, otra enzima partícipe de la síntesis de PGE₂, no se vieron transcripcionalmente alterados por el estímulo con LPS (**Figura 23b**). Por otra parte, la expresión del receptor de PGE₂, conocido como EP-2, no se vio incrementada en THP-1 tras el cocultivo con MenSCs (**Figura 23a**).

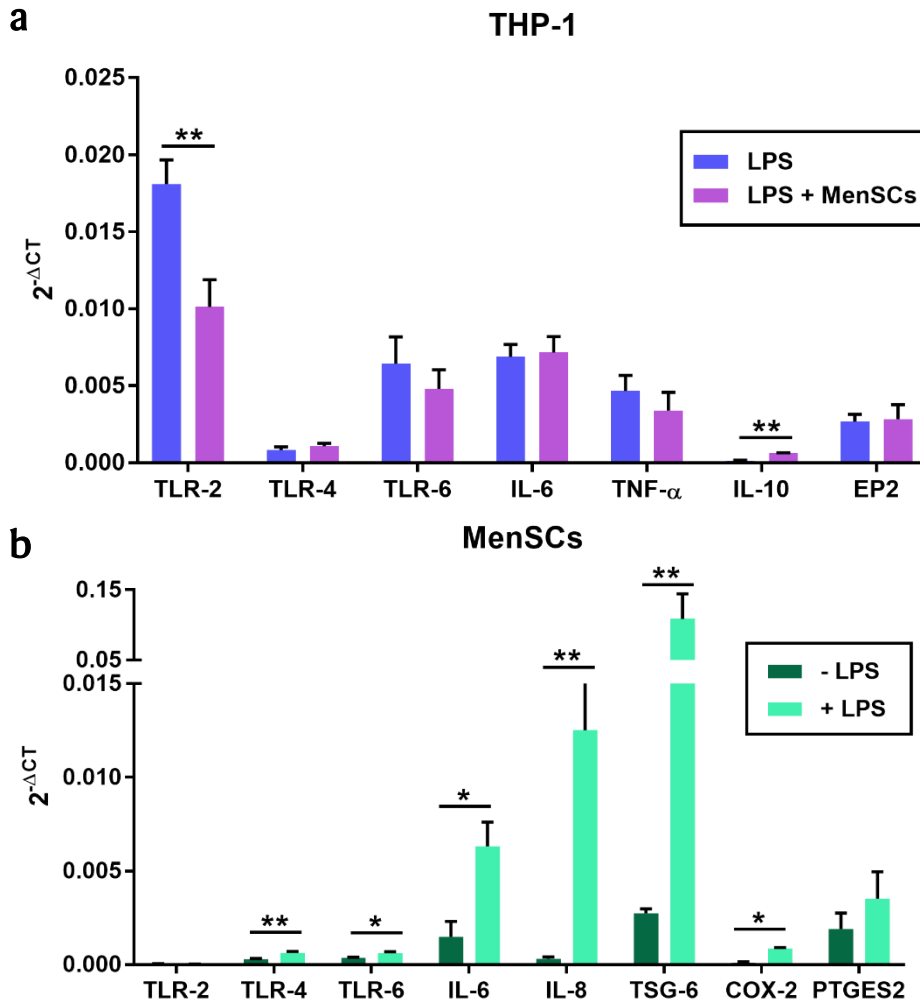


Figura 23. Perfil de expresión de genes relacionados con inflamación en THP-1_{PMA} y MenSCs estimuladas con LPS

Gráfica de los niveles de expresión relativa de ARNm para distintos receptores y mediadores pro- y antiinflamatorios. (a) Las células THP1_{PMA} fueron cultivadas (o no) con MenSCs durante 72h (ratio 4:1) mediante cámara *Transwell*. Pasado este tiempo, las células fueron estimuladas durante 24h con LPS independientemente de su cocultivo (LPS/LPS+MenSCs). (b) Tres líneas distintas de MenSCs fueron tratadas con LPS durante 24h para analizar la expresión relativa de ARNm para distintos receptores y factores inmunorreguladores. Los niveles de expresión de actina fueron utilizados como controles de expresión constitutiva para ARN. La condición experimental de cocultivo con MenSCs fue repetida con 3 líneas de MenSCs distintas. Representación de la media \pm SEM (n=3 por grupo experimental). *p< 0.05, **p< 0.01.

Efecto de las MenSCs sobre las propiedades bactericidas de las THP-1_{PMA}

Una vez observado que el efecto de las MenSCs sobre el fenotipo de las THP-1_{PMA} no ofrecía un perfil claro de polarización, los posteriores ensayos *in vitro* se centraron en analizar su impacto sobre las propiedades funcionales de los macrófagos dirigidas al control de la infección, tales como la fagocitosis y la eliminación de patógenos mediante la producción de ROS.

En primer lugar, se evaluó el efecto de las MenSCs sobre la capacidad fagocítica de las THP-1_{PMA}. Para ello, fueron cocultivadas con MenSCs mediante cámara *Transwell* durante 48h. Pasado este tiempo, las THP-1_{PMA} fueron incubadas con la cepa de *Salmonella SseB* durante 30 y 60 minutos para ser posteriormente lisadas, permitiendo así el recuento de CFU indicativo del grado de fagocitosis. Sorprendentemente, el cocultivo con MenSCs incrementó de forma significativa la capacidad fagocítica de las THP-1 en comparación con las THP-1_{PMA} sin cocultivo a ambos tiempos (**Figura 24a**)

A continuación, y con el propósito de medir el grado de efectividad con el que los macrófagos eran capaces de bloquear la replicación intracelular de *Salmonella*, se realizó un ensayo de aclaramiento de bacterias con gentamicina a 6, 24 y 48h (**Figura 24b**). Tras 6h de incubación con *SseB*, el número de bacterias viables recuperadas del grupo experimental THP-1_{PMA} + MenSCs fue similar al de las THP-1_{PMA} en ausencia de cocultivo. Sin embargo, tanto a 24 como a 48h tras la incubación con *SseB*, se detectó un incremento significativo de la bacteria viable recuperada del cocultivo con MenSCs (**Figura 24b**), indicando que el tratamiento con MenSCs perjudica gravemente la capacidad bactericida de las THP-1_{PMA}, aumentando así la capacidad proliferativa de la bacteria.

Para evaluar en detalle si la ineficacia de los efectos bactericidas era consecuencia de un defecto en la generación de ROS, se analizó la producción de H_2O_2 por parte de las THP-1_{PMA} directamente cocultivadas o no con MenSCs (Figura 24c). La medición del grado de oxidación del compuesto DCFDA mostró una reducción significativa en la producción de H_2O_2 en las THP-1_{PMA} tratadas con MenSCs a todos los tiempos en comparación con las células control en ausencia de cocultivo (Figura 24c). Estos datos sugieren que, en el contexto de la infección *in vitro* por *SseB*, las MenSCs afectarían a la producción de ROS por parte de las THP-1 y, en consecuencia, a su actividad bactericida. Sorprendentemente, la incubación de MenSCs con *SseB* estimuló su propia producción de intermediarios de oxígeno bactericidas (Figura 24c).

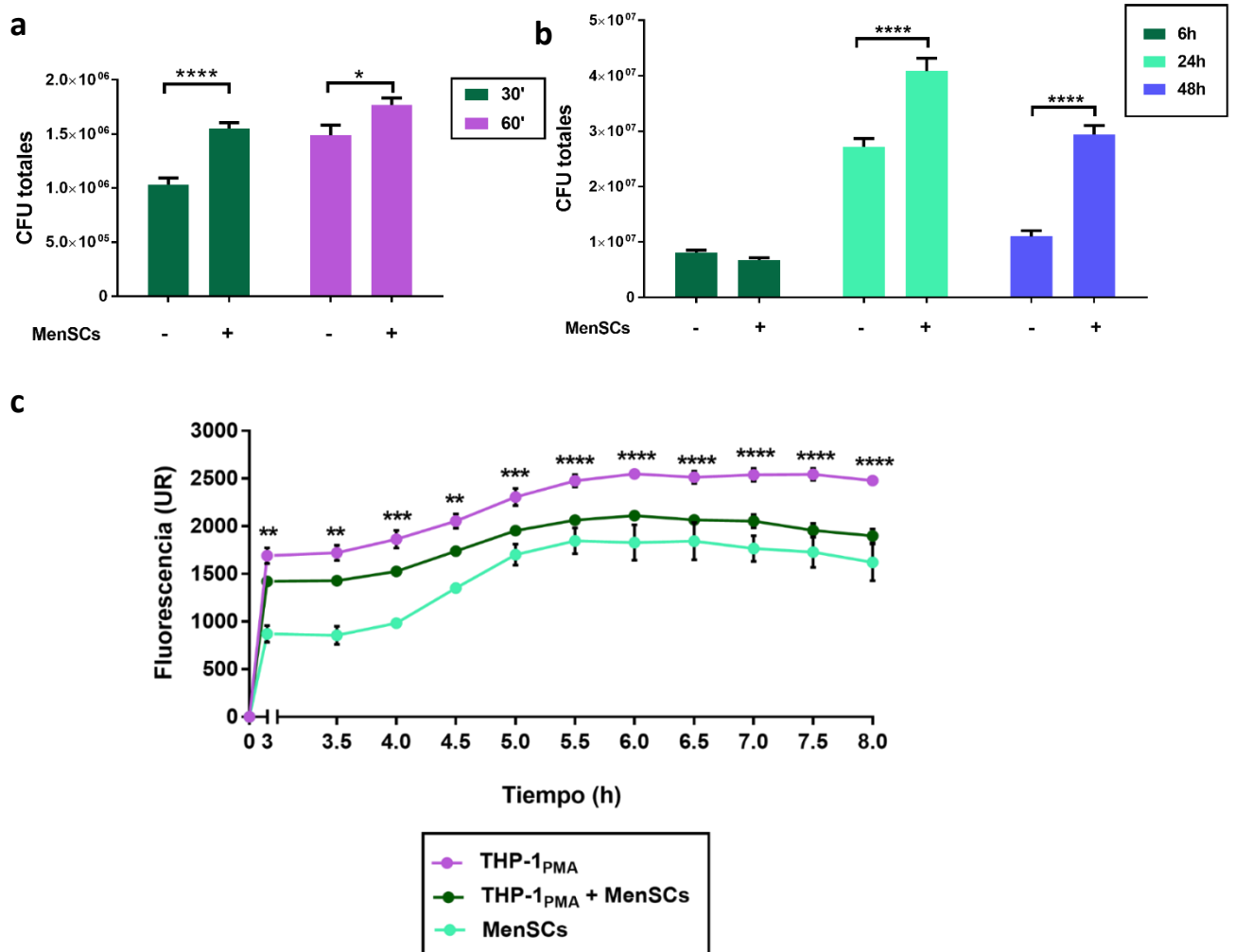
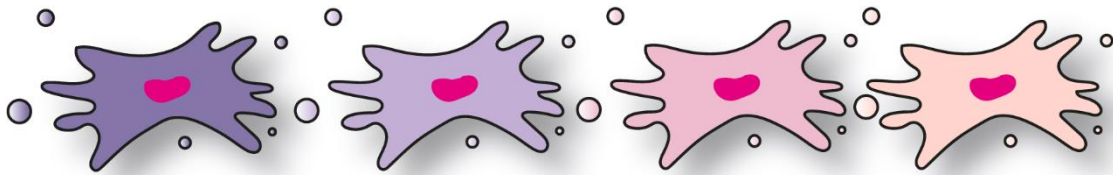


Figura 24. Evaluación de las propiedades bactericidas de las THP-1_{PMA} cocultivadas con MenSCs.

(a) Capacidad fagocítica de las THP1_{PMA} tras la exposición a *Salmonella SseB* durante 30 y 60 min previa incubación en ausencia o presencia de MenSCs. (b) Ensayo de aclaramiento de bacterias con gentamicina que refleja la secuencia temporal de eliminación de *SseB* (determinada a las 6h, 24h y 48h) tras 60 minutos de incubación con bacteria. En ambos experimentos (a, b) el cocultivo con MenSCs se realiza durante 48h, previamente a la exposición a la bacteria, mediante cámara *Transwell*. (c) Producción de H₂O₂ *in vitro* medida en virtud del grado de oxidación de DCFDA. En este experimento, las MenSCs se cocultivan de forma directa con las THP1_{PMA} durante 48h. Los resultados aparecen representados como la media ± SEM, procedentes 3-6 líneas distintas de MenSCs (n= 3-10 replicados por grupo experimental). *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001, ****p<0.0001. CFU: unidades formadoras de colonias, UR: unidades relativas.

Discusión



La proyección terapéutica de las MenSCs es innegable. Características como su enorme disponibilidad o la facilidad en su aislamiento mediante procedimientos no invasivos, las sitúan en primera fila como fuente de MSCs para su uso en terapia celular. Aunque, de forma general, las propiedades inmunomoduladoras de las MenSCs resultan prometedoras, el alcance de sus efectos en fenómenos de inflamación sigue estando poco caracterizado.

Por este motivo, en la presente tesis doctoral se ha estudiado el efecto que las MenSCs ejercen en el curso de dos modelos de inflamación aguda: un modelo de peritonitis inducida por TGC y un modelo de sepsis inducida por distintas cepas de *Salmonella* Typhimurium. Cada modelo ofrece un contexto inflamatorio particular que nos ha permitido esbozar las particularidades de los efectos inmunomoduladores de las MenSCs sobre poblaciones inmunológicas innatas.

Inmunomodulación en el modelo de peritonitis

El modelo murino de peritonitis inducida por TGC es considerado un modelo de referencia para estudiar los procesos responsables del reclutamiento de poblaciones inmunitarias innatas y su posible regulación^{198,199}. En este sentido, los resultados aquí presentados confirman que la administración de MenSCs afecta de forma crítica al número y porcentaje de poblaciones inmunitarias reclutadas en un contexto inflamatorio. En particular, llama la atención que la administración de MenSCs 4 h después del TGC, reduce la población de macrófagos, mientras que los neutrófilos aumentan de forma acusada (Figura 3a, Figura 4b). Puesto que en esta condición experimental la administración de MenSCs tiene lugar durante el pico máximo de reclutamiento de neutrófilos^{198,199}, los resultados obtenidos sugieren que su administración podría estar favoreciendo la permanencia de los neutrófilos en el peritoneo. Una de las hipótesis barajadas es que este aumento en la proporción de neutrófilos podría producirse tanto por (i) la promoción del reclutamiento de neutrófilos como por (ii) la extensión de su vida útil, inhibiendo así el subsiguiente reclutamiento de macrófagos.

La citoquina IL-8 es considerada una de las principales quimioquinas responsables de la quimiotaxis de neutrófilos, junto con otros mediadores como IL-6, GM-CSF y MIF²¹⁷. La bibliografía existente confirma que las MenSCs expresan y secretan IL-6 e IL-8 de forma constitutiva^{127,131,136,144,146,181}. De hecho, vemos que el tratamiento de MenSCs con TGC *in vitro* incrementa la expresión de ambas citoquinas (Figura 15). Por otra parte, MSCs procedentes de otras fuentes han demostrado alargar la vida útil de los neutrófilos mediante la secreción de IL-6^{45,218}. No obstante, sería de gran interés estudiar el efecto de las MenSCs sobre la protección de los neutrófilos frente a la apoptosis. En este contexto, tanto la IL-6 como la IL-8 secretadas por las MenSCs podrían ser responsables de los efectos inmunomoduladores observados sobre la población de neutrófilos.

Por otra parte, cuando las MenSCs son inyectadas en los inicios del descenso de neutrófilos (24h), fenómeno que coincide temporalmente con el reclutamiento de macrófagos^{198,199}, el recuento celular peritoneal se ve reducido. Esta disminución afecta especialmente al número y porcentaje de macrófagos (Figura 3a, Figura 4b). En otros modelos de inflamación, como el de peritonitis inducida por *zymosan*, la administración de BM-MSCs también ha demostrado reducir el recuento celular peritoneal mediante la secreción del mediador antiinflamatorio TSG-6²¹⁹. El aumento de los niveles de expresión de TSG-6 en MenSCs tras su estimulación *in vitro* con TGC sugiere una posible implicación de este factor en nuestro modelo TGC, por lo que futuros estudios enfocados en su sobreexpresión/silenciamiento en MenSCs podrían ser útiles para entender como estas células llevan a cabo la modulación del reclutamiento de las poblaciones peritoneales.

Curiosamente, la reducción de macrófagos en este protocolo coincide con la aparición de agregados peritoneales en la cavidad abdominal del ratón (Figura 6). Estas estructuras presentan una distribución celular particular, con un estroma interior laxo poblado de macrófagos y algunas MenSCs, y una acumulación periférica de macrófagos y neutrófilos. Creemos que la presencia de estos agregados es, en gran parte, responsable de la reducción dramática de macrófagos en el lavado peritoneal, ya que suponen el principal componente

celular de dichas estructuras. Adicionalmente, aunque no es significativa, la tendencia a la baja observada en el porcentaje de neutrófilos podría relacionarse también con su acumulación periférica en los agregados.

Como ya se ha descrito en la introducción, una de las propiedades intrínsecas de las MenSCs es su capacidad de migración a tejidos dañados^{109,112,118,120,121,127,147}. Por ello, nuestra hipótesis es que, una vez inyectadas, las MenSCs podrían reconocer el entorno inflamatorio y emplear el tejido adiposo peritoneal como andamiaje para reclutar y modular las poblaciones inmunológicas. La expresión de IL-6 y sobre todo IL-8 en los agregados peritoneales, así como en las MenSCs tratadas con TGC *in vitro* parecen apoyar esta suposición.

La distribución de los macrófagos en los agregados indica que su reclutamiento podría ser tanto local –macrófagos localizados en la periferia– como por vía sanguínea –macrófagos rodeando vasos sanguíneos en la parte interna– (Figura 9). Creemos que las propias MenSCs inyectadas podrían establecer “un diálogo” con los macrófagos a través de la secreción de distintas quimioquinas que provoque la formación de los agregados. En la bibliografía podemos encontrar evidencias de la capacidad de MSCs de otros tejidos para reclutar monocitos y macrófagos a través de CCL2²¹⁷ y, puesto que las MenSCs expresan de forma constitutiva esta quimioquina¹²⁷ y hemos detectado su expresión en los agregados, sería interesante estudiar en mayor detalle su implicación en este modelo. Tampoco podemos descartar la posible participación de CCL5, otra quimioquina responsable del reclutamiento de macrófagos y monocitos que, a pesar de no ser detectada en la mayoría de los agregados, presenta un incremento en su expresión en las MenSCs tratadas *in vitro* con TGC. Por último, la expresión en los agregados de la enzima responsable de la síntesis de PGE₂, un mediador que ha sido asociado con la quimiotaxis de macrófagos²²⁰, podría indicar su participación en la formación de estas estructuras. Es importante destacar que, en línea con otros estudios en MenSCs^{153,181}, IL-10 no parece participar en este modelo como agente mediador de sus propiedades inmunomoduladoras.

Aunque la aparición de agregados peritoneales tras la administración de MenSCs no ha sido descrita con anterioridad, sí se han observado estructuras similares con otras fuentes de MSCs. En 2015, Sala y col. detectaron agregados peritoneales tras la administración de AD-MSCs humanas o BM-MSCs de ratón en un modelo murino de colitis²⁰⁹. En sus condiciones experimentales, la presencia de agregados peritoneales ocurría tanto en ratones sanos como en ratones con colitis, a diferencia de nuestro modelo en el que la formación de los agregados por parte de las MenSCs necesita del estímulo proinflamatorio previo generado por la administración de TGC. Este hallazgo reforzaría la hipótesis de considerar a las MenSCs como células sensoras del microambiente, generando una modulación de la respuesta inmunológica acorde a las necesidades homeostáticas, pro- o antiinflamatorias del momento.

Sala y col. consideraron la posibilidad de que los agregados peritoneales funcionaran como una estructura linfoide terciaria (TLS) capaz de ejercer funciones antiinflamatorias²⁰⁹. Las TLS son estructuras ectópicas similares a los órganos linfoides secundarios que aparecen en contextos inflamatorios, enfermedades autoinmunes y cáncer. El hecho de que su aparición sea positiva o negativa para la resolución de la inflamación sigue siendo objeto de controversia²⁰⁸. Estructuralmente, muestran una compartimentación espacial de las zonas de células B y T, induciendo incluso funciones efectoras en estas células. Los mecanismos reguladores del desarrollo inicial y mantenimiento de las TLS no han sido perfilados de forma concreta, pero existe cierto consenso en torno al papel crucial que podrían desempeñar las quimioquinas CXCL13, CCL21, CXCL12 y CCL19, secretadas por las células organizadoras del tejido linfoide (LTos)^{207,208}.

En nuestro modelo, los agregados peritoneales generados difieren en su estructura de los descritos hasta ahora y de la propia definición de las TLS. En primer lugar, nuestros agregados no albergan células T ni B (Figura 11) ni tampoco expresan, en la mayoría de los casos, las quimioquinas necesarias para la inducción y el mantenimiento de las TLS, como CCL19, CCL21 y CXCL13

(Figura 13). Estos resultados descartarían la posibilidad de considerar a los agregados como TLS.

Por otra parte, existe numerosa bibliografía que describe la capacidad de las MSCs para, en condiciones inflamatorias, adquirir propiedades características de LTos tanto en tejidos linfoides secundarios como en TLS^{207,208,221-223}. Además, la quimioquina CXCL12, implicada también en fenómenos de neogénesis linfoide y TLS, se expresa de forma constitutiva en MenSCs^{153,173,176} y podría estar relacionada con limitar el infiltrado inflamatorio de forma localizada¹⁷⁶. Queremos, por tanto, estudiar en un futuro los niveles de expresión de CXCL12 en nuestros agregados y su papel en la formación de estas estructuras peritoneales autoorganizadas y compuestas por células inmunológicas innatas para esclarecer, si CXCL12 es partícipe, el modo de acción terapéutico de las MenSCs.

El hecho de que solo aparezcan estos agregados cuando las MenSCs se inyectan en los inicios de reclutamiento de macrófagos recuerda a algunas patologías en las que ambos tipos celulares se postulan como responsables de las mismas. Es el caso de la endometriosis²²⁴, donde pueden generarse quistes ováricos, peritoneales e incluso cerebrales²²⁵, compuestos por tejido endometrial y macrófagos²²⁶. En este sentido hemos visto que, una vez administradas, las MenSCs no solo se encuentran en los agregados peritoneales, sino que migran a otras localizaciones como los cuernos uterinos y los ganglios mesentéricos (Figura 14). Este primer destino puede guardar relación con su papel en el mantenimiento y regeneración del endometrio, mientras que su aparición en los ganglios mesentéricos podría relacionarse con un hipotético viraje fenotípico hacia LTos.

Inmunomodulación en el modelo de sepsis

El modelo de peritonitis inducida por TGC puso de manifiesto la importancia de la interacción entre macrófagos y MenSCs, lo que nos llevó a analizar dicha interacción en un contexto más clínico: la inflamación producida como consecuencia de una infección. El modelo murino de sepsis inducida por *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium es particularmente

interesante, puesto que esta bacteria ha desarrollado sistemas de evasión del sistema inmunitario, ofreciendo la posibilidad de distinguir diferentes procesos durante la infección. Así pues, la administración de distintas cepas de *Salmonella* genera en ratón una patología sistémica similar a la fiebre tifoidea¹⁹¹ donde, mediante la coinyección IP de *Salmonella* silvestre (ST) y atenuada (*SseB*), es posible investigar la eficiencia de los mecanismos de defensa del ratón para hacer frente a la infección generada.

En este modelo de sepsis, la administración de MenSCs conlleva de nuevo una reducción del número y porcentaje de macrófagos y neutrófilos reclutados peritonealmente (Figura 16, Figura 17). Ambas células fagocíticas son las responsables del control del grado de replicación bacteriano, por lo que la reducción en su reclutamiento podría favorecer la diseminación del patógeno de forma sistémica. El aumento de la carga peritoneal bacteriana y la mayor diseminación de *Salmonella* a bazo y ganglios mesentéricos parecen apoyar esta hipótesis (Figura 18d). Por otra parte, la incapacidad para eliminar de forma eficaz a los agentes patógenos también puede estar asociada a un cambio fenotípico en la población de macrófagos, pasando de un perfil proinflamatorio a uno regulador. Los macrófagos reguladores se caracterizan por presentar un fenotipo híbrido entre marcadores clásicos de macrófagos de tipo M1 –como iNOS– y M2 –IL-10, arginasa-1– y propiedades bactericidas muy limitadas^{227,228}, siendo su principal función reestablecer la homeostasis del tejido en el que se encuentran^{82,227,229,230}. En nuestro modelo, el análisis del fluido peritoneal revela un incremento en la expresión de iNOS e IL-10 con respecto al grupo control que podría corresponderse con una polarización a macrófagos reguladores como consecuencia de la interacción con las MenSCs. En el caso concreto de *Salmonella* Typhimurium, la replicación intracelular del patógeno se ve potenciada en macrófagos reguladores²³¹, fenómeno que también apoyaría los resultados obtenidos con respecto a la reducción en el control del agente patógeno. Además, la secreción de IL-10 por parte de los macrófagos reguladores puede frenar la migración de los neutrófilos a la zona de daño, apoyando la reducción en el reclutamiento de neutrófilos observada.

Los modelos murinos estudiados en esta tesis doctoral difieren en relación al impacto de las MenSCs sobre el grado de reclutamiento de neutrófilos. En el modelo de peritonitis, la administración de MenSCs produce un incremento en el porcentaje de neutrófilos (Figura 4), mientras que en el de sepsis se detecta una reducción (Figura 17). Lejos de considerar estos resultados una contradicción, creemos que ponen de manifiesto el papel dinámico que presentan las MenSCs respecto a la modulación de la respuesta inmunológica. En el modelo de peritonitis, las MenSCs se enfrentan a un ambiente inflamatorio libre de patógenos en el que la señalización inflamatoria se inicia a través de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)²³². En el modelo de sepsis, en cambio, la señalización depende de PAMPs tanto para la internalización del patógeno²³³ como para la generación de una respuesta bactericida²³⁴ que permita combatir la infección. Estas dos situaciones muestran que ligeras diferencias en la activación de la respuesta inmunitaria inducen respuestas distintas por parte de las MenSCs, y en ambos modelos parecen estar centradas en reducir el daño tisular y promover la homeostasis.

Interacción entre MenSCs y macrófagos humanos

Puesto que la supervivencia de *Salmonella* en el interior del macrófago es crucial para su patogenicidad²¹⁴, decidimos estudiar en mayor detalle el efecto de las MenSCs sobre el fenotipo y las propiedades funcionales de los macrófagos. En este caso, los ensayos fueron llevados a cabo con macrófagos humanos (THP-1_{PMA})²³⁵, intentando así aumentar el grado de aplicabilidad clínica del modelo.

A nivel fenotípico, los ensayos de cocultivo con MenSCs reducen la expresión en superficie de marcadores como CD80 y CD86 (Figura 20), moléculas coestimuladoras implicadas en procesos de presentación antigénica T²³⁶. En otras APCs, como las células dendríticas, el cocultivo con MenSCs también reduce la expresión CD80 y CD86¹⁸¹. Lo mismo ocurre con el marcador CD16 (Figura 20), propio de monocitos proinflamatorios²³⁷, y también relacionado con procesamiento y presentación de antígenos a células T. Esta reducción de las moléculas implicadas en fenómenos de presentación antigénica podría

indicar una transición a un fenotipo más regulador²³⁸, sin embargo, al analizar marcadores de superficie clásicos para M2 (CD206, DC-SIGN, CD163) no encontramos un aumento en su expresión. Además, los niveles de ARNm tras el cocultivo indican un incremento en la expresión tanto de marcadores M₁ (CXCL10) como M₂ (CD163) (Figura 22), hecho que dificulta poder situar a las THP-1 tratadas con MenSCs dentro del espectro M₁-M₂.

Aunque el uso de THP-1 para el estudio de fenómenos de activación y polarización de macrófagos *in vitro* está ampliamente estandarizado^{215,239,240}, no siempre reproducen de forma equivalente el fenotipo observado en macrófagos derivados de monocitos procedentes de sangre periférica (MDMs)²⁴¹. De hecho, mientras que la polarización a M₁ parece ser bastante reproducible, es en la transición a M2 donde suelen fracasar al no mostrar la expresión de marcadores de superficie como CD206 y CD163²⁴¹. En nuestros experimentos, la polarización de THP-1 hacia fenotipo M₂ por la acción de IL-4 tampoco ha culminado en la expresión de dichos marcadores (Figura 20). La repetición de estos experimentos de cocultivo con MDMs nos podría ayudar a esclarecer los posibles cambios fenotípicos que las MenSCs producen en las poblaciones de macrófagos.

En relación a CD14 y CD11b, marcadores que determinan la transición de monocito a macrófago^{235,238} observamos un perfil de expresión dispar. El porcentaje de expresión de CD11b disminuye, mientras que el de CD14 se mantiene pero varía su intensidad de fluorescencia, aumentando de forma significativa la proporción de células CD14^{high} (Figura 20). En la bibliografía, se describe la capacidad de los macrófagos para internalizar bacterias gramnegativas mediante un mecanismo dependiente de CD14²⁴², fenómeno que podría explicar tanto el incremento de la población CD14^{high} como el aumento del grado de internalización bacteriana por parte de las THP-1 tras el cocultivo con MenSCs (Figura 24a). Además, esta potenciación de la actividad fagocítica ha sido descrita empleando MSCs de distintos orígenes^{81,82,230}, apoyando la posible capacidad de las MenSCs para modular las propiedades funcionales de los macrófagos.

Los experimentos de estimulación de THP-1 con LPS previo cocultivo con MenSCs han permitido analizar el efecto que el condicionamiento con MenSCs puede tener sobre una posterior activación de las THP-1. A nivel de ARNm, el cocultivo con MenSCs incrementa la expresión de IL-10 reforzando la hipótesis de la transición a un fenotipo regulador^{82,227-230} sugerida en los experimentos *in vivo* (Figura 18a). En modelos de colitis, el mediador antiinflamatorio TSG-6 secretado por MSCs promueve la expansión de macrófagos reguladores^{209,229} y, dado que las MenSCs lo expresan de forma constitutiva y su expresión aumenta con el tratamiento con LPS (Figura 23b), sería interesante confirmar su papel tanto en la modulación de THP-1 en condiciones inflamatorias como en el modelo *in vivo*.

Por otra parte, el cocultivo también reduce los niveles del receptor de reconocimiento de patrones (PRR) TLR-2, responsable del reconocimiento de componentes de bacterias grampositivas, como las lipoproteínas²⁴³. Aunque se ha descrito la modulación negativa de TLR-2 mediante TSG-6²¹⁹, se requieren ensayos de estimulación simultánea de MenSCs y THP-1 con LPS para confirmar su implicación en nuestro modelo *in vitro*.

Si nos centramos en los ensayos funcionales para estudiar el grado de efectividad de las THP-1 en bloquear la replicación intracelular de *Salmonella*, estos confirman una actividad bactericida deficiente, donde el número de bacterias viables recuperadas es significativamente superior en el grupo experimental que ha sido cocultivado con MenSCs (Figura 24b). Por tanto, a pesar de que el tratamiento con MenSCs aumenta la capacidad fagocítica de los macrófagos humanos, esto no parece traducirse en un mayor aclaramiento bacteriano. Además, estos resultados permiten hipotetizar que, en el modelo *in vivo* de sepsis, la administración de MenSCs no solo podría afectar al grado de reclutamiento de los fagocitos murinos, sino también a la efectividad de sus mecanismos bactericidas.

En la infección por *Salmonella*, la generación de ROS es fundamental para controlar eficazmente el grado proliferación intracelular y supervivencia de las distintas cepas²⁴⁴⁻²⁴⁷. Cuando las células THP-1 se cocultivan de forma

directa con MenSCs, la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se reduce de forma significativa (Figura 24c), lo que nos lleva a concluir que el déficit en su actividad bactericida se debe en gran parte a una disminución en la generación de ROS en respuesta al estímulo bacteriano. Puesto que la eliminación temprana de *Salmonella* recae fundamentalmente en la acción de la enzima NADPH oxidasa²⁴⁶, sería muy informativo analizar las concentraciones de su producto (anión superóxido, $O_2\cdot^-$), en nuestro diseño experimental.

En conjunto, los resultados obtenidos del modelo de sepsis sugieren que el efecto inmunomodulador de las MenSCs se centraría en mitigar la respuesta inflamatoria tanto por la reducción en el reclutamiento de fagocitos como por la reprogramación de los macrófagos a un fenotipo de carácter más regulador y con menor capacidad bactericida. Esto se traduce en un fallo en el control de la infección que favorece la diseminación bacteriana y por tanto agrava el cuadro clínico de septicemia.

Uso terapéutico de las MenSCs en inflamación

Otros investigadores también han empleado MenSCs como estrategia terapéutica frente a la sepsis^{135,145,176}, obteniendo resultados similares en cuanto al grado de infiltración inflamatoria local. Es el caso del modelo de endotoxemia inducida por LPS tanto a nivel peritoneal¹⁷⁶ como pulmonar¹³⁵, donde la administración de MenSCs reduce el número de células reclutadas en peritoneo y en el fluido broncoalveolar respectivamente. Esta reducción en el infiltrado inflamatorio se acompaña de una mejora clínica que contrasta con nuestros resultados. Sin embargo, este modelo carece de un agente patógeno viable que requiera ser eliminado una vez el proceso inflamatorio hiperagudo inicial esté bajo control.

El modelo de punción y ligación cecal (CLP) empleado por Alcayaga-Miranda y col.¹⁴⁵, se asemeja más fielmente a un proceso de septicemia, donde además de la fase proinflamatoria, es necesario controlar la replicación de bacterias viables responsables del foco infeccioso. En este trabajo, la administración de MenSCs no solo reduce la sobreestimulación inflamatoria sino que mejora la supervivencia de los ratones e incluso reduce su carga bacteriana a nivel

peritoneal¹⁴⁵. Quizá, la disparidad con nuestros resultados pueda ser justificada por diferencias en la cepa murina y el tipo de bacteria empleada. En nuestro modelo de sepsis utilizamos ratones BALB/c, considerados una cepa de respuesta Th₂ que presenta mayor dificultad para eliminar bacterias intracelulares tanto *in vitro* como *in vivo*²⁴⁸. Alcayaga-Miranda y col., en cambio, hacen uso de la cepa C57BL6/j que presenta predisposición a Th₁ y por tanto puede favorecer la eliminación efectiva de los agentes patógenos²⁴⁸. Esta predisposición a Th₁/Th₂ podría condicionar el ambiente inflamatorio concreto en el que las MenSCs se encuentran una vez administradas y por tanto su respuesta. Además, en el modelo de CLP se trabaja con bacterias comensales propias del ciego del ratón, cuyo mecanismo de replicación es extracelular²⁴⁹. Por el contrario, nuestro modelo hace uso de distintas cepas de *Salmonella*, una bacteria que se multiplica intracelularmente en fagosomas modificados²⁵⁰.

En el mismo trabajo¹⁴⁵, Alcayaga-Miranda y col. demostraron *in vitro* que el péptido microbicida hepcidina podría estar implicado en los efectos microbicidas ejercidos por las MenSCs. El hecho de que la incubación *in vitro* de MenSCs con *Salmonella* estimule su propia generación de especies reactivas de oxígeno (Figura 24c) y se produzca un aumento en la expresión de TLRs y citoquinas inflamatorias en respuesta a LPS (Figura 23b), apoya la hipótesis de un posible efecto microbicida por parte de las MenSCs. Sin embargo, la reducción en el reclutamiento de macrófagos tanto en el modelo de peritonitis como en el de sepsis, junto con la reprogramación *in vitro* de macrófagos humanos cocultivados con MenSCs, consolidan la hipótesis de considerar a las MenSCs como moduladores claves de la inflamación no tanto por sus propiedades microbicidas como por su acción directa sobre las poblaciones inmunológicas innatas.

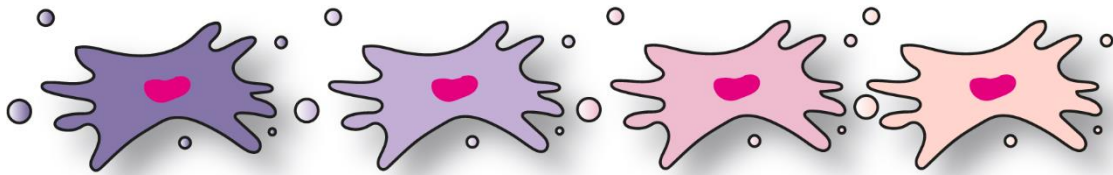
Comentario final

El trabajo presentado en esta tesis doctoral ofrece resultados preliminares con respecto a las propiedades inmunomoduladoras de las MenSCs en aquellos modelos donde el papel de las poblaciones inmunológicas innatas tiene un gran peso. La determinación de los mediadores responsables

de estos efectos y las vías moleculares implicadas son tareas todavía pendientes y, en este sentido, vemos que moléculas como IL-6, IL-8, CCL2, CCL5, CXCL12, PGE₂ y TSG-6 son posibles candidatas para futuros estudios funcionales. Por otro lado, nuestros resultados demuestran que el papel de la MenSCs es sensible a distintas condiciones medioambientales, como señales proinflamatorias estériles o la presencia de agentes bacterianos. También cabe resaltar que, la formación de agregados peritoneales en el modelo de peritonitis inducida por TGC, se muestra como un modelo válido para el estudio de situaciones patológicas como la endometriosis y el cáncer, donde macrófagos y células estromales – y la interacción entre ambos – son actores fundamentales y responsables de dichas patologías.

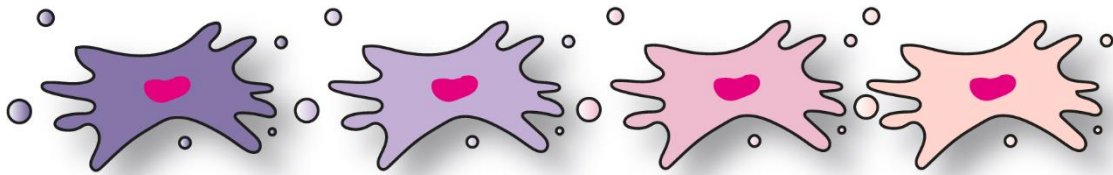
En resumen, este trabajo confirma en los dos modelos murinos estudiados que las MenSCs son células sensibles al microambiente, capaces de interactuar con poblaciones celulares locales para favorecer la resolución de la inflamación.

Conclusiones



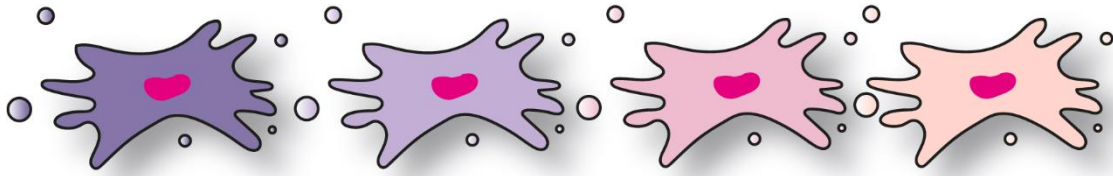
1. En el modelo de peritonitis inducida por TGC, la administración de MenSCs altera el número y porcentaje de macrófagos y neutrófilos reclutados hacia el peritoneo. Esta alteración en la población peritoneal varía en función del momento o contexto inflamatorio de administración de las MenSCs.
2. En el modelo de peritonitis inducida por TGC, las MenSCs administradas intraperitonealmente en el momento de reclutamiento de macrófagos, migran específicamente hacia los ganglios mesentéricos y cuernos uterinos del ratón, además de formar agregados peritoneales, donde se encuentran asociadas junto a macrófagos y neutrófilos.
3. Las MenSCs muestran un cambio en perfil de citoquinas como consecuencia del efecto del TGC, aumentando tanto la expresión de genes quimioatrayentes de leucocitos como de mediadores antiinflamatorios.
4. En el modelo de sepsis inducida por *Salmonella* Typhimurium, la administración de MenSCs reduce el número y porcentaje de fagocitos reclutados hacia el peritoneo, mermando la capacidad microbiciada y el ambiente inflamatorio lo que contribuye a potenciar el grado de diseminación bacteriana.
5. Las MenSCs modulan el fenotipo de macrófagos humanos hacia un perfil intermedio próximo a M2, incrementan su capacidad fagocítica y reducen su capacidad microbiciada y de producción de especies reactivas de oxígeno.

Conclusions



1. In the TGC-elicited peritonitis model, MenSCs administration alters the number and percentage of macrophages and neutrophils recruited to the peritoneum. The alteration in the peritoneal population observed varies depending on the MenSCs administration timepoint and the particular inflammatory context at the time of MenSCs administration.
2. In the TGC-elicited peritonitis model, MenSCs administered intraperitoneally at the time of macrophage recruitment migrate specifically to the mesenteric nodes and murine uterine horns. Additionally, they form peritoneal aggregates, which harbour macrophages and neutrophils.
3. MenSCs display changes in their cytokine profile after treatment with TGC, increasing both the expression of leukocyte-chemoattracting genes and anti-inflammatory mediators.
4. In the *Salmonella* Typhimurium-induced sepsis model, MenSCs administration reduces the number and percentage of phagocytes recruited towards the peritoneum, impairing their microbicidal capacity and diminishing the inflammatory environment, which in turn contributes to increase bacterial dissemination.
5. MenSCs reshape the phenotype of human macrophages towards an intermediate profile close to M2. They also increase macrophage phagocytic capacity but impair their microbicidal and reactive oxygen species production ability.

Índice tablas y figuras



Ilustraciones

- **Ilustración 1. Criterios fenotípicos y funcionales que deben cumplir las MSCs humanas para ser consideradas como tales 2**
- **Ilustración 2. Efecto de las MSCs sobre la población celular T 7**
- **Ilustración 3. Efecto de las MSCs sobre la población celular B 8**
- **Ilustración 4. Controversia acerca del efecto de las MSCs sobre células NK. ... 9**
- **Ilustración 5. Efecto de las MSCs sobre los neutrófilos..... 10**
- **Ilustración 6. Efecto de las MSCs sobre la diferenciación de monocitos a macrófagos y células dendríticas 11**
- **Ilustración 7. Efecto de las MenSCs sobre la población celular T 35**
- **Ilustración 8. Efecto de las MenSCs sobre la población celular B36**
- **Ilustración 9. Efecto de las MenSCs sobre la diferenciación de monocitos a células dendríticas..... 37**
- **Ilustración 10. Efecto de las MenSCs sobre la polarización de macrófagos ... 38**
- **Ilustración 11. Efecto de las MenSCs sobre las células NK..... 39**
- **Ilustración 12. Esquema resumen del modelo murino de peritonitis inducida por TGC 59**
- **Ilustración 13. Esquema resumen del modelo murino de sepsis monobacteriana 61**

Figuras

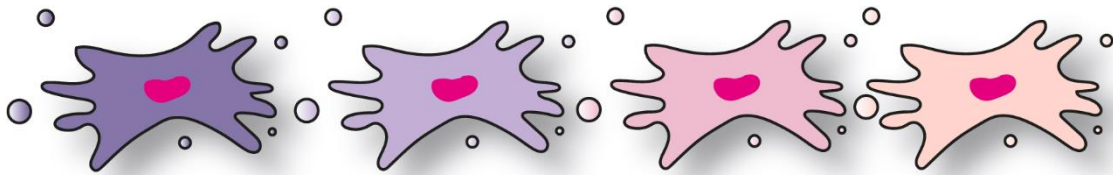
- **Figura 1. Caracterización morfológica e inmunofenotípica de las MenSCs. .. 87**
- **Figura 2. Recuento de células en el lavado peritoneal 89**
- **Figura 3. Fenotipo de las células presentes en el lavado peritoneal (I) 91**
- **Figura 4. Fenotipo de las células presentes en el lavado peritoneal (II)..... 93**
- **Figura 5. Niveles de expresión de citoquinas en el fluido peritoneal..... 95**
- **Figura 6. Localización y morfología de los agregados peritoneales..... 97**
- **Figura 7. Tinción histológica de los agregados peritoneales 98**
- **Figura 8. Presencia y distribución de leucocitos en los agregados peritoneales101**
- **Figura 9. Presencia y distribución de macrófagos en los agregados peritoneales 102**
- **Figura 10. Presencia y distribución de neutrófilos en los agregados peritoneales 103**
- **Figura 11. Presencia y distribución de linfocitos en los agregados peritoneales 104**
- **Figura 12. Presencia y distribución de células humanas en los agregados peritoneales 105**
- **Figura 13. Perfil de expresión de mediadores en los agregados peritoneales 107**
- **Figura 14. Presencia de citocromo b humano en distintos órganos de interés 109**
- **Figura 15. Niveles de expresión de factores quimiotácticos e inmunorreguladores por parte de las MenSCs tras el tratamiento con TGC. 111**
- **Figura 16. Recuento celular y fenotipo de las poblaciones presentes en el lavado peritoneal 114**
- **Figura 17. Proporción de las poblaciones presentes en el lavado peritoneal 115**
- **Figura 18. Parámetros indicativos de septicemia..... 118**
- **Figura 19. Efecto de las MenSCs sobre el grado de proliferación de THP-1_{PMA} 120**
- **Figura 20. Caracterización fenotípica de THP1_{PMA} cocultivadas con MenSCs122**
- **Figura 21. Caracterización, en THP1_{PMA}, de los marcadores CD14, CD163 y CD206 mediante microscopía confocal123**

- **Figura 22. Expresión relativa de ARNm de distintos marcadores en THP1_{PMA} cocultivadas con MenSCs..... 124**
- **Figura 23. Perfil de expresión de genes relacionados con inflamación en THP-1_{PMA} y MenSCs estimuladas con LPS127**
- **Figura 24. Evaluación de las propiedades bactericidas de las THP-1_{PMA} cocultivadas con MenSCs..... 130**

Tablas

- **Tabla 1. Recopilación de los factores paracrinos más representativos secretados por las MSCs 5**
- **Tabla 2. Caracterización fenotípica de las MenSCs en la literatura17**
- **Tabla 3. Heterogeneidad en la nomenclatura de las MenSCs21**
- **Tabla 4. Potencial de diferenciación de las MenSCs. 25**
- **Tabla 5. Recopilación sobre el uso de MenSCs en modelos preclínicos 31**
- **Tabla 6. Ventajas y limitaciones de los principales modelos experimentales de sepsis 42**
- **Tabla 7. Listado de anticuerpos empleados para la caracterización fenotípica de las MenSCs mediante citometría de flujo 63**
- **Tabla 8. Listado de anticuerpos empleados para la caracterización fenotípica de las poblaciones peritoneales de ratón mediante citometría de flujo.....64**
- **Tabla 9. Listado de anticuerpos empleados para la caracterización de la plasticidad fenotípica de las células THP-1_{PMA} mediante citometría de flujo .. 65**
- **Tabla 10. Listado de anticuerpos empleados para el análisis de los agregados peritoneales mediante microscopía confocal69**
- **Tabla 11. Listado de anticuerpos empleados para la caracterización de la plasticidad fenotípica de las THP-1_{PMA} mediante microscopía confocal70**
- **Tabla 12. Lista de oligonucleótidos utilizados para el análisis transcriptómico mediante PCR cualitativa. 77**
- **Tabla 13. Lista de oligonucleótidos utilizados para el análisis transcriptómico mediante PCR cuantitativa 80**

Abreviaturas



- **Actb**: gen codificante de la β -actina en ratón
- **AD-MSCs**: MSCs procedentes/derivadas de tejido adiposo
- **ADN**: ácido desoxirribonucleico
- **ADNc**: ADN complementario
- **AF**: alexa flúor.
- **AMV**: virus de la mieloblastosis aviar
- **Ang**: angiopoyetina
- **APC**: aloficocianina
- **APCs**: células presentadoras de antígenos
- **APRIL**: ligando inductor de la proliferación
- **ARN**: ácido ribonucleico
- **ARNm**: ARN mensajero
- **ATTC**: «American Type Culture Collection»
- **BAFF**: factor activador de células B
- **Bax**: proteína x asociada a Bcl-2
- **Bcl-2**: «B cell lymphoma 2»
- **Bcl-xL**: «B cell lymphoma extra large»
- **BD**: «Becton, Dickinson and Company»
- **BM-MSCs**: MSCs procedentes/derivadas de médula ósea
- **Breg**: células B reguladoras
- **BSA**: albúmina sérica bovina
- **C**: control negativo
- **C⁺**: control positivo
- **CCL18**: quimioquina 13 con motivo CC.
- **CCL19**: quimioquina 19 con motivo CC.
- **CCL2**: quimioquina 2 con motivo CC. También conocida como MCP-1.
- **CCL21**: quimioquina 21 con motivo CC.
- **CCL5**: quimioquina 5 con motivo CC. También conocida como RANTES.
- **CCR1**: receptor de quimioquinas CC tipo 1
- **CCR4**: receptor de quimioquinas CC tipo 4
- **CCR7**: receptor de quimioquinas CC tipo 7

- **CCR9:** receptor de quimioquinas CC tipo 9
- **CEEA-OH:** Comité de Ética de Experimentación Animal y Órgano Habilitado de la UGR.
- **CEIH:** Comité de Ética en Investigación Humana de la UGR.
- **CFSE:** éster de succinimidil-carboxifluoresceína
- **CFU:** «colony-forming units» o unidades formadoras de colonias
- **CIC-CIBM:** Centro de Instrumentación Científica. Sede localizada en el Centro de Investigación Biomédica.
- **CLP:** modelo de punción y ligación de cecal
- **CO₂:** dióxido de carbono
- **Col.:** colaboradores
- **COX-2:** ciclooxigenasa 2. Codificada por el gen *PTGS2* en humano.
- **CT:** «cycle treshold» o ciclo umbral
- **CXCL1:** quimioquina 1 con motivo CXC. También conocida como GRO- γ .
- **CXCL10:** quimioquina 10 con motivo CXC.
- **CXCL12:** quimioquina 12 con motivo CXC. También conocida como SDF-1.
- **CXCL13:** quimioquina 13 con motivo CXC.
- **CXCL15:** quimioquina homóloga de IL-8 humana en ratón.
- **CXCL8:** interleuquina 8.
- **CXCR4:** receptor de quimioquinas CXC tipo 4
- **CXCR5:** receptor de quimioquinas CXC tipo 5
- **CXCR6:** receptor de quimioquinas CXC tipo 6
- **DAMPs:** patrones moleculares asociados a daño
- **DC1:** células dendríticas proinflamatorias/ de tipo 1
- **DC2:** células dendríticas antiinflamatorias/de tipo 2
- **DCF:** diclorofluoresceína
- **DCFDA:** diacetato de 2',7'- diclorofluoresceína
- **DC-SIGN:** «dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin»
- **DEPC:** dietilpirocarbonato
- **DNAsa I:** desoxirribonucleasa I

- **dNTP:** desoxinucleótidos trifosfato
- **DO:** densidad óptica
- **DP-MSCs:** MSCs procedentes/derivadas de pulpa dental
- **EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- **eMSCs:** MSCs endometriales
- **EP2:** receptor 2 de prostaglandina E2. Codificada por el gen *PTGER2* en humano.
- **EpCAM:** molécula de adhesión celular epitelial
- **FBS:** suero bovino fetal
- **FGF-2:** factor de crecimiento fibroblástico 2
- **FITC:** isotiocianato de fluoresceína,
- **Foxp3:** «forkhead box P3»
- **GAPDH:** gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
- **GFAP:** proteína ácida fibrilar de la glía
- **GRO-γ:** oncogén regulado por crecimiento gamma. También conocido como CXCL1.
- **H&E:** hematoxilina y eosina
- **H₂O₂:** peróxido de hidrógeno
- **HEPES:** ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
- **HGF:** factor de crecimiento hepatocítico
- **HLA:** antígeno leucocitario humano
- **HLA-Gs:** antígeno leucocitario humano G soluble
- **HO-1:** hemooxigenasa 1
- **hTERT:** telomerasa retrotranscriptasa humana
- **HUVECs:** células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
- **IC:** intracardiaca
- **ICAM:** molécula de adhesión intercelular
- **ICB:** intracerebral
- **ICSI:** inyección intracitoplasmática de espermatozoides
- **ID:** identificador
- **ID:** intradérmica
- **IDO:** indolamina 2,3 dioxigenasa

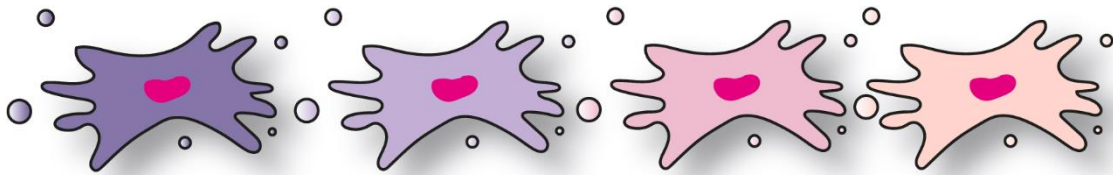
- **IE:** intraesplénica
- **IFN- γ :** interferón gamma
- **IgA:** inmunoglobulina A
- **IGF-1R:** receptor para el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1. También conocido como CD221.
- **IgG:** inmunoglobulina G
- **IgM:** inmunoglobulina M
- **IL-10:** interleuquina 10
- **IL-12:** interleuquina 12
- **IL-15:** interleuquina 15
- **IL-17:** interleuquina 17
- **IL-1 β :** interleuquina 1 beta
- **IL-2:** interleuquina 2
- **IL-22:** interleuquina 22
- **IL-4:** interleuquina 4
- **IL-6:** interleuquina 6
- **IL-8:** interleuquina 8. También conocida como CXCL8.
- **IM:** intramuscular
- **iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible. Codificada por el gen *Nos2* en ratón.
- **IP:** intraperitoneal, intraperitonealmente
- **iPSCs:** células pluripotentes inducidas
- **ISCT:** Sociedad Internacional de Terapia Génica y Celular
- **IV:** intravenosa
- **IVB:** intravertebral
- **JJAA:** Junta de Andalucía
- **KGF:** factor de crecimiento queratinocítico
- **LB:** Luria-Bertani
- **LPS:** lipopolisacárido
- **LTos:** células organizadoras de tejido linfoide
- **M1:** macrófagos proinflamatorios

- **M2:** macrófagos antiinflamatorios
- **MCP-1:** proteína quimiotáctica de monocitos 1
- **MDMs:** monocitos procedentes de sangre periférica
- **MenSCs:** células endometriales estromales procedentes/derivadas de sangre menstrual
- **MgCl₂:** cloruro de magnesio
- **MIF:** factor inhibidor de la migración de macrófagos
- **MLR:** cultivos mixtos de linfocitos
- **MOI:** «multiplicity of infection» o multiplicidad de infección
- **MSCs:** células estromales mesenquimales multipotentes
- ***MT-CYB*:** gen del citocromo b humano
- ***Mt-Cytb*:** gen del citocromo b murino
- **n:** número de replicados biológicos por condición experimental
- **NCTC:** «National Collection of Type Cultures»
- **NFW:** «nuclease-free water» o agua libre de nucleasas
- **NK:** células «natural killer»
- **NO:** óxido nítrico
- ***Nos2*:** «nitric oxide synthase 2». Gen codificante de iNOS en ratón.
- **O.C.T:** «optimal temperature cutting» o temperatura óptima de corte
- **o/n:** «overnight» o toda la noche
- **OCT-4:** factor de transcripción de unión a octámero 4
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **OVA:** ovoalbúmina
- **PAMPs:** patrones moleculares asociados a patógenos
- **pb:** pares de bases
- **PBMCs:** células mononucleares de sangre periférica
- **PBS:** tampón fosfato salino
- **PCNA:** antígeno nuclear de células en proliferación
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **PD-1L:** ligando de muerte programada 1
- **pDC:** células dendríticas plasmacitoides
- **PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas

- **PDGFR- β** : receptor beta para el factor de crecimiento derivado de plaquetas. También conocido como CD140B.
- **PE**: ficoeritrina
- **PFA**: paraformaldehído
- **PGE₂**: prostaglandina E2
- **PHA**: fitohemaglutinina
- **PMA**: forbol 12-miristato 13-acetato
- **PRR**: receptor de reconocimiento de patrones
- ***PTGER2***: «prostaglandin E receptor 2». Gen codificante de EP2 en humano.
- ***PTGES2***: gen codificante de la prostaglandina E sintasa 2 en humano.
- ***PTGS2***: «prostaglandin-endoperoxide synthase 2». Gen codificante de COX-2 en humanos.
- **RANTES**: «regulated on activation, normal T cell expressed and secreted». También conocido como CCL5.
- **RNAsa**: ribonucleasa
- **ROR- γ T**: receptor gamma T huérfano asociado a retinoides.
- **ROS**: especies reactivas de oxígeno
- **rpm**: revoluciones por minuto
- ***Salmonella***: *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium
- **SDF-1**: factor derivado de células estromales tipo 1. También conocido como CXCL12.
- **SDS**: dodecilsulfato sódico
- **SEM**: error estándar de la media
- **SSEA-3**: antígeno embrionario específico de etapa 3
- **SSEA-4**: antígeno embrionario específico de etapa 4
- ***SseB***: cepa *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium atenuada
- **ST**: cepa *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium silvestre
- **TA**: temperatura ambiente
- **TGC**: tioglicolato
- **TGF- β / β 1**: factor de crecimiento transformante beta/beta 1
- **Th1**: linfocitos T cooperadores tipo 1

- **Th17:** linfocitos T cooperadores tipo 17
- **Th2:** linfocitos T cooperadores tipo 2
- **THP-1_{M1}:** células THP-1 polarizadas a macrófagos M1
- **THP-1_{M2}:** células THP-1 polarizadas a macrófagos M2
- **THP-1_{PMA}:** células THP-1 tratadas con PMA para su diferenciación a macrófagos.
- **TLR-2:** receptor «Toll-like» tipo 2.
- **TLR-4:** receptor «Toll-like» tipo 4.
- **TLR-6:** receptor «Toll-like» tipo 6.
- **TLS:** estructuras linfoides terciarias
- **Tm:** temperatura de «melting» o fusión del ADN
- ***TNFAIP6*:** gen codificante de TSG-6 en humano.
- **TNF- α :** factor de necrosis tumoral alfa
- **TRA-1-60:** locus del receptor de linfocitos T alfa
- **Treg:** linfocitos T reguladores
- **TSG-6:** «Tumor necrosis factor stimulated gene-6 protein». Codificada por el gen *TNFAIP6* en humano.
- **UC-MSCs:** MSCs procedentes/derivadas de cordón umbilical
- **UGR:** Universidad de Granada
- **UR:** unidades relativas
- **VCAM:** molécula de adhesión celular vascular
- **VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular
- **γ :** longitud de onda
- **Δ :** incremento

Bibliografía



1. Le Blanc, K. & Mougiakakos, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 383–396 (2012).
2. Chen, L., Qu, J. & Xiang, C. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 1–10 (2019).
3. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 726–736 (2008).
4. Wagner, W. *et al.* Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* **33**, 1402–1416 (2005).
5. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
6. Horwitz, E. M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **7**, 393–395 (2005).
7. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (80-)*. **284**, 143–147 (1999).
8. Heo, J. S. *et al.* Neural transdifferentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on hydrophobic polymer-modified surface and therapeutic effects in an animal model of ischemic stroke. *Neuroscience* **238**, 305–318 (2013).
9. Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J. & Kessler, P. D. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* **105**, 93–98 (2002).
10. Morigi, M. *et al.* Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1794–1804 (2004).
11. Sasaki, M. *et al.* Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J. Immunol.* **180**, 2581–2587 (2008).
12. Phinney, D. G. & Prockop, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells* **25**, 2896–2902 (2007).
13. Horwitz, E. & Dominici, M. How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? *Cytotherapy* **10**, 771–774 (2008).
14. Khubutiya, M. S., Vagabov, A. V., Temnov, A. A. & Sklifas, A. N. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury. *Cytotherapy* **16**, 579–585 (2014).
15. da Silva Meirelles, L., Fontes, A. M., Covas, D. T. & Caplan, A. I.

- Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine and Growth Factor Reviews* vol. 20 (2009).
16. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**, 2739–2749 (2007).
 17. Augello, A., Kurth, T. & De Bari, C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur. Cells Mater.* **20**, 121–133 (2010).
 18. Honczarenko, M. *et al.* Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* **24**, 1030–1041 (2006).
 19. Chen, W. *et al.* CXCR4-transduced mesenchymal stem cells protect mice against graft-versus-host disease. *Immunol. Lett.* **143**, 161–169 (2012).
 20. Kitaori, T. *et al.* Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum.* **60**, 813–823 (2009).
 21. Jin, W. *et al.* Modelling of the SDF-1/CXCR4 regulated in vivo homing of therapeutic mesenchymal stem/stromal cells in mice. *PeerJ* **6**, e6072 (2018).
 22. Golinelli, G. *et al.* Arming mesenchymal stromal/stem cells against cancer: has the time come? *Front. Pharmacol.* **11**, (2020).
 23. Domanska, U. M. *et al.* A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. *Eur. J. Cancer* **49**, 219–230 (2013).
 24. Squillaro, T., Peluso, G. & Galderisi, U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplant.* **25**, 829–848 (2016).
 25. Rehman, J. *et al.* Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109**, 1292–1298 (2004).
 26. Hung, S.-C., Pochampally, R. R., Chen, S.-C., Hsu, S.-C. & Prockop, D. J. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* **25**, 2363–2370 (2007).
 27. Eliopoulos, N. *et al.* Human marrow-derived mesenchymal stromal cells decrease cisplatin renotoxicity in vitro and in vivo and enhance survival of mice post-intraperitoneal injection. *Am. J. Physiol. Physiol.* **299**, F1288–F1298 (2010).
 28. Morigi, M. *et al.* Life-sparing effect of human cord-blood mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. *Stem Cells* **5**, 13–22 (2009) doi:10.1002/stem.293.
 29. Kennelly, H., Mahon, B. P. & English, K. Human mesenchymal stromal

- cells exert HGF dependent cytoprotective effects in a human relevant pre-clinical model of COPD. *Sci. Rep.* **6**, 38207 (2016).
30. Lee, J. W., Fang, X., Gupta, N., Serikov, V. & Matthay, M. A. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 16357–16362 (2009).
 31. Parekkadan, B. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* **2**, e941 (2007).
 32. Suga, H. *et al.* IFATS collection: fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Stem Cells* **27**, 238–249 (2009).
 33. Martinet, L. *et al.* A regulatory cross-talk between V γ 9V δ 2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur. J. Immunol.* **39**, 752–762 (2009).
 34. Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N. & Papamichail, M. Interactions between human mesenchymal stem cells and Natural Killer cells. *Stem Cells* **24**, 74–85 (2006).
 35. Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815–1822 (2005).
 36. Németh, K. *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* **15**, 42–49 (2009).
 37. Ortiz-Virumbrales, M. *et al.* Human adipose mesenchymal stem cells modulate myeloid cells toward an anti-inflammatory and reparative phenotype: role of IL-6 and PGE₂. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 462 (2020).
 38. Liang, C. *et al.* Interferon- γ mediates the immunosuppression of bone marrow mesenchymal stem cells on T-lymphocytes in vitro. *Hematology* **23**, 44–49 (2018).
 39. Ghannam, S., Pène, J., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C. & Yssel, H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J. Immunol.* **185**, 302–312 (2010).
 40. Chen, X. *et al.* Human mesenchymal stem cell-treated regulatory CD23+ CD43+ B cells alleviate intestinal inflammation. *Theranostics* **9**, 4633–4647 (2019).
 41. Spaggiari, G. M., Abdelrazik, H., Becchetti, F. & Moretta, L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E₂. *Blood* **113**, 6576–6583 (2009).
 42. Selmani, Z. *et al.* Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and

- natural killer function and to induce CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells* **26**, 212–222 (2008).
43. Nasef, A. *et al.* Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation* **84**, 231–237 (2007).
 44. Deng, Y. *et al.* Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells instruct monocytes towards an IL10-producing phenotype by secreting IL-6 and HGF. *Sci. Rep.* **6**, 37566 (2016).
 45. Raffaghello, L. *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* **26**, 151–162 (2008).
 46. Melief, S. M., Geutskens, S. B., Fibbe, W. E. & Roelofs, H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica* **98**, 888–895 (2013).
 47. Yagura, K. *et al.* The enhancement of CCL2 and CCL5 by human bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells might contribute to inflammatory suppression and axonal extension after spinal cord injury. *PLoS One* **15**, e0230080 (2020).
 48. Papa, S. *et al.* Mesenchymal stem cells encapsulated into biomimetic hydrogel scaffold gradually release CCL2 chemokine in situ preserving cytoarchitecture and promoting functional recovery in spinal cord injury. *J. Control. Release* **278**, 49–56 (2018).
 49. Cui, R. *et al.* Human mesenchymal stromal/stem cells acquire immunostimulatory capacity upon cross-talk with natural killer cells and might improve the NK cell function of immunocompromised patients. *Stem Cell Res. Ther.* **7**, 88 (2016).
 50. Di Nicola, M. *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**, 3838–3843 (2002).
 51. English, K. *et al.* Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4⁺ CD25^{High} forkhead box P3⁺ regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* **156**, 149–160 (2009).
 52. Meisel, R. *et al.* Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* **103**, 4619–4621 (2004).
 53. Luk, F. *et al.* Inflammatory conditions dictate the effect of mesenchymal stem or stromal cells on B cell function. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
 54. Peng, Y. *et al.* Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5⁺ regulatory B cells producing interleukin 10. *Leukemia* **29**, 636–646 (2015).

55. Spaggiari, G. M. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood***111**, 1327–1333 (2008).
56. François, M., Romieu-Mourez, R., Li, M. & Galipeau, J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol. Ther.* **20**, 187–195 (2012).
57. Zoehler, B., Fracaro, L., Senegaglia, A. C. & Bicalho, M. D. G. Infusion of mesenchymal stem cells to treat graft versus host disease: the role of HLA-G and the impact of its polymorphisms. *Stem Cell Rev. Reports***16**, 459–471 (2020).
58. Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S. E. & Ringden, O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* **57**, 11–20 (2003).
59. Maccario, R. *et al.* Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica***90**, 516–25 (2005).
60. Jones, S., Horwood, N., Cope, A. & Dazzi, F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J. Immunol.* **179**, 2824–2831 (2007).
61. Chabannes, D. *et al.* A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood***110**, 3691–3694 (2007).
62. Sato, K. *et al.* Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood***109**, 228–234 (2007).
63. Davies, L. C., Heldring, N., Kadri, N. & Le Blanc, K. Mesenchymal stromal cell secretion of programmed death-1 ligands regulates T Cell mediated immunosuppression. *Stem Cells***35**, 766–776 (2017).
64. Ciccocioppo, R. *et al.* Ex vivo immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells on Crohn's disease mucosal T cells are largely dependent on indoleamine 2,3-dioxygenase activity and cell-cell contact. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 137 (2015).
65. Beyth, S. *et al.* Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* **105**, 2214–2219 (2005).
66. Ren, G. *et al.* Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J. Immunol.* **184**, 2321–2328 (2010).
67. Xue, Q. *et al.* The negative co-signaling molecule B7-H4 is expressed by

- human bone marrow–derived mesenchymal stem cells and mediates its T-cell modulatory activity. *Stem Cells Dev.* **19**, 27–38 (2010).
68. Rasmusson, I., Ringden, O., Sundberg, B. & Le Blanc, K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* **76**, 1208–1213 (2003).
 69. Corcione, A. *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **107**, 367–372 (2006).
 70. Tabera, S. *et al.* The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica* **93**, 1301–1309 (2008).
 71. Rosado, M. M. *et al.* Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T Cells. *Stem Cells Dev.* **24**, 93–103 (2015).
 72. Gowhari Shabgah, A. *et al.* A significant decrease of BAFF, APRIL, and BAFF receptors following mesenchymal stem cell transplantation in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Gene* **732**, 144336 (2020).
 73. Franquesa, M. *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells* **33**, 880–891 (2015).
 74. Watson, R. W. G. Redox regulation of neutrophil apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* **4**, 97–104 (2002).
 75. Brandau, S. *et al.* Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 1005–1015 (2010).
 76. Jiang, X.-X. *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **105**, 4120–4126 (2005).
 77. Nauta, A. J., Kruisselbrink, A. B., Lurvink, E., Willemze, R. & Fibbe, W. E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34 + -derived and monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **177**, 2080–2087 (2006).
 78. Ramasamy, R. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* **83**, 71–76 (2007).
 79. Zhang, W. *et al.* Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev.* **13**, 263–271 (2004).
 80. Chen, H.-W. *et al.* Mesenchymal stem cells tune the development of monocyte-derived dendritic cells toward a myeloid-derived suppressive phenotype through growth-regulated oncogene Chemokines. *J.*

- Immunol.* **190**, 5065–5077 (2013).
81. Zhang, Q. Z. *et al.* Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of M2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells* **28**, 1856–1868 (2010).
 82. Kim, J. & Hematti, P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Exp. Hematol.* **37**, 1445–1453 (2009).
 83. Melief, S. M. *et al.* Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* **31**, 1980–1991 (2013).
 84. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* **119**, 2204–2213 (2006).
 85. Zuk, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**, 211–228 (2001).
 86. Ponnaiyan, D., Bhat, K. M. & Bhat, G. S. Comparison of immunophenotypes of stem cells from human dental pulp and periodontal ligament. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **25**, 127–134 (2012).
 87. Jahoda, C. A. B., Whitehouse, C. J., Reynolds, A. J. & Hole, N. Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp. Dermatol.* **12**, 849–859 (2003).
 88. Garcia-Pacheco, J. M., Oliver, C., Kimatrai, M., Blanco, F. J. & Olivares, E. . G. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol. Hum. Reprod.* **7**, 1151–1157 (2001).
 89. in 't Anker, P. S. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* **22**, 1338–1345 (2004).
 90. McElreavey, K. D., Irvine, A. I., Ennis, K. T. & Mclean, W. H. I. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 29S-29S (1991).
 91. in 't Anker, P. S. *et al.* Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* **102**, 1548–1549 (2003).
 92. Zvaifler, N. J. *et al.* Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res. Ther.* **2**, 477 (2000).
 93. Meng, X. *et al.* Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J. Transl. Med.* **5**, 57 (2007).
 94. Cui, C.-H. *et al.* Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1586–1594 (2007).

95. Bieback, K. & Kluter, H. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **2**, 310–323 (2007).
96. Patki, S., Kadam, S., Chandra, V. & BHONDE, R. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum. Cell* **23**, 35–40 (2010).
97. Wegmeyer, H. *et al.* Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem Cells Dev.* **22**, 2606–2618 (2013).
98. Hass, R., Kasper, C., Böhm, S. & Jacobs, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun. Signal.* **9**, 12 (2011).
99. Ménard, C. *et al.* Integrated transcriptomic, phenotypic, and functional study reveals tissue-specific immune properties of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* **38**, 146–159 (2020).
100. Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O. & Michalek, J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* **21**, 2724–2752 (2012).
101. Ren, H. *et al.* Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from umbilical cord, dental pulp, and menstrual blood as sources for cell therapy. *Stem Cells Int.* **2016**, 1–13 (2016).
102. Topoluk, N., Hawkins, R., Tokish, J. & Mercuri, J. Amniotic mesenchymal stromal cells exhibit preferential osteogenic and chondrogenic differentiation and enhanced matrix production compared with adipose mesenchymal stromal cells. *Am. J. Sports Med.* **45**, 2637–2646 (2017).
103. Akimoto, K. *et al.* Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit, but adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote, glioblastoma multiforme proliferation. *Stem Cells Dev.* **22**, 1370–1386 (2013).
104. Bochev, I. *et al.* Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol. Int.* **32**, 384–393 (2008).
105. Ribeiro, A. *et al.* Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Res. Ther.* **4**, 125 (2013).
106. Talwadekar, M. D., Kale, V. P. & Limaye, L. S. Placenta-derived mesenchymal stem cells possess better immunoregulatory properties compared to their cord-derived counterparts-a paired sample study. *Sci. Rep.* **5**, 1–12 (2015).
107. Khanmohammadi, M. *et al.* Modified protocol for improvement of differentiation potential of menstrual blood-derived stem cells into adipogenic lineage. *Cell Prolif.* **47**, 615–623 (2014).

108. Patel, A. N. *et al.* Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant.* **17**, 303–311 (2008).
109. Borlongan, C. V. *et al.* Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells Dev.* **19**, 439–452 (2010).
110. Allickson, J. G., Sanchez, A., Yefimenko, N., Borlongan, C. V. & Sanberg, P. R. Recent studies assessing the proliferative capability of a novel adult stem cell identified in menstrual blood. *Open Stem Cell J.* **3**, 4–10 (2011).
111. Alcayaga-Miranda, F. *et al.* Characterization of menstrual stem cells: angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 32 (2015).
112. Wu, X. *et al.* Transplantation of human menstrual blood progenitor cells improves hyperglycemia by promoting endogenous progenitor differentiation in type 1 diabetic mice. *Stem Cells Dev.* **23**, 1245–1257 (2014).
113. Kazemnejad, S. *et al.* Characterization and chondrogenic differentiation of menstrual blood-derived stem cells on a nanofibrous scaffold. *Int. J. Artif. Organs* **35**, 55–66 (2012).
114. Khanmohammadi, M. *et al.* Proliferation and chondrogenic differentiation potential of menstrual blood- and bone marrow-derived stem cells in two-dimensional culture. *Int. J. Hematol.* **95**, 484–493 (2012).
115. Darzi, S. *et al.* Osteogenic differentiation of stem cells derived from menstrual blood versus bone marrow in the presence of human platelet releasate. *Tissue Eng. - Part A* **18**, 1720–1728 (2012).
116. Rossignoli, F. *et al.* Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. *Biomed Res. Int.* **2013**, 1–14 (2013).
117. Khanjani, S. *et al.* Comparative evaluation of differentiation potential of menstrual blood- Versus bone marrow- derived stem cells into hepatocyte-like cells. *PLoS One* **9**, (2014).
118. Mou, X. *et al.* Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Zhejiang Univ. Sci. B (Biomedicine Biotechnol.)* **14**, 961–972 (2013).
119. Mehrabani, D. *et al.* Growth kinetics, characterization, and plasticity of human menstrual blood stem cells. *Iran. J. Med. Sci.* **41**, 132–139 (2016).
120. Lai, D. *et al.* Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *J. Transl. Med.* **13**, 1–13 (2015).

121. Wang, Z., Wang, Y., Yang, T., Li, J. & Yang, X. Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 1–14 (2017).
122. Musina, R. A., Belyavski, A. V., Tarusova, O. V., Solovyova, E. V. & Sukhikh, G. T. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. *Bull. Exp. Biol. Med.* **145**, 539–543 (2008).
123. Fiorelli-Arazawa, L. R. *et al.* Hormonal oral contraceptive influence on isolation, Characterization and cryopreservation of mesenchymal stem cells from menstrual fluid. *Gynecol. Endocrinol.* **35**, 638–644 (2019).
124. Farzamfar, S. *et al.* Sciatic nerve regeneration by transplantation of menstrual blood-derived stem cells. *Mol. Biol. Rep.* **44**, 407–412 (2017).
125. Khanjani, S. *et al.* Efficient generation of functional hepatocyte-like cells from menstrual blood-derived stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **9**, 124–134 (2015).
126. Chen, L., Xiang, B., Wang, X. & Xiang, C. Exosomes derived from human menstrual blood-derived stem cells alleviate fulminant hepatic failure. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 1–15 (2017).
127. Chen, L. *et al.* Human menstrual blood-derived stem cells ameliorate liver fibrosis in mice by targeting hepatic stellate cells via paracrine mediators. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 272–284 (2017).
128. Nikoo, S. *et al.* Effect of menstrual blood-derived stromal stem cells on proliferative capacity of peripheral blood mononuclear cells in allogeneic mixed lymphocyte reaction. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **38**, 804–809 (2012).
129. Nikoo, S. *et al.* Menstrual blood-derived stromal stem cells from women with and without endometriosis reveal different phenotypic and functional characteristics. *Mol. Hum. Reprod.* **20**, 905–918 (2014).
130. Tan, J. *et al.* Autologous menstrual blood-derived stromal cells transplantation for severe Asherman's syndrome. *Hum. Reprod.* **31**, 2723–2729 (2016).
131. Liu, Y. *et al.* Biological characteristics of human menstrual blood-derived endometrial stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 1627–1639 (2018).
132. Liu, Y. *et al.* N-cadherin upregulation promotes the neurogenic differentiation of menstrual blood-derived endometrial stem cells. *Stem Cells Int.* **2018**, (2018).
133. Moreno, R. *et al.* Human menstrual blood-derived mesenchymal stem cells as potential cell carriers for oncolytic adenovirus. *Stem Cells Int.* **2017**, (2017).
134. Zhao, Y. *et al.* Transplantation of human menstrual blood-derived mesenchymal stem cells alleviates Alzheimer's disease-like pathology in APP/PS1 transgenic mice. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, (2018).

135. Xiang, B. *et al.* Transplantation of menstrual blood-derived mesenchymal stem cells promotes the repair of LPS-induced acute lung injury. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 689 (2017).
136. Cuenca, J. *et al.* The reparative abilities of menstrual stem cells modulate the wound matrix signals and improve cutaneous regeneration. *Front. Physiol.* **9**, 1–19 (2018).
137. Wang, X. J. *et al.* Human menstrual blood-derived mesenchymal stem cells as a cellular vehicle for malignant glioma gene therapy. *Oncotarget* **8**, 58309–58321 (2017).
138. Gonçalves, M. F. *et al.* Human menstrual blood-derived mesenchymal cells improve mouse embryonic development. *Tissue Eng. Part A* **00**, (2020).
139. Liu, Q.-Y. *et al.* Human menstrual blood-derived stem cells inhibit the proliferation of HeLa cells via TGF- β 1-mediated JNK/P21 signaling pathways. *Stem Cells Int.* **2019**, 1–18 (2019).
140. Li, Y. *et al.* Efficient induction of pluripotent stem cells from menstrual blood. *Stem Cells Dev.* **22**, 1147–1158 (2013).
141. Akhavan-Tavakoli, M. *et al.* In vitro differentiation of menstrual blood stem cells into keratinocytes: A potential approach for management of wound healing. *Biologicals* **48**, 66–73 (2017).
142. Wu, Q. *et al.* Human menstrual blood-derived stem cells promote functional recovery in a rat spinal cord hemisection model. *Cell Death Dis.* **9**, (2018).
143. Faramarzi, H. *et al.* The potential of menstrual blood-derived stem cells in differentiation to epidermal lineage: a preliminary report. *World J. Plast. Surg.* **5**, 26–31 (2016).
144. Luz-Crawford, P. *et al.* The immunosuppressive signature of menstrual blood mesenchymal stem cells entails opposite effects on experimental arthritis and graft versus host diseases. *Stem Cells* **34**, 456–469 (2016).
145. Alcayaga-Miranda, F. *et al.* Combination therapy of menstrual derived mesenchymal stem cells and antibiotics ameliorates survival in sepsis. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 199 (2015).
146. Shokri, M.-R. *et al.* Human menstrual blood-derived stromal/stem cells modulate functional features of natural killer cells. *Sci. Rep.* **9**, 10007 (2019).
147. Liu, T. *et al.* Transplantation of human menstrual blood stem cells to treat premature ovarian failure in mouse model. *Stem Cells Dev.* **23**, 1548–1557 (2014).
148. Hida, N. *et al.* Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells* **26**, 1695–1704 (2008).
149. Dalirfardouei, R., Jamialahmadi, K., Jafarian, A. H. & Mahdipour, E.

- Promising effects of exosomes isolated from menstrual blood-derived mesenchymal stem cell on wound-healing process in diabetic mouse model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **13**, 555–568 (2019).
150. Jiang, Z. *et al.* Human endometrial stem cells confer enhanced myocardial salvage and regeneration by paracrine mechanisms. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 1247–1260 (2013).
 151. Xu, X. *et al.* Treatment of experimental colitis by endometrial regenerative cells through regulation of B lymphocytes in mice. *Stem Cell Res. Ther.* **9**, 1–12 (2018).
 152. Zheng, S. X. *et al.* Feasibility analysis of treating severe intrauterine adhesions by transplanting menstrual blood-derived stem cells. *Int. J. Mol. Med.* **41**, 2201–2212 (2018).
 153. Wang, H. *et al.* Comparison of endometrial regenerative cells and bone marrow stromal cells. *J. Transl. Med.* **10**, 1–14 (2012).
 154. Azedi, F. *et al.* Comparative capability of menstrual blood versus bone marrow derived stem cells in neural differentiation. *Mol. Biol. Rep.* **44**, 169–182 (2017).
 155. Azedi, F. *et al.* Differentiation potential of menstrual blood- versus bone marrow-stem cells into glial-like cells. *Cell Biol. Int.* **38**, 615–624 (2014).
 156. Short, R. V. The evolution of human reproduction. *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* **195**, 3–24 (1976).
 157. Cho, N. H., Park, Y. K., Kim, Y. T., Yang, H. & Kim, S. K. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil. Steril.* **81**, 403–407 (2004).
 158. Schwab, K. E. & Gargett, C. E. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum. Reprod.* **22**, 2903–2911 (2007).
 159. Prianishnikov, V. A. On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium. *Contraception* **18**, 213–223 (1978).
 160. Gargett, C. E., Schwab, K. E. & Deane, J. A. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum. Reprod. Update* **22**, 137–163 (2016).
 161. Kuznetsov, S. A. *et al.* Circulating skeletal stem cells. *J. Cell Biol.* **153**, 1133–1140 (2001).
 162. Du, H. & Taylor, H. S. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells* **25**, 2082–2086 (2007).
 163. Ong, Y. R. *et al.* Bone marrow stem cells do not contribute to endometrial cell lineages in chimeric mouse models. *Stem Cells* **36**, 91–102 (2018).
 164. Schwab, K. E., Hutchinson, P. & Gargett, C. E. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-

- forming cells. *Hum. Reprod.* **23**, 934–943 (2008).
165. Lai, D., Guo, Y., Zhang, Q., Chen, Y. & Xiang, C. Differentiation of human menstrual blood-derived endometrial mesenchymal stem cells into oocyte-like cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **48**, 998–1005 (2016).
 166. Ikegami, Y. *et al.* Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells. *Artif. Organs* **34**, 280–288 (2010).
 167. Rodrigues, D. de C. *et al.* Human menstrual blood-derived mesenchymal cells as a cell source of rapid and efficient nuclear reprogramming. *Cell Transplant.* **21**, 2215–2224 (2012).
 168. Zhang, Y. *et al.* Endometrial stem cells repair injured endometrium and induce angiogenesis via AKT and ERK pathways. *Reproduction* **152**, 389–402 (2016).
 169. Murphy, M. P. *et al.* Allogeneic endometrial regenerative cells: an ‘Off the shelf solution’ for critical limb ischemia? *J. Transl. Med.* **6**, 45 (2008).
 170. Han, X. *et al.* Inhibition of intracranial glioma growth by endometrial regenerative cells. *Cell Cycle* **8**, 606–610 (2009).
 171. Lv, Y. *et al.* Endometrial regenerative cells as a novel cell therapy attenuate experimental colitis in mice. *J. Transl. Med.* **12**, 1–11 (2014).
 172. Zhong, Z. *et al.* Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. *J. Transl. Med.* **7**, 15 (2009).
 173. Lan, X. *et al.* Stromal cell-derived factor-1 mediates cardiac allograft tolerance induced by human endometrial regenerative cell-based therapy. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 1997–2008 (2017).
 174. Sun, P. *et al.* Human endometrial regenerative cells attenuate renal ischemia reperfusion injury in mice. *J. Transl. Med.* **14**, 28 (2016).
 175. Xu, X. *et al.* Prolongation of cardiac allograft survival by endometrial regenerative cells: focusing on B-cell responses. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 778–787 (2017).
 176. Jin, W. *et al.* Stromal cell-derived factor-1 enhances the therapeutic effects of human endometrial regenerative cells in a mouse sepsis model. *Stem Cells Int.* **2020**, 1–14 (2020).
 177. Hu, X. *et al.* Differentiation of menstrual blood-derived stem cells toward Nucleus Pulposus-like cells in a coculture system with Nucleus Pulposus cells. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **39**, 754–760 (2014).
 178. Chen, S. *et al.* Human menstrual blood-derived stem cells protect H9c2 cells against hydrogen peroxide-associated apoptosis. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* (2019) doi:10.1007/s11626-018-0311-1.
 179. Chang, Q.-Y., Zhang, S.-W., Li, P.-P., Yuan, Z.-W. & Tan, J.-C. Safety of

- menstrual blood-derived stromal cell transplantation in treatment of intrauterine adhesion. *World J. Stem Cells* **12**, 368–380 (2020).
180. Zhang, Z. *et al.* Menstrual blood derived mesenchymal cells ameliorate cardiac fibrosis via inhibition of endothelial to mesenchymal transition in myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* **168**, 1711–1714 (2013).
 181. Bozorgmehr, M. *et al.* Menstrual blood-derived stromal stem cells inhibit optimal generation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunol. Lett.* **162**, 239–246 (2014).
 182. Lin, J., Xiang, D., Zhang, J. L., Allickson, J. & Xiang, C. Plasticity of human menstrual blood stem cells derived from the endometrium. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **12**, 372–380 (2011).
 183. Ichim, T. E. *et al.* Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: Implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell. Immunol.* **260**, 75–82 (2010).
 184. Ichim, T. E. *et al.* Combination stem cell therapy for heart failure. *Int. Arch. Med.* **3**, 5 (2010).
 185. Bockeria, L. *et al.* Endometrial regenerative cells for treatment of heart failure: a new stem cell enters the clinic. *J. Transl. Med.* **11**, 56 (2013).
 186. Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* **420**, 885–891 (2002).
 187. Rudd, K. E. *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* **395**, 200–211 (2020).
 188. WHO. *Seventy-third world health assembly. Progress Reports.* (2020).
 189. van der Poll, T., van de Veerdonk, F. L., Scicluna, B. P. & Netea, M. G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 407–420 (2017).
 190. DeJager, L., Pinheiro, I., Dejonckheere, E. & Libert, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol.* **19**, 198–208 (2011).
 191. Poli-de-Figueiredo, L. F., Garrido, A. G., Nakagawa, N. & Sannomiya, P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock* **30**, 53–59 (2008).
 192. Rittirsch, D., Hoesel, L. M. & Ward, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 137–143 (2007).
 193. Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* **4**, 31–36 (2009).
 194. Krasnodembskaya, A. *et al.* Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide

- LL-37. *Stem Cells* **28**, 2229–2238 (2010).
195. Tsuchiya, S. *et al.* Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* **26**, 171–176 (1980).
196. Hölzer, S. U. & Hensel, M. Functional dissection of translocon proteins of the Salmonella Pathogenicity Island 2-encoded type III secretion system. *BMC Microbiol.* **10**, 104 (2010).
197. Muñoz-Fernández, R. *et al.* Human predecidual stromal cells are mesenchymal stromal/stem cells and have a therapeutic effect in an immune-based mouse model of recurrent spontaneous abortion. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 177 (2019).
198. Leijh, P. C., van Zwet, T. L., ter Kuile, M. N. & van Furth, R. Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **46**, 448–52 (1984).
199. Lam, D., Harris, D. & Qin, Z. Inflammatory mediator profiling reveals immune properties of chemotactic gradients and macrophage mediator production inhibition during thioglycollate elicited peritoneal inflammation. *Mediators Inflamm.* **2013**, 1–9 (2013).
200. Schubert, K. *et al.* Thy-1 (CD90) regulates the extravasation of leukocytes during inflammation. *Eur J Immunol* **41**, 645–56 (2011).
201. Zaslona, Z., Serezani, C., Okunishi, K., Aronoff, D. & Peters-Golden, M. Prostaglandin E2 restrains macrophage maturation via E prostanoid receptor 2/protein kinase A signaling. *Blood* **119**, 2358–67 (2012).
202. Fakhrudin, N. *et al.* Identification of plumericin as a potent new inhibitor of the NF- κ B pathway with anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* **171**, 1676–86 (2014).
203. Baron, E. J. & Proctor, R. A. Elicitation of peritoneal polymorphonuclear neutrophils from mice. *J. Immunol. Methods* **49**, 305–313 (1982).
204. Chen, S.-C. *et al.* Impaired pulmonary host defense in mice lacking expression of the CXC chemokine lungkine. *J. Immunol.* **166**, 3362–3368 (2001).
205. Hammond, M. E. *et al.* IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J. Immunol.* **155**, 1428–33 (1995).
206. Kalinski, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J. Immunol.* **188**, 21–28 (2012).
207. Dorraji, S. E. *et al.* Mesenchymal stem cells and T cells in the formation of tertiary lymphoid structures in lupus nephritis. *Sci. Rep.* **8**, 7861 (2018).
208. Pitzalis, C., Jones, G. W., Bombardieri, M. & Jones, S. A. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 447–462 (2014).
209. Sala, E. *et al.* Mesenchymal stem cells reduce colitis in mice via release of

- TSG6, independently of their localization to the intestine. *Gastroenterology* **149**, 163–176 (2015).
210. Liu, Y. *et al.* MSCs inhibit bone marrow-derived DC maturation and function through the release of TSG-6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450**, 1409–1415 (2014).
 211. Forest, C. G., Ferraro, E., Sabbagh, S. C. & Daigle, F. Intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human macrophages is independent of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2. *Microbiology* **156**, 3689–3698 (2010).
 212. Keane, C., Jerkic, M. & Laffey, J. G. Stem cell-based therapies for sepsis. *Anesthesiology* **127**, 1017–1034 (2017).
 213. LaRock, D. L., Chaudhary, A. & Miller, S. I. *Salmonellae* interactions with host processes. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 191–205 (2015).
 214. Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G. & Heffron, F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 5189–5193 (1986).
 215. Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M. & Michiels, C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer* **15**, 577 (2015).
 216. Neu, C. *et al.* CD14-dependent monocyte isolation enhances phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by proinflammatory GM-CSF-derived macrophages. *PLoS One* **8**, e66898 (2013).
 217. Le Blanc, K. & Davies, L. C. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol. Lett.* **168**, 140–146 (2015).
 218. Wang, Q., Ding, G. & Xu, X. Periodontal ligament stem cells regulate apoptosis of neutrophils. *Open Med.* **12**, (2017).
 219. Choi, H., Lee, R. H., Bazhanov, N., Oh, J. Y. & Prockop, D. J. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages. *Blood* **118**, 330–338 (2011).
 220. Osma-Garcia, I. C., Punzón, C., Fresno, M. & Díaz-Muñoz, M. D. Dose-dependent effects of prostaglandin E2 in macrophage adhesion and migration. *Eur. J. Immunol.* **46**, 677–688 (2016).
 221. Prados, A., Muñoz-Fernández, R., Fernandez-Rubio, P. & Olivares, E. G. Characterization of mesenchymal stem/stromal cells with lymphoid tissue organizer cell potential in tonsils from children. *Eur. J. Immunol.* **48**, 829–843 (2018).
 222. Kain, M. J. W. & Owens, B. M. J. Stromal cell regulation of homeostatic and inflammatory lymphoid organogenesis. *Immunology* **140**, 12–21 (2013).
 223. Nayar, S. *et al.* Immunofibroblasts are pivotal drivers of tertiary lymphoid structure formation and local pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- 116, 13490–13497 (2019).
224. Vercellini, P., Viganò, P., Somigliana, E. & Fedele, L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 261–275 (2014).
 225. Thibodeau, L. L., Prioleau, G. R., Manuelidis, E. E., Merino, M. J. & Heafner, M. D. Cerebral endometriosis. *J. Neurosurg.* **66**, 609–610 (1987).
 226. Hogg, C., Horne, A. W. & Greaves, E. Endometriosis-associated macrophages: origin, phenotype, and function. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **11**, (2020).
 227. Bystrom, J. *et al.* Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood* **112**, 4117–4127 (2008).
 228. Fleming, S. D. & Campbell, P. A. Macrophages have cell surface IL-10 that regulates macrophage bactericidal activity. *J. Immunol.* **156**, 1143–50 (1996).
 229. Anderson, P. *et al.* Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* **62**, 1131–1141 (2013).
 230. Maggini, J. *et al.* Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One* **5**, e9252 (2010).
 231. Lathrop, S. K. *et al.* Replication of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* **83**, 2661–2671 (2015).
 232. Chen, G. Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 826–837 (2010).
 233. O'Brien, A. D. *et al.* Genetic control of susceptibility to *Salmonella* Typhimurium in mice: role of the LPS gene. *J. Immunol.* **124**, 20–4 (1980).
 234. Rajaei, A., Barnett, R. & Cheadle, W. G. Pathogen- and danger-associated molecular patterns and the cytokine response in sepsis. *Surg. Infect. (Larchmt)*. **19**, 107–116 (2018).
 235. Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P. & Dieter, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 555–561 (1996).
 236. June, C. H., Bluestone, J. A., Nadler, L. M. & Thompson, C. B. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today* **15**, 321–331 (1994).
 237. Grage-Griebenow, E., Flad, H. D. & Ernst, M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 11–20 (2001).
 238. Vasandan, A. B. *et al.* Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE₂-dependent mechanism. *Sci. Rep.* **6**, 1–17 (2016).

239. Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A. & Donnelly, S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J. Immunol. Methods* **430**, 64–70 (2016).
240. Chanput, W., Mes, J.J., Savelkoul, H. F.J. & Wichers, H.J. Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct.* **4**, 266–276 (2013).
241. Tedesco, S. *et al.* Convenience versus biological significance: are PMA-differentiated THP-1 Cells a reliable Substitute for blood-derived macrophages when studying in vitro polarization? *Front. Pharmacol.* **9**, (2018).
242. Grunwald, U. *et al.* Monocytes can phagocytose Gram-negative bacteria by a CD14-dependent mechanism. *J. Immunol.* **157**, 4119–4125 (1996).
243. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
244. Li, Y. *et al.* P40phox-deficient mice exhibit impaired bacterial clearance and enhanced pro-inflammatory responses during Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Front. Immunol.* **8**, 1–16 (2017).
245. Taub, N. *et al.* The late endosomal adaptor p14 is a macrophage host-defense factor against Salmonella infection. *J. Cell Sci.* **125**, 2698–2708 (2012).
246. Mastroeni, P. *et al.* Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. *J. Exp. Med.* **192**, 237–248 (2000).
247. Vazquez-Torres, A. *et al.* Salmonella Pathogenicity Island 2-Dependent Evasion of the Phagocyte NADPH Oxidase. *Science (80-)*. **287**, 1655–1658 (2000).
248. Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K. & Matsukawa, A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* **22**, 460–466 (2004).
249. Ruiz, S. *et al.* Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. *Intensive Care Med. Exp.* **4**, 22 (2016).
250. Steele-Mortimer, O. The Salmonella-containing vacuole—moving with the times. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 38–45 (2008).