

# Propiedades inmunomoduladoras de las células madre de la membrana amniótica. Nuevas perspectivas

## RESUMEN

Las células epiteliales y mesenquimales aisladas de la membrana amniótica poseen características de células madre, potencial de diferenciación hacia líneas de las diferentes capas germinales y propiedades inmunomoduladoras. Al seguir las primeras aproximaciones con el uso de células madre para la regeneración tisular, las células de la membrana amniótica comenzaron a utilizarse en ensayos preclínicos en modelos animales de diversas enfermedades con resultados prometedores. No obstante, al igual que lo observado con células mesenquimales de otras fuentes, la mayor parte de las veces, el efecto benéfico no podía atribuirse a la plasticidad celular, porque el número de células que se injerta es escaso. En los últimos años, diferentes observaciones experimentales sugieren que las células madre derivadas de la membrana amniótica actúan benéficamente por sus efectos inmunomoduladores e inmunorreguladores. Los mecanismos implicados se han investigado extensamente en ensayos *in vitro* y en modelos animales de enfermedades inflamatorias. Hasta ahora se han implicado al menos tres mecanismos: *a)* las células madre de la membrana amniótica son hipoinmunogénicas, *b)* modulan los fenotipos de las células T y *c)* inmunosuprimen el ambiente local mediante la secreción de factores como IL-10, TGF- $\beta$ 1, HGF, IDO y PGE2. En esta revisión describimos brevemente las características generales de las células madre de la membrana amniótica, analizamos algunas de las evidencias de estudios *in vitro* que fundamentan su propiedades inmunosupresoras y presentamos los resultados de algunos ensayos en modelos animales de enfermedades inflamatorias que apoyan el uso potencial de estas células en el tratamiento de estas enfermedades.

**Palabras clave:** membrana amniótica, células madre, terapia celular, inmunomodulación, inmunorregulación, inmunogenicidad.

## Immunomodulatory Properties of the Amniotic Membrane Stem Cells: New Perspectives

### ABSTRACT

Epithelial and mesenchymal cells isolated from the amniotic membrane possess stem cell characteristics, differentiation potential toward lines of different germ layers and immunomodulatory properties. They have been used as donor cells for regenerative therapies in pre-clinical studies. However, although the preliminary results described were quite

Carmen L Insausti<sup>1</sup>  
Mónica Rodríguez<sup>1</sup>  
Gregorio Castellanos<sup>2</sup>  
José M Moraleda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular.

<sup>2</sup> Servicio de Cirugía.

Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, El Palmar, Murcia. IMIB. Campus Mare Nostrum. Universidad de Murcia, España.

Recibido: julio 2013

Aceptado: octubre 2013

### Correspondencia

Dra. Carmen L Insausti  
Unidad de Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular,  
Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca  
Ctra. Madrid-Cartagena s/n  
30120 El Palmar, Murcia, España  
caymed@gmail.com

### Este artículo debe citarse como

Insausti CL, Rodríguez M, Castellanos G, Moraleda JM. Propiedades inmunomoduladoras de las células madre de la membrana amniótica. Nuevas perspectivas. Rev Hematol Mex 2014;15:11-20.

promising, many times the beneficial effect could not be attributed to the plasticity of the cells, because the engraftment was low. In the last several years, increasing experimental findings have pointed toward the immunomodulatory properties of the amniotic membrane-derived stem cells. The mechanisms of such immunomodulatory properties have been extensively studied *in vitro* on various target cells of the innate and the adaptive system and *in vivo* in animal models of different inflammatory diseases. *In vitro*, at least three candidate mechanisms have emerged: a) amniotic membrane-derived stem cells are hypoimmunogenic, b) they modulated T cell phenotype and c) they immunosuppress the local environment. Some results have evidenced that these effects are dependent on cell-cell contact, other, that are mediated through the secretion of suppressive molecules, such as IL-10, TGF- $\beta$ 1, HGF, IDO and PGE2. In this review we will briefly review the general properties of the amniotic membrane-derived stem cells, we then discuss some of the *in vitro* evidences behind the role of these cells in immunomodulation, and furthermore, we will describe some assays in animal models of different inflammatory diseases, which reveal the potential use of these cells to treat such diseases.

**Key words:** amniotic membrane, stem cells, cell therapy, immunomodulation, immunoregulation, immunogenicity.

Las primeras publicaciones de la existencia de células madre en la membrana amniótica datan de los primeros años del decenio de 2000.<sup>1-5</sup> Desde entonces se sabe que las células aisladas del epitelio amniótico, conocidas como hAECs (por sus siglas en inglés de *human amniotic epithelial cells*), poseen características de células madre pluripotenciales con capacidad de diferenciación hacia células de las tres capas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo,<sup>1-4,6-8</sup> y que las células obtenidas del estroma amniótico, conocidas como hAMSCs (por sus siglas en inglés de *human amniotic mesenchymal stromal cells*) poseen al menos características multipotenciales.<sup>5,6,8-12</sup>

Al seguir las primeras aproximaciones con el uso de células madre para la regeneración tisular, las células madre obtenidas de la membrana amniótica comenzaron a utilizarse en ensayos preclínicos en modelos animales de diversas enfermedades, con resultados prometedores.<sup>13-18</sup>

No obstante, al igual que lo observado en la terapia celular con células mesenquimales de la médula ósea y de otras fuentes, la mayor parte de las veces, el efecto benéfico no podía atribuirse a la propiedad de diferenciación de estas células, porque el número de células que se injerta es escaso y probablemente insuficiente para explicar la mejoría funcional observada. En los últimos años, diferentes observaciones experimentales *in vitro* e *in vivo* sugieren que las células madre derivadas de la membrana amniótica, al igual que las células mesenquimales obtenidas de diferentes fuentes, actúan benéficamente ejerciendo efectos tróficos en las células del huésped, así como efectos inmunomoduladores e inmunorreguladores en las diferentes células del sistema inmunitario.<sup>19-29</sup>

En esta revisión describimos brevemente las características generales de las células madre derivadas de la membrana amniótica, analizamos algunas de las evidencias de estudios *in vitro* que

fundamentan las propiedades inmunosupresoras de dichas células y presentamos los resultados de algunos ensayos *in vivo* en modelos animales de enfermedades inflamatorias que apoyan el uso potencial de estas células en el tratamiento de estas enfermedades.

### **Características generales de las células madre derivadas de la membrana amniótica**

Las células obtenidas del epitelio amniótico recién aisladas expresan los marcadores de superficie asociados con células madre embrionarias SSEA-3, SSEA-4 (del inglés *stage specific embryonic antigen*), TRA 1-60 y TRA 1-81 (del inglés *tumor rejection antigen*). Además, expresan moléculas como E-caderina, CD9, CD29, CD104, CD49e, CD49f, CD49d y CD44 que, junto con otras moléculas, participan en los procesos de interacción y adhesión celular.<sup>1,3,4,6,9-12,30,31</sup> Igualmente, las células obtenidas del epitelio amniótico expresan factores de transcripción específicos de células madre pluripotenciales: Oct-4, Sox-2, Nanog y Rex-1.<sup>3,4,6,9-12</sup> En cultivos primarios estas células proliferan y forman una capa de células confluentes con la típica apariencia de células epiteliales.<sup>3,4,6-9,12</sup> En subcultivos experimentan la transición epitelio-mesénquima mediada por la producción autocrina del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ).<sup>32</sup>

Las células obtenidas del estroma amniótico se definen por su capacidad de proliferar adheridas al plástico, con apariencia fusiforme, de producir unidades formadoras de colonias fibroblásticas y de expresar un patrón de antígenos en la superficie celular, similar al de las células mesenquimales de la médula ósea y de otras fuentes. Expresan concentraciones variables de CD90, CD73, CD105, CD29, CD44, CD49d, CD49e, CD56 y CD166, no expresan los marcadores de células hematopoyéticas: CD45, CD34, CD14 y

son reconocidas por el anticuerpo monoclonal STRO-1.<sup>5,6,9-12,31</sup>

Desde el punto de vista de los marcadores inmunológicos, ambos tipos de células no expresan, o expresan concentraciones muy bajas de los antígenos HLA-clase IA y de los componentes principales de la maquinaria procesadora de antígenos. No expresan antígenos HLADR (clase-II),<sup>3-12,31</sup> tampoco las moléculas coestimuladoras CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40 o CD40L.<sup>6,33,34</sup> La falta de expresión de antígenos HLA hace que estas células escapen al reconocimiento por las células T efectoras CD4+. Ambos tipos de células expresan de forma constitutiva los antígenos leucocitarios humanos no polimórficos, no clásicos: HLA-G,<sup>4,12,35,36</sup> cuya expresión, bajo condiciones fisiológicas, ocurre en órganos privilegiados desde el punto de vista inmunológico (por ejemplo, testículos, ovarios y células fetales), donde se asocian con propiedades tolerogénicas e inmunosupresoras.<sup>35,36</sup>

Además de estos marcadores, las células aisladas del epitelio amniótico y las obtenidas del estroma amniótico no expresan el receptor de muerte celular programada (PD-1: *programmed cell death receptor*), un receptor inhibitorio normalmente expresado en las células T y B activadas; tampoco sus dos ligandos: PD-L1 y PD-L2 (*programmed death ligands 1 and 2*), que sí se expresan en presencia de IFN- $\gamma$ .<sup>33,34,37</sup> Estas células tampoco expresan los receptores ILTR-2, ILTR-3 e ILTR-4 (del inglés *immunoglobulin like transcript receptors*), expresados en los linfocitos T y B, en las células NK (del inglés *natural killer*) y en las células dendríticas.<sup>34</sup> Hay controversias acerca de la expresión de TRAIL, TNF- $\alpha$  y el ligando de FAS (Fas-L), todos miembros de la familia TNF involucrada en la inducción de apoptosis.<sup>34,38</sup>

Las características señaladas sugieren que estas células son hipoinmunogénicas y que juegan un papel importante en la inmunorregulación.

### Evidencias *in vitro* de las propiedades inmunosupresoras de las células madre derivadas de la membrana amniótica

Los mecanismos que subyacen a las actividades inmunosupresoras no se conocen completamente, su investigación se ha realizado fundamentalmente en ensayos *in vitro* de cocultivo celular con células del sistema inmunitario innato y adquirido. Se han realizado algunos ensayos sin separar los dos tipos de células de la membrana amniótica (epiteliales y mesenquimales),<sup>33,39-44</sup> otros se han realizado sobre cada población celular.<sup>30,34,38</sup> Al respecto, Wolbank y su grupo demostraron que, aunque las células epiteliales y las mesenquimales tienen morfología y marcadores de superficie diferentes, su potencia para modular las reacciones inmunológicas *in vitro* es similar.<sup>30</sup> Nuestro grupo, además, demostró que las células epiteliales en cultivo experimentan transición epitelio-mesénquima mediada por la producción autocrina de TGF- $\beta$ .<sup>32</sup>

### Inmunidad natural

Se ha demostrado que las células derivadas de la membrana amniótica ejercen un efecto inmunomodulador en las células presentadoras de antígenos. Los monocitos expuestos a condiciones de diferenciación y maduración en presencia de células derivadas de la membrana amniótica muestran un bloqueo en su maduración hacia células dendríticas, fallan para expresar marcadores CD1a, para regular positivamente la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD83 y para incrementar la expresión de moléculas HLA-DR.<sup>42,43</sup> Los mecanismos responsables de esta inhibición no se conocen claramente. Se ha planteado que puede deberse a una parada del ciclo celular de los monocitos en la fase G<sub>0</sub>, con la consiguiente inhibición en la síntesis de proteínas en los monocitos estimulados.<sup>42</sup> Además, se ha considerado que en la generación

de células dendríticas tolerogénicas podrían participar los antígenos HLA-G de las células aisladas del epitelio amniótico y las obtenidas del estroma amniótico a través de su unión con los receptores inhibitorios ILT presentes en los monocitos, macrófagos y células dendríticas.<sup>45,46</sup>

Algunos investigadores han demostrado que la inhibición de la diferenciación de los monocitos no requiere contacto celular, sino que ocurre por la liberación de factores solubles.<sup>42,43</sup> Han detectado que las células derivadas de membrana amniótica producen altas concentraciones de citocinas Th2 relacionadas con CCL2, CXCL8 e IL-6, esta última muy implicada en la inhibición de las células CD34+ y de la diferenciación de los monocitos hacia células dendríticas. Además, se ha demostrado que las células derivadas de la membrana amniótica bloquean la producción de las citocinas inflamatorias TNF- $\alpha$ , CXCL10, CXCL9 y CCL5 cuando se añaden a los cultivos de diferenciación de monocitos.<sup>42</sup>

El bloqueo en la diferenciación y maduración de los monocitos hacia células dendríticas en presencia de las células derivadas de la membrana amniótica resulta en la alteración de la capacidad aloestimuladora de las células T alogénicas, es decir, en la inducción de células T anérgicas.<sup>33,42,43</sup> Este efecto persiste tras la retirada de las células derivadas de la membrana amniótica de los cultivos, lo que sugiere un efecto irreversible.<sup>42</sup>

Los hallazgos señalados son similares a los observados por diferentes investigadores utilizando células mesenquimales de la membrana amniótica y se consideran pruebas de que las células derivadas de la membrana amniótica son tolerogénicas, al menos en parte, a través de un efecto directo en las células dendríticas que, a su vez, altera la función de las células T.<sup>42,45-48</sup>

Las células *natural killer* (NK) son importantes células efectoras de la inmunidad innata, con un

papel fundamental en la respuesta inmunitaria antiviral y antitumoral debido a su actividad citolítica y a la producción de citocinas proinflamatorias.<sup>49</sup> Su función es estrictamente regulada por los receptores de la membrana celular que transmiten señales inhibitorias o activadoras. La lisis mediada por estas células requiere la expresión de ligando(s) en las células dianas reconocidos por los receptores activadores de las células NK, junto con la expresión baja o ausente de los antígenos HLA clase I en las células dianas reconocidos por los receptores inhibitorios específicos de las células NK. La ausencia de los antígenos HLA clase I en las células derivadas de la membrana amniótica les proporciona un privilegio inmunológico frente a las células de la inmunidad adquirida, pero las hace potencialmente vulnerables al ataque por las células NK. Sin embargo, diferentes ensayos experimentales han aportado evidencias de que las células derivadas de la membrana amniótica no son lisadas por las células NK.<sup>33</sup> Análisis por RT-PCR y ELISA han evidenciado que las células aisladas del epitelio amniótico producen un potente inhibidor de la migración de los macrófagos, el MIF (del inglés *migration inhibitory factor*) que, además, es un potente inhibidor de la actividad lítica mediada por las células NK.<sup>38</sup> Otro mecanismo probablemente involucrado depende de la interacción de los antígenos HLA-G presentes en las células derivadas de las células aisladas del epitelio amniótico con los receptores ILT inhibitorios expresados en las células NK, así como en los linfocitos T y B.<sup>45-50</sup>

### **Inmunidad adquirida**

Hay buenas evidencias *in vitro* de que las células madre derivadas de la membrana amniótica pueden modular la función de las células T. Diferentes experimentos realizados en cocultivos con células T estimuladas con mitógenos (PHA), con células alogénicas o con antígenos específicos han demostrado que las células derivadas

de la membrana amniótica inhiben la proliferación de las células T estimuladas.<sup>33,34,38-40,42,51</sup> Al igual que lo observado con las células de la inmunidad innata, algunos autores consideran que estos efectos requieren el contacto célula-célula en los cultivos mixtos.<sup>30,34</sup> Otros creen que estos efectos son producidos por factores solubles detectados en el sobrenadante de los cultivos de las células derivadas de la membrana amniótica y en el medio condicionado de estas células.<sup>33,38-40</sup>

Es probable que las células madre derivadas de la membrana amniótica, al igual que las células mesenquimales de la médula ósea requieran el cebado (*priming*) por factores producidos por las células del sistema inmunitario, para ejercer sus funciones inmunosupresoras.<sup>47,48,52,53</sup> Durante la respuesta inmunitaria, las células presentadoras de antígenos y las células T producen citocinas inflamatorias, como el interferón g (IFN-g), una de las citocinas inflamatorias más potentes que modulan las funciones de las células mesenquimales conduciendo a la producción de factores de crecimiento, a cambios en la expresión de moléculas de superficie y a la liberación de factores inmunosupresores.

Los antígenos HLA-G y el ligando del receptor de muerte programada (PD-L1) aumentan su expresión en los cultivos de células derivadas de la membrana amniótica expuestos a IFN-g.<sup>33,34</sup> Es probable que algunos de los efectos inhibitorios sean ejercidos por los antígenos HLA-G a través de la vía del receptor inhibitorio ILT-4,<sup>34</sup> a través del acoplamiento del ligando del receptor de muerte programada (PD-L1) a la proteína de muerte programada (PD-1), o mediante ambos mecanismos.<sup>33</sup> Los antígenos HLA-G inducen apoptosis de las células CD8+ activadas e inhiben la proliferación de las células CD4+.<sup>34,45,46,50</sup> Además, se ha demostrado que la producción de moléculas de HLA-G5 soluble por las células amnióticas suprime la proliferación

de las células T, NK y promueve la generación de células Treg.<sup>34,50</sup>

Recientemente se detectó, y es también observación de nuestro grupo (datos no publicados), un incremento en la proporción de células Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>/Fox3<sup>+</sup> en los ensayos de proliferación de linfocitos estimulados con PHA tras tres días de cocultivo con células mesenquimales derivadas de la placenta,<sup>33</sup> y de la membrana amniótica en particular. Se sabe que estos linfocitos modulan la respuesta inmunitaria.

Roelen y colaboradores, al analizar la producción de citocinas durante los cultivos mixtos de linfocitos primarios y secundarios y la respuesta en la proliferación mitogénica en presencia y ausencia de células mesenquimales fetales, observaron que el cocultivo con células mesenquimales fetales incrementó las citocinas/factores de crecimiento: IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IFN- $\gamma$  (en los cultivos secundarios) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*).<sup>41</sup> Li y su grupo, al medir las concentraciones de IL-2, INF-g e IL-10 en el sobrenadante de los cultivos mixtos, detectaron que las células mesenquimales de la placenta disminuyeron las concentraciones de IL-2 e INF-g (citocinas Th1) y aumentaron las concentraciones de IL-10 (citocinas Th2).<sup>39</sup> La IL-10 tiene un papel bien documentado en la regulación de las células T y en la formación de un fenotipo supresor. Con ensayos similares, Kang y colaboradores detectaron concentraciones más bajas de IL-17 e INF-g y más altas de IL-10 y de TGF- $\beta$  en el sobrenadante de los cocultivos de células obtenidas del estroma amniótico y células mononucleares de sangre periférica en presencia de mitógenos, en comparación con el sobrenadante obtenido de cultivos de células mononucleares de sangre periférica solos.<sup>40</sup> Los mismos investigadores detectaron que la expresión de ARN mensajero de TGF- $\beta$ , factor de crecimiento hepático (HGF, del inglés *hepatic growth factor*), dioxigenasa de

indolamina (IDO, del inglés *indoleamine 2,3-dioxygenase*) y ciclooxigenasa-2 (COX-2, del inglés *cyclooxygenase-2*) fue mayor, no sólo cuando las células obtenidas del estroma amniótico crecieron en contacto con las células mononucleares de sangre periférica, sino también cuando estas células se separaron de las células mononucleares de sangre periférica en cámaras *transwell*, comparada con la expresión en las que crecieron sin células mononucleares de sangre periférica.<sup>40</sup> La realización de los cultivos mixtos en cámaras *transwell* en presencia de anticuerpos neutralizantes para IL-10 y TGF- $\beta$  eliminó el efecto inhibitorio de las células mesenquimales de la placenta, lo que ratificó la importancia de ambos factores para mediar la capacidad supresora de esas células.<sup>33,41</sup>

En conclusión, los ensayos *in vitro* han evidenciado al menos tres mecanismos, probablemente interrelacionados, implicados en los efectos inmunosupresores de las células derivadas de la membrana amniótica: a) las células derivadas de la membrana amniótica son hipoinmunogénicas y bloquean la generación y maduración de las células presentadoras de antígenos; b) son capaces de modular el fenotipo de las células T, de modular la respuesta inmunitaria *in vitro* y, en particular, son capaces de inhibir la proliferación alogénica de los linfocitos, y c) inhiben la producción de citocinas inflamatorias e inmunosuprimen el ambiente local probablemente a través de la producción de al menos: IL-10, TGF- $\beta$ , IDO y PGE-2.<sup>1,33,40,50,52,54</sup> Es probable que cada uno tenga una importancia variable según el microambiente local. Es claro que se requieren estudios adicionales para clarificar sus papeles específicos.

#### **Evidencias *in vivo* del uso potencial de las células madre derivadas de la membrana amniótica en enfermedades inflamatorias**

Aunque los datos de hallazgos *in vitro* que sustentan las propiedades inmunosupresoras de las

células madre de la membrana amniótica son extensos, existen relativamente pocos estudios realizados *in vivo* en modelos animales de enfermedades con componente inflamatorio que han utilizado células de la membrana amniótica para modular las respuestas inmunitarias patogénicas. Presentaremos algunos de ellos.

*Enfermedades neurológicas.* El traumatismo directo de la médula espinal es un trastorno neurológico relativamente frecuente, en el que la reacción inflamatoria secundaria tiene un papel muy importante en el daño que sigue al traumatismo.<sup>55</sup> Recientemente se demostró en modelos de ratas con hemisección medular en T13 que el trasplante de células aisladas del epitelio amniótico dentro de la médula espinal realizado a los 14 días de la sección medular suprime la alodinia mecánica y reduce la expresión de las proteínas F4/80 (marcador de microglía) en el sitio del daño, y en el segmento espinal L4-5, ubicado por debajo del daño. Además, inhibe significativamente el incremento de la fosforilación del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato, indicador de dolor neuropático crónico en las ratas con sección medular) en los segmentos L4-5, lo que sugiere que las células aisladas del epitelio amniótico producen un efecto antinociceptivo en el estímulo mecánico en animales neuropáticos. Además, al reducir la expresión de la microglía se produce menos liberación de citocinas proinflamatorias y, subsecuentemente, menos dolor crónico.<sup>21</sup>

El ictus es otra alteración neurológica en la que la inflamación es un importante factor en la cascada de muerte celular secundaria que sigue al evento inicial.<sup>22</sup> En un modelo de ratas con ictus isquémico, Liu y su grupo evaluaron el efecto de las células aisladas del epitelio amniótico inyectadas directamente en el cerebro a las 24 horas tras la oclusión de la arteria cerebral media. Observaron disminución del volumen del área infartada y mejoría en las pruebas conductuales

y en la evolución neurológica a los 16 días del ictus. Además, evidenciaron que la apoptosis dependiente de caspasa fue menor en las células del tejido vecino al área de inyección.<sup>17</sup>

De manera similar, modelos de ratas con hemorragia intracerebral también han recibido trasplantes de células aisladas del epitelio amniótico para evaluar los efectos en el edema y la recuperación funcional neurológica.<sup>24</sup> La administración se realizó en el ventrículo lateral y ambos parámetros se evaluaron a los 28 días del trasplante. Se realizaron cortes del cerebro para estudios morfológicos e inmunohistoquímicos. Los resultados evidenciaron que las células aisladas del epitelio amniótico trasplantadas a lo largo de la pared lateral del ventrículo estuvieron vivas durante al menos cuatro semanas. Alrededor del sitio de hemorragia, la activación de la microglía y el edema cerebral fueron menores en el grupo tratado. Igualmente, las pruebas de comportamiento fueron superiores en el grupo tratado en relación con el grupo control.<sup>24</sup>

Los efectos inmunosupresores de las células aisladas del epitelio amniótico también se han evaluado en ratones con un modelo experimental de esclerosis múltiple: la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental.<sup>20,25</sup> McDonald y su grupo reportaron que la inyección intraperitoneal de células aisladas del epitelio amniótico podía suprimir los síntomas clínicos, así como disminuir la inflamación del sistema nervioso central, la desmielinización y la degeneración axonal en la médula espinal y en el cerebro de ratones con encefalomiелitis autoinmunitaria experimental.<sup>20</sup> Encontraron que las células aisladas del epitelio amniótico redujeron la proliferación de linfocitos T y su secreción de citocinas inflamatorias, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Consistentes con estos hallazgos, Liu y su grupo recientemente reportaron que la administración intravenosa de células aisladas del epitelio amniótico redujo la infiltración de linfocitos T CD3+, y la población F4/80+ de

monocitos/macrófagos, y atenuó la desmielinización dentro del sistema nervioso central de un modelo de ratón con encefalomiелitis autoinmunitaria experimental.<sup>25</sup> Los autores demostraron que la inmunosupresión fue mediada por TGF- $\beta$  o PGE2 neutralizando ambos factores en ensayos de proliferación de esplenocitos. Los esplenocitos de los ratones tratados con células aisladas del epitelio amniótico mostraron una desviación hacia citocinas Th2 con incremento en la producción de IL-5.<sup>25</sup>

*Fibrosis hepática.* En un modelo de fibrosis hepática inducida en ratones inmunocompetentes por la administración de tetracloruro de carbono (CCl4), el trasplante de células aisladas del epitelio amniótico condujo al injerto celular observado incluso cuatro semanas después del trasplante, a una importante disminución en la fibrosis hepática asociada con disminución en la activación de las células estrelladas hepáticas productoras de colágeno, y a disminución en las concentraciones de las citocinas hepáticas profibrogénicas. El trasplante de células aisladas del epitelio amniótico disminuyó significativamente la infiltración hepática por células T y por macrófagos generada por la administración de tetracloruro de carbono. Además, los ratones tratados tuvieron concentraciones significativamente más bajas de MCP-1 (del inglés: *chemokine monocyte chemoattractant protein-1*) que los ratones que sólo recibieron tetracloruro de carbono y mostraron mayor expresión de los genes asociados con macrófagos M2: YM-1, IL-10 y CD206, todos ellos relacionados con alivio de la fibrosis. Por último, el trasplante de células aisladas del epitelio amniótico disminuyó la apoptosis de los hepatocitos, la inflamación y la fibrosis.<sup>19</sup>

*Fibrosis pulmonar.* Varios ensayos evidenciaron que las células aisladas del epitelio amniótico modulan la respuesta inflamatoria del huésped, reducen la fibrosis pulmonar y previenen la

pérdida de la función pulmonar cuando se trasplantan en ratones con un modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.<sup>26-28</sup> Los efectos benéficos fueron concomitantes con la reducción de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1 e IL-6 en el pulmón del ratón y resultaron en disminución de la infiltración por células inflamatorias y en incremento en la citocina antiinflamatoria IL-10.<sup>27-28</sup> La reparación del tejido pulmonar se promovió vía moléculas de acción paracrina, como pudo comprobarse por la administración en modelos animales similares de medio condicionado obtenido del cultivo de células mesenquimales amnióticas humanas. A los 14 días el grado de fibrosis pulmonar en los animales tratados con el medio condicionado fue significativamente menor que el del grupo de ratones tratado con bleomicina, en cuanto a distribución de la fibrosis, proliferación de fibroblastos, deposición de colágeno y obliteración alveolar. No se observaron diferencias entre los ratones tratados con bleomicina y los ratones tratados con el medio condicionado.

En los estudios preclínicos mencionados, los investigadores observaron que los efectos inmunomoduladores de las células derivadas de la membrana amniótica frenaron la respuesta inflamatoria, lo que finalmente produjo un número reducido de fibroblastos y menos cicatriz en los diferentes órganos evaluados. En estos estudios los efectos no se relacionaron con trans-diferenciación de las células derivadas de la membrana amniótica en otros tipos de células, sino con la liberación de moléculas antiinflamatorias, como se ha demostrado con células mesenquimales de la membrana amniótica.

En conclusión, los resultados *in vitro* e *in vivo* en modelos animales sugieren que las células derivadas de la membrana amniótica humana tienen la capacidad de suprimir las respuestas inmunitarias, inducir tolerancia y revertir el



daño inflamatorio. Debido a que las células de la membrana amniótica son fácilmente aisladas de un tejido que habitualmente se desecha, sin las implicaciones éticas de otros tipos de células, estos resultados estimulan la realización de estudios adicionales en modelos animales de enfermedades inflamatorias a fin de identificar claramente los mecanismos responsables de los efectos inmunomoduladores y de validar la eficacia de estas células en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, con el objeto de trasladar su utilización a ensayos clínicos en humanos.

## REFERENCIAS

- Whittle WL, Gibb W, Challis JRG. Characterization of human amnion epithelial and mesenchymal cells: The cellular expression, activity and glucocorticoid regulation of prostaglandin output. *Placenta* 2000;21:394-401.
- Bailo M, Soncini M, Vertua E, et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation* 2004;78:1439-1448.
- Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz D, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 2005;23:1549-1559.
- Miki T, Strom SC. Amnion derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2006;2:133-142.
- Alviano F, Fossati V, Marchionni C, et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Developmental Biology* 2007;7:1-14.
- Parolini O, Alviano F, Bagnara G, et al. Concise review: Isolation and characterization of cells from human term placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2008;26:300-311.
- Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, et al. Stem cell derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod* 2007;77:577-588.
- Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1:296-305.
- Kim J, Kang HM, Kim H, et al. Ex vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. *Cloning Stem Cells* 2007;9:581-594.
- Miki T, Marongiu F, Dorko K, Ellis EC, Strom SC. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2010;1:E.3.
- Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol* 2010;25:91-98.
- Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human fetal membranes: A source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta* 2009;30:2-10.
- Parolini O, Alviano F, Bergwerf I, et al. Toward cell therapy using placenta-derived cells: Disease mechanisms, cell biology, preclinical studies, and regulatory aspects at the round table. *Stem Cells Dev* 2010;19:143-154.
- Marcus AJ, Coyne TM, Black IB, Woodbury D. Fate of amnion derived stem cells transplanted to the fetal rat brain: Migration, survival and differentiation. *J Cell Mol Med* 2008;12:1256-1264.
- Sankar V, Muthusamy R. Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research. *Neuroscience* 2003;118:1-17.
- Wu ZY, Hui GZ, Lu Y, Wu X, Guo LH. Transplantation of human amniotic epithelial cells improves hindlimb function in rats with spinal cord injury. *Chin Med J (Engl)* 2006;119:2101-2107.
- Liu T, Wu J, Huang Q, et al. Human amniotic epithelial cells ameliorate behavioral dysfunction and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Shock* 2008;29:603-611.
- Yu SJ, Soncini M, Kaneko Y, Hess DC, et al. Amnion a potent graft source for cell therapy in stroke. *Cell Transplant* 2009;18:111-118.
- Manuelpillai I, Tchongue J, Lourensz D, et al. Transplantation of human amniotic epithelial cells reduce hepatic fibrosis in immunocompetent CCl<sub>4</sub>-treated mice. *Cell Transplant* 2010;19:1157-1168.
- McDonald C, Siatskas C, Bernard CC. The emergence of amnion epithelial stem cells for the treatment of multiple sclerosis. *Inflamm Regen* 2011;31:256-271.
- Roh DH, Seo MS, Choi HS, et al. Transplantation of human umbilical cord blood or amniotic epithelial stem cells alleviates mechanical allodynia after spinal cord injury in rats. *Cell Transplant* 2013;22:1577-1590.
- Broughton BR, Lim R, Arumugam T, Drummond GR, et al. Post-stroke inflammation and the potential efficacy of novel stem cell therapies: focus on amnion epithelial cells. *Front Cell Neurosci* 2013;6:66-75.
- Parolini O, Hess D, Borlongan C. Human amniotic epithelial cells and amniotic mesenchymal cells express the embryonic stem cell marker Oct-4 in vitro and promote behavioral and histological benefits when transplanted in ischemic stroke rats. *Stroke* 2008;39:657-660.
- Dong W, Chen H, Yang X, Guo L, Hui G. Treatment of intracerebral haemorrhage in rats with intraventricular transplantation of human amniotic epithelial cells. *Cell Biol Int* 2010;34:573-577.
- Liu YH, Vaghjiani V, Tee JY, et al. Amniotic epithelial cells from the human placenta potently suppress a mouse model of multiple sclerosis. *PLoS One* 2012;7:e35758.

26. Cargnoni A, Gibelli L, Tosini A, et al. Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis. *Cell Transplant* 2009;18:405-442.
27. Moodley Y, Ilancheran S, Samuel C, et al. Human amnion epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augments repair. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:643-651.
28. Murphy S, Lim R, Dickinson H, et al. Human amnion epithelial cells prevent bleomycin-induced lung injury and preserve lung function. *Cell Transplant* 2011;20:909-923.
29. Cargnoni A, Ressel L, Rossi D, et al. Conditioned medium from amniotic mesenchymal tissue cells reduces progression of bleomycin-induced lung fibrosis. *Cytotherapy* 2012;14:153-161.
30. Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M, et al. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: A comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng* 2007;13(6):1173-1183.
31. Roubelakis MG, Trohatou O, Anagnostou NP. Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells: marker discovery. *Stem Cells Int* 2012;2012.
32. Alcaraz A, Mrowiec A, Insausti CL, et al. Autocrine TGF- $\beta$  induces epithelial to mesenchymal transition in human amniotic epithelial cells. *Cell Transplant* 2013;22:1351-1367.
33. Chang CJ, Yen ML, Chen YC, et al. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. *Stem Cells* 2006;24:2466-2477
34. Banas RA, Trumppower C, Bentlejewski C, Marshall V, et al. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. *Hum Immunol* 2008;69:321-328.
35. Lefebvre S, Adrian F, Moreau P, et al. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. *Hum Immunol* 2000;61:1095-1101.
36. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FABER J* 2005;19:681-693.
37. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: From discovery to clinical application. *Int Immunol* 2007;19:813-824.
38. Li H, Niederkorn JY, Neelam S, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Investigative Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:900-907.
39. Li C, Zhang W, Jiang X, Mao N. Human-placenta-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation and function of allogeneic immune cells. *Cell Tissue Res* 2007;330:437-446.
40. Kang JW, Koo HC, Hwang SY, et al. Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *J. Vet Sci* 2012;13:23-31.
41. Roelen DV, van der Mast BJ, in't Anker PS, et al. Differential immunomodulatory effects of fetal versus maternal multipotent stromal cells. *Human Immunol* 2009;70:16-23.
42. Magatti M, De Munari S, Vertua E, et al. Amniotic mesenchymal tissue cells inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes. *Cell Transplant* 2009;18:899-914.
43. Magatii M, De Munari S, Vertua E, Gibelli L, et al. Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T-cell suppression and stimulation capabilities. *Stem Cells* 2008;26:182-192.
44. Hao Y, Hui-Kang D, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of anti-inflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000;19:348-352.
45. Ristic V, Liang S, Zhang W, Wu J, Horuzsko A. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur J Immunol* 2005;35(4):1133-1142.
46. LeMaout J, Caumartin J, Daouya M, et al. Immune regulation by pretenders: Cell to cell transfers of HLA-G make effector T-cells act as regulator cells. *Blood* 2007;109:2040-2048.
47. Chiesa S, Morbelli S, Morando S, et al. Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *PNAS* 2011;108:17384-17389.
48. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:726-736.
49. Moretta L, Moretta A. Natural killer cell immune regulation: Coordination of immune function in tissue. In: Lotze MT, Thompson AW, editors. *Natural killer cells basic science and clinical applications*. London: Elsevier, 2010;433-445.
50. Chen PM, Yen ML, Liu KJ, Sytwu HK, Yen BL. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2011;18: 49-55.
51. Sessarego N, Parodi A, Podestà M, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Haematologica* 2008;93:339-346.
52. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 2012;33:136-143.
53. Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008;2:141-150.
54. Petroff M. Immune interactions at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol* 2005;68:1-13.
55. Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* 2003;41:369-378.