



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
Clasificación de las células madre	4
Células madre mesenquimales (MSCs)	5
Caracterización de las MSCs equinas	6
Capacidad inmunomoduladora de las MSCs	7
Inmunogenicidad de las MSCs	9
Equilibrio inmunomodulación-inmunogenicidad de las MSCs	10
El papel del caballo en investigación traslacional con MSCs	12
Actualidad y futuro de las MSCs	12
OBJETIVOS DEL ESTUDIO	13
METODOLOGÍA	13
Diseño experimental	14
Animales	14
Obtención de las células: MSCs y PBLs	15
Tipos de co-cultivo	16
Test ELISA para la cuantificación de IL-6/ IFN-γ	19
Test ELISA para la cuantificación de PGE2	22
Análisis de datos	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
Resultados cuantificación IL-6	26
Resultados cuantificación PGE2	33
Resultados cuantificación IFN-γ	39
CONCLUSIONES	44
CONCLUSIONS	45
BIBLIOGRAFÍA	46

RESUMEN

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células madre adultas de origen mesodérmico que, tanto en la especie humana como en las especies animales, presentan un prometedor potencial terapéutico en diferentes patologías, incluidas aquellas que afectan al aparato locomotor. Uno de los modelos más utilizados es el equino, dado su gran interés tanto como modelo traslacional como por su condición de paciente. En los últimos años ha ido creciendo la evidencia de que sus efectos terapéuticos se basan principalmente en su capacidad para modular la respuesta inmune e inflamatoria, la cual reside principalmente en su habilidad para secretar una gran variedad de moléculas que regulan distintas funciones de las células inmunes. Las propiedades inmunomoduladoras son uno de los principales mecanismos implicados en el potencial terapéutico de las MSCs, requiriendo la exposición a estímulos inflamatorios para su activación. Sin embargo, también debe considerarse que dicha exposición puede conllevar efectos sobre su inmunogenicidad, es decir, la capacidad de que sean reconocidas por el sistema inmune del receptor y de que generen una respuesta de rechazo, pudiendo comprometer tanto la seguridad como la eficacia de la terapia. Además, se ha demostrado que la inmunogenicidad de las MSCs no sólo puede ser incrementada por el ambiente inflamatorio, sino que también puede influir la diferenciación de las células in vivo y la compatibilidad/incompatibilidad del MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) entre donante y receptor.

Dado que la capacidad terapéutica de las MSCs está condicionada por el equilibrio entre sus capacidades inmunomoduladoras y su inmunogenicidad, el presente trabajo tiene como objetivo el estudio del efecto de la inflamación, la diferenciación condrogénica y la compatibilidad para el MHC sobre el equilibrio inmunomodulación-inmunogenicidad de las MSCs equinas. Para ello, se han analizado mediante test ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) la secreción de tres mediadores relacionados con dicho equilibrio: Interleuquina 6 (IL-6); Prostaglandina E2 (PGE2) e Interferón gamma (IFN- γ), teniendo en cuenta las situaciones comentadas previamente (inflamación, diferenciación y compatibilidad). Asimismo, se han realizado cocultivos autólogos y alogénicos, dado el creciente interés en estas últimas ya que las MSCs autólogas presentan ciertos inconvenientes relacionados con el tiempo necesario para su aislamiento y cultivo, así como con la edad o las características genéticas del individuo. Los resultados obtenidos muestran que la secreción de estas moléculas varía según la situación experimentada, y que por lo tanto deberían ser tenidas en cuenta a la hora de proponer mecanismos para la consecución de terapias seguras y eficaces.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult stem cells of mesodermal origin, which in both human and animal species, show promising therapeutic potential in different pathologies, including those affecting the locomotor system. One of the most widely used models is the equine, given its great interest both as a translational model and as a patient. In recent years, there has been growing evidence that their therapeutic effects are based mainly on their ability to modulate the immune and inflammatory response, which lies mainly in their capacity to secrete a wide variety of molecules that regulate different immune cell functions. Immunomodulatory properties are one of the main mechanisms involved in the therapeutic potential of MSCs, requiring exposure to inflammatory stimuli for their activation. However, it must also be considered that such exposure may have effects on their immunogenicity, i.e. the ability to be recognised by the recipient's immune system and to generate a rejection response, which may compromise both the safety and efficacy of the therapy. Furthermore, it has been shown that the immunogenicity of MSCs can not only be increased by the inflammatory environment, but can also be influenced by the differentiation of the cells in vivo and the MHC (Major Histocompatibility Complex) compatibility/incompatibility between donor and recipient.

Since the therapeutic capacity of MSCs will be conditioned by the balance between their immunomodulatory capacities and their immunogenicity, the present work aims to study the effect of inflammation, chondrogenic differentiation and MHC compatibility on the immunomodulation-immunogenicity balance of equine MSCs. For this purpose, the secretion of three mediators related to this balance: Interleukin 6 (IL-6); Prostaglandin E2 (PGE2) and Interferon gamma (IFN- γ), have been analysed by ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) test, taking into account the situations previously mentioned (inflammation, differentiation and compatibility). Likewise, autologous and allogeneic co-cultures have been performed, given the growing interest in the latter, as autologous MSCs present several drawbacks related to the time required for their isolation and culture, as well as to the age or genetic characteristics of the individual. The results obtained show that the secretion of these molecules varies according to the situation experienced, and that they should therefore be taken into account when proposing mechanisms for the achievement of safe and effective therapies.

INTRODUCCIÓN

Al igual que en medicina humana, los animales sufren patologías articulares inflamatorias y degenerativas de difícil resolución en una gran parte de los casos. En los últimos años, los esfuerzos de médicos y veterinarios se han centrado en la medicina regenerativa, y concretamente, en el desarrollo de terapias basadas en el uso de células madre, cuya finalidad es conseguir un resultado mejor que el que proporcionan los tratamientos utilizados actualmente. Numerosos estudios (Berg et al., 2009; Schnabel et al., 2013) han demostrado resultados prometedores en la reparación del cartílago articular tras la administración intraarticular de MSCs (células madre mesenquimales) autólogas y alogénicas. Sin embargo, hay cierta controversia ya que en algunos estudios se han observado efectos negativos tras el uso repetido de estas últimas, que podrían estar relacionados con un rechazo inmune hacia las mismas, lo que crea una incógnita en torno a su utilización segura (Van Hecke et al., 2021).

Clasificación de las células madre

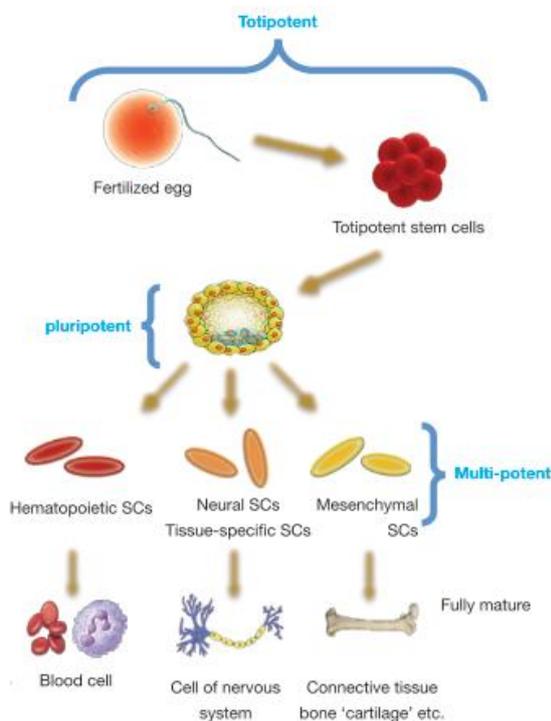


Figura 1. Vista general de la clasificación de las células madre según su capacidad de diferenciación (Rajabzadeh et al., 2019).

Las células madre tienen dos características principales que las definen: la capacidad de diferenciarse y la habilidad para autorrenovarse (Ding et al., 2011). Se pueden encontrar diferentes tipos de células madre en un individuo según su capacidad de diferenciación, el origen o la relación con el paciente. Según la capacidad de diferenciación se distinguen los siguientes tipos mostrados en la *Figura 1*: totipotente, pluripotente, multipotente y unipotente. Las totipotentes son las que derivan del cigoto, permitiéndoles diferenciarse en cualquier célula del individuo o de los anejos fetales; las pluripotentes pueden transformarse en cualquier linaje celular que forme parte del endodermo, ectodermo o mesodermo, mientras que las multipotentes solo pueden diferenciarse en los tipos celulares de la capa germinal de la

que proceden. En último lugar, las células unipotentes son las que pueden diferenciarse en un tipo específico de células adultas (Rajabzadeh et al., 2019).

Según la fuente de origen, las células madre se dividen principalmente en embrionarias y adultas, siendo las primeras totipotentes o pluripotentes, mientras que las segundas suelen caracterizarse por ser multipotentes o unipotentes (Prządka et al., 2021).

Por otro lado, las células madre se pueden dividir según la relación con el receptor al que se le van a administrar, refiriéndose a si se tratan de células autólogas, alogénicas o xenogénicas. Las células autólogas son aquellas provenientes del mismo donante, las alogénicas proceden de un donante ajeno pero de la misma especie, y las células xenogénicas provienen de una especie distinta a la del receptor (Prządka et al., 2021).

Las células madre mesenquimales (MSCs) son un tipo de células madre adultas multipotentes, que pueden administrarse de forma autóloga o alogénica. Este tipo de células es en las que se centra el presente trabajo, por lo que a continuación se expondrán algunas de sus características con más detalle.

Células madre mesenquimales (MSCs)

Un tipo de células madre ampliamente estudiadas con fines terapéuticos son las células madre mesenquimales (MSCs), las cuales fueron descritas por primera vez a partir de médula ósea de ratón por Friedenstein en 1970 (Friedenstein et al., 1970). Las MSCs son consideradas células madre adultas multipotentes, procedentes del mesodermo y cuya habilidad principal es la capacidad para diferenciarse en diversos tejidos de su mismo linaje (Cequier et al., 2021). Uno de sus mayores atractivos es que pueden obtenerse de pacientes adultos y de manera relativamente sencilla, lo que evita los problemas éticos relacionados con la utilización de células embrionarias o fetales (Prządka et al., 2021). Su origen todavía no ha sido completamente dilucidado, aunque se cree que son células provenientes de los pericitos o tejido perivascular. La hipótesis principal es que los pericitos son la fuente originaria *in vivo*, ya que se ha descubierto que comparten marcadores fenotípicos de superficie como la molécula de adhesión celular CD146 o el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas. Esto explicaría la amplia distribución de este tipo celular en el organismo (Murphy et al., 2013).

Las MSCs se encuentran en prácticamente casi todos los tejidos, lo que permite aislarlas a partir de diversas fuentes como la médula ósea, el tejido adiposo, la membrana sinovial o el tejido proveniente del cordón umbilical, siendo las dos primeras fuentes las más utilizadas en la actualidad en el caballo, por la alta concentración de estas células y la facilidad para obtenerlas de este tejido. La extracción de la médula ósea se hace a partir de esternón o del ilion (BM-MSCs,) mientras que para obtenerlas de tejido adiposo este se suele extraer del tejido subcutáneo junto a la base de la cola (AT-MSCs) (Schnabel et al., 2013). A su vez, las MSCs son células fácilmente expandibles, capaces de alcanzar altas concentraciones celulares en poco tiempo, convirtiéndolas en candidatas ideales para terapias celulares (Han et al., 2019; Newman et al., 2009).

Otro de los factores que han generado interés por las MSCs es el uso de células de naturaleza alogénica, dándose así la posibilidad de contar con bancos de almacenamiento con células disponibles para ser utilizadas en el momento en que se da la patología, esquivando la necesidad de tener que cultivar y dejar crecer durante semanas las células autólogas del paciente. De esta forma, se pueden conservar lotes específicos de células caracterizadas, con un alto nivel de seguridad, evitando la variabilidad ligada al uso de células autólogas, y permitiendo una terapia homogénea y más rápida, ya que su tiempo de expansión *ex vivo* es más corto. Pueden utilizarse en multitud de enfermedades, englobándose sobre todo aquellas de naturaleza cardiovascular, inflamatorias y ortopédicas (Newman et al., 2009; Van Hecke et al., 2021; Ardanaz et al., 2016). Sin embargo, y como se desarrollará posteriormente, la terapia alogénica con MSCs no está exenta de consideraciones referentes a su inmunogenicidad.

Caracterización de las MSCs equinas

Para que las MSCs equinas sean consideradas como tales, se siguen los criterios establecidos por la ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) para las MSCs humanas (Cequier et al., 2021), entre los que se encuentran:

- Capacidad para adherirse al plástico en condiciones de cultivo estándar: atmósfera humidificada al 5% de CO₂ y temperatura de 37° C (Berglund et al., 2017; Jiang & Xu, 2020).
- Morfología en forma de huso o *spindle shape* (Berglund et al., 2017; Jiang & Xu, 2020).
- Expresión de un patrón específico de antígenos de superficie:
 - o Ser fenotípicamente positivos a los siguientes antígenos (>95% de la población celular): CD90, CD105 y CD73.

- Ser fenotípicamente negativos a los siguientes antígenos (< 2% de la población celular): CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y el antígeno leucocitario humano clase II (HLA-DR) (Cequier et al., 2021; Murphy et al., 2013).
- Multipotencialidad: capacidad para diferenciarse *in vitro*, bajo los estímulos adecuados, en osteoblastos, adipocitos y condrocitos (Cequier et al., 2021)

Sin embargo, debe considerarse que estos criterios de caracterización, especialmente los referidos a los marcadores, varían según la especie e incluso dependiendo del tejido de origen, del donante, de las condiciones de extracción y de cultivo, así como del número de pases realizados (Paebst et al., 2014).

Además de estas consideraciones sobre su caracterización, estas células presentan ciertas propiedades que las distinguen y que se relacionan con su potencial terapéutico, tal y como se verá a continuación.

Capacidad inmunomoduladora de las MSCs

Una de las vías de actuación de las MSCs es la secreción de distintos factores paracrinos y, en ocasiones, el contacto entre células (Berglund et al., 2017). Las moléculas secretadas por las MSCs se relacionan con distintos efectos que, en su conjunto, son capaces de promover la reparación de ciertos tejidos afectados, ya que se encargan de prevenir la apoptosis, de estimular la reparación tisular y de controlar las reacciones inflamatorias e inmunes del individuo (Newman et al., 2009).

Se ha visto que las MSCs pueden tener capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria en ciertas ocasiones (Waterman et al., 2010). Parece ser que esta capacidad está mediada por señales tanto dependientes como independientes del contacto entre células, dándose un proceso multifactorial en el que participan diversos mecanismos y moléculas. Además, esta capacidad reguladora puede verse aumentada cuando las MSCs son previamente estimuladas o activadas con citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TFN- α), el interferón gamma (IFN- γ) o ambos. De hecho, se cree que el efecto es sinérgico cuando se utilizan las dos citoquinas juntas, ya que se ha observado que la activación de las MSCs es mayor si se combinan (Montesinos et al., 2020).

Dicho efecto se ha visto tanto *in vitro* como *in vivo*, donde las MSCs estimuladas fueron más potentes para evitar el rechazo inmune tras un trasplante, conocido como la enfermedad del injerto contra el huésped (Cuerquis et al., 2014).

En situaciones en las que se presenta una lesión, aparece generalmente una respuesta inflamatoria, que si no se regula correctamente dificulta la reparación natural apropiada de dicha zona. De esta forma, las MSCs mejorarían el proceso de reparación tisular al modular el ambiente inflamatorio gracias a la producción de diversos factores de crecimiento, proteínas antiinflamatorias y citoquinas, siendo algunos de los mediadores más importantes la interleuquina 6 (IL-6) y la prostaglandina E2 (PGE2). Sin embargo, estas moléculas no son las únicas implicadas ya que también actúan otros mediadores como: indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), óxido nítrico (NO), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-B1), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor derivado del estroma 1 (SDF-1), interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10), entre otras. Además, el propio ambiente inflamatorio activaría la producción de dichos mediadores (Berglund et al., 2017).

Esta capacidad inmunomoduladora se produce generalmente a través de la interacción de las MSCs y otras células inmunes como los linfocitos B, T, las células dendríticas, las células Natural Killer (NK) o los macrófagos, tras la cual se regula la migración celular, la proliferación y la función de las mismas, ya sea aumentándolas o disminuyéndolas (Aldrich et al., 2021).

Generalmente, esta acción se ha visto reflejada en la supresión de la proliferación de linfocitos T, específicamente linfocitos T CD4+ y T CD8+, así como de los NK, disminuyendo y previniendo la respuesta inmune hacia la zona que se busca reparar (Krampera et al., 2006; Newman et al., 2009). En ambientes de inflamación crónica, las MSCs consiguen reducir el IFN- γ - y aumentar la producción de IL-4 y IL-10, promoviendo la transición de los linfocitos TH1 (T *helper* 1) a TH2 (T *helper* 2), lo que mejora la reparación tisular en tejidos dañados, especialmente en el cartílago, músculo y otros tejidos blandos. Por otra parte, las MSCs son capaces de polarizar los macrófagos tipo M1, caracterizados por estimular la inflamación e inhibir la angiogénesis y el crecimiento tisular, hacia el fenotipo tipo M2, los cuales tienen un perfil antiinflamatorio y promotor de la reparación del tejido (Murphy et al., 2013).

Inmunogenicidad de las MSCs

Pese a todo lo que se ha avanzado en el conocimiento de las propiedades inmunes de las MSCs, una de las principales cuestiones que envuelven el uso de estas células es si realmente son inmunoprivilegiadas como se consideraba en un principio. Durante muchos años se ha creído que estas células pueden eludir el reconocimiento por el sistema inmune cuando se administran de forma alogénica, alegándose que no provocan ningún efecto adverso en el paciente receptor. Sin embargo, en los últimos años ha crecido el número de estudios que apoyan que las MSCs alogénicas podrían ser inmunogénicas una vez son trasplantadas del donante alogénico al receptor. Tal y como revisa Berglund et al. (2017), se han observado respuestas inmunes a distintos niveles tras la inoculación de MSCs alogénicas tanto en la especie humana como en ratón, llegando hasta el rechazo *in vivo* en algunos casos (Berglund et al., 2017).

En algunos estudios con modelos animales equinos se ha observado que al inocular intraarticularmente MSCs autólogas y/o alogénicas repetidamente, se genera una leve reacción inflamatoria con ambos tipos celulares (Ardanaz et al., 2016), o mayor con la inoculación de las células alogénicas (Pigott et al., 2013). No obstante, esta respuesta es ligera y desaparece en poco tiempo, sin conllevar problemas de mayor gravedad (Ardanaz et al., 2016; Pigott et al., 2013).

Asimismo, diversos estudios basados en enfrentar MSCs con células inmunes de individuos adultos incompatibles para el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que puede producirse una respuesta inmune humoral, celular o incluso ambas, dando a entender que hay reconocimiento por parte del sistema inmune pero sin haberse determinado aún la implicación clínica de dicha respuesta (Berglund et al., 2017). Schnabel et al. (2014) analizaron MSCs de distintos caballos, tanto jóvenes como adultos, y encontraron resultados muy heterogéneos en cuanto a la expresión del MHC-II, concluyendo que el porcentaje de MSCs que presentan MHC-II es variable dependiendo del donante y, además, puede verse modificado por un considerable rango de factores tales como la genética, la calidad del aspirado de médula o incluso el estado inmune del animal en ese momento. Por tanto, los autores recomiendan que todos los animales donantes alogénicos sean inmunofenotipados, ya que aquellos con MHC-II positivo producían una respuesta inmune *in vitro* (Schnabel et al., 2014).

Esta teoría es apoyada por el estudio *in vivo* realizado por Broeckx et al. (2019), donde observan que la respuesta clínica tras la inoculación intraarticular de MSCs alogénicas en caballos fue bastante leve, similar a la obtenida al inocular suero salino. Esta falta de reacción la relaciona con la negatividad de las MSCs utilizadas para el MHC tipo I y II, puesto que la expresión de estos antígenos puede inducir la respuesta inmune en individuos incompatibles (Broeckx et al., 2019).

Berglund y colaboradores (2017) presentan una amplia revisión en la cual recogen diversos estudios en distintas especies donde se ha observado una respuesta clínica negativa *in vivo* tras la utilización de MSCs con MHC incompatible. En algunos ensayos en modelos animales se produjo un aumento de las células T circulantes y de las NK, así como de auto-anticuerpos reactivos frente a las MSCs, tras la administración de MSCs incompatibles; no visto con el uso de células MHC compatibles (autólogas). A su vez, las MSCs implantadas en individuos MHC incompatibles perduraban períodos de tiempo considerablemente más cortos que aquellas con un MHC compatible, lo que indica que la incompatibilidad reduce la capacidad reparadora e inmunomoduladora de estas células (Berglund et al., 2017).

Equilibrio inmunomodulación-inmunogenicidad de las MSCs

Tras lo comentado previamente, se establece una gran incógnita en cuanto a qué factores condicionan ese equilibrio entre la inmunomodulación y la inmunogenicidad de las MSCs. Los estudios publicados hasta ahora indican que dicho equilibrio no es dependiente de una sola condición, sino que es el conjunto de muchas lo que hace que las MSCs se comporten de una forma más reguladora o más inmunogénica. Además de la compatibilidad para el MHC, ya mencionada, la exposición de las MSCs a un ambiente inflamatorio y su diferenciación parecen ser factores que influyen significativamente sobre las propiedades inmunes de las MSCs.

Por ejemplo, Barrachina et al. (2018) revisaron la variabilidad existente entre las diferentes especies en cuanto a la expresión del MHC II en MSCs diferenciadas a diferentes linajes y cómo esta diferenciación puede influir en la consiguiente respuesta inmune. En este estudio, observaron que la diferenciación de las MSCs podría provocar un aumento en su inmunogenicidad ya que activaba la expresión de los MHC I y II (Barrachina et al., 2018). A su vez, Ryan et al. (2014) reportan que las características inmunomoduladoras de estas células pueden llegar a perderse tras la diferenciación (Ryan et al., 2014).

Asimismo, las MSCs pueden variar su fenotipo de pro-inflamatorio a antiinflamatorio, según las condiciones con las que encuentren (*Figura 2*).

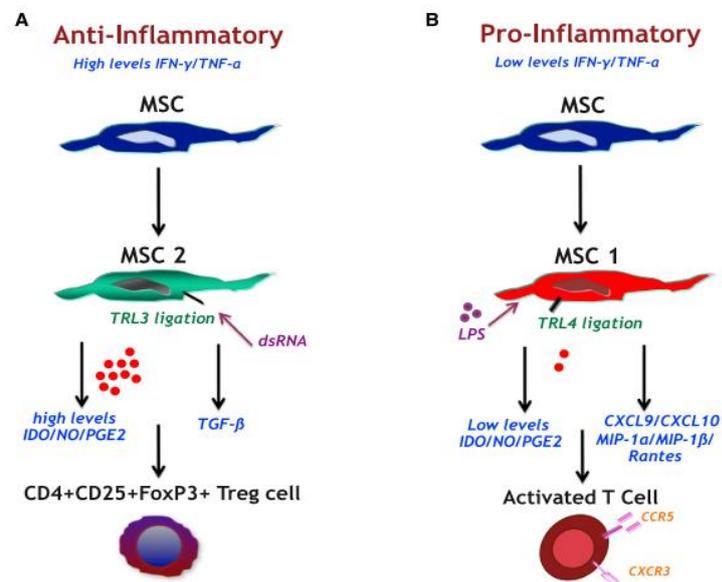


Figura 2. Esquema gráfico de la dicotomía entre el equilibrio inmunomodulador e inmunogénico de las MSCs. (Bernardo & Fibbe, 2013)

Como revisan Ankrum et al. (2014), las MSCs pueden actuar como un antígeno *in vivo* cuando no consiguen activar su capacidad inmunosupresora, tal y como se ve en la *Figura 2*, donde se explica que en ambientes inflamatorios (presencia de IFN- γ y TNF- α) la capacidad inmunomoduladora de las MSCs se activa y son capaces de liberar factores antiinflamatorios como la IL-6 o la PGE2, mientras que en ambientes que carecen de estos estímulos las MSCs pueden volverse pro-inflamatorias y secretar altos niveles de factores inflamatorios (Bernardo & Fibbe, 2013).

Por otro lado, la relación entre el donante y el receptor también parece guardar relación con este equilibrio. Ankrum et al. (2014) discute cómo en varios estudios en modelos murinos se ha observado un rechazo al trasplante de MSCs alogénicas en comparación con el uso de autólogas, viéndose además que dicha respuesta aumenta tras una segunda inoculación, sugiriendo a su vez que hay cierta memoria en la respuesta inmune.

En conclusión, las MSCs se ven sometidas a factores que pueden variar ese equilibrio, siendo los principales la inflamación, la diferenciación y la relación entre el donante y el receptor.

El papel del caballo en investigación traslacional con MSCs

Uno de los animales más utilizados para el estudio de las MSCs es el caballo. Esta especie tiene gran interés como modelo animal al compartir diversas patologías con el ser humano, dándose semejanzas estrechas entre la patogenia y la clínica y abriendo una ventana a la resolución terapéutica entre ambas medicinas, la humana y la animal.

Uno de los campos más estudiados tanto en la medicina humana como en la veterinaria son las enfermedades articulares tanto inflamatorias como degenerativas, viéndose múltiples similitudes entre ambas especies. La resolución terapéutica para estos problemas no siempre es curativa, por lo que recientemente se ha ampliado el estudio de la medicina regenerativa, destacando las MSCs. Además, la biología y las propiedades de las MSCs equinas son bastante similares tanto a las MSCs humanas como a las murinas, lo cual facilita la investigación en esta área. Por esta razón, se puede considerar al caballo un buen modelo traslacional, ya que los estudios realizados en este animal se asemejan más a las características humanas que las obtenidas en otros modelos no humanos (Carrade et al., 2012; Hecke et al., 2021).

Actualidad y futuro de las MSCs

En los últimos 5 años se han recogido más de 25.000 publicaciones científicas sobre las MSCs, dado su creciente interés en el campo de la biología celular, la genética y la medicina regenerativa (Filiano, 2021). Asimismo, tal y como recoge el portal *Clinical Trials*, se han realizado más de 1000 ensayos clínicos en especialidades muy diversas en los últimos años, guardando más de 300 relación con el uso de células alogénicas (<https://clinicaltrials.gov>).

Aunque las MSCs son células muy estudiadas, aún existe la controversia en cuanto al inmunoprivilegio de estas células y su efectividad una vez son inoculadas *in vivo*. No obstante, deben aunarse los esfuerzos entre la investigación con modelos *in vitro e in vivo*, tanto en medicina humana como animal, para elucidar las complejas interacciones entre las MSCs y el sistema inmune y establecer procedimientos adecuados para evitar o atenuar la respuesta inmune por parte del receptor, favoreciendo así tanto la seguridad como la efectividad de la terapia (Aldrich et al., 2021).

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Por todo lo expuesto, el objetivo principal de este Trabajo de Fin de Máster es estudiar el efecto de la inflamación, de la diferenciación condrogénica y de la compatibilidad para el MHC sobre el equilibrio inmunomodulación-inmunogenicidad de las MSCs equinas. El estudio se realizará en la especie equina por su importancia como paciente veterinario y como modelo con potencial de traslación a medicina humana.

Para alcanzar este objetivo general, se proponen como objetivos específicos el estudio de la secreción de moléculas implicadas en la inmunomodulación e inmunogenicidad de las MSCs equinas (IL-6, PGE2 e IFN- γ) en diversas situaciones:

- Analizar la secreción basal de los mediadores IL-6, PGE2 e IFN- γ por parte de las MSCs sin estimular, estimuladas con citoquinas proinflamatorias, y diferenciadas a condrocitos.
- Estudiar cómo influye la compatibilidad para el MHC entre donantes y receptores analizando la secreción de estos mediadores tras enfrentar *in vitro* MSCs sin estimular, estimuladas y diferenciadas con linfocitos autólogos o alogénicos procedentes de animales compatibles e incompatibles para el MHC.

METODOLOGÍA

Para estudiar la acción inmunomoduladora-inmunogénica de las MSCs equinas en distintos contextos, se ha analizado la secreción de diversas moléculas de interés en el sobrenadante de cultivo de MSCs (sin estimular, estimuladas y diferenciadas), antes (basal) y después de enfrentarlas a linfocitos autólogos o alogénicos MHC-compatibles e incompatibles. Para ello, se han utilizado ensayos tipo ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) para estudiar el IFN- γ , la PGE2 y la IL-6.

El estudio de la inmunomodulación está basado en el potencial de las MSCs para modular la respuesta inmune. Para valorar esta propiedad, se estudia la secreción de las moléculas que hemos mencionado previamente (IL-6, PGE2 e IFN- γ) por parte de las MSCs y/o de los linfocitos de sangre periférica (PBLs) activados y cultivados juntos. Por otra parte, el estudio de la inmunogenicidad se basa en la hipótesis de que las MSCs podrían producir o generar una respuesta inmune en ciertas situaciones.

Este estudio forma parte del proyecto de investigación “Optimización del uso de MSCs en patologías articulares en caballo: equilibrio inmunomodulación-inmunogenicidad”; financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, y llevado a cabo en la Universidad de Zaragoza por el grupo LAGENBIO, dentro de su línea de investigación en terapias celulares veterinarias con aplicación a investigación traslacional. El desarrollo experimental de este Trabajo de Fin de Máster se ha englobado en un proyecto más grande utilizando muestras procedentes de experimentos con más finalidades.

Por ello, parte de la metodología para conseguir estas muestras es común a otros ensayos y se describirá solo brevemente para comprender el contexto del diseño experimental, dando énfasis a las metodologías específicas que han generado los resultados de este trabajo.

Diseño experimental

El diseño experimental se basa en la realización de ensayos ELISA para determinar la concentración de IL-6, PGE2 e IFN- γ en sobrenadantes de cultivo celular. Dichos sobrenadantes proceden del cultivo de MSCs equinas en distintas condiciones (sin estimular, MSC-SE; estimuladas, MSC-E; o diferenciadas a condrocitos, MSC-D), solas o tras estar expuestas a linfocitos autólogos o alogénicos compatibles o incompatibles para el MHC en ensayos de inmunomodulación y de inmunogenicidad.

Animales

Los caballos utilizados fueron seleccionados previamente como parte del proyecto global del grupo LAGENBIO. La implicación de estos animales se basa en el estudio de sus haplotipos genéticos para el ELA o *antígeno leucocitario equino*, el cual define la compatibilidad o no entre estos animales para el MHC, lo cual se relaciona con el reconocimiento inmune por parte del receptor. Todos los procedimientos que implican el uso de animales estuvieron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (PI-15/16).

Para determinar su haplotipo, se extrajo sangre de todos los animales y se analizó el mismo según el panel de marcadores microsatélites utilizado por Sadegui et al. (2018), mediante PCR multiplex utilizando los cebadores y la metodología previamente descritos. (Sadeghi et al., 2018).

Los 11 animales implicados en el estudio se dividen en donantes (D1, D2 y D3) y en receptores (R1, R2, R3, C1, C2, C3, A1 y A2). En la *Tabla 1* se puede observar la relación de compatibilidad/incompatibilidad entre los animales.

COMPATIBILIDAD/INCOMPATIBILIDAD ENTRE ANIMALES		
Donante	Receptor	
	Compatible	Incompatible
D1	R1, R2, R3	A1, A2
D2	A1, A2	R1, R2, R3
D3	C1, C2, C3	A1, A2

Tabla 1. Representación gráfica de la compatibilidad e incompatibilidad entre donantes y receptores.

Obtención de las células: MSCs y PBLs

➤ **Obtención de las MSCs**

Las muestras estudiadas consisten en los sobrenadantes provenientes de co-cultivos establecidos en condiciones diversas y explicados en la siguiente tabla (*Tabla 2*). La obtención de las MSCs y de los PBLs (linfocitos de sangre periférica) fue realizada previamente por el equipo de LAGENBIO para la realización de diversos ensayos, por lo que solo se explicará brevemente.

Para la obtención de las BM-MSCs de los caballos donantes (D1, D2 y D3) se extrajeron entre 20-40 ml de médula ósea del esternón y se aislaron las células nucleadas mediante centrifugación en gradiente de densidad, las cuales se sembraron con medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) bajo en glucosa, con 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina y 10% de suero fetal bovino, bajo unas condiciones de cultivo de 37°C y 5% de CO₂ (Barrachina et al., 2017). Los pases de cultivo se realizaron cuando las células adherentes alcanzaron el 80% de confluencia. Una vez llegado a este punto, se separaron de la placa de cultivo con tripsina y se resembraron nuevamente hasta el 3^{er} o 4^o pase, cuando se criopreservaron para su uso en los diferentes ensayos.

Para la obtención de las MSCs estimuladas (MSC-E), las células fueron estimuladas durante las 12 horas previas al co-cultivo mediante 5ng/mL de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ y TFN- α , previamente descritas como activadoras de la inmunomodulación (Barrachina et al., 2017).

Para estudiar el efecto de la diferenciación de las MSCs, estas fueron diferenciadas a condrocitos utilizando el kit Stempro Chondro de Thermofisher, el cual contiene todos los reactivos necesarios para la inducción de la condrogénesis de las MSCs y la obtención de condrocitos diferenciados. Esta diferenciación se completó mediante la técnica de micro-masas, que consiste en sembrar las MSCs a muy alta densidad para generar un ambiente en 3D que potencie su diferenciación (Sulaiman et al., 2021).

➤ **Obtención de PBLs**

Para la obtención de los PBLs se extrajeron 40 ml de sangre periférica de todos los caballos, se recogió el plasma y posteriormente se incubó con hierro carbonilo, un compuesto que es fagocitado por los granulocitos, permitiendo separarlos mediante un imán. El sobrenadante restante se centrifugó en gradiente de densidad para separar los linfocitos de los componentes restantes. Los linfocitos obtenidos se cultivaron con medio RPMI, suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 10% de FBS y 50 μ M de mercaptoetanol. Estas células se mantuvieron con las mismas condiciones ambientales que las MSCs, con la diferencia que los linfocitos no pueden congelarse y deben utilizarse en fresco.

Las MSCs se obtuvieron de los animales donantes, mientras que los linfocitos fueron extraídos de todos los animales para poder realizar los co-cultivos autólogos y alogénicos (compatibles e incompatibles). Además, los linfocitos se utilizaron para los controles tanto negativos como positivos en las placas de inmunomodulación y de inmunogenicidad.

Tipos de co-cultivo

Los ensayos basados en los co-cultivos de MSCs y PBLs a partir de los que se obtuvieron los sobrenadantes se dividen en dos categorías: inmunomodulación (IM) e inmunogenicidad (IG). El estudio de la inmunomodulación está basado en el potencial de las MSCs para modular la respuesta inmune. Para valorar esta propiedad, se estudia la secreción de las moléculas que hemos mencionado previamente (IL-6, PG E2 e IFN- γ) por parte de las MSCs y/o de los PBLs bajo unas condiciones de cultivo específicas. Por otra parte, el estudio de la inmunogenicidad se basa en la hipótesis de que las MSCs son capaces de producir o generar una respuesta inmune en ciertas situaciones. Para valorarlo, se han establecido los mismos grupos que en el apartado de inmunomodulación. La diferencia entre las dos categorías se basa principalmente en el estado de los linfocitos utilizados.

Para el estudio de la inmunomodulación, se utilizan linfocitos activados mediante el uso del mitógeno fitohemaglutinina (PHA), la cual hace que proliferen. De esta manera, se busca estudiar si las MSCs, en las distintas condiciones, son capaces de modular la proliferación de los linfocitos mediante la producción de factores paracrinos inmunomoduladores (IL-6 y PGE2), así como de reducir la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos.

Por otro lado, en los ensayos de inmunogenicidad el objetivo es estudiar si las MSCs pueden inducir una respuesta inmune y, por tanto, estimular la proliferación de los linfocitos y producción de factores inflamatorios por parte de los mismos. Por esta razón, los linfocitos enfrentados a las MSCs en los ensayos de inmunogenicidad no están previamente activados.

Los controles establecidos para ambos ensayos están conformados por linfocitos únicamente. No obstante, difieren según se estudie la IM o la IG. En inmunomodulación, los controles se componen por linfocitos solos, activados con PHA en el caso del control positivo o sin activar en el caso del control negativo. Lo que se busca comprobar con estos controles es la posible secreción de las moléculas de interés por parte de los linfocitos sin estar en presencia de las MSCs.

Por otro lado, en inmunogenicidad como controles se utilizan MLR (*mixed lymphocyte reaction*), los cuales se basan en el enfrentamiento entre linfocitos respondedores y linfocitos estimuladores. Los estimuladores son linfocitos tratados previamente con mitomicina para inhibir su proliferación y que sirvan únicamente como estímulo alogénico, mientras que los respondedores son los linfocitos que se espera que reaccionen y se activen proliferando y secretando mediadores pro-inflamatorios. En el control negativo de IG los linfocitos estimuladores y respondedores son compatibles, por lo que se espera que estos últimos no se activen (MLR M-). Por contra, en el control positivo, estimuladores y respondedores son incompatibles, por lo que los segundos deberían activarse en respuesta al estímulo alogénico (MLR mm+). En definitiva, los controles de uno y otro ensayo buscan comparar los valores obtenidos por parte de los linfocitos solos y los obtenidos tras su cocultivo con las MSCs, para poder determinar si estas últimas tienen un efecto inmunomodulador o si generan una respuesta inmunogénica.

Por tanto, los sobrenadantes estudiados mediante ELISA proceden de las siguientes condiciones:

- **Cultivo basal:** compuesto por las MSCs solas (sin estimular, estimuladas y diferenciadas), antes del co-cultivo.
- **Co-cultivo compuesto por las MSCs del donante y los linfocitos del receptor:** En este caso, se enfrentan las MSCs anteriores (sin estimular, estimuladas o diferenciadas) a linfocitos autólogos y alogénicos compatibles (*matched*) e incompatibles (*mismatched*), en las condiciones descritas para IM (linfocitos activados con PHA, ratio MSC:PBL 1:10, 3 días) y para IG (linfocitos sin activar, ratio MSC:PBL 1:50, 5 días).
- **Controles inmunomodulación:** control negativo (linfocitos solos sin activar) y control positivo (linfocitos solos activados).
- **Controles inmunogenicidad:** control negativo o MLR M- (linfocitos respondedores y linfocitos estimuladores compatibles) y control positivo o MLR mm+ (linfocitos respondedores y linfocitos estimuladores incompatibles). Los linfocitos respondedores se enfrentan a los linfocitos estimuladores, los cuales han sido tratados con mitomicina para evitar su proliferación pero que puedan inducir la activación de los primeros. Esta activación solo debería darse en la situación de incompatibilidad.

Condición	Tipo celular utilizado		
	MSCs donante	Linfocitos del donante	Linfocitos del receptor
Basal	X		
Auto	X	X	
Compatible	X		X (Compatibles)
Incompatible	X		X (Incompatibles)
CTL-		X (Linfocitos solos)	
CTL+		X (Linfocitos con PHA)	
MLR M-		X (Compatibles)	
MLR mm+		X (Incompatibles)	

Tabla 2. Condiciones establecidas en el estudio de la inmunomodulación/inmunogenicidad. CTL-: control negativo; CTL+: control positivo; MRL M-: reacción mixta de linfocitos, control negativo; MLR mm+: reacción mixta de linfocitos, control positivo.

Las condiciones del co-cultivo se establecieron a 37° C y con 5% de CO₂. El co-cultivo formado por MSCs-PBLS en IM, se mantuvo durante 3 días, con una ratio MSCs: linfocitos de 1:10, mientras que en IG, el cultivo se mantuvo durante 5 días y la ratio utilizada fue de 1:50. Antes del co-cultivo (MSCs solas) y tras los tiempos establecidos de co-cultivo, se recogieron los sobrenadantes de los co-cultivos y de los controles correspondientes, se centrifugaron durante 10 minutos a 500 G para desechar posibles restos celulares, se alicuotaron y marcaron siguiendo la codificación preestablecida y se almacenaron en congelación a -20°C hasta la realización de los ELISAs. Para este estudio se han analizado un total de 1278 muestras de sobrenadantes, valorándose por duplicado tanto las muestras experimentales como los controles.

Test ELISA para la cuantificación de IL-6/ IFN- γ

Para realizar los ensayos ELISA se recurrió a kits específicos utilizados en estudios similares en caballos (Carrade Holt et al., 2014). Para la detección de IL-6 equina e IFN- γ equino se utilizaron los kits denominados “*DuoSet ELISA Development Kit*”, siendo la casa comercial R&D Systems.

Ambos kits se basan en el ELISA tipo sándwich e incluyen todo el contenido necesario para, una vez incorporadas las muestras, detectar de manera cuantitativa la presencia de IL-6 e IFN- γ , respectivamente. Al compartir ambos kits ELISA la misma base, la secuencia de pasos realizada es la misma y, por tanto, se explicará conjuntamente, siendo los únicos cambios los realizados en las concentraciones de la curva estándar. Todas las muestras, controles y puntos de la curva estándar se analizaron por duplicado.

1. Preparación de los reactivos y de las muestras: los reactivos fueron diluidos según los criterios establecidos por la casa comercial y las muestras fueron diluidas con diluyente de reactivos en proporción 1:1 (factor de dilución 2).
2. Preparación de la placa para el ensayo ELISA con el anticuerpo de captura: el día anterior al ensayo se cubrió el fondo de todos los pocillos a utilizar con el anticuerpo de captura. Los pocillos indicados se cubrieron con 100 μ L de la solución de anticuerpo de captura proporcionada en el kit. La placa se incubó durante la noche a temperatura ambiente y en oscuridad. Al anticuerpo de captura se unen los antígenos de interés presentes en la muestra, en nuestro caso la IL-6 o el IFN- γ secretados en el sobrenadante por las MSCs o PBLS.

Al día siguiente, se retiró el contenido de cada pocillo y se lavó cada uno con la solución de lavado del kit un total de 3 veces. En nuestro caso este paso se realizó utilizando una pipeta multicanal y un frasco lavador. Tras el último lavado, se utilizó un papel absorbente para retirar el exceso de solución de lavado y se aspiraron las posibles burbujas remanentes o el contenido que pudiera haber quedado en los pocillos, asegurándonos de que aquellos que íbamos a utilizar estaban completamente vacíos.

3. Bloqueo de los sitios de unión inespecífica de la placa: tras los lavados anteriores, se añadió a cada pocillo un volumen de 300 μL del reactivo diluyente con el objetivo de bloquear aquellos huecos del fondo del pocillo que pudieran estar sin cubrir por el anticuerpo de captura y así evitar que pudieran adherirse otras moléculas, como el anticuerpo de detección, en los siguientes pasos, ya que podría dar una señal inespecífica. Este reactivo contiene una proteína que no es de interés como la albúmina sérica bovina (BSA), la cual bloqueará los sitios de unión inespecífica. Se repitió el lavado como se ha descrito en el paso anterior.
4. Preparación de la curva estándar: la curva estándar se realizó con 8 concentraciones conocidas de la molécula de interés a partir de diluciones seriadas, añadiéndose un noveno punto como control negativo (compuesto por diluyente únicamente). Se añadieron 100 μL /pocillo de cada dilución en duplicado. La dilución se realizó a partir de una concentración primaria diferente según la molécula y proporcionada en cada kit. Tal y como se muestra en la *Tabla 3*, las concentraciones establecidas en cada recta son diferentes. Es muy importante incorporar siempre una curva estándar o de referencia en cada placa para correlacionar la señal obtenida con concentraciones definidas, así como un control negativo para sustraer la señal de fondo.
5. Adición de las muestras: se añadieron 100 μL /pocillo de cada muestra en duplicado. Se cubrió la placa con la lámina de aluminio para dejarla incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. En este paso la IL-6 o el IFN- γ presentes en las muestras son reconocidos por los anticuerpos de captura y se unen a ellos de manera permanente, permitiendo que el siguiente anticuerpo de detección se una a ellos en el paso inmediatamente posterior. Tras la incubación se lavaron los pocillos como se ha descrito.

6. Adición del anticuerpo de detección: el siguiente paso se basa en añadir 100 μL de la solución del anticuerpo de detección proporcionada en el kit. Este anticuerpo de detección se une a las moléculas IL-6/ IFN- γ retenidas por el anticuerpo de captura, y forman un complejo en el que la molécula de interés queda en medio, lo que da el nombre de “sándwich” a este tipo de análisis ELISA. Se cubrió nuevamente la placa con la lámina de aluminio y se dejó incubando con las mismas condiciones que antes durante 2 horas a temperatura ambiente. Se repitió el lavado de las placas.
7. Unión del complejo estreptavidina-HRP (*horseradish peroxidase*) al anticuerpo de detección: se añadieron 100 μL de la solución compuesta por estreptavidina-HRP a cada pocillo. Este complejo se une al anticuerpo de detección mediante la reacción de la estreptavidina con la biotina, con la que va marcado el anticuerpo y que a su vez está unido a las moléculas de IL-6/IFN- γ . Se cubrió la placa para evitar su exposición a la luz directa y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron nuevamente las placas.
8. Adición del sustrato y formación del color: se añadieron 100 μL de la solución con el sustrato a cada pocillo y se incubó durante 20 minutos con las mismas condiciones que en el paso 7. Al añadir esta solución, la enzima peroxidasa del rábano (HRP) presente en el pocillo (conjugada al anticuerpo de detección) cataliza el sustrato, produciendo un compuesto coloreado. De esta manera, cuanto mayor concentración haya de HRP-estreptavidina unida a los complejos antígeno-anticuerpo, mayor color se obtendrá en cada pocillo.
9. Detención de la reacción: Tras la incubación, se añaden 50 μL a cada pocillo de la solución de parada para detener la formación de color. Es necesario homogeneizar la placa ligeramente para que se mezclen adecuadamente los compuestos y se forme un color homogéneo amarillento.
10. Medición de la absorbancia (densidad óptica) de cada pocillo inmediatamente en un espectrofotómetro para placas. Se utilizó un lector de placas NOVOstar Microplate Reader, de BMG LABTECH con una longitud de onda de 450 nm, utilizando una corrección con una longitud de onda de hasta 560 nm. La corrección debe hacerse, ya que una única lectura a 450 nm puede generar valores finales más altos y, por tanto, erróneos.

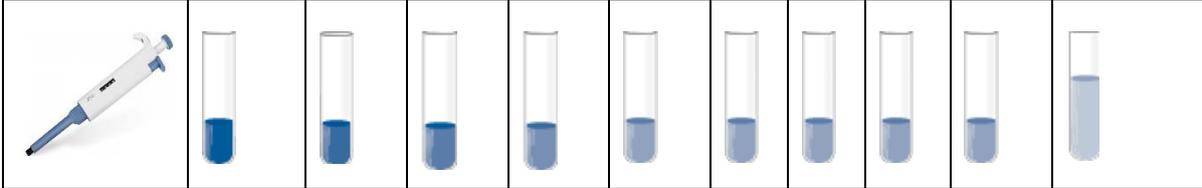
PREPARACIÓN CURVA ESTÁNDAR IL-6/ IFN- γ										
										
IL-6 (pg/ml)	16.000	8.000	4.000	2.000	1.000	500	250	125	62.5	Negativo
IFN-γ (pg/ml)	8.000	4.000	2.000	1.000	500	250	125	62.5	31.25	Negativo

Tabla 3. Representación gráfica de la preparación de la curva estándar para IL-6 e IFN- γ

Test ELISA para la cuantificación de PGE2

El ensayo utilizado para la medición cuantitativa de la prostaglandina E2 en nuestras muestras fue un *Parameter Prostaglandin E2 Assay* de la compañía R&D Systems. Se trata de un ELISA de competición dirigido a la especie humana, cuya elección está respaldada por otros estudios con buenos resultados tras su utilización en la especie equina (Colbath et al., 2017).

Este ensayo se basa en la competición entre el analito de la muestra de interés y el analito añadido de forma exógena por unirse al anticuerpo adherido al fondo de los pocillos, de forma que se realiza una detección indirecta de la molécula de interés.

En cada pocillo hay un número determinado de sitios de unión (anticuerpo monoclonal de ratón), a los que se pueden unir las moléculas de PGE2 presentes en nuestra muestra o la PGE2 unida a HRP que se añade de forma exógena. Primero se añade la muestra, permitiendo la unión de la PGE2 presente al anticuerpo adherido al fondo del pocillo. Tras este paso, se añadiría la solución con la PGE2-HRP, que se unirá a los sitios de unión libres, no ocupados por la PGE2 de nuestra muestra. El siguiente paso será incorporar un sustrato que, al ser catalizado por la HRP, producirá una señal colorimétrica detectable en el espectrofotómetro. De esta manera, cuanto más color haya, menos PGE2 de la muestra se habrá unido y, por tanto, menor concentración de la misma habrá en dicha muestra.

El protocolo se realizó siguiendo los pasos indicados por el fabricante:

1. Preparación de los reactivos y las muestras: las muestras fueron diluidas siguiendo distintos factores de dilución en función del tipo de muestra. Los sobrenadantes basales (MSCs solas) fueron diluidos 1:2, con un factor de dilución 3, los controles siguieron un patrón de dilución

1:10, con factor de dilución 11, mientras que las muestras experimentales (co-cultivos IM e IG) fueron diluidas 1:50, con un factor de dilución 51.

2. Preparación de la curva estándar: tal y como se muestra en la *Tabla 4*, la curva estándar se realizó con 8 concentraciones conocidas de la molécula de interés a partir de diluciones seriadas. Se añadieron 100 μL /pocillo de cada dilución en duplicado. La dilución se realizó a partir de una concentración primaria proporcionada en el kit.
3. Establecimiento de los controles negativos y NSB (unión no específica): se añadieron 150 o 200 μL del diluyente calibrador a los pocillos negativos y NSB, respectivamente. La finalidad de los pocillos NSB es restar su valor de absorbancia al de cada pocillo una vez se obtienen los resultados, para poder descartar cualquier señal inespecífica.
4. Adición de muestras: se añadieron 150 μL de cada muestra, ya sea basal, control, experimental o de curva estándar, en duplicado y siguiendo las diluciones arriba descritas.
5. Adición del anticuerpo primario: se añadieron 50 μL de la solución con el anticuerpo primario a cada pocillo, excluyendo los pocillos NSB. Se colocó una lámina de aluminio para sellar la placa y dejarla incubando durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. Para ello, se dispuso en un agitador de placas a 500 revoluciones por minuto. Durante la incubación, la PGE2 presente en las muestras se une al anticuerpo primario adicionado en este paso. A diferencia de los protocolos de ELISA sándwich, no se lava la placa tras la incubación.
6. Adición del conjugado PGE2-HRP: se añadieron 50 μL a cada pocillo, excepto a los NSB. Se cubrieron las placas nuevamente con la lámina de aluminio y se incubaron en el agitador de placas a 500 rpm y a temperatura ambiente durante dos horas. En esta incubación se produce la competición por parte de la PGE2 por la unión al anticuerpo primario. En este caso, el conjugado añadido solo podrá unirse al anticuerpo que aún este libre y al que no se haya unido la PGE2 presente en las muestras. Tras la incubación, se aspiró cada pocillo y se realizaron 3 lavados con la solución de lavado proporcionada en el kit. Tras el último lavado se eliminó el exceso de solución con papel absorbente y se aspiraron las burbujas o el posible contenido restante presente en cada pocillo.
7. Adición del sustrato: se añadieron 200 μL de la solución con el sustrato a todos los pocillos y se incubaron las placas durante 30 minutos, protegidas de la luz y sin agitación. El sustrato será catalizado por la HRP conjugada con la PGE2 que haya conseguido unirse a los sitios de unión libres del anticuerpo de captura.

Cuanta mayor concentración de PGE2-HRP se haya unido al anticuerpo primario, mayor intensidad de color habrá, indicando por tanto menor PGE2 presente en las muestras estudiadas.

8. Detener la reacción: se añadieron 100 μ L de la solución de parada a cada pocillo. El color de los pocillos debe cambiar de morado a amarillo y debe ser un color homogéneo. Si se ve de color verdoso, se debe homogeneizar la placa mediante unos toques en el lateral.
9. Determinación de la absorbancia o densidad óptica: la lectura de las placas debe realizarse en un periodo de tiempo menor a 30 minutos. Se utilizó un espectrofotómetro NOVOstar Microplate Reader, de BMG LABTECH para placas con una longitud de onda de 450 nm y una corrección de 560 nm.

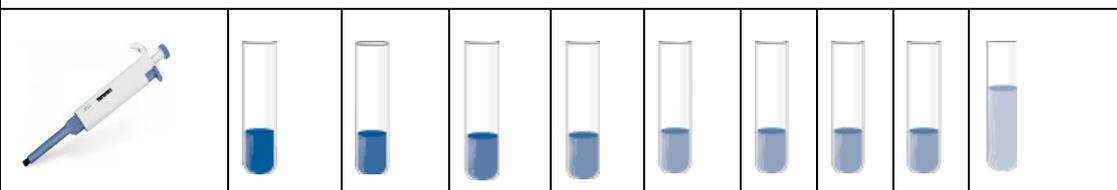
PREPARACIÓN CURVA ESTÁNDAR PGE2									
									
PGE2 (pg/ml)	5.000	2.500	1.250	625	313	156	78	39	Negativo

Tabla 4. Representación gráfica para la preparación de la curva estándar para PGE2.

Análisis de datos

De cada placa y para todas las moléculas, se tomaron dos medidas, una a 450 nm de longitud de onda y la otra a 560 nm de longitud de onda. El software del lector de placas presenta los resultados de absorbancia de cada pocillo en formato Excel, donde se realizó la resta de ambas medidas (valores a 450 nm – valores a 560 nm), ya que el espectrofotómetro utilizado no contenía la corrección necesaria, por lo que los valores se restaron manualmente para eliminar las posibles variaciones debidas a imperfecciones ópticas de la placa.

Los valores obtenidos se analizaron en la plataforma de análisis online *MyAssays*, disponible en el siguiente enlace: <https://www.myassays.com/>. Dicha plataforma permite realizar un análisis 4PL (*four parameter logistics*), recomendado por la casa comercial de los kits ELISA empleados. Consiste en un modelo de regresión, comúnmente utilizado en el análisis de datos para ELISA, ya que sirve para calcular las concentraciones a partir de la curva estándar incluida en cada placa. Según la absorbancia generada por las diferentes concentraciones del analito de la curva estándar, se genera una recta a partir de cuya pendiente el software obtiene la fórmula para extrapolar las concentraciones presentes en las muestras a partir de dicha absorbancia.

Para cada análisis, se establecieron los distintos parámetros requeridos, tales como la distribución de cada placa, los factores de dilución correspondientes, el nombre de las muestras analizadas y las concentraciones de la recta estándar. El software genera un Excel, en el cual se muestran los resultados obtenidos en las unidades de concentración indicadas. El software también detecta las muestras con valores fuera de rango que no pueden cuantificarse por la baja presencia del analito, excluyéndose por tanto del análisis estadístico.

Posteriormente, estos datos fueron ordenados en otro Excel agrupándolos por condiciones experimentales, con la finalidad de facilitar el análisis estadístico.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa *GraphPad Prism 5*. El análisis se basó en la comparación de los resultados obtenidos para cada molécula en las siguientes situaciones:

- Comparación de los datos obtenidos entre las condiciones “Basal”, combinación “Autóloga”, “*Matched*” o compatible y “*Mismatched*” o incompatible para cada tipo de MSCs (MSC-SE, MSC-E, MSC-D), por separado para los ensayos de inmunomodulación (IM) e inmunogenicidad (IG).
- Comparación entre los datos obtenidos para cada tipo de MSCs (“SE” o sin estimular, “E” o estimuladas y “D” o diferenciadas) entre las condiciones basal y los distintos co-cultivos, por separado para los ensayos de IM e IG.
- Comparación de los datos obtenidos en las clases precedentes frente a los controles “CTL- y CTL+” en inmunomodulación, o frente a MLR M- y MLR mm+ en inmunogenicidad.

El protocolo de análisis seguido para todas las comparaciones ha sido el mismo. Se comenzó con el análisis de la normalidad de los datos, utilizando el test Shapiro Wilk. En el caso de que los datos siguieran una distribución normal, se utilizaron test paramétricos no pareados (test One-Way Anova y análisis posterior Tukey), mientras que, si la distribución no era normal, se eligió un test no paramétrico y no pareado (Kruskal-Wallis test, y posteriormente, test Dunn para todas las columnas). Se ha considerado estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis y discusión se va a dividir en tres apartados, diferenciados según la molécula estudiada. Cada uno de estos apartados se ha subdividido, además, en una primera parte sobre la función de cada molécula y en otras dos partes que recogen el análisis de inmunomodulación e inmunogenicidad.

Resultados cuantificación IL-6

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica, producida por un diverso grupo de células inmunes o no inmunes como macrófagos, células dendríticas, linfocitos tipo B o MSCs. A su vez, es una de las encargadas de regular múltiples aspectos de la respuesta inmune, tales como la hematopoyesis, la inflamación o las respuestas de fase aguda, con un rol principal en la respuesta inmune primaria (Eddahri et al., 2016; Rochman et al., 2015). Además, otros autores afirman que la IL-6 es una citoquina proinflamatoria (Burton et al., 2009), por lo que esta molécula tendría un rango de acción dicotómico.

Una de sus principales características es que interviene en la activación de la vía STAT3, implicada a su vez en la regulación de la expresión de otras citoquinas, y consecuentemente, en la reparación de tejidos por parte de las MSCs. Se ha demostrado que la IL-6 secretada por las MSCs es capaz de activar esta vía reguladora (Ayala-cuellar et al., 2019; Shabbir et al., 2010). Asimismo, se ha demostrado que la IL-6 posee la capacidad de actuar en la diferenciación, desarrollo, regeneración y remodelación de ciertos tejidos, incluido el cartílago (Id et al., 2020).

Por otro lado, la IL-6 se considera un factor soluble relevante en la inmunomodulación mediada por las MSCs, ya que se encarga, junto con otras moléculas, de reducir la proliferación de las células T (Carrade et al., 2012). Sin embargo, se ha observado en MSCs murinas que la IL-6 no producía un efecto inmunomodulador relevante, mientras que en MSCs humanas se ha descrito que las MSCs sin estimular pueden secretar esta molécula y generar una acción dañina o beneficiosa dependiendo del tejido u órgano diana (Ayala-cuellar et al., 2019; Kondo et al., 2014). Por tanto, cabe destacar la importancia de la especie a la hora de valorar los efectos de cada citoquina al existir variabilidad en los mecanismos inmunomoduladores de las MSCs de cada especie (Ren et al., 2008).

La IL-6 es capaz de inhibir la apoptosis *in vitro* de células T activadas por antígenos (Rochman et al., 2015) o en reposo en el caso de MSCs de ratón (Teague et al., 1997). Tanto es así, que se ha visto que la inhibición de la IL-6 producida por las MSCs en co-cultivo provoca la disminución de la proliferación de los linfocitos T, aumentando a su vez la apoptosis de neutrófilos. Por otro lado, Najjar et al. (2009) describen que, al incluir anticuerpos frente a la IL-6 (Anti-IL-6) para bloquearla en co-cultivos de MSCs con linfocitos T, el número de estos últimos decae progresivamente. Sin embargo, una vez se retiran estos anticuerpos, la concentración de linfocitos T aumenta considerablemente, indicando que esta citoquina es primordial en la regulación de la proliferación de los linfocitos (Najar et al., 2009).

Eddhari y colaboradores (2008) presentan otra característica de la IL-6: la capacidad para promover la diferenciación de los linfocitos T inmaduros a linfocitos T *helper* que expresan la molécula de superficie CD4+, la cual junto a otros receptores reconoce los antígenos presentados por el MHC-II de las células presentadoras de antígenos. De esta manera, estos linfocitos se activan y proliferan, interviniendo en la respuesta inmune innata y adaptativa mediante la activación de las células B y la consiguiente secreción de anticuerpos (Eddahri et al., 2016; Steward-Tharp et al., 2010; Wing & Sakaguchi, 2010).

Dicho esto, los resultados del presente estudio muestran, tanto en el análisis de inmunomodulación (IM) como en el de inmunogenicidad (IG), que los valores más altos de IL-6 se han obtenido en las MSCs estimuladas, concordando con resultados vistos previamente en otros estudios en los que se afirma que las MSCs previamente estimuladas con IFN- γ y/o TFN- α producen mayores concentraciones de esta molécula (Borjesson & Peroni, 2011)

Ensayo de Inmunomodulación (IM)

Los valores más altos de IL-6 se han obtenido en los co-cultivos autólogos, principalmente en aquellos en los que las MSCs se encuentran previamente estimuladas. Tal y como se observa en la *Figura 3*, al comparar los tres tipos de MSCs (MSC-SE, MSC-E y MSC-D) para un mismo tipo de co-cultivo (autólogo, alogénico MHC-compatible y alogénico MHC-incompatible) se observó en todos los casos que las MSC-E generaban los mayores niveles de IL-6, seguidas por las MSC-SE y, con valores muy bajos, las MSC-D. Sin embargo, a pesar de presentar valores altos, la concentración de IL-6 únicamente fue significativamente mayor respecto a MSC-D en el co-cultivo incompatible ($p < 0,05$). Por otro lado, se han observado diferencias significativas, tanto en el co-cultivo compatible como en el incompatible, respecto a los controles.

En el caso de los co-cultivos compatibles, estas diferencias se observan entre MSC-SE y CTL- ($p < 0,05$) y CTL+ ($p < 0,01$), al igual que con MSC-E y CTL- ($p < 0,001$) y CTL+ ($p < 0,001$), no habiendo diferencias entre MSC-D y los controles. En los co-cultivos incompatibles, también hay diferencia significativa entre MSC-SE y CTL+ ($p < 0,05$), así como entre MSC-E y CTL- ($p < 0,01$) y CTL+ ($p < 0,001$), pero no de MSC-D respecto a los controles. Los valores obtenidos en los controles son muy bajos, ya que es esperable que los linfocitos por sí solos no produzcan IL-6, dado que su secreción se debe principalmente a las MSCs. Carrade et al. (2012) observa resultados similares, donde los co-cultivos conformados por MSCs y PBMCs presentaron significativamente más IL-6 que los linfocitos T sin estimular o activados con PHA (Carrade et al., 2012)

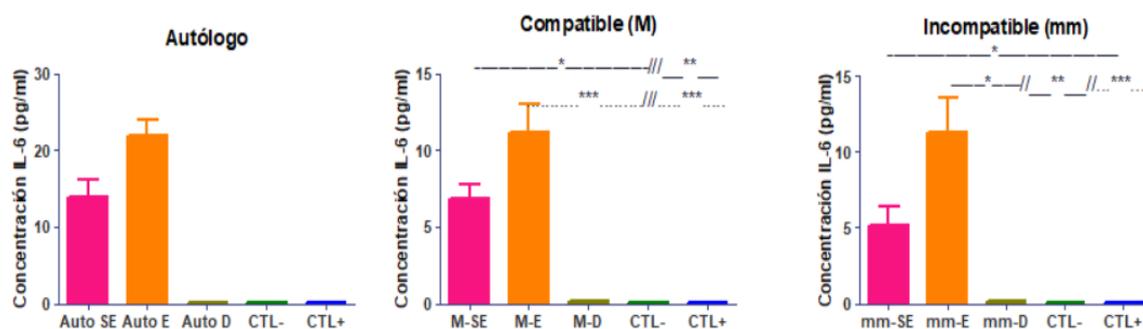


Figura 3. Secreción de IL-6 en los ensayos de inmunomodulación. Comparativa entre co-cultivos con células madre mesenquimales (MSCs) sin estimular (MSC-SE), estimuladas (MSC-E) y diferenciadas (MSC-D) y controles, negativo (CTRL-) y positivo (CTRL+), en combinación autóloga (auto), alógena compatible (M) e incompatible (mm). Diferencias significativas representadas por *: $(p < 0,05)$; ** $(p < 0,01)$; *** $(p < 0,001)$.

Por otro lado, en la *Figura 4* pueden verse los mismos grupos de datos utilizados anteriormente, pero agrupados de distinta forma para poder valorar otras diferencias observables. En este caso, se comparan los tres tipos de co-cultivos (autólogo, compatible e incompatible) con MSCs sin estimular, estimulados y diferenciados por separado, viéndose una tendencia similar para MSC-SE y MSC-E y con valores mucho más bajos y similares entre co-cultivos para MSC-D. Cabe destacar que, para los tres tipos de MSCs, la secreción de IL-6 basal (MSCs solas) es muy baja o prácticamente nula. Los valores más altos se han dado en los co-cultivos con MSC-E, donde se ha dado una diferencia significativa entre el co-cultivo autólogo y el basal ($p < 0,01$). En los co-cultivos sin estimular los valores son más bajos, pero siguen la misma tendencia de mayor secreción en combinación autóloga, pero en los co-cultivos diferenciados la concentración de IL-6 es muy baja, rondando los 0,15 pg/ml en comparación con los 20 pg/ml de los estimulados.

En estudios *in vitro* previos se puede observar que, en co-cultivos compuestos por MSCs y linfocitos previamente activados, la producción de IL-6 aumenta hasta 18 veces respecto a las condiciones basales. La hipótesis que plantean estos resultados es que la capacidad de las MSCs para modular la actividad de las células inmunes, tanto su proliferación como diferenciación, puede estar regulada por la secreción de IL-6, haciendo de esta molécula uno de los principales componentes inmunomoduladores secretado por estas células (Najar et al., 2009). A su vez, Nasef et al. (2008) aseguran que tanto la baja inmunogenicidad, como la capacidad de regulación por parte de las MSCs alogénicas una vez se enfrentan con PBMCs (células mononucleares de sangre periférica), se debe a la producción de ciertos factores solubles, entre los que se incluye la IL-6 (Nasef et al., 2008).

-Además, como también han descrito otros estudios, la exposición a un ambiente inflamatorio activaría el perfil inmunomodulador de las MSCs equinas, lo que se reflejaría en una mayor secreción de IL-6 (Barrachina et al., 2016; Polchert et al., 2008), tal y como se ha observado en este estudio con los co-cultivos con MSC-E.

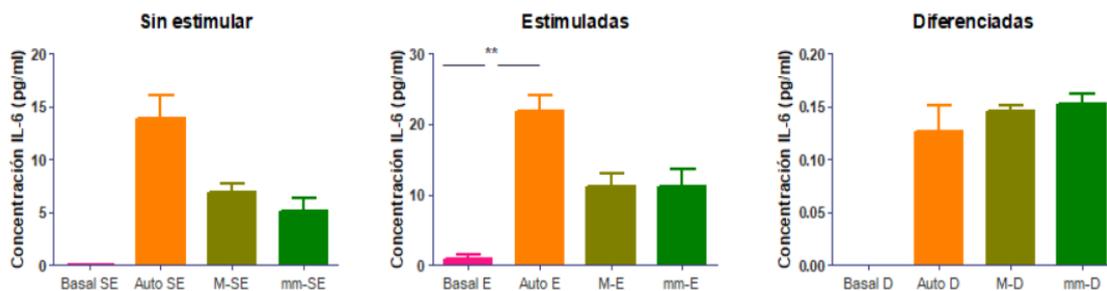


Figura 4. Secreción de IL-6 en los ensayos de inmunomodulación. Comparativa entre co-cultivos SE, E y D, en combinación basal, autóloga (auto), alogénica compatible (M) e incompatible (mm). Diferencias significativas representadas por *: *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001).

Por otra parte, los hallazgos de este estudio apoyan las observaciones de Ryan et al. (2014) de que las MSCs, una vez diferenciadas, producen menor concentración de factores inmunomoduladores como la IL-6 (Ryan et al., 2014). Mientras que dicho trabajo se realizó con MSCs de rata, parece que en la especie equina se seguiría la misma tendencia, aunque cabe destacar que no se han encontrado estudios previos con MSCs de caballo diferenciadas en que se valore su comportamiento en co-cultivos con linfocitos.

En cuanto al efecto del tipo de combinación, pese a que otros trabajos con MSCs equinas han descrito un potencial inmunomodulador similar para las autólogas y las alogénicas (Colbath et al., 2017), en las condiciones de nuestro estudio se ha encontrado mayor secreción de IL-6 en los co-cultivos autólogos, aunque la diferencia no ha sido significativa respecto a los alogénicos

Ensayo de inmunogenicidad (IG)

En este ensayo se observa, en líneas generales, que los valores obtenidos de IL-6 en todas las condiciones son más bajos que en los ensayos de IM. Sin embargo, se ha mantenido la tendencia de las MSC-E a secretar mayores niveles de IL-6.

Al comparar los tipos de MSC dentro de cada tipo de co-cultivo (*Figura 5*), se ha observado un aumento significativo de la IL-6 en los co-cultivos alogénicos MHC-compatibles de MSC-E respecto a MSC-D ($p<0,01$) y a MSC-SE, así como respecto a MLR mm+ ($p<0,05$). También se ha visto un aumento significativo de IL-6 en MSC-E respecto a MSC-D ($p<0,05$) en los co-cultivos MHC-incompatibles. Estas diferencias pueden deberse a que, como se ha comentado previamente para la IM, la inflamación activaría la capacidad inmunomoduladora de las MSCs (Zayed et al., 2021) mientras que la diferenciación la disminuiría (Barrachina et al., 2018), reflejándose en mayores y menores valores de IL-6, respectivamente, secretados por las MSCs..

Las concentraciones más altas de IL-6 se han dado, en general, en los co-cultivos incompatibles, lo cual puede indicar que en este ambiente hay una mayor respuesta por parte de los PBLs que, a su vez, desencadenaría por parte de las MSCs un aumento de la secreción de IL-6. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas entre las distintas combinaciones ni respecto a la secreción basal para ningún tipo de MSCs.

En comparación con los controles MLR M- y MLR mm+, la única diferencia significativa se ha dado en el co-cultivo compatible entre MSC-E y MLR mm+ ($p<0,05$). Los controles presentan valores de IL-6 similares a los co-cultivos de MSC-SE y MSC-D en los tres tipos de co-cultivo. Dado que los controles están únicamente compuestos por linfocitos compatibles o incompatibles, este dato nos indicaría que las MSCs no secretarían niveles relevantes de IL-6 cuando los linfocitos no están activados, lo que de forma indirecta sugeriría una baja capacidad inmunogénica de las MSCs sin estimular y diferenciadas. En el caso de las MSCs estimuladas, la mayor secreción de IL-6 se atribuiría principalmente a la activación de su potencial inmunomodulador.

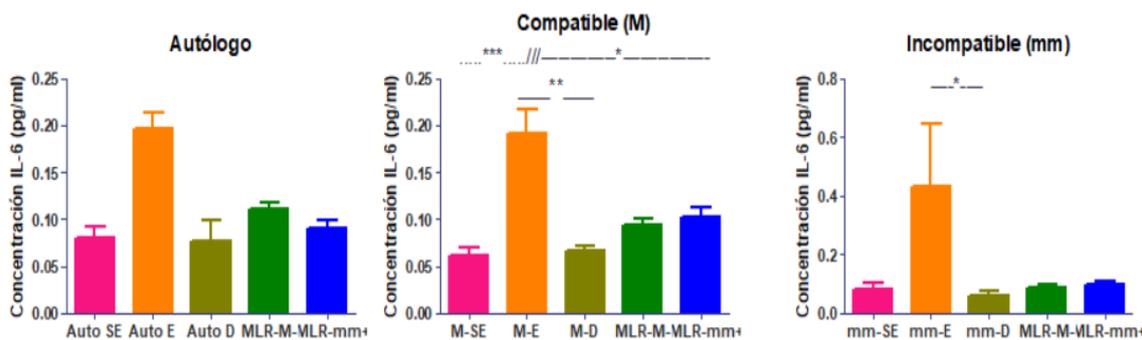


Figura 5. Secreción de IL-6 en los ensayos de inmunogenicidad. Comparativa entre co-cultivos con células madre mesenquimales (MSCs) sin estimular (MSC-SE), estimuladas (MSC-E) y diferenciadas (MSC-D) y control negativo (MLR M-) y positivo (MLR mm+), en combinación autóloga (auto), alógena compatible (M) e incompatible (mm). Diferencias significativas representadas por *: *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001).

Por otra parte, en la comparación entre co-cultivo basal, autólogo, compatible e incompatible mostrada en la *Figura 6*, para las MSC-E se observan valores más elevados de secreción basal en comparación con los otros co-cultivos, aunque con una desviación estándar bastante elevada. Al estar estimuladas, las MSCs serían capaces de producir esta molécula en ausencia de linfocitos, pero su producción no se mantendría en presencia de los mismos si estos no se activan. Por otra parte, para las MSC-SE y MSC-D los valores basales obtenidos son muy bajos o incluso indetectables en el caso de MSC-D. En definitiva, los valores obtenidos en IG son bastante bajos, indicando que las MSCs en presencia de un ambiente no inflamatorio no producirían altos niveles de IL-6. La estimulación previa de las MSCs parece aumentar levemente la secreción, pero sin llegar a los niveles observados en IM.

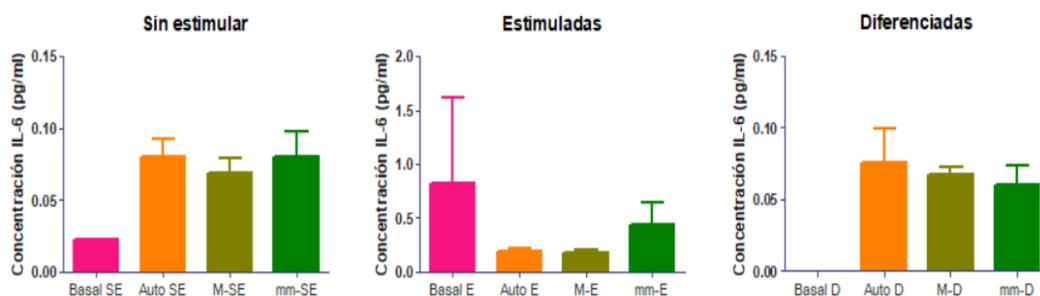


Figura 6. Secreción de IL-6 en los ensayos de inmunogenicidad. Comparativa entre co-cultivos SE, E y D, en combinación basal, autóloga (auto), alógena compatible (M) e incompatible (mm). Diferencias significativas representadas por *: *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Aunque los ensayos de IM e IG no son directamente comparables al variar las condiciones experimentales, es interesante destacar la diferencia entre los valores de IL-6 obtenidos entre ambos tipos de ensayos. Como puede observarse en las gráficas, los valores obtenidos en inmunogenicidad son mucho más bajos que los referentes a inmunomodulación. Tal y como señalan Najar y sus compañeros (2009), la producción de IL-6 aumenta en los co-cultivos en presencia de linfocitos activados con PHA, por lo que seguramente esta es la razón principal por la cual en inmunogenicidad los valores están disminuidos (Najar et al., 2009). A su vez, concuerda este aumento de la producción con la estimulación previa de las MSCs tal y como puede verse en otros estudios (Caffi et al., 2020; Carrade et al., 2012; J. M. Cassano et al., 2018). Los resultados de Carrade et al. (2012) muestran que las MSCs equinas de distintos orígenes producen mayor concentración de IL-6 tras la estimulación de las mismas con citoquinas proinflamatorias y tras su co-cultivo con PBMCs. En dicho estudio, las MSCs no estimuladas no produjeron IL-6, demostrando que estas células requerirían ser estimuladas previamente para activar su perfil inmunomodulador (Carrade et al., 2012). Esta condición parece ser específica de las MSCs equinas, ya que Aggarwal & Pittenger (2005) observaron que las MSCs humanas sí que pueden producir IL-6 en condiciones basales (sin estimular y sin co-cultivar con células inmunes) (Aggarwal & Pittenger, 2005).

Los datos de la producción basal de IL-6 son los mismos para hacer las comparaciones con los co-cultivos tanto de IM como de IG. Sin embargo, mientras que en las gráficas se ve un claro aumento de IL-6 tras los co-cultivos respecto a los valores basales en los ensayos de IM (linfocitos activados), hay menor variación en las gráficas de IG. Aunque otros estudios (Aggarwal & Pittenger, 2005; Id et al., 2020) en humanos y modelos murinos indican que la secreción de IL-6 por parte de las MSCs puede ser elevada en situaciones basales, en las condiciones de este estudio se han detectado niveles bajos e incluso indetectables en algunas condiciones, cabiendo mencionar que la secreción basal de IL-6 no ha podido ser valorada convenientemente al encontrarse en varias muestras por debajo del límite de detección. Aun así, cabe destacar que hay una clara influencia de la especie y de las condiciones necesarias para que se dé la secreción de esta molécula, debiéndose realizar más estudios al respecto para llegar a una conclusión definitiva.

Resultados cuantificación PGE2

Las prostaglandinas son moléculas de pequeño tamaño producidas por las ciclooxigenasas (COX 1 y COX 2) y las sintasas de las prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Una de las más conocidas es la PGE2, dado que es una molécula muy ubicua en el organismo y con múltiples funciones, destacando la hematopoyesis, la señalización neuronal, la filtración renal, la regulación de la presión arterial, la integridad de las mucosas y la permeabilidad muscular a nivel local. Esta molécula puede ser secretada por diversas células, siendo las principales fuentes las células epiteliales, los fibroblastos y las células inflamatorias, sobre todo durante una respuesta inmune. No solo la producen estas células, sino que se ha comprobado que las MSCs también producen PGE2, independientemente de qué tejido se deriven o de qué especie provengan (Carrade Holt et al., 2014).

La PGE2 es capaz de intervenir y regular múltiples aspectos de la inflamación y de la actividad de las células inmunes. Es conocida no solo por ser un mediador activo en la inflamación, sino también por promover la supresión de la síntesis de citoquinas proinflamatorias, por lo que se trata de una molécula con doble función: proinflamatoria e inmunosupresora al mismo tiempo (Kalinski, 2012).

Una de las funciones inmunomoduladoras principales de la PGE2 es la regulación de las células T, regulando la proliferación celular y la apoptosis y siendo el principal de sus efectos el de reducir la proliferación de los linfocitos Th1, encargados de producir citoquinas proinflamatorias como IFN- γ e IL-2 (Connard et al., 2021; Harris et al., 2002). Además, la PGE2 también es capaz de inhibir la secreción de ciertas moléculas co-estimuladoras, reduciendo así indirectamente la activación de los linfocitos. Asimismo, PGE2 contribuye a la inducción de interleucinas inmunosupresoras como IL-4, IL-6 e IL-10. La PGE2, junto con IDO e NO, forman una triada muy relevante para la inmunomodulación de las MSCs que parece común a todas las especies (Caffi et al., 2020).

Un ensayo *in vivo* con MSCs humanas realizado por Auletta et al. (2015), demostró que tras la inoculación de un inhibidor de la PGE2 se revirtió la proliferación de los linfocitos T, la cual había sido previamente disminuida por las MSCs, y consecuentemente, por la PGE2 que estas habían secretado. Otros estudios explican diferentes vías de actuación de esta molécula. Una de ellas está relacionada directamente con las células dendríticas, ya que actúa sobre la maduración y diferenciación de las mismas y, a su vez, reduce la activación de las células T.

La PGE2 no solo actúa sobre dichas células, sino que también lo hace sobre los macrófagos, aumentando la secreción de IL-10 y reduciendo de esta manera la inflamación. La acción de la PGE2 está muy ligada a la de IL-6, pudiendo apreciarse en un modelo murino que la PGE2 inducía la actividad de IL-6, mientras que la IL-6 actuaba directamente sobre la COX-2, confirmándose *in vitro* que en ausencia de IL-6 la producción de PGE2 disminuía (Bouffi et al., 2010).

De forma similar, en otro estudio con MSCs equinas se comparó la producción de diversas citoquinas por MSCs aisladas a partir de distintos tejidos y se observó que el bloqueo químico de PGE2 derivaba en un aumento de la proliferación de los linfocitos, así como de la producción de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ y TNF- α), verificando que es un factor determinante en la regulación de la respuesta inmune (Carrade Holt et al., 2014).

Ensayo de inmunomodulación (IM)

Los resultados observados en los ensayos de inmunomodulación muestran una producción considerable de PGE2, especialmente en los co-cultivos autólogos y alogénicos MHC-compatibles, mientras que se observa una menor concentración en los co-cultivos MHC-incompatibles en comparación con los anteriores, excepto en el caso de las MSC-D.

Como muestra la siguiente figura (*Figura 7*), no se observan diferencias significativas entre los tipos de MSCs testadas en el co-cultivo autólogo, a pesar de que las concentraciones en MSC-D fueron mucho más bajas que con MSC-SE y MSC-E, que destacan con los valores más altos. Trabajos previos en MSCs equinas aisladas de distintos orígenes también mostraron que la secreción de PGE2 aumenta tras el co-cultivo con linfocitos T previamente activados (Carrade et al., 2012; Carrade Holt et al., 2014; Colbath et al., 2017). Como señalan Bernardo y colaboradores (2013), en presencia de ambientes inflamatorios, las MSCs se activan y adoptan un fenotipo inmunosupresor caracterizado por el aumento en la secreción de mediadores como PGE2 (Bernardo & Fibbe, 2013). Por otro lado, la variabilidad en la secreción de PGE2 por parte de las MSCs en distintas situaciones puede deberse a que las MSCs diferenciadas a condrocitos perderían su capacidad inmunomoduladora y, por tanto, no secretarían la misma concentración de esta prostaglandina en comparación con las MSCs sin diferenciar, como evidencian estudios realizados en otros modelos animales que también reportan una menor producción de PGE2 por parte de las MSCs diferenciadas (Ryan et al., 2014).

En la comparación realizada entre nuestros co-cultivos y los controles hay diferencias significativas observándose un claro patrón en el cual los controles muestran concentraciones muy bajas de PGE2, seguramente debido a que esta molécula no es secretada principalmente por los linfocitos (Najar et al., 2010). Concretamente, en el co-cultivo alogénico compatible se ha visto diferencia significativa entre MSC-SE ($p < 0,01$) y MSC-E ($p < 0,001$) con ambos controles (CTL- y CTL+), al igual que en el co-cultivo incompatible, donde se ha dado una diferencia significativa entre MSC-SE y CTL- ($p < 0,05$) y entre MSC-E y ambos controles ($p < 0,001$).

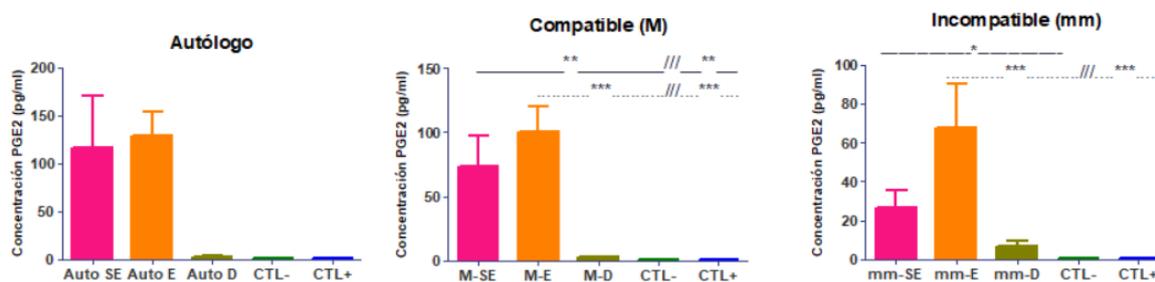


Figura 7. Secreción de PGE2 en los ensayos de inmunomodulación. Comparativa entre co-cultivos con células madre mesenquimales (MSCs) sin estimular (MSC-SE), estimuladas (MSC-E) y diferenciadas (MSC-D) y controles negativo (CTRL-) y positivo (CTRL+), en combinación autóloga (auto), alogénica compatible (M) e incompatible (mm). Diferencias significativas representadas por *: *($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

En la comparación realizada entre las MSCs expuestas a linfocitos en distintas combinaciones (Figura 8), las MSC-SE y MSC-E siguen un patrón similar con mayores concentraciones en combinación autóloga, seguida por la compatible y finalmente la incompatible. Sin embargo, en el caso de MSC-D, los valores son considerablemente más bajos y destaca la secreción en los co-cultivos incompatibles. Como punto común entre los tres tipos de MSCs, cabe mencionar los bajos valores obtenidos en los cultivos basales en comparación con los co-cultivos.

El cultivo basal ha mostrado valores de PGE2 muy bajos, lo cual es esperable ya que la actividad paracrina de las MSCs se estimula en situaciones inflamatorias. En los co-cultivos sin estimular se han dado diferencias significativas entre el cultivo basal y el autólogo, así como con el co-cultivo alogénico MHC-compatible ($p < 0,05$). Respecto a las MSCs estimuladas, los valores son un poco más altos que en el caso anterior, pero la tendencia y las diferencias con significación son las mismas: el valor de PGE2 más alto se presenta en el co-cultivo autólogo, seguido del compatible, y el más bajo en el cultivo basal, dándose diferencia significativa entre ellos ($p < 0,05$).

Por último, en las MSCs diferenciadas a condrocitos, la concentración de PGE2 en todos los grupos es mucho menor que para MSC-SE y MSC-E. El máximo valor es cercano a los 6 pg/ml mientras que en los casos anteriores ronda los 100 pg/ml.

Cabe destacar que es el único grupo donde se ve una diferencia significativa entre el co-cultivo incompatible y los valores basales ($p < 0,01$). Esto refuerza la hipótesis de que las MSCs diferenciadas a condrocito no son capaces de producir la misma concentración de PGE2 que las indiferenciadas (Ryan et al., 2014).

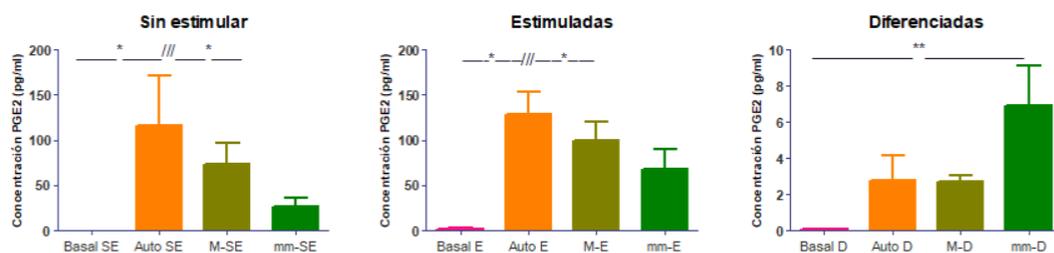


Figura 8. Secreción de PGE2 en los ensayos de inmunomodulación. Comparativa entre co- cultivos SE, E y D, en combinación basal, autóloga (auto), alogénica compatible (M) e incompatible (mm). Diferencias significativas representadas por *: *($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

Ensayo de inmunogenicidad (IG)

Dentro del estudio de la inmunogenicidad, los valores más altos de PGE2 se han obtenido en los co-cultivos compatibles, llegando a valores que sobrepasan los 20 pg/ml. A su vez, cabe destacar que en los co-cultivos de MSCs diferenciadas se observó una mayor concentración en las tres combinaciones. Por otro lado, los valores más bajos generalmente se han dado en los co-cultivos incompatibles, ya que la concentración más alta observada no llega a los 10 pg/ml.

Tal y como muestra la *Figura 9*, dentro de los co-cultivos autólogos el valor medio de PGE2 más bajo es el obtenido con MSC-E, valorando que esta condición es la que mayor desviación estándar presenta y sin darse diferencias significativas, mientras que las MSCs diferenciadas a condrocito son las que han generado valores más altos en esta condición. En el co-cultivo compatible también destacan los valores de las MSCs diferenciadas, con valores que rozan los 20 pg/ml y presentando diferencias significativas con ambos controles, siendo de $p < 0,001$ con MLR M- y de $p < 0,01$ con MLR mm+.

Asimismo, dentro del co-cultivo compatible se da también significación entre MSC-SE y MLR M- ($p < 0,01$) y MSC-E con ambos controles: MLR M- ($p < 0,001$) y MLR mm+ ($p < 0,01$). Por último, en el co-cultivo incompatible, la concentración de PGE2 es bastante menor en comparación con los grupos anteriores, siendo el valor más alto cercano a los 8 pg/ml. Nuevamente, el co-cultivo con MSCs diferenciadas muestra valores más altos que con los otros dos tipos de MSCs, dándose una diferencia significativa entre el co-cultivo diferenciado y el control negativo MLR M- ($p < 0,01$). Como se ha mencionado en el subapartado de la IM, los bajos valores de PGE2 en los controles serían esperables al consistir únicamente en linfocitos y justificaría la diferencia respecto a los co-cultivos, entre los cuales no se han observado diferencias significativas dependiendo del tipo de MSC.

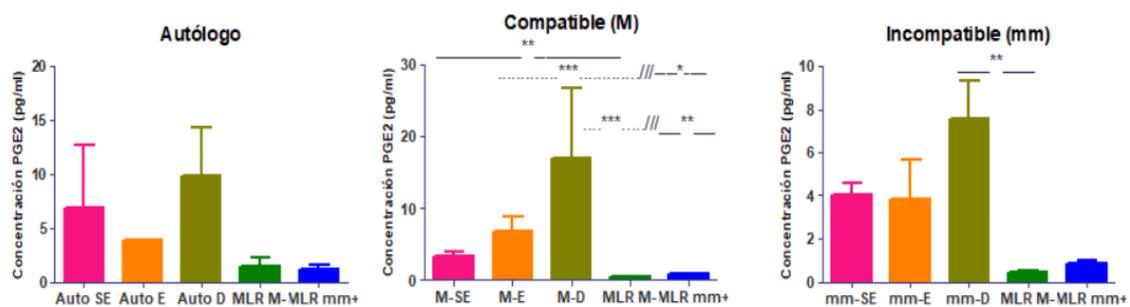


Figura 9. Secreción de PGE2 en los ensayos de inmunogenicidad. Comparativa entre co-cultivos con células madre mesenquimales (MSCs) sin estimular (MSC-SE), estimuladas (MSC-E) y diferenciadas (MSC-D) y control negativo (MLR M-) y positivo (MLR mm+), en combinación autóloga (auto), alogénica compatible (M) e incompatible (mm). Diferencias significativas representadas por *: $(p < 0,05)$; ** $(p < 0,01)$; *** $(p < 0,001)$.

Asimismo, y como se observa en la *Figura 10*, destacarían los mínimos valores obtenidos por las MSC-SE basales (sin co-cultivar), dándose una diferencia significativa respecto a los co-cultivos incompatibles con las mismas células ($p < 0,01$), aunque los tres tipos de co-cultivo muestran valores similares como ya se ha mencionado. Para las MSCs estimuladas en situación basal también se han obtenido resultados bajos pero mayores que en el anterior caso, mientras que en las MSCs diferenciadas basales los valores apenas son detectables. En la comparación entre las MSC-E co-cultivadas con diferentes linfocitos, no se han dado diferencias significativas. Sin embargo, cabe mencionar que la concentración de PGE2 en la condición de compatibilidad es mayor que la que se da en los otros co-cultivos.

Por último, en MSC-D, destacan las mínimas concentraciones obtenidas en el co-cultivo basal, así como el alto valor del co-cultivo compatible al igual que en el caso anterior. Nuevamente no se dan diferencias significativas entre los grupos de estudio.

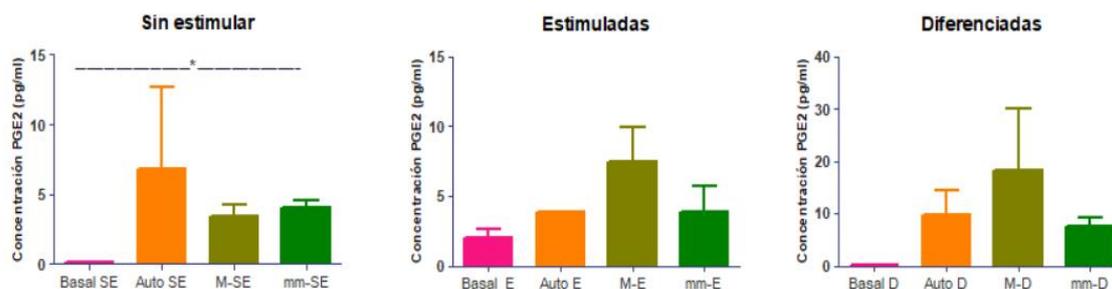


Figura 10. Secreción de PGE2 en los ensayos de inmunogenicidad. Comparativa entre co-cultivos SE, E y D, en combinación basal, autóloga (auto), alogénica compatible (M) e incompatible (mm). Diferencias significativas representadas por *: *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001).

En comparación con el estudio de la inmunomodulación, la mayor diferencia en cuanto a la secreción de PGE2 se da entre los co-cultivos con MSC-SE y MSC-D. Mientras que en IM los valores eran más altos en los co-cultivos con MSCs estimuladas, en IG se observan valores más elevados para las MSCs diferenciadas a condrocito. Como se describe en otros estudios, sería esperable que las MSCs enfrentadas a linfocitos activados aumentaran la producción de PGE2, sobre todo si han sido previamente estimuladas (Colbath et al., 2017). Por otro lado, en los ensayos de IG, al no estar activados los linfocitos, las MSCs no producirían tanta concentración de esta molécula al ser un ambiente menos inflamatorio. Sin embargo, resulta interesante que en nuestro estudio las MSCs diferenciadas produzcan más PGE2 en los ensayos de IG, ya que en estudios mencionados previamente como el de Ryan et al. (2014), se reporta que las MSCs no producen PGE2 una vez diferenciadas (Ryan et al., 2014). Una posible explicación a esta observación es que las MSCs diferenciadas fueran también más inmunogénicas y activaran a los linfocitos en los ensayos de IG, haciendo que estos secretaran mediadores pro-inflamatorios que, a su vez resultarían en un ambiente inflamatorio que estimulara a las MSCs a producir PGE2, pese a encontrarse diferenciadas. En cualquier caso, no existe una producción de PGE2 significativamente superior por parte de las MSC-D a la observada para MSC-SE y MSC-E en ningún tipo de co-cultivo.

Resultados cuantificación IFN- γ

El IFN- γ es una citoquina proinflamatoria relacionada con la inmunidad celular y especialmente ligada al rechazo a compuestos biológicos alogénicos, estimulando la respuesta inmune tanto innata como adaptativa, (Cassano et al., 2018; Sage et al., 2021). Los linfocitos T son los secretores principales de dicha molécula, promoviendo la activación de otras células inmunes como monocitos o macrófagos y, por tanto, pudiendo activar el rechazo a células alogénicas (Sivanathan et al., 2014). Por otra parte, de acuerdo con numerosos estudios en modelos animales, el pre-acondicionamiento de las MSCs con esta molécula promueve la producción de otras citoquinas como PGE2, estimulando su acción inmunomoduladora. Sin embargo, esta estimulación con IFN- γ también puede modificar la expresión del MHC de las MSCs, aumentando la expresión del MHC-I e induciendo la expresión del MHC-II, aunque dichos cambios no necesariamente modificarían su capacidad inmunomoduladora *in vivo* (Caffi et al., 2020; Polchert et al., 2008).

Asimismo, estudios en MSCs humanas verifican la influencia de esta molécula sobre la actividad inmunomoduladora de las MSCs, ya que se ha demostrado que la producción de IFN- γ por parte de linfocitos T o NK, estimula a las MSCs y reduce la proliferación posteriores de estas mismas células inmunes (Krampera et al., 2006). Por tanto, la determinación de IFN- γ en sobrenadantes de co-cultivo proporciona información sobre la activación de los linfocitos expuestos a las MSCs, pero esta activación podría influir en la propia modulación de los linfocitos.

Ensayo de inmunomodulación (IM)

En los ensayos de inmunomodulación se observaron niveles más altos de IFN- γ en los co-cultivos de MSCs estimuladas, siendo en cambio más bajos en las MSCs diferenciadas. Sin embargo, al comparar la concentración de esta molécula en los co-cultivos con la de los cultivos basales (MSCs solas), en estos últimos se observó una presencia similar o incluso superior de IFN- γ .

Como se observa en la *Figura 11*, en los co-cultivos autólogos, compatibles e incompatibles, destaca la concentración obtenida con las MSCs estimuladas, que ronda los 750 pg/ml en el primero, los 600 pg/ml en el segundo, y los 700 pg/ml en el tercero. Mientras que estos valores más elevados podrían reflejar una mayor activación de los linfocitos o una menor capacidad reguladora de las MSC-E, también cabe considerar que en el sobrenadante de las MSC-E

basales la concentración de IFN- γ superó los 1.000 pg/ml, por lo que estos valores podrían corresponderse a una concentración residual debida a la estimulación previa con esta misma citoquina, siendo los valores en MSCs-SE y MSCs-D considerablemente menores.

En los co-cultivos MHC-compatibles se ha encontrado una diferencia significativa entre MSC-E y MSC-D ($p < 0,01$), viéndose lo mismo en el co-cultivo incompatible ($p < 0,05$) dándose altos valores en MSC-E y considerablemente más bajos en MSC-D. Por otro lado, también existe una concentración significativamente mayor de IFN- γ en los co-cultivos compatibles ($p < 0,001$) e incompatibles ($p < 0,05$) de MSC-E respecto al control negativo (CTL-). Sin embargo, no hay diferencias significativas respecto a la secreción de IFN- γ por parte de los linfocitos activados solos (control positivo), sugiriendo que las MSCs no habrían modificado su activación, al contrario de lo reportado por otros autores (Carrade et al., 2012).

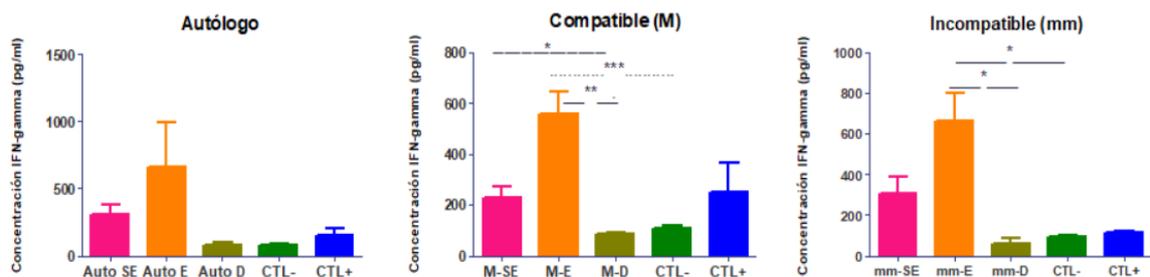


Figura 11. Secreción de IFN- γ en los ensayos de inmunomodulación. Comparativa entre co-cultivos con células madre mesenquimales (MSCs) sin estimular (MSC-SE), estimuladas (MSC-E) y diferenciadas (MSC-D) y controles negativo (CTRL-) y positivo (CTRL+), en combinación autóloga (auto), alogénica compatible (M) e incompatible (mm). Diferencias significativas representadas por *: *($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

En la *Figura 12* puede observarse la comparación para la secreción de IFN- γ según el tipo de MSC cultivado (MSC-SE, MSC-E y MSC-D) entre las distintas combinaciones de co-cultivo (autólogo, compatible, incompatible) y respecto a MSCs solas (basal). Se observa que el valor más alto en todos ellos es el del cultivo basal, pero sin llegar a suponer una diferencia significativa. Como se ha comentado anteriormente, en el caso de las MSC-E esta presencia de IFN- γ podría deberse a restos exógenos de la molécula utilizada para estimularlas, pero en el caso de MSC-SE y MSC-D basales estos resultados son inesperados ya que otros autores han descrito que las MSCs equinas por sí solas no producen niveles detectables de IFN- γ (Carrade et al., 2012; Connard et al., 2021).

Entre las distintas combinaciones de co-cultivo no se observaron diferencias, sugiriendo que el mismo tipo de MSCs tendría una capacidad reguladora similar independientemente de la compatibilidad con el receptor, como han sugerido otros estudios (Colbath et al., 2017).

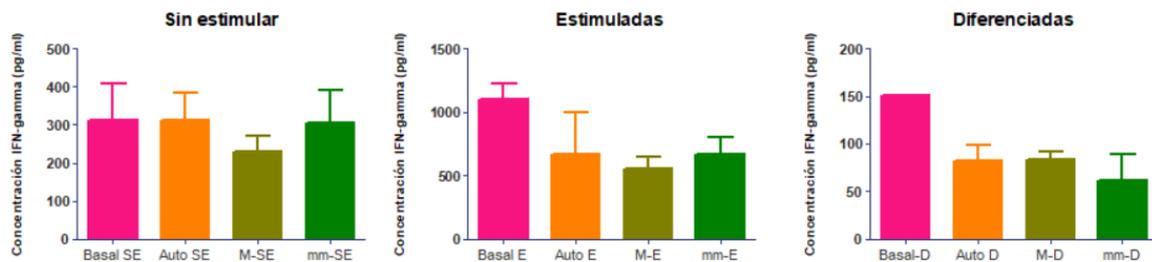


Figura 12. Secreción de IFN- γ en los ensayos de inmunomodulación. Comparativa entre co-cultivos SE, E y D, en combinación basal, autóloga (auto), alógena compatible (M) e incompatible (mm). Diferencias significativas representadas por *: *($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

Ensayo de inmunogenicidad (IG)

En el ensayo de la inmunogenicidad se ha observado como resultado general un valor de IFN- γ más alto en los co-cultivos con MSC-E y más bajo con MSC-D, presentando los co-cultivos con MSC-SE una concentración de IFN- γ intermedia. Este patrón es muy similar al observado en los ensayos de inmunomodulación, pero las concentraciones son más bajas al no estar los linfocitos previamente activados con mitógeno. En el caso de las MSC-E, y como se ha mencionado antes, estos mayores niveles de IFN- γ podrían deberse a la presencia de la molécula añadida al medio de cultivo para la estimulación previa al co-cultivo. Otra posible explicación es que los linfocitos se activaran más en presencia de estas MSC-E, ya que se ha descrito que la estimulación de las MSCs con citoquinas pro-inflamatorias puede aumentar la expresión del MHC y hacerlas más inmunogénicas (Caffi et al., 2020). Sin embargo, aunque también se ha descrito que las MSCs equinas pueden incrementar la expresión de MHC tras diferenciarse (Barrachina et al., 2018), los co-cultivos con MSC-D son los que presentan menores niveles de IFN- γ , por lo que la diferenciación no necesariamente implicaría una mayor inmunogenicidad en este caso. Cabe mencionar la clara diferencia obtenida entre los controles MLR, destacando la mayor concentración en MLR mm+ (linfocitos estimuladores y respondedores MHC-incompatibles) que aproximadamente dobla la concentración obtenida en MLR M- (estimuladores y respondedores MHC-compatibles), como puede verse en la *Figura 13*. Esto se debe a que los linfocitos en el co-cultivo MLR mm+ son incompatibles y, por tanto, se activan y generan mayor concentración de IFN- γ .

Sin embargo, no ha habido diferencias significativas respecto a los controles excepto en los co-cultivos compatibles para MSC-E respecto a MSC-D ($p < 0,05$) y MLR-M ($p < 0,05$). Exceptuando las MSC-E, el resto de co-cultivos han mostrado valores de IFN- γ inferiores a los del control MLR-mm+, sugiriendo que la activación de los linfocitos sería inferior con las MSCs en las distintas condiciones.

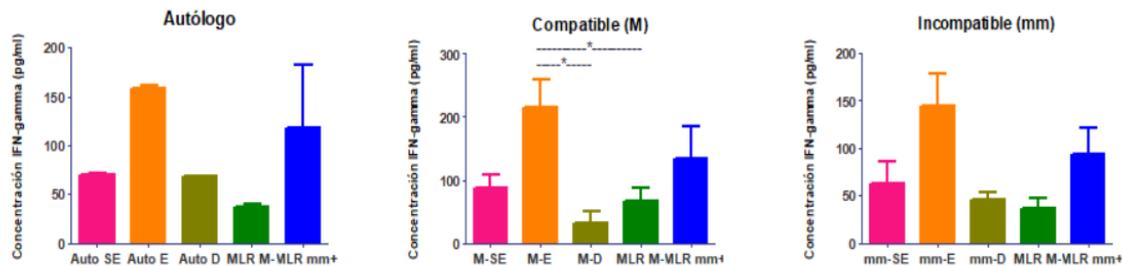


Figura 13. Secreción de IFN- γ en los ensayos de inmunogenicidad. Comparativa entre co-cultivos con células madre mesenquimales (MSCs) sin estimular (MSC-SE), estimuladas (MSC-E) y diferenciadas (MSC-D) y control negativo (MLR M-) y positivo (MLR mm+), en combinación autóloga (auto), alógena compatible (M) e incompatible (mm). Diferencias significativas representadas por *: *($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

En la comparación mostrada en la *Figura 14*, entre los cultivos basales y los co-cultivos autólogos, compatibles e incompatibles para los grupos SE y E, se ha observado una diferencia significativa entre las MSCs basales y el resto de los co-cultivos, con un valor más alto en el primer caso, siguiendo la tendencia observada al comparar estos valores basales con los obtenidos tras los co-cultivos en los ensayos de inmunomodulación. Esta diferencia es de $p < 0,05$ en los co-cultivos SE y de $p < 0,001$ en los co-cultivos E para los tres tipos de combinaciones. En el caso de los co-cultivos diferenciados no se ha dado diferencia significativa entre los grupos, aunque también se han obtenido niveles más bajos de IFN- γ respecto cultivo basal. En el resto de las comparaciones realizadas no se han obtenido diferencias significativas entre las distintas combinaciones para ningún tipo de MSCs.

De hecho, es destacable que no se aprecia un gran contraste entre los valores de los co-cultivos compatibles e incompatibles.

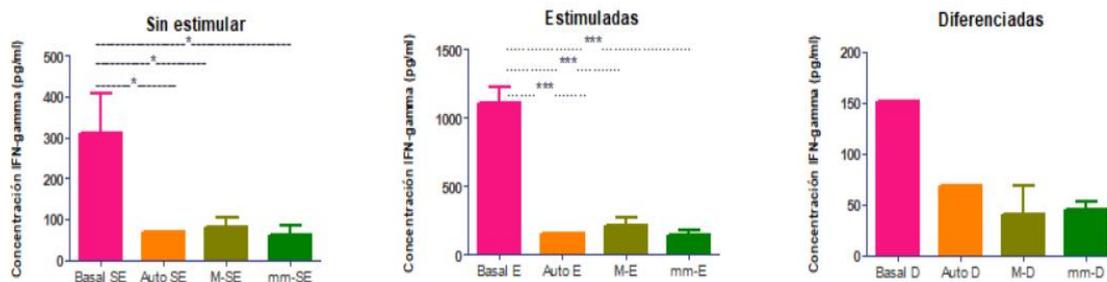


Figura 14. Secreción de IFN- γ en los ensayos de inmunogenicidad. Comparativa entre co-cultivos SE, E y D, en combinación basal, autóloga (auto), alogénica compatible (M) e incompatible (mm). Diferencias significativas representadas por *: *($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

En un principio, la hipótesis inicial se basaba en que los co-cultivos incompatibles supondrían un ambiente más inmunogénico que provocaría la activación de los linfocitos y, con ello, el aumento del IFN- γ . Sin embargo, este resultado no se ha observado con ningún tipo de MSC, sugiriendo que la incompatibilidad para el MHC no sería determinante para la inmunogenicidad de las MSCs, posiblemente gracias a su capacidad para evadir la respuesta inmune mediante la secreción de PGE2 e IL-6. Cabe mencionar como limitación del estudio la falta de datos en algunos grupos al haberse obtenido valores muy bajos que no entraban en el rango de determinación aceptada.

Entre IM e IG, la mayor diferencia es un menor nivel en la concentración de IFN- γ obtenida en el segundo estudio, debido seguramente a la inactividad de los linfocitos en este caso. A su vez, es destacable el alto valor obtenido en los cultivos basales al compararlos con los co-cultivos tanto con IM como con IG. Este valor es inesperado ya que las MSCs por sí solas no producirían valores detectables de IFN- γ (Carrade et al., 2012; Connard et al., 2021). Por otro lado, los resultados obtenidos en los co-cultivos con MSCs diferenciadas también contravienen la hipótesis inicial, dado que serían menos inmunomoduladoras y más inmunogénicas, y serían esperables niveles más altos de IFN- γ en ambos tipos de ensayos. Es importante destacar que no hay publicados estudios previos que comparen las propiedades inmunes de MSCs equinas en estas condiciones, por lo que nuestros resultados solo pueden compararse con los de otras especies y ya se ha observado, a otros niveles, que puede haber diferencias sustanciales (Zheng et al., 2008).

CONCLUSIONES

El estudio realizado en este TFM aporta información sobre las propiedades inmunes de las MSCs equinas en distintas condiciones que, en nuestro conocimiento, no se habían explorado previamente en esta especie de gran valor traslacional. A partir del análisis de los resultados obtenidos en las condiciones de nuestro estudio, se obtienen las siguientes conclusiones:

- Las MSCs equinas tienen potencial inmunomodulador *in vitro*, ya que son capaces de secretar citoquinas con funciones reguladoras como PGE2 e IL-6. La estimulación previa de las MSCs con citoquinas proinflamatorias activa la secreción de dichas citoquinas inmunomoduladoras, mientras que la diferenciación a condrocito supone una notable disminución en dicha secreción, por lo que la inflamación activaría la capacidad reguladora de las MSCs mientras que la diferenciación la disminuiría.
- Las MSCs equinas no presentan una marcada capacidad inmunogénica ligada a la activación de linfocitos T, ya que no se ha visto un claro aumento en los niveles de IFN- γ . Sin embargo, la estimulación inflamatoria de las MSCs podría conducir a un aumento de su inmunogenicidad, mientras que la diferenciación a condrocito no parece incrementar el reconocimiento inmune. Cabe considerar que el potencial inmunogénico de las MSCs en las distintas situaciones está también condicionado a su capacidad inmunomoduladora, que las ayudaría a evadir el reconocimiento inmune.
- La compatibilidad para el MHC podría influir sobre la inmunomodulación de las MSCs, pero no necesariamente sería un factor determinante de su inmunogenicidad. La secreción de IL-6 y PGE2 es mayor en la combinación autóloga, seguida por la alogénica compatible, mientras que para IFN- γ no se observan diferencias, pudiendo existir otros factores relacionados con la inmunomodulación que contribuyan a mantener el equilibrio.
- Los datos aportados por este TFM contribuyen a ampliar el conocimiento sobre las propiedades inmunes de las MSCs equinas, pero es necesario realizar más estudios que profundicen en el papel de otras moléculas o procesos implicados en el equilibrio inmunomodulación-inmunogenicidad de estas células, así como las implicaciones que estos hallazgos *in vitro* pueden tener para la aplicación terapéutica *in vivo* de las mismas.

CONCLUSIONS

The study carried out in this Final Master's Degree Project provides information on the immune properties of equine MSCs under different conditions that, to our knowledge, had not been previously explored in this species of great translational value. From the analysis of the results obtained under the conditions of our study, the following conclusions can be drawn:

- Equine MSCs have immunomodulatory potential *in vitro*, as they are able to secrete cytokines with regulatory functions such as PGE2 and IL-6. Prior stimulation of MSCs with proinflammatory cytokines activates the secretion of these immunomodulatory cytokines, while differentiation to chondrocytes leads to a marked decrease in their secretion, so that inflammation activates the regulatory capacity of MSCs while differentiation decreases it.
- Equine MSCs do not show a marked immunogenic capacity linked to T-lymphocyte activation, as no clear increase in IFN- γ levels has been seen. However, inflammatory stimulation of MSCs could lead to an increase in their immunogenicity, whereas differentiation to chondrocytes does not seem to increase immune recognition. It should be considered that the immunogenic potential of MSCs in the different situations is also conditioned by their immunomodulatory capacity, which would help them to evade immune recognition.
- MHC matching or mismatching could influence the immunomodulation of MSCs but would not necessarily be a determinant of their immunogenicity. IL-6 and PGE2 secretion is higher in the autologous combination, followed by the allogeneic match, while no differences are observed for IFN- γ , and there may be other factors related to immunomodulation that contribute to the balance.
- The data provided by this Final Master's Degree Project contribute to the knowledge of the immune properties of equine MSCs, but further studies are needed to investigate the role of other molecules or processes involved in the immunomodulation-immunogenicity balance of these cells, as well as the implications that these *in vitro* findings may have for the *in vivo* therapeutic application of these cells.

BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, *105*(4), 1815–1822. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>
- Aldrich, E. D., Hooper, G. J., Cui, X., Murphy, C. A., Lim, K. S., McIlwraith, C. W., & Woodfield, T. B. F. (n.d.). *Allogeneic mesenchymal stromal cells for cartilage regeneration : A review of in vitro evaluation , clinical experience , and translational opportunities*. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0552>
- Ankrum, J. A., Ong, J. F., & Karp, J. M. (2014). Mesenchymal stem cells: Immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology*, *32*(3), 252–260. <https://doi.org/10.1038/nbt.2816>
- Ardanaz, N., Vázquez, F. J., Romero, A., Remacha, A. R., Barrachina, L., Sanz, A., Ranera, B., Vitoria, A., Albareda, J., Prades, M., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., & Rodellar, C. (2016). Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: Effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC Veterinary Research*, *12*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12917-016-0692-X>
- Augello, A., & De Bari, C. (2010). The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Human Gene Therapy*, *21*(10), 1226–1238. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.173>
- Ayala-cuellar, A. P., Kang, J., Jeung, E., & Choi, K. (2019). *Roles of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration and Immunomodulation*. *27*(1), 25–33.
- Barrachina, L., Remacha, A. R., Romero, A., Vázquez, F. J., Albareda, J., Prades, M., Ranera, B., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., & Rodellar, C. (2016). Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *171*, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.007>
- Barrachina, Laura, Cequier, A., Romero, A., Vitoria, A., Zaragoza, P., Vázquez, F. J., & Rodellar, C. (2020). Allo-antibody production after intraarticular administration of mesenchymal stem cells (MSCs) in an equine osteoarthritis model: Effect of repeated administration, MSC inflammatory stimulation, and equine leukocyte antigen (ELA) compatibility. *Stem Cell Research and Therapy*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-1571-8>
- Barrachina, Laura, Remacha, A. R., Romero, A., Vázquez, F. J., Albareda, J., Prades, M., Gosálvez, J., Roy, R., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., & Rodellar, C. (2017). Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Proinflammatory Cytokines: Implications in Immunomodulation-Immunogenicity Balance, Cell Viability, and Differentiation Potential. *Stem Cells and Development*, *26*(1), 15–24. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0209>
- Barrachina, Laura, Remacha, A. R., Romero, A., Zaragoza, P., Vázquez, F. J., & Rodellar, C. (2018). Differentiation of equine bone marrow derived mesenchymal stem cells increases the expression of immunogenic genes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *200*(March), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.04.004>
- Berg, L. C., Koch, T. G., Heerkens, T., Besonov, K., Thomsen, P. D., & Betts, D. H. (2009). Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, *22*(5), 363–370. <https://doi.org/10.3415/VCOT-08-10-0107>
- Berglund, A. K., Fortier, L. A., Antczak, D. F., & Schnabel, L. V. (2017). Immunoprivileged no more: Measuring the immunogenicity of allogeneic adult mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, *8*(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0742-8>
- Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, *13*(4), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>

- Borjesson, D. L., & Peroni, J. F. (2011). The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31(1), 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.12.001>
- Bouffi, C., Bony, C., Courties, G., Jorgensen, C., & Noël, D. (2010). IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS ONE*, 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014247>
- Broeckx, S. Y., Martens, A. M., Bertone, A. L., Van Brantegem, L., Duchateau, L., Van Hecke, L., Dumoulin, M., Oosterlinck, M., Chiers, K., Hussein, H., Pille, F., & Spaas, J. H. (2019). The use of equine chondrogenic-induced mesenchymal stem cells as a treatment for osteoarthritis: A randomised, double-blinded, placebo-controlled proof-of-concept study. *Equine Veterinary Journal*, 51(6), 787–794. <https://doi.org/10.1111/evj.13089>
- Burton, A. B., Wagner, B., Erb, H. N., & Ainsworth, D. M. (2009). *Veterinary Immunology and Immunopathology Serum interleukin-6 (IL-6) and IL-10 concentrations in normal and septic neonatal foals*. 132, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.05.006>
- Caffi, V., Espinosa, G., Gajardo, G., Morales, N., & Taylor, S. (2020). *Pre-conditioning of Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Increases Their Immunomodulatory Capacity*. 7(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00318>
- Carrade, D. D., Lame, M. W., Kent, M. S., Clark, K. C., Walker, N. J., & Borjesson, D. L. (2012). Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Medicine*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.3727/215517912x647217>
- Carrade Holt, D. D., Wood, J. A., Granick, J. L., Walker, N. J., Clark, K. C., & Borjesson, D. L. (2014). Equine mesenchymal stem cells inhibit T cell proliferation through different mechanisms depending on tissue source. *Stem Cells and Development*, 23(11), 1258–1265. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0537>
- Cassano, A. J. M., Fortier, L. A., Rebecca, B., Harman, R. M., & Walle, G. R. Van De. (2018). SC. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.06.008>
- Cassano, J. M., Schnabel, L. V., Goodale, M. B., & Fortier, L. A. (2018). Inflammatory licensed equine MSCs are chondroprotective and exhibit enhanced immunomodulation in an inflammatory environment. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0840-2>
- Cells, A. M. S., Carrade, D. D., Lame, M. W., Kent, M. S., Clark, K. C., Walker, N. J., & Borjesson, D. L. (2012). *Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine*. 4(37), 1–11.
- Cequier, A., Sanz, C., Rodellar, C., & Barrachina, L. (2021). The Usefulness of Mesenchymal Stem Cells beyond the Musculoskeletal System in Horses. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 11(4).
- Colbath, A. C., Dow, S. W., Phillips, J. N., McIlwraith, C. W., & Goodrich, L. R. (2017). Autologous and Allogeneic Equine Mesenchymal Stem Cells Exhibit Equivalent Immunomodulatory Properties In Vitro. *Stem Cells and Development*, 26(7), 503–511. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0266>
- Connard, S. S., Linardi, R. L., Even, K. M., Berglund, A. K., Schnabel, L. V., & Orved, K. F. (2021). Effects of continuous passage on the immunomodulatory properties of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 234(February), 110203. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110203>
- Cuerquis, J., Romieu-Mourez, R., François, M., Routy, J. P., Young, Y. K., Zhao, J., & Eliopoulos, N. (2014). Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: Effect of interferon- γ and tumor necrosis factor- α

- stimulation. *Cytotherapy*, 16(2), 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.008>
- Ding, D. C., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 20(1), 5–14. <https://doi.org/10.3727/096368910X>
- Eddahri, F., Bureau, F., Spolski, R., Leonard, W. J., Leo, O., & Andris, F. (2016). *Interleukin-6 / STAT3 signaling regulates the ability of naive T cells to acquire B-cell help capacities*. 113(11), 2426–2434. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-154682>.
- Filiano, A. (2021). *Under the microscope : Mesenchymal Stromal Cells*. 28(3), 4–7.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 3(4), 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
- Han, Y., Li, X., Zhang, Y., Han, Y., Chang, F., & Ding, J. (2019). Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*, 8(8), 886. <https://doi.org/10.3390/cells8080886>
- Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., & Phipps, R. P. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*, 23(3), 144–150. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02154-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02154-8)
- Hecke, L. Van, Magri, C., Duchateau, L., Beerts, C., Geburek, F., Suls, M., Da, L., Patruno, M., Saunders, J., Broeckx, S. Y., Depuydt, E., & Spaas, J. H. (2021). Veterinary Immunology and Immunopathology Repeated intra-articular administration of equine allogeneic peripheral blood-derived mesenchymal stem cells does not induce a cellular and humoral immune response in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 239(July), 110306. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110306>
- Id, E. F., Id, B. V., Id, Z. S., Nozad, H., Id, C., & Farahzadi, R. (2020). Interleukin-6 , -8 , and TGF- β Secreted from Mesenchymal Stem Cells Show Functional Role in Reduction of Telomerase Activity of Leukemia Cell Via Wnt5a / β -Catenin and P53 Pathways. *Tabriz University of Medical Sciences*, 10(2), 307–314. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.037>
- Jiang, W., & Xu, J. (2020). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, 53(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/cpr.12712>
- Kalinski, P. (2012). Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E 2 . *The Journal of Immunology*, 188(1), 21–28. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101029>
- Kondo, M., Yamaoka, K., Sakata, K., Sonomoto, K., Lin, L., Nakano, K., & Tanaka, Y. (2014). IL-6/STAT3 Signaling Pathway Contributes to Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Life Science Journal*, 11(10), 300–308. <https://doi.org/10.1002/art>.
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., & Annunziato, F. (2006). Role for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 24(2), 386–398. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0008>
- Montesinos, J. J., López-García, L., Cortés-Morales, V. A., Arriaga-Pizano, L., Valle-Ríos, R., Fajardo-Orduña, G. R., & Castro-Manreza, M. E. (2020). Human bone marrow mesenchymal stem/stromal cells exposed to an inflammatory environment increase the expression of ICAM-1 and release microvesicles enriched in this adhesive molecule: Analysis of the participation of TNF- α and IFN- γ . *Journal of Immunology Research*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8839625>
- Murphy, M. B., Moncivais, K., & Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: Environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental and Molecular Medicine*, 45(11), e54-16. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.94>
- Najar, M., Raicevic, G., Boufker, H. I., Kazan, H. F., Bruyn, C. De, Meuleman, N., Bron, D., Toungouz,

- M., & Lagneaux, L. (2010). Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cellular Immunology*, 264(2), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.06.006>
- Najar, M., Rouas, R., Raicevic, G., Boufker, H. I., Lewalle, P., Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M., Martiat, P., & Lagneaux, L. (2009). *Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood : the importance of low cell ratio and role of interleukin-6*. 11(5), 570–583. <https://doi.org/10.1080/14653240903079377>
- Nasef, A., Ashammakhi, N., & Fouillard, L. (2008). *Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells : possible mechanisms*. 3, 531–546.
- Newman, R. E., Yoo, D., LeRoux, M. A., & Danilkovitch-Miagkova, A. (2009). Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, 8(2), 110–123. <https://doi.org/10.2174/187152809788462635>
- Paebst, F., Piehler, D., Brehm, W., Heller, S., Schroeck, C., Tárnok, A., & Burk, J. (2014). Comparative immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: An approach toward a standardized definition. *Cytometry Part A*, 85(8), 678–687. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22491>
- Pigott, J. H., Ishihara, A., Wellman, M. L., Russell, D. S., & Bertone, A. L. (2013). Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 26(6), 453–460. <https://doi.org/10.3415/VCOT-13-01-0008>
- Polchert, D., Sobinsky, J., Douglas, G. W., Kidd, M., Moadsiri, A., Reina, E., Genrich, K., Mehrotra, S., Setty, S., Smith, B., & Bartholomew, A. (2008). *IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease*. 1745–1755. <https://doi.org/10.1002/eji.200738129>
- Prządka, P., Buczak, K., Frejlich, E., Gąsior, L., Suliga, K., & Kielbowicz, Z. (2021). The role of mesenchymal stem cells (Mscs) in veterinary medicine and their use in musculoskeletal disorders. *Biomolecules*, 11(8), 1–20. <https://doi.org/10.3390/biom11081141>
- Rajabzadeh, N., Fathi, E., & Farahzadi, R. (2019). Stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Investigation*, 6(July). <https://doi.org/10.21037/sci.2019.06.04>
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., & Shi, Y. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*, 2(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014>
- Rochman, I., Paul, W. E., Rochman, I., & Paul, W. E. (2015). *IL-6 Increases Primed Cell Expansion and Survival*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4761>
- Ryan, A. E., Lohan, P., O'Flynn, L., Treacy, O., Chen, X., Coleman, C., Shaw, G., Murphy, M., Barry, F., Griffin, M. D., & Ritter, T. (2014a). Chondrogenic differentiation increases antidonor immune response to allogeneic mesenchymal stem cell transplantation. *Molecular Therapy*, 22(3), 655–667. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.261>
- Sage, S. E., Bedenice, D., McKinney, C. A., Long, A. E., Pacheco, A., Wagner, B., Mazan, M. R., & Paradis, M. R. (2021). Assessment of the impact of age and of blood-derived inflammatory markers in horses with colitis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, February 2020*, 1–9. <https://doi.org/10.1111/vec.13099>
- Schnabel, L. V., Fortier, L. A., Wayne McIlwraith, C., & Nobert, K. M. (2013). Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? *Veterinary Journal*, 197(3), 570–577. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.04.018>

- Schnabel, L. V., Pezzanite, L. M., Antczak, D. F., Felipe, M. J. B., & Fortier, L. A. (2014). Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Research and Therapy*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/scrt402>
- Shabbir, A., Zisa, D., Lin, H., Mastri, M., Roloff, G., Suzuki, G., & Lee, T. (2010). *Activation of host tissue trophic factors through JAK-STAT3 signaling : a mechanism of mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair*. 54, 1428–1439. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00488.2010>.
- Sivanathan, K. N., Gronthos, S., Rojas-Canales, D., Thierry, B., & Coates, P. T. (2014). Interferon-Gamma Modification of Mesenchymal Stem Cells: Implications of Autologous and Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Therapy in Allotransplantation. *Stem Cell Reviews and Reports*, 10(3), 351–375. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9495-2>
- Steward-Tharp, S. M., Song, Y. J., Siegel, R. M., & O’Shea, J. J. (2010). New insights into T cell biology and T cell-directed therapy for autoimmunity, inflammation, and immunosuppression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1183(II), 123–148. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05124.x>
- Sulaiman, S. Bin, Chowdhury, S. R., Busra, M. F. B. M., Rani, R. B. A., Yahaya, N. H. B. M., Tabata, Y., Hiraoka, Y., Idrus, R. B. H., & Hwei, N. M. (2021). Type II collagen-conjugated mesenchymal stem cells micromass for articular tissue targeting. *Biomedicines*, 9(8), 1–17. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080880>
- Teague, T., Marrack, P., Kappler, J., & Vella, A. (1997). IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *Journal of Immunology Research*, 158(12), 5791.
- Van Hecke, L., Magri, C., Duchateau, L., Beerts, C., Geburek, F., Suls, M., Da Dalt, L., Patruno, M., Saunders, J., Broeckx, S. Y., Depuydt, E., & Spaas, J. H. (2021). Repeated intra-articular administration of equine allogeneic peripheral blood-derived mesenchymal stem cells does not induce a cellular and humoral immune response in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 239, 110306. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2021.110306>
- Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., & Betancourt, A. M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS ONE*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>
- Wing, K., & Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature Immunology*, 11(1), 7–13. <https://doi.org/10.1038/ni.1818>
- Zayed, M., Adair, S., & Dhar, M. (2021). Effects of normal synovial fluid and interferon gamma on chondrogenic capability and immunomodulatory potential respectively on equine mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126391>
- Zheng, Z. H., Li, X. Y., Ding, J., Jia, J. F., & Zhu, P. (2008). Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 47(1), 22–30. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kem284>