



# TERAPIA INMUNOSUPRESORA CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.

Flavio Carrion<sup>1</sup>, Estefanía Nova-Lamperti<sup>1</sup>, Carolina Ruiz<sup>2</sup>, Fabiola Diaz<sup>1</sup>, Carolina Inostroza<sup>1</sup>, Daniel Rojo<sup>1</sup>, Fernando E. Figueroa<sup>1</sup>. Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Santiago de Chile

## RESUMEN

**Introducción:** Las células madre mesenquimales (MSCs) son células progenitoras que ejercen efecto inmunosupresor. Su empleo se ha asociado a la mejoría de la enfermedad de *Injerto contra Huésped* en el hombre y también en algunos modelos de enfermedad autoinmune en animales. Se ha propuesto que sus efectos son dependientes de la inducción de linfocitos T reguladores (Treg).

**Objetivos:** Evaluar la seguridad y eficacia clínica de un protocolo de infusión de MSCs autólogas en pacientes con LES. Se estudió el efecto inmunosupresor de las MSCs *in-vitro* y su efecto sobre las células Treg circulantes.

**Metodología:** Tratamos a dos mujeres, (JQ y SA) de 19 y 25 años, que cumplían criterios ACR para LES. JQ presentó obstrucción intestinal con ascitis recurrente. SA presentó neutropenia marcada, sin respuesta a micofenolato mofetil y prednisona. Se infundió por vía i.v. 1x10<sup>6</sup> MSCs/kg cultivadas de médula ósea autóloga, evaluando índices *Sledai* y *Bilag* de actividad de la enfermedad y Treg circulantes en condiciones basales y a la semana 1, 2, 7 y 14 de la infusión. Las Treg (CD4+CD25+FoxP3+) se cuantificaron por citometría de flujo y la inmunosupresión por inhibición de la proliferación y activación de mononucleares de sangre periférica normales *in-vitro*.

**Resultados:** Los linfocitos Treg aumentaron progresivamente en ambas pacientes: 5.9%, 13.1%, 3.3 %, 22.9%, y 37.9% para JQ y de 0% a 9.5%, 7.5%, 39.6%, 52.9% para SA. Pese a ello no detectamos un cambio importante en las manifestaciones de enfermedad ni en los índices *Sledai* o *Bilag*.

**Conclusiones:** Este es el primer reporte de terapia celular con MSCs en pacientes con LES. Aunque el tratamiento incrementó el nivel de Tregs circulantes, no observamos efectos clínicos ni adversos de la infusión de MSCs en estas dos pacientes. Nuestros resultados sugieren que la terapia con MSCs autólogas debe evaluarse en LES.

## INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales (MSC) son progenitoras no hematopoyéticas conocidas por su capacidad de originar diversos linajes celulares y contribuir a la restauración del daño tisular<sup>1</sup>. Sin embargo, los estudios recientes que demuestran efectos inmunosupresores y anti inflamatorios de las MSC en distintos sistemas experimentales, han aumentado el interés en su uso como una forma de terapia celular en enfermedades mediadas por el sistema inmune. En este sentido, las MSC ejercen un profundo efecto supresor de la función de casi todos los componentes celulares del sistema inmune<sup>2,3,4,5</sup>. En humanos, la administración de MSC derivadas de la médula ósea se ha empleado para tratar la *Enfermedad de Injerto contra Huésped* y también en el trasplante hematopoiético allogenico, promoviendo la reconstitución celular<sup>6,7</sup>. En modelos animales las MSC han demostrado efecto en la *Artritis inducida por Colágeno*<sup>8</sup>, en *Encefalomielitis Alérgica Experimental*<sup>9</sup> y en ratones lúpicos MRL/lpr<sup>10</sup>. Sin embargo, esta es la primera comunicación respecto de terapia con MSC en el Lupus Eritematoso Sistémico humano (LES). En la presente investigación evaluamos la seguridad y la eficacia clínica de la infusión de MSC autólogas derivadas de médula ósea, en dos portadoras de LES con manifestaciones de la enfermedad de difícil tratamiento. Adicionalmente examinamos el efecto inmunosupresor *in-vitro* de las MSC de ambas pacientes y el cambio del nivel de Treg circulantes (CD4+CD25+FoxP3+) en respuesta a la infusión de MSC.

## PACIENTES y MÉTODOS

Se incluyó en este estudio a dos mujeres (JQ y SA) de 19 y 25 años de edad respectivamente, provenientes del Hospital Parroquial de San Bernardo, que cumplían los criterios de clasificación de 1997 para LES, del *American College of Rheumatology* (ACR). Se obtuvieron los consentimientos informados escritos en los que se describía la naturaleza experimental de este protocolo. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes y del Hospital Parroquial de San Bernardo.

La actividad de la enfermedad de LES se evaluó de acuerdo a los índices:  
 \* *British Isles Lupus Assessment Group* (Bilag) y  
 \* *Selena Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (Selena Sledai)  
 Los parámetros inmunológicos fueron determinados a tiempo basal y la semana 1, 2, 7 y 14 post infusión.



**Aislamiento y cultivo de MSC derivadas de médula ósea.**  
 \*Se aspiraron 20 ml de médula ósea de la cresta iliaca posterior bajo anestesia local y sedación, supervisadas por un anestesiólogo.  
 \* Las muestras se diluyeron 1:2 con PBS-EDTA  
 \*La fracción mononuclear se separó por Gradiente de Densidad Histopaque-Ficoll  
 \*Las células (0,2x10<sup>6</sup>) fueron resuspendidas en medio MSC humano (αMEM, 10% SBF más antibióticos).  
 \*Los cultivos fueron expandidos por 3 semanas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>.  
 \*Al día 21, los cultivos se examinaron en cuanto a esterilidad microbiológica y las células adherentes se tripsinizaron, lavaron y resuspendieron en 10 ml de suero autólogo. Las MSC (1x10<sup>6</sup>/kg) se infundieron por vía intravenosa en el plazo de una hora de su preparación, tomando alícuotas de cada preparado para su inmunofenotipificación por citometría de flujo.

**Determinación del efecto inmunosupresor de las MSC *in-vitro***  
 El efecto de las MSCs de las pacientes con LES fue determinado mediante citometría de flujo midiendo la proliferación y activación de células mononucleares de sangre periférica en respuesta a mitógeno según la técnica de Carayon y Bord<sup>11</sup>.

**Cuantificación de células T FoxP3+**  
 Los linfocitos Treg se cuantificaron mediante citometría de flujo con el *Kit Human Regulatory T Cell Staining* (Bioscience). La adquisición y análisis se efectuó en un citómetro Coulter Epics-XL.

El porcentaje de células T CD4+CD25+ que expresan FoxP3 fue calculado para cada paciente a tiempo basal y a las semanas 1, 2, 7 y 14 post-infusión de MSC.

Todas las reactivos usados fueron calidad "good manufacturing practice" (GMP) y los procedimientos fueron realizados bajo técnica de Buenas Condiciones de Prácticas de Laboratorio.

## RESULTADOS

### Actividad Clínica y Treg circulantes en respuesta a MSCs.

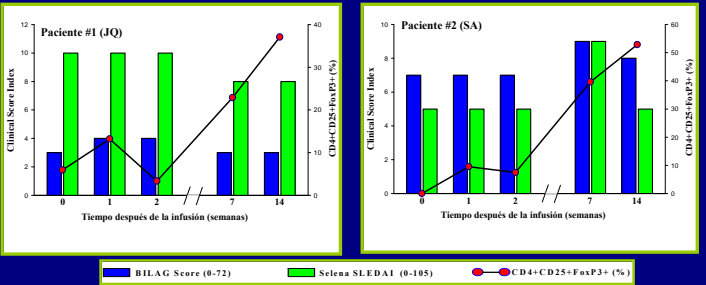


Figura 1. Los índices de actividad clínica de la enfermedad (Bilag = barras azules; Selena Sledai = barras verdes) y el porcentaje de células T CD4+CD25+ en sangre periférica que expresan Foxp3 (puntos rojos) se muestran a tiempo basal (0) y a la semana 1, 2, 7 y 14 post infusión de MSC.

### Efecto de MSC sobre la activación y proliferación celular *in-vitro*.

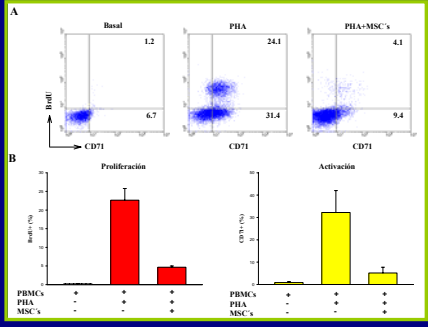


Figura 2. Supresión de la proliferación (barras rojas) y activación (barras amarillas) de células mononucleares de sangre periférica en respuesta a 10 mg/ml de PHA. Las MSCs de la paciente N°2 (SA) inhibieron la proliferación mediada por PHA (A) (ejemplificado en un caso) y activación (B) de PBMCs de 2 controles (individuos sanos). MSCs: Mesenchymal Stem Cells. PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells. PHA: Phytohemagglutinin.

### Inmunofenotipo de las MSC

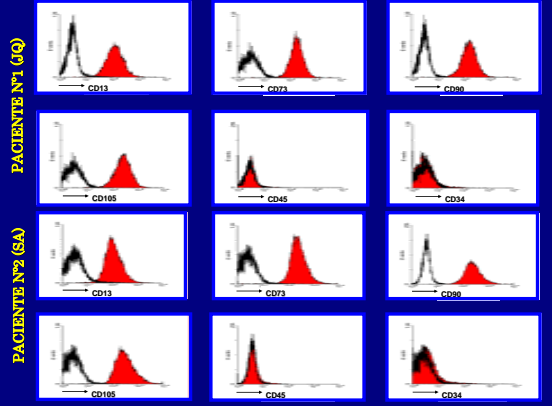


Figura 3. Citometría de flujo de las MSC de las pacientes con LES al momento de la infusión. Se observa expresión de marcadores fenotípicos característicos de MSC (CD13, CD73, CD90, CD105) y negatividad para marcadores hematopoyéticos (CD45 y CD34) en ambas pacientes.

## CONCLUSIÓN

No observamos efectos adversos de la terapia celular en estas pacientes. Pese al marcado incremento de las células supresoras circulantes (Treg) en respuesta a la infusión de MSC, no se indujo un cambio en las manifestaciones clínicas de la enfermedad o los índices de actividad del LES. Puesto que el efecto inmunosupresor de las MSC se ha vinculado con la presencia simultánea de IPN<sup>7</sup> y de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$ 12, pensamos que el beneficio clínico de la terapia con MSC pudieran ser dependiente de un ambiente celular más inflamatorio, como el que presentan los pacientes con grados más altos de actividad de la enfermedad

## REFERENCIAS

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoni V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006;36:2566-73.
- Kraninger M, Gleim S, Dwyer J, Scott D, Taylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101:3722-9.
- Deng W, Han Q, Liao L, You S, Deng H, Zhao R. Effects of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on T and B Lymphocytes from BXSB Mice. *Dev Cell Biology* 2005;24: 458-63.
- Maccario R, Podda M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in allogeneic-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005;90:516-25.
- Maitra B, Székely E, Gijni K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:597-604.
- Le Blanc K, Samulsson H, Gustafsson B, Ringden B, Sundberg B, Avallón J, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Lancet* 2007;21:1733-8.
- Angello A, Tasso R, Negri S, Cancedda R, Pennesi G, et al. Cell Therapy Using Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Prevents Tissue Damage in Collagen-Induced Arthritis. *Arthritis Rheumatism* 2007;56: 1175-86.
- Zappa E, Carazza S, Polmonese E, Berenvento F, Bonanni F, Geroldi E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005;106:1758-6.
- Ishida T, Inaba M, Hishi H, Sugita K, Adachi Y, Nagata N, et al. Requirement of donor-derived stromal cells in the bone marrow for successful allogeneic bone marrow transplantation. Complete prevention of recurrence of autoimmune diseases in MRL/lpr/lpr mice by transplantation of bone marrow plus bones (stromal cells) from the same donor. *J Immunol* 1994;152:63119-27.
- Carayon P, Bord A. Identification of DNA-replicating lymphocyte subsets using a new method to label the bromo-deoxyuridine incorporated into the DNA. *J Immunol Methods*. 1992;147:225-30.
- Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008;2:141-50.