

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 454**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/38** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 35/17** (2015.01)  
**A61K 35/28** (2015.01)  
**A61P 19/00** (2006.01)  
**A61K 31/616** (2006.01)  
**A61L 27/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2012 PCT/US2012/035036**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12149046**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2012 E 12777000 (6)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2701516**

54 Título: **Composiciones para la regeneración mejorada de tejidos por supresión de interferón-gamma y factor de necrosis tumoral-alfa**

30 Prioridad:

**25.04.2011 US 201161478894 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.04.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA  
(100.0%)  
USC Stevens 1150 South Olive Street, Suite 2300  
Los Angeles, California 90015, US**

72 Inventor/es:

**SHI, SONGTAO;  
LIU, YI y  
WANG, LEI**

74 Agente/Representante:

**LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen**

ES 2 661 454 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**Descripción**

COMPOSICIONES PARA LA REGENERACIÓN MEJORADA DE TEJIDOS POR SUPRESIÓN DE INTERFERON-GAMMA Y FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-ALFA

**REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

- 5 Esta solicitud reivindica una invención que fue revelada en la solicitud provisional número 61/478.894 presentada el 25 de abril de 2011.

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La invención pertenece al campo de la medicina regenerativa.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

- 10 El campo de la medicina regenerativa busca reparar, reemplazar o regenerar tejidos y órganos dañados por lesiones o enfermedades. Con este fin, la medicina regenerativa basada en células ha sido reconocida como un enfoque prometedor para enfrentar los muchos desafíos de la regeneración tisular. Dentro de la medicina regenerativa basada en células, las células madre han surgido como una fuente de células prometedora. Hasta la fecha, las células osteoprogenitoras expandidas por cultivo se han utilizado junto  
15 con andamiajes para la ingeniería de tejidos con cierto éxito (26-28). Sin embargo, el principal desafío de la regeneración tisular basada en células es formar grandes cantidades de estructuras tisulares de alta calidad que coincidan con las necesidades funcionales del cuerpo (29, 30). Las metodologías actuales todavía tienen que superar los desafíos del campo.

- 20 En vista de lo anterior, todavía existe una necesidad sustancial de composiciones mejoradas y métodos para la regeneración de tejidos, especialmente métodos y composiciones que permitan la formación de cantidades significativas de estructuras tisulares de alta calidad que satisfagan las necesidades funcionales del cuerpo.

Además, también existe la necesidad de aclarar aún más el papel de las respuestas inmunes en la regeneración tisular basada en células. La invención se describe por medio de las reivindicaciones.

**25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

- La **Figura 1** muestra que las células T regulaban la formación ósea mediada por BMMSC (células madre mesenquimales de médula ósea) *in vivo*. (A) Esquema de evaluación de la regeneración tisular basada en BMMSC. (B) Cuando se implantó BMMSC ( $4 \times 10^6$  células) de  
30 compañero de camada por vía subcutánea en ratones C57BL6 usando hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TCP, 40 mg/cada implante) como portador, no se pudo regenerar el hueso en 8 semanas después de la implantación. La tinción de H&E mostró que el tejido conjuntivo rodea las partículas HA/TCP (HA) en los implantes de BMMSC. (C) Bajo la misma condición de implantación, las BMMSC formaron una cantidad sustancial de hueso (B), médula ósea (BM) y tejido conjuntivo (CT) alrededor de HA/TCP (HA) en ratones inmunodeprimidos a las 8 semanas después de la implantación. La infusión (D-F) de células T Pan (D),  $CD4^+$  (E) y  $CD4^+CD25^-$  (F) ( $1 \times 10^6$ ) a través de la vena de la cola 2 días antes de la implantación de BMMSC bloqueada  
35 Formación ósea mediada por BMMSC en ratones inmunocomprometidos. La tinción de H&E mostró partículas HA/TCP (HA) rodeando el tejido conjuntivo (CT) en los implantes de BMMSC. (G) La infusión de células T reguladoras de  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  (Tregs,  $1 \times 10^6$  vía vena de la cola 2 días antes de la implantación de BMMSC no mostró efecto inhibitor sobre el hueso (B) y formación de médula ósea (BM) en ratones inmunocomprometidos. (H) El análisis semicuantitativo de la imagen J indicó una marcada formación ósea en implantes de BMMSC en ratones inmunocomprometidos (C: Control) y ratones inmunocomprometidos con infusión de Treg (G: Tregs). Sin embargo, no hubo formación de hueso en los implantes de BMMSC en  
40 ratones C57BL6 (B: C57BL6), ratones inmunocomprometidos infundidos en células T Pan (D: T Pan), ratones inmunocomprometidos en células  $CD4^+$  (E:  $CD4^+$ ), y ratones inmunocomprometidos infundidos con células  $CD4^+CD25^-$  (F:  $CD4^+CD25^-$ ). (I) Cuando se implantaron BMMSC por vía subcutánea en ratones C57BL6, hubo expresión bruscamente elevada de IFN- $\gamma$  y una expresión aumentada de TNF- $\alpha$  en los implantes de BMMSC de 4 a 14 días después de la implantación, tal como se evidencia por el análisis ELISA. Sin embargo, no  
50 hubo cambios significativos en los niveles de IL-4, IL-6 e IL-17A en los implantes de BMMSC.

(J-M) Cuando se implantaron BMMSC por vía subcutánea en ratones inmunocomprometidos, no hubo cambios significativos en los niveles de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 e IL-17A (J). Con la infusión de células T Pan o células CD4<sup>+</sup>CD25 (1x10<sup>6</sup>) en ratones inmunocomprometidos, los niveles de IF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  se incrementaron en los implantes de BMMSC, a la vez que no se produjo ningún cambio significativo para los niveles de IL-4, IL-6 e IL-17A (K, L). La infusión de Tregs no mostró ningún efecto sobre los niveles de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 e IL-17A en los implantes de BMMSC en ratones inmunocomprometidos (M), (N-T) IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 e IL-17A (200 ng) se mezclaron con 250  $\mu$ l de hidrogel que contenía BMMSC (4x10<sup>6</sup>) y se implantaron posteriormente en ratones inmunodeficientes utilizando HA/TCP como vehículo. Como era de esperar, el grupo de control positivo BMMSC/HA/TCP mostró formación ósea marcada (E) alrededor de HA/TCP (HA) a las 8 semanas después de la implantación (N). Las BMMSC tratadas con IL-4 e IL-6 mostraron una reducción en la formación de hueso nuevo (O, P) y el tratamiento con IL-17 no pareció tener efecto inhibitorio sobre la formación de hueso mediada por BMMSC (Q). Además, el tratamiento con IFN- $\gamma$  tuvo como resultado un bloqueo total de la formación de hueso nuevo (R) y el tratamiento con TNF- $\alpha$  llevó a una formación ósea muy limitada en los implantes de BMMSC (S). El análisis semicuantitativo de la imagen J mostró la cantidad de formación de hueso nuevo en cada grupo (T). (U-W) Cuando se inyectaron anticuerpos neutralizantes de IFN- $\gamma$  y TNP- $\alpha$  (300  $\mu$ g/ratón) en ratones C57BL6 por tres veces vía LP, comenzando 2 días antes del implante BMMSC, se observó formación de hueso nuevo en implantes de BMMSC a las 8 semanas después de la implantación (U, V). La cantidad de nueva formación de hueso se mostró por análisis semicuantitativo del análisis de imagen J (W). (\*\*P<0.01, N=5).

La **Figura 2** muestra que la célula T reguladora (Treg) mejoró la formación de hueso mediada por BMMSC en ratones C57BL6. (A-C) La implantación subcutánea de BMMSC en ratones C57BL6 no logró generar ningún hueso (A), y solo se observó tejido conjuntivo (CT) alrededor de HA/TCP (HA). Sin embargo, la infusión de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (1x10<sup>6</sup>) a través de las venas de la cola 2 días antes de la implantación de BMMSC/HA/TCP dio como resultado una nueva formación ósea marcada (B) alrededor de partículas HA/TCP (HA) y tejido conjuntivo (CT) en implantes de BMMSC a las 8 semanas después de la implantación (B). El análisis semicuantitativo de la imagen J indicó la cantidad relativa de formación de hueso en los implantes de BMMSC (C). (D) El análisis ELISA mostró que la infusión de Treg redujo los niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en los implantes de BMMSC a los 7-14 días después de la implantación en comparación con el grupo de control no tratado. Parecía que los niveles de IL-4 e IL-10 no tenían cambios significativos entre estos grupos. Además, la infusión Treg redujo el número de células de neutrófilos y los niveles de IL-6 en los implantes de BMMSC a los 1-2 y 4-7 días después de la implantación, respectivamente. (\*P<0.05, \*\*P<0.01, N=5).

La **Figura 3** muestra que IFN- $\gamma$  inhibe la diferenciación osteogénica de BMMSC. (A) Cuando se cocultivaron BMMSC con 200 ng/ml de IL-4, IL-6, IL-17A e IFN- $\gamma$  en medios osteogénicos durante 14 días, la tinción con rojo de alizarina mostró que el tratamiento con IFN- $\gamma$  inhibía significativamente la formación de nódulos mineralizados en comparación a grupos osteogénicos inductivos (osteogénicos), IL-4, IL-6 e IL-17A. Parecía que el tratamiento con IL-4 reducía la formación de nódulos mineralizados. Pero el tratamiento con IL-6 e IL-17A no tuvo efecto de inhibición sobre la formación de nódulos mineralizados. (B) Cuando se utilizó 50 ng/ml de IFN- $\gamma$  para tratar BMMSC, no hubo un efecto inhibitorio significativo sobre la formación de nódulos mineralizados en comparación con el grupo inductivo osteogénico, tal como se evidencia por la tinción con rojo de alizarina. Sin embargo, el tratamiento con IFN- $\gamma$  de 200 ng/ml mostró una reducción significativa en la formación de nódulos mineralizados. (C) El análisis de transferencia Western mostró que IFN- $\gamma$  a 200 ng/ml elevaba la expresión de Smad6 e inhibía los niveles de expresión de los genes osteogénicos Runx2, ALP y OCN, que no se observaron en 50 ng/ml del grupo de tratamiento con IFN- $\gamma$ . El nivel de expresión de Smad 7 no se alteró en BMMSC tratadas con IFN- $\gamma$ . (D, E) El tratamiento con IFN- $\gamma$  no bloqueó la osteogénesis ni alteró los niveles de expresión de Smad 6 y Runx2 en BMMSC Fas<sup>-/-</sup> derivados de ratones lpr (D) y Fas knock down BMMSC por siRNA (E) según la evaluación de alizarina tinción roja y análisis de Western blot, respectivamente. (\*P<0.05, \*\*P<0.01, N=5).

La **Figura 4** muestra que el IFN- $\gamma$  potenciaba sinérgicamente la apoptosis de BMMSC inducida por TNF- $\alpha$  a través de la vía apoptótica Fas. (A) IL-4, IL-6, IL-17A, TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$  en diversas concentraciones (1, 10, 20, 50, 100, 200 ng/ml) se cultivaron con BMMSC durante tres días. La viabilidad de BMMSC se evaluó mediante tinción con azul de toluidina. Solo TNF- $\alpha$  indujo una muerte celular dependiente de la dosis y otras citoquinas no mostraron ningún efecto sobre la muerte de BMMSC. (B) La apoptosis BMMSC inducida por TNF- $\alpha$  (50 ng/ml a 200 ng/ml) se potenció sinérgicamente mediante tratamiento con IFN- $\gamma$  (50 ng/ml) según se evaluó mediante tinción con azul de toluidina. (C) IFN- $\gamma$  (1-200 ng/ml) no fue capaz de inducir la apoptosis de BMMSC. Con la adición de TNF- $\alpha$  (50 ng/ml), se observó una muerte de BMMSC

dependiente de la dosis de 1 a 50 ng/ml de grupos IFN- $\gamma$ . Cuando la concentración de IFN- $\gamma$  alcanzó más de 100 ng/ml, no hubo ninguna BMMSC que sobreviviera en los cultivos. (D) Las imágenes representativas mostraron que IFN- $\gamma$  (50 ng/ml) aceleró TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) indujo apoptosis de BMMSC (triángulos, TNF- $\alpha$  20 ng/ml/IFN- $\gamma$  50 ng/ml) tal como se evidenció mediante tinción con 7ADD/anexina cuando se compara con el grupo de tratamiento con TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  20 ng/ml). (E) Cuando se implantaron BMMSC ( $4 \times 10^6$ ) por vía subcutánea en ratones inmunocomprometidos con matrigel que contenía TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) mostraron una marcada reducción en el número de BMMSC supervivientes en comparación con el grupo de control no tratado a los 30 días de la implantación. Además, el tratamiento combinado de TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) e IFN- $\gamma$  (200 ng/ml) dio como resultado que absolutamente ninguna BMMSC sobrevivió a los 30 días después de la implantación. (F) El papel sinérgico de IFN- $\gamma$  en la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  se realizó a través de la vía Fas. El tratamiento con IFN- $\gamma$  (50 ng/ml) indujo la expresión regulada de Fas en BMMSC naturales junto con la ausencia de activación de caspasa 3 y caspasa 8, el tratamiento con TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) mostró un ligero aumento en la expresión de la actividad de Fas y caspasa 3 como lo demuestra el análisis de transferencia Western. Cuando se coestimularon con IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , los niveles de expresión de Fas y caspasa escindida 8 y 3 fueron significativamente elevados en comparación con el grupo de tratamiento con TNF- $\alpha$ . Curiosamente, BMMSC derivados de ratones *lpr Fas<sup>-/-</sup>* no mostraron respuesta al tratamiento con IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en términos de expresión de la caspasa escindida 8 y 3. (G, H) Cuando la expresión de Fas estaba parcialmente bloqueada por ARNip, el análisis de transferencia Western mostró que los niveles de expresión de la caspasa escindida 8 y 3 se redujeron en el grupo tratado con IFN- $\gamma$  / TNF- $\alpha$  (G), junto con una muerte de células significativamente reducida evaluada por tinción con azul de toluidina (H). (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , N=5).

La **Figura 5** muestra que iFN- $\gamma$  intensificó sinérgicamente la apoptosis de BMMSC inducida por TNF- $\alpha$  mediante la inhibición de la ruta de TNFR2 NFKB y la internalización de Fas. (A) La tinción inmunocitoquímica mostró que Fas y actina se localizaban en la superficie de BMMSC y en el citoplasma, respectivamente (0 h). El tratamiento con IFN- $\gamma$  (50 ng/ml) y TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) dio como resultado la internalización de Fas y el agrupamiento en BMMSC tal como se muestra en puntos de tiempo indicados (0.5-4h). Se observó una marcada apoptosis de BMMSC a 2-4h de tratamiento con IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ . (B) Cuando se utilizó el inhibidor de endocitosis Lnt A para tratar BMMSC durante 3 horas, la muerte celular inducida por IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  y la activación de la caspasa escindida 8 y 3 se redujeron significativamente según se evaluó mediante tinción con azul de toluidina y análisis de transferencia Western. (C) El inhibidor de caspasa 8 puede reducir los niveles de caspasa escindida 8 y 3 en BMMSC tratadas con IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ , que se asoció con el rescate de la muerte celular inducida por IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  tal como se muestra mediante tinción con azul de toluidina. El inhibidor de caspasa 3 también fue capaz de rescatar la muerte de BMMSC inducida por IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  con inhibición parcial de la caspasa 3 escindida y sin efecto inhibitor sobre la caspasa escindida 8. (D) El bloqueo de las actividades de caspasa utilizando el inhibidor de pan caspasa (b), el inhibidor de caspasa 8 (c) o el inhibidor de caspasa 3 (d) redujo el número de internalización de Fas en comparación con el grupo de control (a). La tinción inmunocitoquímica se utilizó para identificar el número de BMMSC con internalización de Fas. (E) El análisis de transferencia de Western mostró que el tratamiento con IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  dio como resultado una expresión disminuida de TNFR2, NFKB fosforilado (PNFkB), FLIP y XIAP cuando se compara con BMMSC tratadas con TNF- $\alpha$ . (F) La inhibición de TNFR2, IKK, FLIP y XIAP usando siRNA condujo a la regulación positiva de la caspasa escindida 8 y 3 en BMMSC tratadas con IFN- $\gamma$  (25 ng/ml) / TNF- $\alpha$  (10ng/ml). (G) El análisis de transferencia Western confirmó la eficacia del ARNip en la inhibición de TNFR2, IKK, FLIP y XIAP. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , N=5).

La **Figura 6** muestra que la infusión de Treg mejoró la formación de hueso mediada por BMMSC para reparar defectos óseos de calota en ratones C57BL6. (A) Huesos de calota e imágenes de sutura de la imagen coronal microCT (panel superior), tinción H&E de microCT sagital (panel central) y coronal (panel inferior). (B) Se generaron defectos óseos de calota de tamaño crítico de 7x8 mm en ratones de control no tratados, y se identificó una cantidad muy limitada de formación de hueso a las 12 semanas después de la cirugía (flecha). (C) Con la implantación de  $4 \times 10^6$  BMMSC utilizando espuma de gel como vehículo, hubo cierta cantidad de regeneración ósea a las 12 semanas después de la implantación, pero no se repararon completamente los defectos de la calota (flecha). (D) Se infundieron  $1 \times 10^6$  Tregs en los ratones receptores a través de la vena de la cola 2 días antes de la implantación de BMMSC ( $4 \times 10^6$ ) / en espuma de gel, se observó una reparación total de los defectos de la calota a las 12 semanas después de la implantación (flecha). (E) El análisis cuantitativo de MicroQCT mostró la cantidad de formación de hueso en cada grupo. (F) El análisis semicuantitativo de la imagen J indicó que la implantación de BMMSC/espuma de gel con el grupo de infusión de Treg

sistémica tenía un grosor óseo similar al del hueso de la bóveda craneal normal. (\*P<0.01, N=5; G: espuma de gel; B: hueso).

La **Figura 7** muestra que el tratamiento con aspirina mejoró significativamente la regeneración ósea basada en BMMSC a través de la inhibición de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . (A) El análisis ELISA mostró que la aspirina reduce los niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , pero no para IL-10, en los implantes de BMMSC en comparación con el grupo de control no tratado de 2 a 14 días después de la implantación. (B-I) La tinción inmunohistoquímica mostró que los números de células positivas para IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  fueron superiores en los implantes de BMMSC en ratones C57BL6 en comparación con los implantes de BMMSC en ratones inmunocomprometidos. Hubo niveles significativamente disminuidos de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en el grupo tratado con aspirina cuando se compararon con el grupo de control no tratado en ratones C57BL6. (J-N) Se cultivaron  $4 \times 10^6$  BMMSC con 50  $\mu\text{g/ml}$  de aspirina durante 2 días y posteriormente se sembraron en áreas de defectos óseos bilaterales de 7x8 mm utilizando espuma de gel como vehículo, que contenía 100  $\mu\text{g}$  de aspirina. A las 12 semanas de la implantación, el análisis de microQCT mostró que los defectos de las calotas se repararon por completo (k). Sin embargo, el grupo de implantación de BMMSC mostró una reparación parcial de los defectos óseos de la calota (J). La imagen sagital de microQCT y la tinción H&E coronal mostró la estructura ósea reparada (L, M). El análisis semicuantitativo J de la imagen J mostró la cantidad relativa de formación de hueso en el área del defecto de la calota (N). (\*P<0.01, N=5).

La **Figura 8** muestra BMMSC autólogas que no pudieron regenerar hueso en ratones C57BL6. (A) Cuando BMMSC fueron implantadas por vía subcutánea en ratones inmunocomprometidos utilizando fosfato tricálcico de hidroxapatita (HA/TCP) como vehículo, el hueso (B) y la médula ósea (BM) se regeneraron alrededor de HA/TCP (HA). (B) Cuando se implantaron BMMSC autólogas en C57BL6 por vía subcutánea, no hubo formación de hueso. Solo se encontró tejido conjuntivo (CT) alrededor de HA/TCP (HA).

La **Figura 9** muestra que las células T deficientes en IFN- $\gamma$  no pudieron bloquear la formación de hueso mediada por BMMSC en ratones inmunocomprometidos. (A) Infusión de células T Pan ( $1 \times 10^6$ ) a ratones inmunocomprometidos 2 días antes de la implantación de BMMSC ( $2 \times 10^6$  con 40 mg de HA/TCP), no hubo formación de hueso. La tinción H&E mostró tejido conjuntivo (CT) alrededor de HA/TCP (HA). (B) La infusión de células T Pan deficientes en IFN- $\gamma$  derivadas de ratones nulos en IFN- $\gamma$  no fue capaz de bloquear la formación de hueso mediada por BMMSC. La tinción de H&E mostró ese hueso recién formado (B) alrededor de HA/TCP (HA). (C) El análisis semicuantitativo de la imagen J mostró la cantidad de formación de hueso. (\*P<0.01, N=5).

La **Figura 10** muestra la apoptosis de BMMSC inducida por IFN- $\gamma$  potenciada con TNF- $\alpha$  sinérgicamente *in vitro*. (A) El análisis de citometría de flujo confirmó que el TNF- $\alpha$  a 0, 5, 50, 100 ng/ml causaba apoptosis de BMMSC dependiente de la dosis. IFN- $\gamma$  adicional (50 ng/ml) podría sinergizar la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$ . (B) El análisis estadístico mostró que 50 ng/ml de IFN- $\gamma$  potenciaba significativamente la apoptosis de BMMSC inducida por TNF- $\alpha$ . (\*P<0.01, N=4).

La **Figura 11** muestra los niveles de expresión de Fas L, Trail y TNFR1 en BMMSC tratadas con IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ . El análisis de transferencia Western mostró que el tratamiento con IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  no afectó los niveles de expresión de Fas L, TNFR1 y Trail.

La **Figura 12** muestra un diagrama esquemático de la vía no apoptótica inducida por IFN- $\gamma$  (A) e IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  indujeron la ruta apoptótica de CD95 (B).

La **Figura 13** muestra que el tratamiento con aspirina mejoró la supervivencia de BMMSC y la regeneración ósea *in vivo*. (A) Cuando BMMSC positivas a GFP se implantaron por vía subcutánea durante 30 días, el grupo tratado con aspirina (50  $\mu\text{g/ml}$  de aspirina pretratada durante 2 días, 100 g de aspirina co-implantada) mostró un número significativamente mayor de células de supervivencia en comparación con el grupo de control no tratado de 4 a 30 días después de la implantación. (B-G) Se trataron BMMSC con 50  $\mu\text{g/ml}$  de aspirina durante 2 días y a continuación se combinaron con partículas de HA/TCP para ser implantadas en ratones inmunocomprometidos por vía subcutánea. La cantidad de formación de hueso nuevo aumentó en el grupo tratado con aspirina en comparación con el grupo de control no tratado (B, C). La co-implantación de 200 ng IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$  con BMMSC inhibió la formación de hueso subcutáneo en ratones inmunocomprometidos (D, E), sin embargo, el pretratamiento BMMSC con 50  $\mu\text{g/ml}$  de aspirina y la co-implantación de 100  $\mu\text{g}$  de aspirina dieron como resultado un rescate

significativo de la formación ósea mediada por BMMSC (F, G). El análisis semicuantitativo de la imagen J mostró la cantidad relativa de formación de hueso (H). (\*P<0.05, \*\*P<0.01, N=5).

5 La **Figura 14** muestra un diagrama esquemático de la implantación de BMMSC/aspirina para reparar defectos de calota craneal. (a) Se generaron BMMSC/hidrogel/aspirina y BMMSC/espuma de gel/aspirina para la implantación, (b) se generaron defectos de calota a lo largo de los puntos amarillos en ratones C57BL6, (c) implantación de complejo de BMMSC/hidrogel/aspirina a defectos óseos de calota en Ratones C57BL6, (d) Cubiertos con BMMSC/espuma de gel/aspirina. (e) El defecto óseo de la calota fue suturado.

## RESUMEN DE LA INVENCION

10 La presente invención describe métodos y composiciones para mejorar la ingeniería de tejidos basada en BMMSC a través de la supresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , preferiblemente por tratamiento específico de sitio y más preferiblemente por tratamiento con aspirina.

15 Las células T proinflamatorias contribuyen a la inhibición de la formación de hueso basada en BMMSC. Es un descubrimiento de la presente invención que las citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  juegan un papel importante en la supresión mediada por células T proinflamatorias en la formación de hueso basada en BMMSC. En particular, la presente invención ha descubierto que niveles altos de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en los implantes de BMMSC están relacionados negativamente con la formación de hueso. Por el contrario, el bloqueo de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  con sus respectivos anticuerpos neutralizantes resultó eficaz en el rescate de la formación de hueso mediada por BMMSC. Por ejemplo, la adición de agente (s) reductor (es) de citoquinas proinflamatorias, como por ejemplo aspirina (por ejemplo, 100  $\mu$ g) a los implantes de BMMSC, restauraron la formación de hueso que fue suprimida por IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

20 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se dirige a una composición de complejo de ingeniería de tejidos o a un dispositivo de regeneración de tejidos para aplicarse a un sitio que necesita regeneración de tejidos. Las composiciones o dispositivos de acuerdo con este aspecto de la invención generalmente incluirán BMMSC y agente(s) reductor(es) de citocinas proinflamatorias en una cantidad efectiva para reducir el nivel de las citoquinas proinflamatorias. En algunas formas de realización, las composiciones o dispositivos pueden incluir adicionalmente un sustrato. En todavía algunas otras formas de realización, las composiciones o dispositivos pueden incluir además al menos un vehículo.

25 En el contexto de la presente invención, los términos "agente reductor de citocina proinflamatoria" y "agente antiinflamatorio" se utilizan de forma intercambiable. Pueden ser cualquier agente capaz de reducir directa o indirectamente el efecto de la citocina proinflamatoria IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ , o ambos. Por ejemplo, los anticuerpos capaces de neutralizar estas citoquinas se pueden utilizar como agentes antiinflamatorios. También se pueden usar otros agentes conocidos o agentes desarrollados en el futuro capaces de inhibir o regular negativamente estas citoquinas como agente antiinflamatorio de la presente invención. En una forma de realización preferente, la citoquina proinflamatoria es aspirina. En otra forma de realización preferente, la cantidad de aspirina es preferiblemente de aproximadamente 50  $\mu$ g/ml a aproximadamente 100  $\mu$ g/ml, más preferiblemente 50  $\mu$ g/ml.

El(los) vehículo(s) adecuado(s) para su utilización en las composiciones o dispositivos de la invención es preferiblemente un líquido tal como Extracel® Hidrogel.

30 Los sustratos adecuados para su uso en las composiciones o dispositivos de la invención son preferiblemente insolubles en agua, no elásticos, porosos, flexibles y capaces de absorber o adsorber los BMMSC y el agente o agentes antiinflamatorios. En una forma de realización preferente, el sustrato es una esponja como por ejemplo GEL-FOAM®. También se pueden utilizar otros materiales conocidos en la técnica con propiedades comparables. Un ejemplo para este propósito es una esponja de gelatina absorbible,

35 Otro aspecto de la presente invención se dirige a un método para formar una composición o dispositivo tal como se ha descrito anteriormente. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención generalmente incluirán las etapas de añadir una cantidad eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios a BMMSC. En algunas formas de realización, puede incluirse una etapa de añadir el(los) agente(s) antiinflamatorio(s) y/o BMMSC a un vehículo. En algunas otras formas de realización, también se puede incluir una etapa de depositar los agentes antiinflamatorios y/o los BMMSC sobre un sustrato. En una forma de realización preferente, para formar la composición/dispositivo, las BMMSC pueden tratarse con aspirina durante un período de tiempo adecuado, preferiblemente de aproximadamente 3 días, y mezclarse con hidrogel. Dichos hidrogel-BMMSC pueden trasplantarse con aspirina en defectos óseos de la bóveda craneal recién

generados. Otra parte de BMMSC puede sembrarse en GEL-FOAM® y cultivarse durante una cantidad adecuada de tiempo, preferiblemente alrededor de 3 días, con aspirina. El gelfoam-BMMSC resultante que contiene aspirina puede utilizarse para cubrir el complejo BMMSC-hidrogel previamente implantado en el área del defecto óseo de la bóveda craneal.

5 Otro aspecto de la presente descripción se dirige a un método para mejorar la regeneración tisular en un sitio que necesita tejido nuevo. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención generalmente incluirán la etapa de aplicar una composición compleja o dispositivo tal como se ha descrito anteriormente en el sitio. Los sitios que necesitan regeneración tisular pueden ser cualquier sitio accesible directa o indirectamente. Por ejemplo, puede ser un sitio *ex vivo* o un sitio *in vivo*, en una forma de realización preferente, el sitio está en un tejido/órgano cultivado artificialmente. En otra forma de realización preferente, el sitio es un sitio de defecto de calota.

10 Otro aspecto de la presente descripción se dirige a un método para mejorar la formación de tejido óseo mediado por BMMSC en un sujeto. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la presente invención generalmente incluirán la etapa de infundir células T reguladoras F<sub>oxp3</sub><sup>+</sup> (Tregs) sistemáticamente al sujeto durante una duración predeterminada antes de aplicar un inductor de regeneración tisular basado en BMMSC al sujeto. En algunas formas de realización, el inductor de regeneración de tejido basado en BMMSC puede ser solo BMMSC de siembra. En otras formas de realización, el inductor de regeneración de tejido basado en BMMSC puede ser BMMSC en un vehículo. En todavía algunas otras formas de realización, el inductor de regeneración de tejido basado en BMMSC puede ser una composición o dispositivo de regeneración de tejido tal como se ha descrito anteriormente.

Aunque la forma de realización descrita anteriormente describe los pasos y elementos generales de la presente invención, los expertos en la técnica entenderán que son posibles diversas modificaciones. Otros aspectos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas.

## 25 DESCRIPCIÓN DETALLADA

### Abreviaturas:

Tal como se utiliza en el presente documento, la abreviatura "BMMSC" significa "célula madre mesenquimal de médula ósea".

Tal como se utiliza en el presente documento, la abreviatura "Th1" significa "T auxiliar 1".

30 Tal como se utiliza en el presente documento, la abreviatura "Runx-2" significa "factor de transcripción 2 relacionado con Runt".

Tal como se utiliza en el presente documento, la abreviatura "TNF- $\alpha$ " significa "factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ".

Tal como se utiliza en el presente documento, la abreviatura "NF $\kappa$ B" significa "factor nuclear kappa B".

35 Tal como se utiliza en el presente documento, la abreviatura "Tregs" significa "células T reguladoras".

40 Las células madre mesenquimales de médula ósea (BMMSC) son células madre multipotentes no hematopoyéticas capaces de diferenciarse en tipos de células tanto mesenquimales como no mesenquimales, que incluyen osteoblastos, adipocitos y condrocitos. Cuando se implantan *in vivo*, las BMMSC pueden formar huesos e inducir a las células receptoras para formar componentes de la médula hematopoyética.

45 Un descubrimiento de la presente invención es que IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  desempeñan papeles críticos en el control de la formación de hueso basado en BMMSC *in vivo*. Un aumento en IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  se correlaciona negativamente con la formación de hueso mediada por BMMSC en los implantes de BMMSC. El IFN- $\gamma$  potencia sinérgicamente la apoptosis de BMMSC inducida por TNF- $\alpha$  e inhibe la osteogénesis de las BMMSC.

Sin limitarse a la teoría, nuestros datos sugieren que la señalización de Fas es necesaria para el efecto sinérgico de IFN- $\gamma$  sobre la apoptosis de BMMSC inducida por TNF- $\alpha$ . La internalización y la agrupación de

Fas aparentemente contribuyen a la apoptosis sinérgica de BMMSC mediante la activación de caspasa 8/3 en presencia de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . El tratamiento con IFN- $\gamma$  activó los niveles de expresión de Fas en BMMSC para iniciar una ruta no apoptótica, en la que la osteogénesis se inhibió mediante la activación de Smad 6 y la reducción de Runx2. El tratamiento de BMMSC con IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  juntos, sin embargo, fue capaz de convertir la señal de Fas no apoptótica en una vía de muerte mediante la inhibición de la ruta de señalización alternativa de TNFR2/NF $\kappa$ B.

En resumen, la inhibición de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  mejora la regeneración ósea basada en BMMSC. El tratamiento con Treg también mejora la ingeniería de tejidos basada en BMMSC para la reparación de defectos de calota. La infusión de Tregs en un receptor antes del implante de BMMSC da como resultado una reparación completa de los defectos evaluada por microQCT (**Figura 6D y 6E**). Las estructuras óseas regeneradas fueron idénticas a las estructuras originales de la calota evaluadas por microQCT y análisis histológico (**Figura 6A, 6D y 6F**). El tratamiento específico del sitio con aspirina mejoró la reparación basada en BMMSC de los defectos de las calotas mediante la inhibición de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Los métodos de tratamiento farmacológico específicos del sitio inhiben la expresión de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$  y mejoran la reparación del defecto de la calota basada en BMMSC. La adición de aspirina (100  $\mu$ g) a los implantes de BMMSC restauró la formación de hueso que fue reprimida por IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ .

Por consiguiente, un aspecto se dirige a un método mejorado para la regeneración de tejidos mediada por BMMSC. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen preferiblemente administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición en una cantidad suficiente para reducir o inhibir una citoquina proinflamatoria seleccionada del grupo que consiste en IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , y ambos.

Otro aspecto se refiere a un método mejorado de regeneración ósea que comprende reducir los niveles de un agente o agentes antiinflamatorios seleccionados del grupo que consiste en IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , y ambos. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención preferiblemente incluyen depositar (o colocar) BMMSC en un sitio o entorno particular, y administrar la composición localmente en el sitio y/o entorno en el que se han depositado las BMMSC.

Otro aspecto más de la presente invención se dirige a composiciones complejas o a un dispositivo complejo. Las composiciones o dispositivos complejos de acuerdo con este aspecto de la invención generalmente incluyen agentes o composiciones farmacéuticas capaces de reducir el nivel de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , o preferiblemente ambos, más preferiblemente en sitios de deposición de BMMSC. Las composiciones complejas también pueden ser composiciones farmacéuticas, preferiblemente una composición farmacéutica que incluye aspirina. Más preferiblemente, la composición farmacéutica incluye al menos uno de entre Tregs y aspirina.

La administración local de aspirina reduce los niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en el sitio de implantación y mejora significativamente la reparación de defectos de calota basados en BMMSC. Estos datos descubren colectivamente un papel previamente no reconocido de las células T receptoras en la ingeniería de tejidos basada en BMMSC y sugieren un enfoque práctico para mejorar la regeneración ósea mediante el control farmacológico de las citoquinas locales. Debe entenderse que la invención incluye aspirina y otros compuestos relacionados estructural o funcionalmente conocidos por reducir los niveles de niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

En otras palabras, hemos desarrollado un enfoque práctico para mejorar la ingeniería tisular basada en BMMSC a través de la supresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  mediante un tratamiento de aspirina específico del sitio. Mediante la transferencia adoptiva de células T en ratones inmunocomprometidos, determinamos que las células T proinflamatorias contribuyen a la inhibición de la formación ósea basada en BMMSC. Además identificamos que el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  desempeñaron un papel principal en la supresión mediada por células T proinflamatorias en la formación de hueso basado en BMMSC. Aunque no pretenden limitarse a ninguna teoría particular, los descubrimientos de la presente invención pueden explicarse por el hallazgo de que altos niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en los implantes de BMMSC se correlacionaron negativamente con la formación de hueso y el bloqueo de IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  con sus respectivos anticuerpos neutralizantes fue eficaz en el rescate de la formación ósea mediada por BMMSC.

Se desconoce cómo IFN- $\gamma$  eleva el nivel de expresión de Fas en BMMSC, esto apareció en el caso que se produjo en líneas celulares de osteosarcoma (6). Curiosamente, la expresión de Fas inducida por IFN- $\gamma$  se asoció con el bloqueo mediado por IFN- $\gamma$  de la diferenciación osteogénica de las BMMSC mediante la activación de la ruta de Smad-6. Se sabía que Smad-6 inhibe la diferenciación osteogénica a través de la señalización de BMP y runx2 (7, 8). Sin embargo, se requirió una concentración relativamente alta de IFN- $\gamma$  para ser eficaz en la inhibición de la osteogénesis de BMMSC. Por lo tanto, la función inhibitoria de IFN- $\gamma$  en la formación ósea mediada por BMMSC probablemente se debió a su efecto sinérgico con TNF- $\alpha$ , que dio como resultado una apoptosis mejorada de BMMSC mediante la activación de la vía de muerte mediada

por señalización de Fas. A este respecto, el tratamiento con IFN- $\gamma$  solo puede regular positivamente la expresión de Fas, pero no indujo la apoptosis de BMMSC, lo que podría atribuirse a la función antiapoptótica de NF $\kappa$ B, XIAP y FLIP asociados a TNFR2 en esta cascada (9, 10) Sin embargo, con la adición del tratamiento con TNF- $\alpha$ , la señalización Fas no apoptótica inducida por IFN- $\gamma$  se convirtió en una cascada apoptótica debido a la reducción de los factores antiapoptóticos NF $\kappa$ B, XIAP y FLIP tal como se evidencia por la internalización de Fas y la activación de mediadores de muerte caspasa 3 y 8.

Las BMMSC, incluyendo las BMMSC autólogas, no pudieron regenerar las estructuras óseas en ratones C57BL6 cuando se implantaron por vía subcutánea, lo que probablemente esté asociado con la citocina Th1 IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . El mismo implante de BMMSC regenera fácilmente hueso en ratones inmunocomprometidos deficientes en células T. De acuerdo con esta observación, la infusión de Tregs redujo los niveles de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$  y mejoró la formación de hueso mediada por BMMSC. Es importante destacar que se utilizó un modelo de defectos óseos de la calota para validar la eficacia de la ingeniería tisular basada en BMMSC, ya que representa un modelo clínicamente relevante de defectos óseos y evalúa fácilmente la cantidad y calidad del hueso regenerado de nuevo (11,12).

La aspirina es un agente antiinflamatorio no esteroideo ampliamente utilizado (NSAID). Inhibe la osteoclastogénesis y mejora la osteogénesis al afectar múltiples vías biológicas, como la inhibición de la actividad de COX2, COX1 y PGE2 (13-15). En la presente invención, descubrimos inesperadamente que la aspirina suprimía los niveles de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e invertía la deficiencia osteogénica de BMMSC inducida por citoquina. Además, utilizamos la implantación subcutánea y un modelo de reparación de defectos óseos de la calota para mostrar que el tratamiento con aspirina es un enfoque apropiado para mejorar la regeneración tisular basada en BMMSC mediante la supresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

#### Descripción de Ciertos Hallazgos y Formas de Realización

Las células T receptoras modulan la regeneración ósea mediada por BMMSC a través de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Sin estar limitados a ninguna teoría en particular, planteamos la hipótesis de que las células T modulan los BMMSC de donantes implantados. Utilizando un sistema de implantación BMMSC *in vivo* establecido, en el que  $4 \times 10^6$  BMMSC con partículas de hidroxapatita fosfato tricálcico portador (HA/TCP) se implantaron por vía subcutánea en ratones C57BL6 o inmunocomprometidos (**Figura 1A**), mostramos que los CMMSs derivados de la camada se incapaz de generar estructuras óseas en ratones C57BL6 a las 8 semanas después de la implantación (**Figura 1B**). Se observaron los mismos resultados con la implantación de BMMSC autólogo (**Figura 8**). Por el contrario, cuando las BMMSC se implantaron en ratones inmunocomprometidos deficientes en células T, formaron hueso y médulas hematopoyéticas asociadas (**Figura 1C**). Para examinar si las células T receptoras afectaron a la formación ósea mediada por BMMSC, infundimos  $1 \times 10^6$  células T pan en ratones inmunocomprometidos 2 días antes de la implantación subcutánea de BMMSC. La formación de hueso mediada por BMMSC se bloqueó completamente en estos ratones inmunocomprometidos infundidos con células T (**Figura 1D**). Solamente se observó tejido conjuntivo alrededor de las partículas HA/TCP en los implantes de BMMSC, similar al de los implantes de BMMSC en ratones C57BL6 (**Figura 1B**). Estos datos indican que las células T receptoras pueden jugar un papel crucial en la inhibición de la formación ósea mediada por BMMSC.

A continuación, examinamos si subconjuntos específicos de células T bloquean la regeneración ósea basada en BMMSC. Encontramos que la infusión de  $1 \times 10^6$  células T de CD4<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en ratones inmunocomprometidos bloqueaba por vía intravenosa la formación de hueso mediada por BMMSC (**Figuras 1E y 1F**). Sin embargo, la administración de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Tregs) no mostró efecto inhibitor sobre la formación ósea mediada por BMMSC en ratones inmunocomprometidos (**Figuras 1G y 1H**), lo que sugiere que las células no Treg inhiben la formación de hueso mediada por BMMSC.

Para explorar los mecanismos de la formación de hueso basado en BMMSC regulado por células T, evaluamos los niveles de una variedad de citoquinas, incluyendo IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 y IL-17A en los implantes de BMMSC (**Figuras 1I-M**). Curiosamente, los niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en los implantes de BMMSC fueron significativamente elevados a los 7-14 días después de la implantación de BMMSC en ratones C57BL6 y en ratones inmunocomprometidos que recibieron células T pan-T o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (**Figuras 1I, 1K, 1L**). Los de implantes de BMMSC con altos niveles de FN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  se correlacionaron con la falta de formación de hueso nuevo a las 8 semanas después de la implantación (**Figuras 1B, 1D, 1E, 1F, 1H**). Por el contrario, los niveles de las citoquinas mencionadas anteriormente no se alteraron en los implantes de BMMSC derivados de ratones inmunocomprometidos e infundidos con Treg después de 2-21 días de implantación (**Figuras 1J y 1M**). Estos implantes mostraron una cantidad sustancial de formación de hueso nuevo (**Figuras 1C y 1G**). Por lo tanto, el aumento en IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  se correlaciona negativamente con la formación de hueso mediada por BMMSC en los implantes de BMMSC.

Para evaluar más a fondo el papel de las citoquinas en la formación ósea mediada por BMMSC, se co-implantaron 200 ng de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 o IL-17A con BMMSC en ratones inmunocomprometidos por vía subcutánea (**Figuras 1N-T**). El tratamiento con IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  redujo la formación ósea mediada por BMMSC a las 8 semanas después de la implantación (**Figuras 1R y 1S**). Mientras tanto, el tratamiento IL-4 o IL-6 inhibió ligeramente la formación ósea mediada por BMMSC (**Figuras 1O y 1P**), y el tratamiento con IL-17A no tuvo efecto inhibitorio sobre la formación ósea mediada por BMMSC (**Figura 1Q**) en comparación con el grupo de control no tratado (**Figuras 1N y 1T**). Por el contrario, la inyección de anticuerpos neutralizantes de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  rescataron sustancialmente la formación de hueso mediada por BMMSC en ratones C57BL6 (**Figuras 1U-W**). Por lo tanto, tanto el IFN- $\gamma$  como el TNF- $\alpha$  desempeñan papeles críticos en el control *in vivo* de la formación ósea basada en BMMSC.

Los Tregs de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> inhiben la activación de células T y reducen la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Por lo tanto, infundimos  $1 \times 10^6$  Tregs en ratones C57BL6 2 días antes del implante de BMMSC y encontramos una cantidad importante de formación de hueso en implantes de BMMSC infundidos con Treg y falta de formación de hueso en implantes de BMMSC de control (**Figuras 2A-2C**). Para examinar si el papel protector de Tregs en la formación ósea basada en BMMSC era atribuible a la supresión de las citoquinas proinflamatorias en ratones C57BL6, medimos los niveles de citoquinas en los ratones tratados con Tregs. Observamos que la infusión de Tregs redujo los niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , pero no los niveles de IL-4 e IL-10 (**Figura 2D**) en los implantes de BMMSC. Por lo tanto, la inhibición de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  mejora la regeneración ósea basada en BMMSC.

IFN- $\gamma$  inhibió la osteogénesis de BMMSC. Cuando las células T IFN- $\gamma$  se infundieron sistémicamente en ratones inmunocomprometidos, no bloquearon la formación ósea mediada por BMMSC (**Figura 9**), lo que sugiere que se requiere IFN- $\gamma$  para la inhibición osteogénica mediada por células T (**Figuras 1D y 1K**). Análisis adicionales mostraron que el tratamiento con IFN- $\gamma$  *in vitro* (200 ng/ml), pero no con IL-6 o IL-17A, inhibió la diferenciación osteogénica de BMMSC en comparación con grupos de control no tratados tal como se evidencia por tinción con rojo de alizarina (**Figuras 3A**). El tratamiento con IL-4 (200 ng/ml) sirvió como un control positivo que muestra una inhibición parcial de la diferenciación osteogénica de BMMSC (24; **Figuras 3A**). Curiosamente, el tratamiento con 50 ng/ml de IFN- $\gamma$  no tuvo efecto inhibitorio sobre la diferenciación osteogénica de BMMSC (**Figura 3B**). Esta inhibición osteogénica dependiente de la dosis por IFN- $\gamma$  se asoció con una expresión regulada positivamente de Smad 6, un regulador negativo de la diferenciación osteogénica y una expresión regulada a la baja del factor de transcripción runt 2 (Runx2) relacionado con los genes osteogénicos runt, osteocalcina y fosfatasa alcalina (ALP) en 200 ng/ml de grupo IFN- $\gamma$ , que no se observaron en 50 ng/ml de grupo IFN- $\gamma$  (**Figura 3C**).

Además, revelamos que el tratamiento con IFN- $\gamma$  activó la expresión de Fas en BMMSC (**Figura 4F**) y el tratamiento con IFN- $\gamma$  no redujo la diferenciación osteogénica ni alteró los niveles de expresión de Smad 6 y Runx2 en Fas<sup>-/-</sup> BMMSC (**Figura 3D**) y Fas desactiva BMMSC por siRNA (**Figura 3E**).

IFN- $\gamma$  potenció sinérgicamente la TNF- $\alpha$  inducida por apoptosis de BMMSC. Cuando los BMMSC se cultivaron con una variedad de citoquinas, incluyendo IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-17A y TGF- $\beta$ , solamente el tratamiento con TNF- $\alpha$  dio como resultado una muerte celular significativa en una forma dependiente de la dosis tal como se evidencia por la tinción con azul de toluidina (**Figura 4A**). Para determinar el efecto de IFN- $\gamma$  en BMMSC tratadas con TNF- $\alpha$ , añadimos 50 ng/ml de IFN- $\gamma$  a BMMSC que se trataron con diferentes dosis de TNF- $\alpha$  (1-200 ng/ml; **Figura 4B**), el tratamiento con IFN- $\gamma$  mejoró significativamente la apoptosis de BMMSC cuando la concentración de TNF- $\alpha$  alcanzó 50-200 ng/ml según se evaluó mediante tinción con azul de toluidina (**Figura 4B**) y análisis citométrico de flujo de apoptosis de anexina V (**Figura 10**). Para confirmar adicionalmente los efectos sinérgicos de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en la inducción de la apoptosis de BMMSC, añadimos 50 ng/ml de TNF- $\alpha$  a BMMSC que se trataron con 1-200 ng/ml de IFN- $\gamma$  (**Figura 4C**). La cantidad de apoptosis de BMMSC se correlacionó con la concentración de IFN- $\gamma$  de 1-50 ng/ml. Cuando la concentración de IFN- $\gamma$  llegó a 100-200 ng/ml, se observó una apoptosis de BMMSC completa (**Figura 4C**). Además, utilizamos inmunocitotinción con anexina V para confirmar que 50 ng/ml de IFN- $\gamma$  potenciaban 20 ng/ml de apoptosis de BMMSC mediada por TNF- $\alpha$  (**Figura 4D**). A continuación, verificamos el efecto sinérgico de IFN- $\gamma$  sobre la apoptosis de BMMSC inducida por TNF- $\alpha$  utilizando un modelo de implantación de BMMSC subcutánea GFP<sup>+</sup> *in vivo* (16, 17). Treinta días después de la implantación, las BMMSC GFP<sup>+</sup> pretratadas con 50 ng/ml de TNF- $\alpha$  mostraron una reducción significativa en el número de células supervivientes en relación con las del grupo de control no tratado (**Figura 4E**). El tratamiento de combinación con 200 ng/ml de IFN- $\gamma$  y 50 ng/ml de TNF- $\alpha$  no condujo a la supervivencia de GMPAC<sup>+</sup> BMMSC en los implantes (**Figura 4E**). IFN- $\gamma$  es capaz de potenciar sinérgicamente la apoptosis de BMMSC inducida por TNF- $\alpha$ .

A continuación, examinamos el mecanismo molecular por el cual el IFN- $\gamma$  potencia la apoptosis de BMMSC inducida por TNF- $\alpha$ . Encontramos que el tratamiento con IFN- $\gamma$  regulaba la expresión de Fas en BMMSC sin activar la caspasa 3 y la caspasa 8 (**Figura 4F**), lo que sugiere que la expresión de Fas inducida por IFN- $\gamma$  no era capaz de iniciar el proceso apoptótico. Con la adición de 20 ng/ml de TNF- $\alpha$ , una concentración

incapaz de inducir apoptosis marcada de BMMSC, se eliminaron 50 ng/ml de BMMSC tratadas con IFN- $\gamma$ , caspasa 3 y caspasa 8 (**Figura 4F**) junto con apoptosis significativa de BMMSC (**Figura 4H**). Sin embargo, la combinación de 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  y 50 ng/ml de IFN- $\gamma$  no logró activar la caspasa 3 y la caspasa 8 en BMMSC de Fas<sup>-/-</sup> (**Figura 4F**), para confirmar aún más que la señalización de Fas contribuye a la  
 5 aceleración proceso apoptótico en BMMSC tratadas con IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ , utilizamos siRNA para eliminar la expresión de Fas en BMMSC y mostramos que la caspasa 8 activada y la caspasa 3 estaban parcialmente bloqueadas en BMMSC tratadas con IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  (**Figura 4G**) con una reducción significativa en el número de BMMSC apoptóticas (**Figura 4H**). Estos datos sugieren que la señalización de Fas es necesaria para el efecto sinérgico de IFN- $\gamma$  sobre la apoptosis de BMMSC inducida por TNF- $\alpha$ .

10 La siguiente pregunta que formulamos fue cómo se activaba la señalización apoptótica de Fas en BMMSC tratadas con IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ . Revelamos que la reducción del nivel de Fas-L utilizando siRNA en BMMSC tratadas con IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  no fue capaz de reducir el número de células apoptóticas (no se muestran los datos), excluyendo Fas-L como un factor potencial que contribuye a la apoptosis de BMMSC. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que la internalización de Fas podría activar la señalización apoptótica  
 15 Fas/caspasa 8/3 en BMMSC tratadas con IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ . Usando inmunocitotinción fluorescente, demostramos que el tratamiento combinado de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  indujo la internalización y la agrupación de Fas. En el grupo de control no tratado, Fas se distribuyó uniformemente en la superficie de BMMSC (Figura 5A). Las BMMSC se trataron con IFN- $\gamma$  durante 12 horas y a continuación se añadió TNF- $\alpha$ , Fas mostró agrupamiento e internalización marcados en el citoplasma a 0.5-1h (**Figura 5A**). Se observó un agrupamiento de Fas más significativo con contracción de la célula y la membrana celular degradada a las  
 20 2-4 horas de tratamiento con TNF- $\alpha$  (**Figura 5A**). El bloqueo de la internalización de Fas por el inhibidor de la endocitosis Latrunadin A (LntA) podría rescatar parcialmente la apoptosis de BMMSC inducida por IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  con la inhibición de la caspasa escindida 3 y 8 (**Figura 5B**). Curiosamente, con el bloqueo de las actividades de caspasa 8 o caspasa 3 utilizando sus inhibidores específicos, las BMMSC tratadas con  
 25 BMMSC- IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  mostraron una reducción significativa en el número de células apoptóticas (**Figura 5C**). Por otra parte, demostramos que la inhibición de pan caspasa, caspasa 3 y caspasa 8 fue capaz de bloquear parcialmente la internalización de Fas tal como se muestra mediante inmunotinción (**Figura 5D**). Estos datos sugieren que la internalización y la agrupación de Fas contribuyen a la apoptosis sinérgica de las BMMSC a través de la activación de la caspasa 8/3 en presencia de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

30 A continuación investigamos cómo IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  conjuntamente dieron como resultado la internalización y la agrupación de Fas en BMMSC. Primero, demostramos que el tratamiento con IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  no podía inducir una expresión regulada significativamente al alza de las proteínas TNFR1, TRAIL y Fas L (**Figura 11**). A continuación descubrimos que el tratamiento con IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  reducía los niveles de TNFR2 y su  
 35 señalización de NF $\kappa$ B, XIAP y FLIP fosforilados en comparación con el grupo tratado con IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  (**Figura 5E**), sugiriendo que la combinación de IFN- $\gamma$  y el tratamiento con TNF- $\alpha$  inhiben selectivamente la ruta de TNFR2 que proporciona un efecto anti-apoptótico. Para confirmar el papel de la vía TNFR2 en la apoptosis de BMMSC inducida por IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ , se demostró que la reducción de TNFR2, IKK, XIAP y FLIP por ARNip activaba además la caspasa 8 y 3 (**Figura 5F**). La eficiencia de la desactivación de TNFR2, IKK, XIAP, y FLIP por sus siRNA específicos se confirmó mediante análisis de transferencia de Western (**Figura 5G**).

40 En su conjunto, estos resultados revelaron que el tratamiento con IFN- $\gamma$  activaba los niveles de expresión de Fas en BMMSC para iniciar una ruta no apoptótica, en la que la osteogénesis se inhibía mediante la activación de Smad 6 y la reducción de Runx-2 (**Figura 12A**). El tratamiento de BMMSC con IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  conjuntamente, sin embargo, fue capaz de convertir la señalización de Fas no apoptótica en una vía de muerte mediante la inhibición de la ruta de señalización alternativa de TNFR2/NF $\kappa$ B (**Figura 12B**).

45 El tratamiento Treg mejora la ingeniería de tejidos basada en BMMSC para la reparación de defectos de calota. Dado que la infusión de Tregs inhibió los niveles de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en el sitio de implantación de los ratones C57BL6 (**Figura 2D**), planteamos la hipótesis de que el tratamiento con Treg podría mejorar la ingeniería tisular basada en células. Para probar esta hipótesis, generamos defectos óseos calotares de  
 50 tamaño crítico (7x8 mm) en ratones C57BL6 (**Figuras 6A y 6B**). Se observaron cantidades muy pequeñas de formación de hueso en el grupo no tratado a las 12 semanas después de la cirugía (**Figura 6B**). La implantación de BMMSC con espuma de gel como vehículo mostró una regeneración ósea moderada, pero no logró reparar completamente los defectos (**Figura 6C**). Sin embargo, la infusión de Tregs en los receptores 2 días antes de la implantación de BMMSC/espuma de gel dio como resultado la reparación  
 55 completa de los defectos evaluados por microQCT (**Figura 6D y 6E**). Las estructuras óseas regeneradas fueron idénticas a las estructuras originales de la calota evaluadas por microQCT y análisis histológico (**Figura 6A, 6D y 6F**). Estos datos implican que el tratamiento con Treg mejora la ingeniería tisular mediada por BMMSC.

60 El tratamiento específico del sitio con aspirina mejoró la reparación basada en BMMSC de los defectos de las calotas mediante la inhibición de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Dado que la aspirina puede inhibir la función de TNF-

- 5  $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (14), se examinó el efecto del tratamiento con aspirina en los niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en implantes de BMMSC entre 2 y 14 días después de la implantación. Mostramos que el tratamiento con aspirina reduce los niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  sin afectar el nivel de IL-10 (**Figura 7A**). El análisis inmunohistoquímico confirmó el efecto supresor del tratamiento con aspirina sobre el número de células positivas para IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en implantes de BMMSC (**Figuras 7B-I**). Para determinar si la reducción mediada por aspirina de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  en los implantes de BMMSC influyó en la apoptosis de BMMSC, utilizamos un modelo de implantación GFP<sup>+</sup> BMMSC para mostrar un aumento significativo en la supervivencia de BMMSC en el grupo tratado con aspirina durante 4 -30 días después de la implantación (**Figura 13A**).
- 10 A continuación, se estudió el efecto de la aspirina en la inhibición de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  exógenos en la formación de hueso mediada por BMMSC *in vivo*. Tratamos BMMSC con 50  $\mu$ g/ml de aspirina durante 2 días seguido de implantación subcutánea en ratones inmunocomprometidos utilizando HA/TCP como vehículo. El pretratamiento con aspirina aumentó la formación de hueso mediado por BMMSC en comparación con el grupo de control no tratado (**Figura 13B, 13C**). Seguidamente implantamos BMMSC con IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  (200 ng) y observamos una formación ósea significativamente reducida (**Figuras 1R-T y Figuras 13D y 13E**). Sin embargo, la adición de aspirina (100  $\mu$ g) a los implantes de BMMSC restauró la formación de hueso que fue suprimida por IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  (**Figuras 13F-13H**). Además, investigamos si el tratamiento con aspirina podría aplicarse para mejorar la reparación del defecto de la calota basada en BMMSC. De hecho, la implantación de BMMSC (4x10<sup>6</sup>) con espuma de gel que contiene aspirina (100  $\mu$ g) dio como resultado una mejora notable en la reparación de los defectos de las calotas en comparación con el grupo de control BMMSC/espuma de gel (**Figuras 7J y 7K**). Las estructuras de los tejidos regenerados fueron análogas a los tejidos de las calotas normales (**Figuras 7L-7N**).

## EXPERIMENTAL

### Material y métodos

- 25 **Animales.** Se adquirieron ratones hembra C3H/HeJ, C57BL/6J, B6.129S7-lfng<sup>tm/Ts/</sup> J, C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) 10sb/J, B6.MRL-Fas<sup>pr/</sup> J en Jackson Lab (Bar Harbor, ME). Se compraron ratones inmunocomprometidos hembra (Beige desnudo/desnudo XIDIII) de Harlan (Indianapolis, IN). Todos los experimentos con animales se realizaron bajo los protocolos institucionalmente aprobados para el uso de investigación con animales (protocolos de la Universidad del Sur de California # 10874 y 10941).
- 30 **Anticuerpos e inhibidores.** Los anticuerpos anti-TNF- $\alpha$ , anti-Fas, anti-Smad 6 y anti-Smad 7 no conjugados se compraron en Santa Cruz Biosciences (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos anti-GFP, anti-OCN, anti-TRAIL, anti-TNFR1, anti-FasL, anti-FLIP y anti-XIAP no conjugados se adquirieron a Abcam Inc. (San Francisco, CA). El Anti-Runx-2 no conjugado se compró a Calbiochem Inc. (La Jolla, CA). Los anticuerpos anti-TNFR2, anti-caspasa 8, anti-caspasa 3, anti-caspasa 8 escindida y anti-caspasa 3 escindida se compraron de Cell Signaling Inc. (San Francisco, CA). El anticuerpo anti-IFN- $\gamma$ -FITC se adquirió en eBioscience (San Diego, CA). El anticuerpo anti- $\beta$ -actina se adquirió en Sigma (St Louis, MO). El anticuerpo anti-IFN- $\gamma$  purificado LEAF<sup>TM</sup> y el anticuerpo TNF anti-ratón se compraron a Biolegend (Danvers, MA). El recombinante murino IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, IL-4 se compraron en PeproTech (Rocky Hill, NJ). Alexa Fluor® 488 phalloidin se adquirió en Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). El inhibidor de la caspasa 1 (Z-VAD (OMe) -FMK) se adquirió en EMD Chemicals, Inc (Gibbstown, NJ). Los inhibidores de la caspasa 8 (2-IETD-FMK) y la caspasa 3 (Z-DEVD-FMK) se adquirieron en R & D System (Minneapolis, MN). El inhibidor para la internalización (Latrunculina A) se adquirió en Sigma-Aldrich Corporate (St. Louis, MO). HyStem<sup>TM</sup> y el hidrogel Extracel-HP se compraron en Glycosan (Salt Lake City, Utah).
- 45 **Kits.** El kit de aislamiento de células T Pan II y el kit de aislamiento de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se adquirieron en Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania). Los kits de ratón IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, IL-4 e IL-10 ELISA Ready-SET-GO se compraron en eBioscience (San Diego, CA). Se compraron kits de siRNA para Fas, Smad 6, TNFR2, IKK, FLIP y XIAP en Santa Cruz Biosciences (Santa Cruz, CA).

- 50 **Aislamiento de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón (BMMSC).** Las células de médula ósea se extrajeron de la cavidad ósea de fémures y tibias con suero bovino fetal inactivado por calor al 2% (FBS, Equitech-Bio, Kerrville, TX) en PBS. La suspensión monocelular de todas las células nucleares (ANCs) se obtuvo pasando a través de un filtro celular de 70  $\mu$ m (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ). Se separaron los CDN positivos para CD146 y se sembraron a 1x10<sup>4</sup> en placas de cultivo de 100 mm (Corning Corporation, Corning, NY) y se incubaron inicialmente durante 48 horas a 37°C en condiciones de 5% de CO<sub>2</sub>. Para eliminar las células no adherentes, los cultivos se lavaron con PBS dos veces. Las células unidas se cultivaron durante 16 días. Las BMMSC se cultivaron con medio esencial mínimo alfa (a-MEM, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) complementado con 20% de SFB, 2 mM de L-glutamina (Invitrogen
- 55

Corporation), 55  $\mu\text{M}$  de 2-mercaptoetanol (Invitrogen Corporation), 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomycin (Invitrogen Corporation).

5 **Microscopía inmunofluorescente e inmunoquímica.** Los trasplantes se recogieron, se fijaron en paraformaldehído al 4% y luego a continuación se descalcificaron con ácido etilendiaminotetraacético al 5% (EDTA, pH 7.4), seguido de parafina o compuesto de temperatura de corte óptima (OCT, Sakura Finetech Inc., Torrance, CA). Las secciones de parafina o congeladas se bloquearon con suero normal apareado con anticuerpos secundarios, se incubaron con los anticuerpos de ratón específicos o de isotipo coincidente (1:200) durante la noche a 4°C. Para la tinción inmunofluorescente, las muestras se trataron con anticuerpos secundarios conjugados con Rhodamin/FITC (1:200, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Southern Biotechnology, Birmingham, AL), y se montaron por medio de un medio de montaje vectashield que contenía 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Para la tinción inmunoquímica, las muestras se tiñeron utilizando el kit Zymed SuperPicture™ (Invitrogen Corporation) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 **Formación ósea mediada por BMMSC.** Aproximadamente  $4.0 \times 10^6$  BMMSC se mezclaron con partículas de cerámica de hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TCP) (40 mg, Zimmer Inc., Warsaw, IN) como vehículo y se implantaron por vía subcutánea en la superficie dorsal de ratones inmunocomprometidos o ratones C57BL/6J de 8-10 semanas de edad. A las ocho semanas de la implantación, los implantes se recogieron, se fijaron en paraformaldehído al 4% y a continuación se descalcificaron con EDTA al 5% (pH 7.4), seguido de la inclusión de parafina. Las secciones de parafina de 6  $\mu\text{m}$  se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E) 20 y se analizaron mediante NiH Image J. Se seleccionaron cinco campos y se calculó el área de tejido mineralizado recién formado en cada campo y se mostró como un porcentaje del área total del tejido.

25 **Citoquinas en la formación ósea mediada por BMMSC.** Aproximadamente  $4.0 \times 10^6$  BMMSC autólogas o derivadas de camada se mezclaron con polvos cerámicos HA/TCP (40 mg, Zimmer Inc.) e hidrogel (Glycosan Biosystems, Salt Lake City, UT) con 200 ng de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 o IL-17A se cubrieron en la superficie de los implantes como un sistema de liberación lenta. A las ocho semanas de la implantación, los implantes se cosecharon y se analizaron las áreas de tejido mineralizado recién formado.

30 **Ensayo de diferenciación osteogénica.** Las BMMSC se cultivaron en medios de cultivo de cultivo osteogénico que contenían 2 mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma-Aldrich), 100  $\mu\text{M}$  de L-ácido ascórbico 2-fosfato y 10 nM de dexametasona (Sigma-Aldrich). Se añadieron diferentes dosis de IFN- $\gamma$  (50, 200 ng/ml) al medio de cultivo de cultivo osteogénico cada 3 días. Después de la inducción osteogénica, los cultivos se tiñeron con rojo de alizarina. Las expresiones de Runx2, ALP y OCN se analizaron mediante análisis de transferencia Western.

**Infusión celular in vivo.** Aproximadamente  $1.0 \times 10^6$  células se suspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de PBS y se inyectaron en los ratones a través de la vena de la cola.

35 **Análisis de transferencia Western.** La proteína total se extrajo utilizando reactivo de extracción de proteína de mamífero M-PER (Thermo, Rockford, IL). La proteína nuclear se obtuvo utilizando reactivo de extracción nuclear y citoplásmico NE-PER (Thermo). La proteína se aplicó y se separó en 4-12% de gel NuPAGE (Invitrogen) y se transfirió a membranas Immobilon™-P (Millipore). Las membranas se bloquearon con leche en polvo sin grasa al 5% y Tween-20 al 0.1% durante 1 hora, seguido de incubación con los anticuerpos primarios (dilución 1:200-1000) a 4°C durante la noche. Se usó IgG conjugada con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biosciences; 1:10,000) para tratar las membranas durante 1 hora, y se mejoró con un Sustrato Quimioluminiscente West Pico SuperSignal® (Thermo). Las bandas se detectaron en películas BIOMAX MR (Kodak, Rochester, NY). Cada membrana también se eliminó usando un tampón de separación (Thermo) y se resonó con anticuerpo anti-actina para cuantificar la cantidad de proteína cargada. 45

50 **Apoptosis celular y ensayo de supervivencia celular.** Se sembraron  $0.5 \times 10^6$  BMMSC en placas de cultivo de 6 pocillos y se cultivaron conjuntamente con diferentes dosis de IL-4, IL-6, IL-17A, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  a e IFN- $\gamma$  recombinados (0, 10, 20, 50, 100, 200 ng/ml) durante 3 días. Para medir la viabilidad celular, se analizaron las células totales utilizando un kit de conteo de células 8 (Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Y las placas de cultivo con células se tiñeron con azul de toluidina O al 2% y paraformaldehído al 2% (Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis, MO).

Para el análisis de apoptosis celular, las BMMSC se tiñeron con el kit de detección de apoptosis I de Annexin V-PE (BD Bioscience) siguiendo el protocolo del fabricante, y se analizaron mediante FACS<sup>Calibur</sup> (BD Bioscience).

- 5 **Sinergismo de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  para apoptosis.** Para la tinción de apoptosis celular, se sembraron  $1 \times 10^4$  BMMSC en placas de dos cámaras, IFN- $\gamma$  (50 ng / ml) y se utilizaron TNF- $\alpha$  (20 ng / ml) para tratar las BMMSC durante 24 horas por separado o combinado, se utilizó el kit de detección de apoptosis I de Anexina V-PE (BD Bioscience) para teñir los BMMSC siguiendo el protocolo de fabricación, y se analizaron en microscopía y FACS<sup>Calibur</sup> (BD Bioscience). La viabilidad celular se analizó utilizando el kit de recuento de células, y las placas de cultivo se tiñeron con azul de toluidina O al 2% y paraformaldehído al 2%.
- 10 **SiRNA e inhibidores.** Se sembraron  $0.5 \times 10^6$  BMMSC en una placa de cultivo de 6 pocillos. Los siRNAs para Fas, TNFR2, IKK, FLIP y XIAP se utilizaron para tratar las BMMSC de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se añadieron IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  durante 24 horas. Se utilizaron inhibidores para internalización (Latrunculina A, 0.2  $\mu$ M), pan caspasa (Z-VAD (OMe)-FMK, 50  $\mu$ M), caspasa 8 (2-IETD-FMK, 20  $\mu$ M) y caspasa 3 (Z-DEVD-FMK, 20  $\mu$ M) para tratar los BMMSC a las 4 h antes de añadir IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . La apoptosis celular fueron análisis por tinción de inmunofluorescencia y FACS<sup>Calibur</sup> (Anexina V-PE, kit de detección de apoptosis I) y Western blot para caspasa 8, caspasa 8 escindida, caspasa 3 y caspasa 3 escindida.
- 15 **Ensayo de supervivencia celular.**  $4 \times 10^6$  BMMSC aisladas de ratones C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) 10sb/J se combinaron con diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$  (0, 20, 50, 100, 200 ng/ml) y TNF- $\alpha$  (0, 20, 50, 100, 200 ng/ml) y se trasplantaron por vía subcutánea en ratones inmunocomprometidos, se utilizó hidrogel como un portador de liberación lenta. Treinta días después de la traducción, los implantes se recogieron y se digirieron en una solución de 3 mg/ml de colagenasa tipo I (Worthington Biochem) y 4 mg/ml de dispasa (Roche) durante 1 hora a 37°C. Se obtuvieron suspensiones monocelulares pasando las células a través de un filtro de 70  $\mu$ m (BD Bioscience). Se sembraron  $1.0$ - $1.5 \times 10^6$  BMMSC en placas de cultivo de 100 mm (Corning) y se incubaron durante 48 horas a 37°C en condiciones de 5% de CO<sub>2</sub>. Para eliminar las células no adherentes, los cultivos se lavaron con PBS dos veces. Las células unidas se cultivaron durante 10 días con medio esencial mínimo alfa, MEM, (Invitrogen) suplementado con 20% de SFB, 2 mM de L-glutamina (Invitrogen), 55  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol (Invitrogen), 100 U/ml de penicilina, y 100  $\mu$ g/ml de estreptomina (Invitrogen). Los números de células positivas para GFP se contaron bajo microscopía de fluorescencia.
- 20
- 25
- 30 **Aislamiento de linfocitos T.** Se aislaron linfocitos T T Pan, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> a partir de células de bazo totales de ratón utilizando un clasificador magnético, kit II de aislamiento de células T Pan de ratón y kit de aislamiento regulador de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de T Pan, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> fue >95%.
- 35 **Inducción de Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>.** Para inducir Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> in vitro, los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $1 \times 10^6$ /pocillo) se recogieron mediante un kit de aislamiento de células reguladoras T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y se cultivaron linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en  $1 \times 10^6$ /pocillo en 12 pocillos multiples en presencia de anticuerpo anti CD3 $\epsilon$  unido a la placa (5  $\mu$ g/ml) anticuerpo anti CD28 soluble (2  $\mu$ g/ml), TGF- $\beta$ 1 de ratón recombinante (2  $\mu$ g/ml) (R & D Systems) e IL2 recombinante de ratón (2  $\mu$ g/ml) (R & D Systems) durante tres días. Todos los pocillos se llenaron con un medio completo que contenía medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Lonza, Walkersville, MD) con 10% de FBS inactivado por calor, 50  $\mu$ M 2-mercaptoetanol, 10 mM HEPES (Sigma), 1 mM de piruvato sódico (Sigma), 1% de aminoácidos no esenciales (Cambrex, Charles City, IA), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina. A continuación, se aislaron los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> utilizando un clasificador magnético y un kit de aislamiento de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de ratón (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> fue >95%, y se utilizaron para infusión sistémica.
- 40
- 45 **Internalización de Fas.** Las BMMSC P1 se sembraron en portaobjetos de cámara de 2 pocillos. Se añadió IFN- $\gamma$  (50 ng/ml) para tratar previamente BMMSC durante 24 horas, y a continuación se añadió TNF- $\alpha$  (20 ng/ml). A las 0.5, 1, 2, 4 horas después de que se añadió TNF- $\alpha$ , las células se lavaron con PBS dos veces y se fijaron con PFA al 4% durante 15 minutos. Después de tratarse con Triton-X 15 min, las células se bloquearon con suero normal apareado con anticuerpos secundarios, se incubaron con 1  $\mu$ g/ml de anticuerpo anti-Fas (Santa Cruz) a temperatura ambiente durante 2 horas, se trataron con anticuerpos secundarios conjugados con Rhodamina (1: 200, Jackson ImmunoResearch). A continuación, las células se incubaron con  $\beta$ -actina (1: 40; Invitrogen) a temperatura ambiente durante 20 min, y se montaron con medio de montaje Vectashield DAPI (Vector Laboratories).
- 50
- 55 **Modelo de defecto de hueso de calota en ratones C57BL/6J.** Se cortó la piel de los ratones C57BL/6J y se elevó el periostio. Se expuso la superficie del hueso de calota de ratón y se establecieron defectos óseos de gran tamaño de 7 mm x 8 mm. El defecto óseo era más grande que el tamaño crítico habitual con un diámetro de 4 mm.

**Implantación de BMMSC en defectos óseos de la calota en ratones C57BL/6J.** Se sembraron  $4 \times 10^6$  BMMSC en un tamaño de espuma de gel de 7 mm x 8 mm (Pharmaca, Boulder, CO) y se cultivaron durante 3 días in vitro. La espuma de gel con BMMSC se colocó en los defectos óseos de la calota y se cubrieron completamente con pieles. Para el grupo tratado con aspirina, las BMMSC sembradas en espuma de gel se pretrataron con 50 µg/ml de aspirina durante 3 días, y a continuación se colocaron en el defecto óseo de la calota. Otra espuma de gel con 100 µg de aspirina como sistema de liberación se cubrió en la superficie de la espuma de gel con BMMSC (Fig. 14).

**Estadística.** Se utilizó SPSS 13.0 para hacer análisis estadísticos. La importancia se evaluó mediante la prueba t de Student independiente de dos colas o el análisis de varianza (ANOVA). Los valores p menores de 0.05 se consideraron significativos.

**Aislamiento de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón (BMMSC).** Las células de médula ósea se extrajeron de la cavidad ósea de fémures y tibias con suero bovino fetal inactivado por calor al 2% (FBS, Equitech-Bio, Kerrville, TX) en PBS. La suspensión monocelular de todas las células nucleares (ANCs) se obtuvo pasando a través de un filtro celular de 70 µm (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ). Se separaron los CDN positivos para CD146 y se sembraron en  $1 \times 10^4$  en placas de cultivo de 100 mm (Corning Corporation, Corning, NY) y se incubaron inicialmente durante 48 horas a 37 °C en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5%. Para eliminar las células no adherentes, los cultivos se lavaron con PBS dos veces al segundo día. Las células unidas se cultivaron durante 16 días. Las BMMSC se cultivaron con medio esencial mínimo alfa (α-MEM, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) suplementado con 20% de SFB, 2 mM de Lglutamina (Invitrogen Corporation), 55 µM de 2-mercaptoetanol (Invitrogen Corporation), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen Corporation).

**Formación ósea mediada por BMMSC.** Aproximadamente  $4.0 \times 10^6$  de BMMSC derivadas de camada o autólogas se mezclaron con partículas cerámicas de hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TCP) (40 mg, Zimmer Inc., Warsaw, IN) como vehículo y se implantaron subcutáneamente en la superficie dorsal de ratones inmunocomprometidos de 8-10 semanas de edad o ratones C57BL6. Cuando se utilizó aspirina, las BMMSC se trataron con 50 µg/ml de aspirina durante 2 días y se mezclaron con partículas de HA/TCP para implantarlas por vía subcutánea en ratones inmunocomprometidos. Cuando se utilizó IFN-γ y TNF-α en los implantes subcutáneos, 200 ng de IFN-γ, TNF-α y/o 100 µg de aspirina se mezclaron con 250 µl de hidrogel como un sistema de liberación lenta y se co-implantaron subcutáneamente en la superficie dorsal de ratones inmunocomprometidos de 8-10 semanas de edad.

A las ocho semanas de la implantación, los implantes se recogieron, se fijaron en paraformaldehído al 4% y a continuación se descalcificaron con EDTA al 5% (pH 7.4), seguido de la inclusión de parafina. Las secciones de parafina de 6 µm se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E) y se analizaron mediante una Imagen NIH J. Se seleccionaron cinco campos y se calculó el área de tejido mineralizado recién formado en cada campo y se mostró como un porcentaje del área de tejido total.

**Aislamiento e infusión de células T Pan.** Los linfocitos T Pan se aislaron a partir de células de bazo totales de ratón usando un clasificador magnético, kit II de aislamiento de células T Pan de ratón. Aproximadamente  $1.0 \times 10^6$  de las células se suspendieron en 200 µl de PBS y se inyectaron en los ratones a través de la vena de la cola.

**Análisis de Transferencia Western.** La proteína total se extrajo utilizando reactivo de extracción de proteína de mamífero M-PER (Thermo, Rockford, IL). La proteína nuclear se obtuvo usando reactivo de extracción nuclear y citoplasmático NE-PER (Thermo). La proteína se aplicó y se separó en 4-12% de gel NuPAGE (Invitrogen) y se transfirió a las membranas Immobilon™-P (Millipore). Las membranas se bloquearon con leche en polvo sin grasa al 5% y Tween-20 al 0.1% durante 1 hora, seguido de incubación con los anticuerpos primarios (dilución 1: 200-1000) a 4°C durante la noche. Se utilizó IgG conjugada con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biosciences; 1:10.000) para tratar las membranas durante 1 hora, y se mejoró con un Sustrato Quimioluminiscente West Pico SuperSignal® (Thermo). Las bandas se detectaron en películas BIOMAX MR (Kodak, Rochester, NY). Cada membrana también se eliminó utilizando un tampón de separación (Thermo) y se reprobó con anticuerpo anti-p-actina para cuantificar la cantidad de proteína cargada.

**Sinergismo de IFN-γ y TNF-α para apoptosis.** Se sembraron  $0.5 \times 10^6$  BMMSC en una placa de cultivo de 6 pocillos y cocultivada con diferentes dosis de TNF-α (0, 5, 50, 100 ng/ml) con o sin IFN-γ (50 ng/ml) durante 1 día. A continuación, las BMMSC se tiñeron con el kit de detección de apoptosis I de Annexin V-PE (BD Bioscience) siguiendo el protocolo del fabricante, y se analizaron mediante FACS<sup>Calibur</sup> (BD Bioscience).

**Microscopía inmunoquímica.** Los trasplantes se recogieron, se fijaron en paraformaldehído al 4% y luego se descalcificaron con ácido etilendiaminotetraacético al 5% (EDTA, pH 7,4), seguido de inclusión en parafina o compuesto de temperatura de corte óptima (OCT, Sakura Finetech Inc., Torrance, CA). Las secciones de parafina o congeladas se bloquearon con suero normal apareado con anticuerpos secundarios, se incubaron con los anticuerpos de ratón específicos o de isotipo coincidente (1:200) durante la noche a 4°C. Las muestras se tificaron con el kit Zymed SuperPicture™ (Invitrogen Corporation) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**REFERENCIAS**

1. Kwan, M.D., Slater, B.J., Wan, D.C. & Longaker, M.T. Cell-based therapies for skeletal regenerative medicine. *Hum Mol Genet* 17, R93-98 (2008).

2. Panetta, N.J., Gupta, D.M., Quarto, N. & Longaker, M.T. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Med* 51, 25-41 (2009).

3. Fredericks, D.C. et al. Cellular interactions and bone healing responses to a novel porous tricalcium phosphate bone graft material. *Orthopedics* 27, s167-173 (2004).

4. Seong, J.M. et al. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater* 5, 062001 (2010)

5. Undale, A.H., Westendorf, J.J., Yaszemski, M.J. & Khosla, S. Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Mayo Clin Proc* 84, 893-902 (2009).

6. Li, Z. et al. IFN-γ enhances HOS and U2OS cell lines susceptibility to T cell-mediated killing through the Fas/Fas ligand pathway. *Int Immunopharmacol* 11, 496-503 (2011)

7. Shen, R. et al. Smad6 interacts with Runx2 and mediates Smad ubiquitin regulatory factor 1-induced Runx2 degradation. *J Biol Chem* 281, 3569-3576 (2006).

8. Itoh, F. et al. Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *EMBO J* 20, 4132-4142 (2001).

9. Qin, J.Z. et al. Role of NF-κB in the apoptotic-resistant phenotype of keratinocytes. *J Biol Chem* 274, 37957-37964 (1999).

10. Moon, D.O., Kim, M.O., Kang, S.H., Choi, Y.H. & Kim, G.Y. Sulforaphane suppresses TNF-α-mediated activation of NF-κB and induces apoptosis through activation of reactive oxygen species-dependent caspase-3. *Cancer Lett* 274, 132-142 (2009).

11. Koob, S. et al. Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A* 17, 311-321 (2011).

12. Rhee, S.C. et al. *In Vivo* evaluation of mixtures of uncultured freshly isolated adipose-derived stem cells and demineralized bone matrix for bone regeneration in a rat critically sized calvarial defect model. *Stem Cells Dev* 20, 233-242 (2011).

13. Buckland, M. et al. Aspirin-treated human DCs up-regulate ILT-3 and induce hyporesponsiveness and regulatory activity in responder T cells. *Am J Transplant* 6, 2046-2059 (2006).

14. Yamaza, T. et al. Pharmacologic stem cell based intervention as a new approach to osteoporosis treatment in rodents. *PLoS ONE* 3, e2615 (2008).

15. Kwon, M.S. et al. Effect of aspirin and acetaminophen on proinflammatory cytokine-induced pain behavior in mice. *Pharmacology* 74, 152-156 (2005).

16. Krebsbach, P.H. et al. Bone formation *in vivo*: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 63, 1059-1069 (1997).

17. Batouli, S. et al. Comparison of stem cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Den Res* 82, 975-980 (2003).

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición compleja para ingeniería de tejidos o un dispositivo de regeneración de tejidos, que comprende:  
5                   al menos una célula madre mesenquimal de médula ósea;  
                      una cantidad efectiva de aspirina;  
                      un sustrato; y  
                      al menos una célula T reguladora CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>.
- 10           2. La composición o el dispositivo de la reivindicación 1, en que dicha cantidad efectiva es de aproximadamente 50 µg/ml o más.
- 15           3. La composición o el dispositivo de la reivindicación 1, en que dicho sustrato es un material insoluble en agua, no elástico, poroso y plegable, capaz de absorber o adsorber la BMMSC y la aspirina.
- 20           4. La composición del complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su utilización en un método para promover la regeneración de tejido localizado, que comprende: aplicar dicha composición de complejo de ingeniería de tejidos en un sitio que necesita regeneración de tejido.
- 25           5. La composición del complejo para su utilización de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además la fase de pre-tratar una pluralidad de células madre mesenquimales de médula espinal con aspirina antes de aplicar el complejo en el sitio.
- 30           6. Un método para formar la composición del complejo o el dispositivo de regeneración de tejido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende: añadir una cantidad predeterminada de células madre mesenquimales de médula espinal, células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> y aspirina en un sustrato o un soporte.
7. Una combinación de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> y aspirina para su utilización en un método para promover la regeneración de tejido en el sitio de implantación de una célula madre mesenquimal de médula espinal (BMMSC) de un sujeto, que comprende: administrar las células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> al sujeto de forma sistémica; y aplicar aspirina en el sitio.

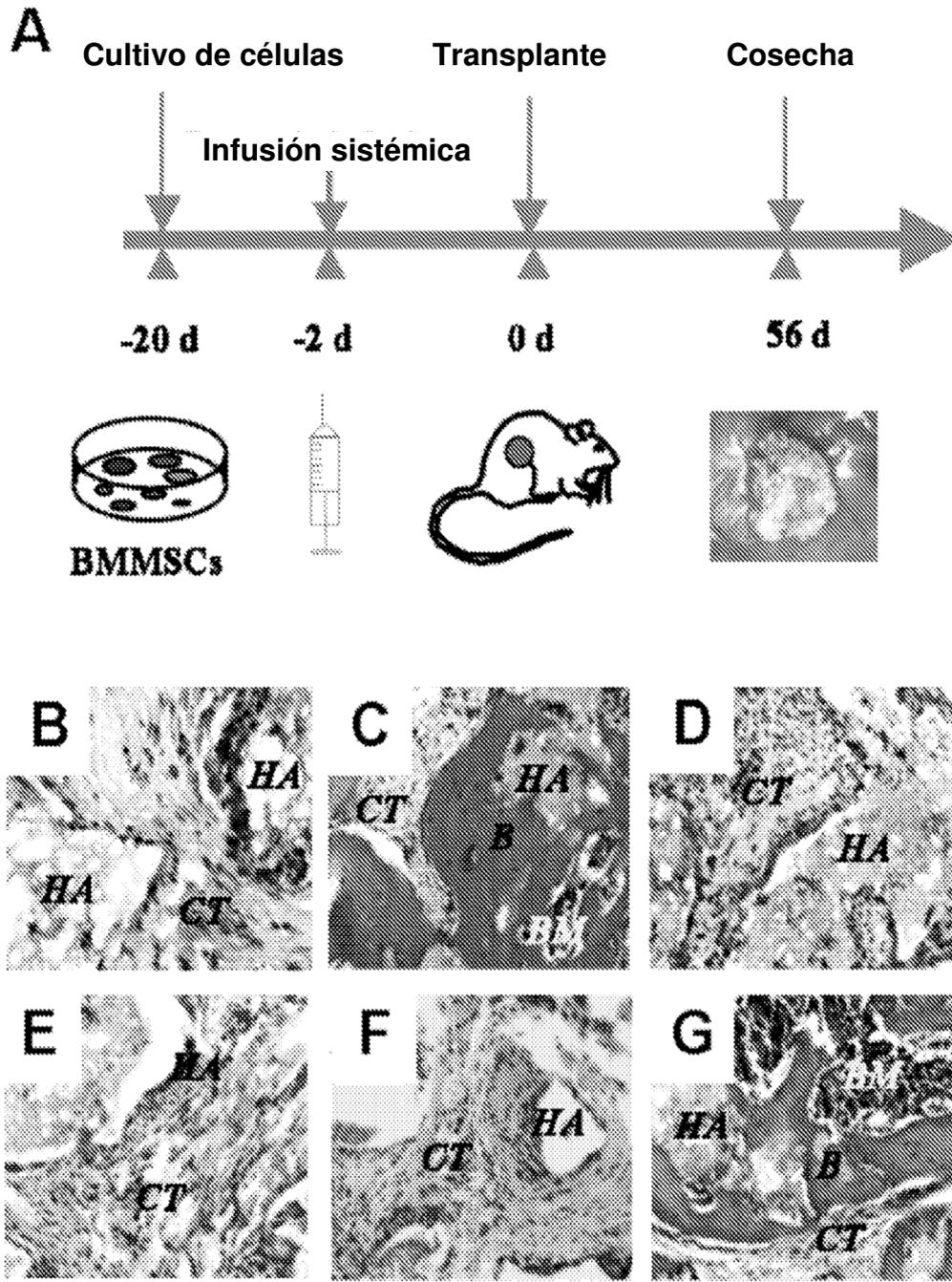


Figura 1A-1G

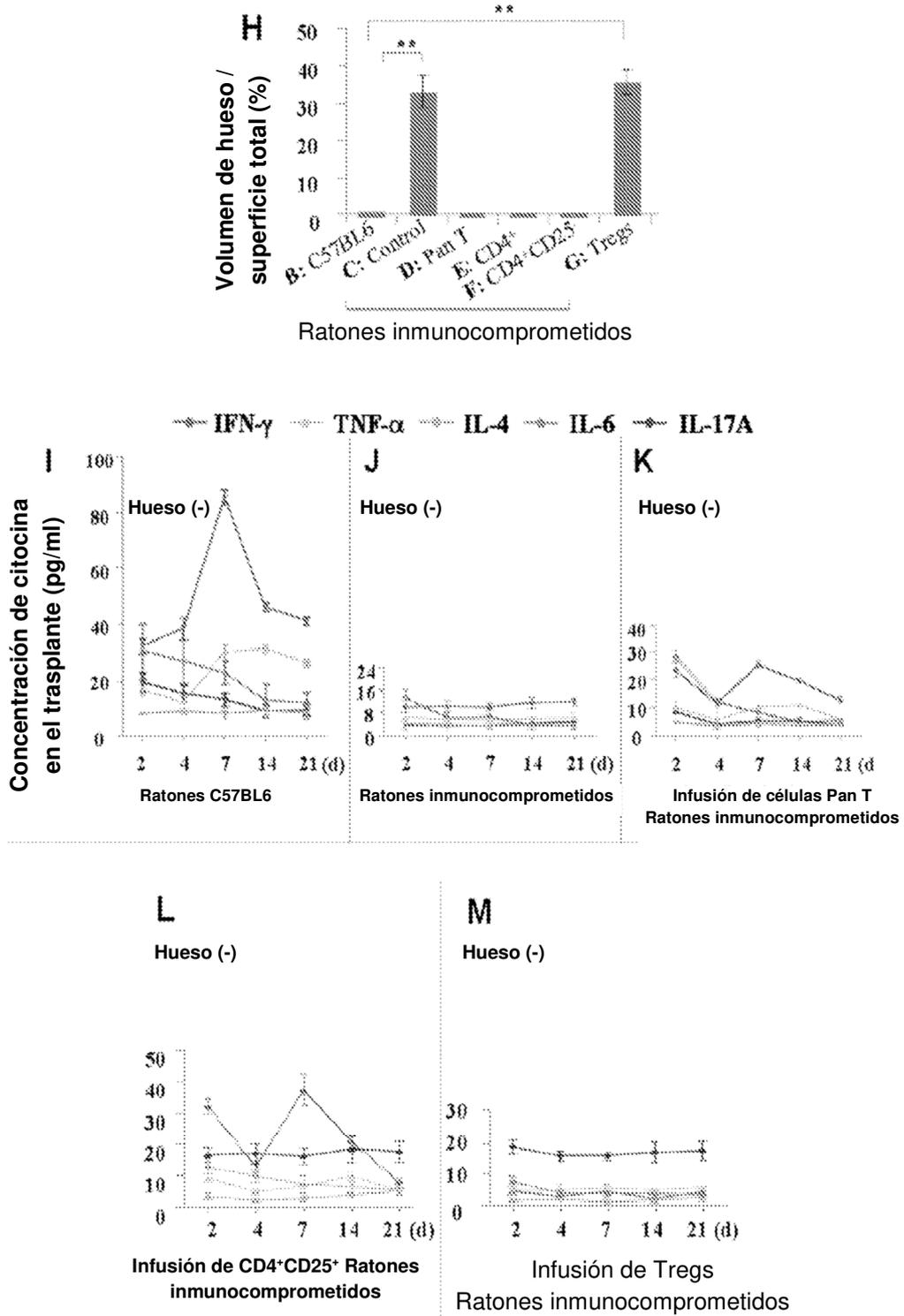
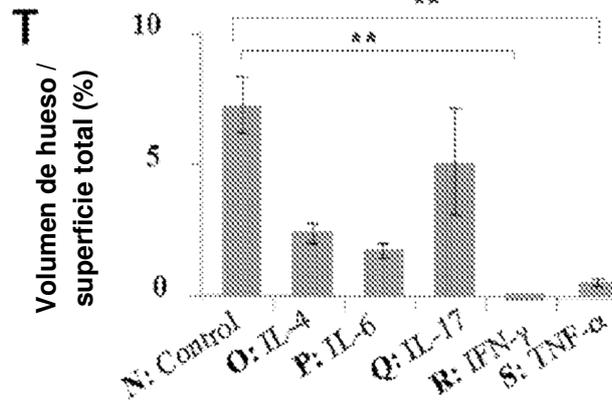
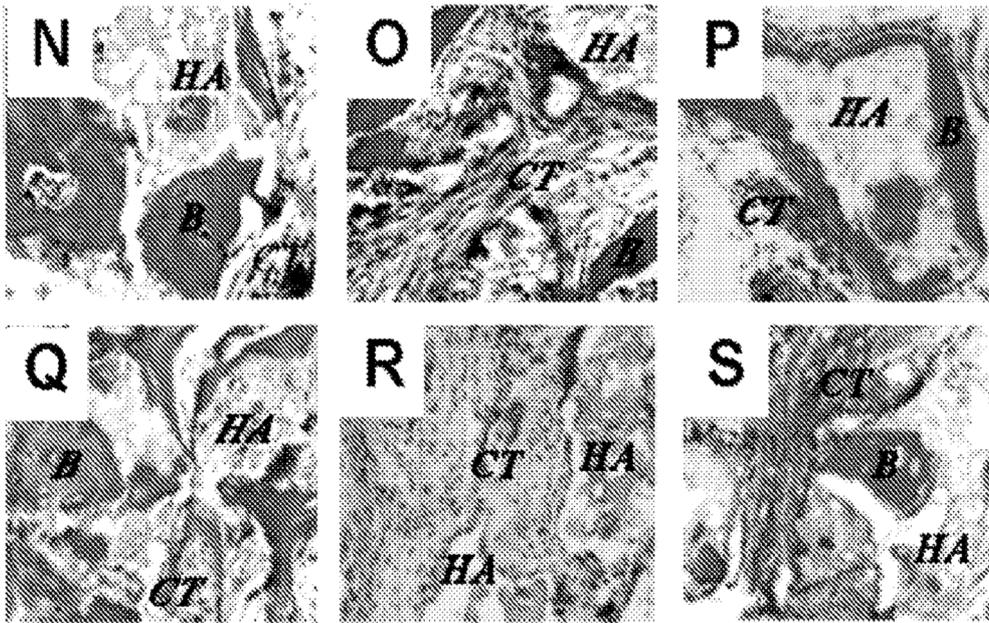
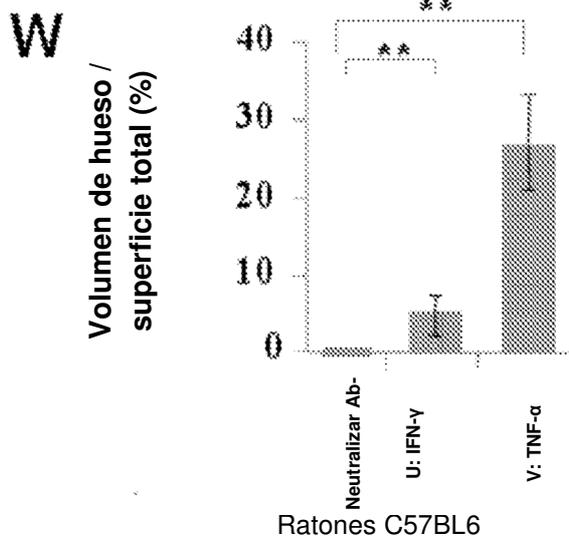
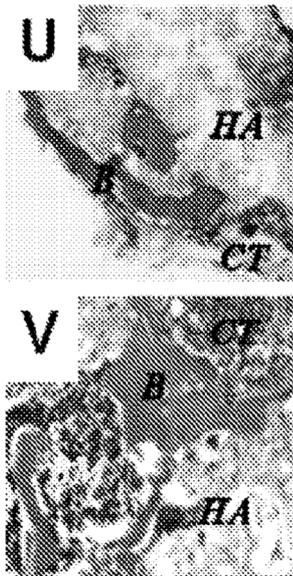


Figura 1H-1M



Ratones inmunocomprometidos



Ratones C57BL6

Figura 1N-1W

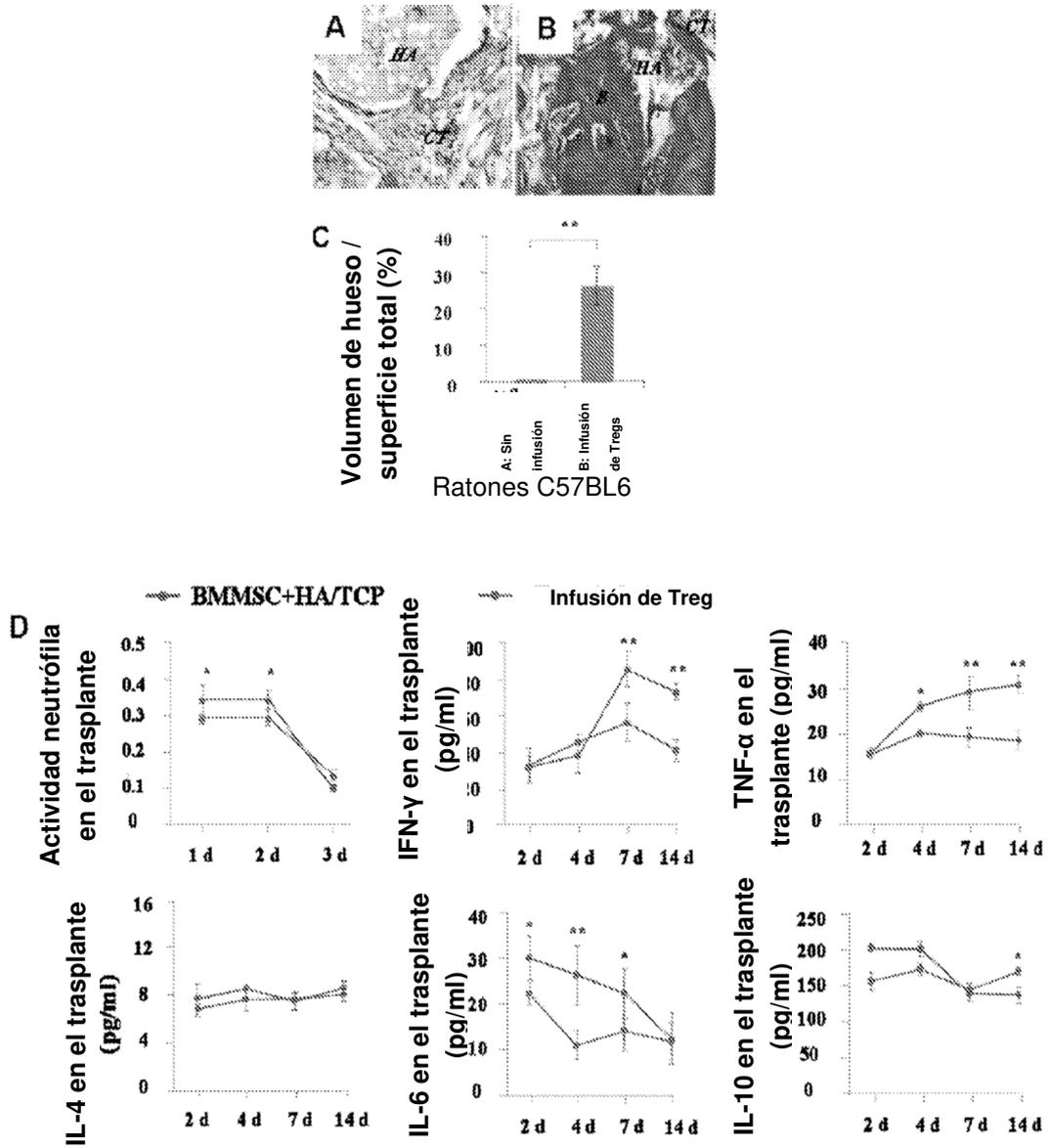


Figura 2A–D

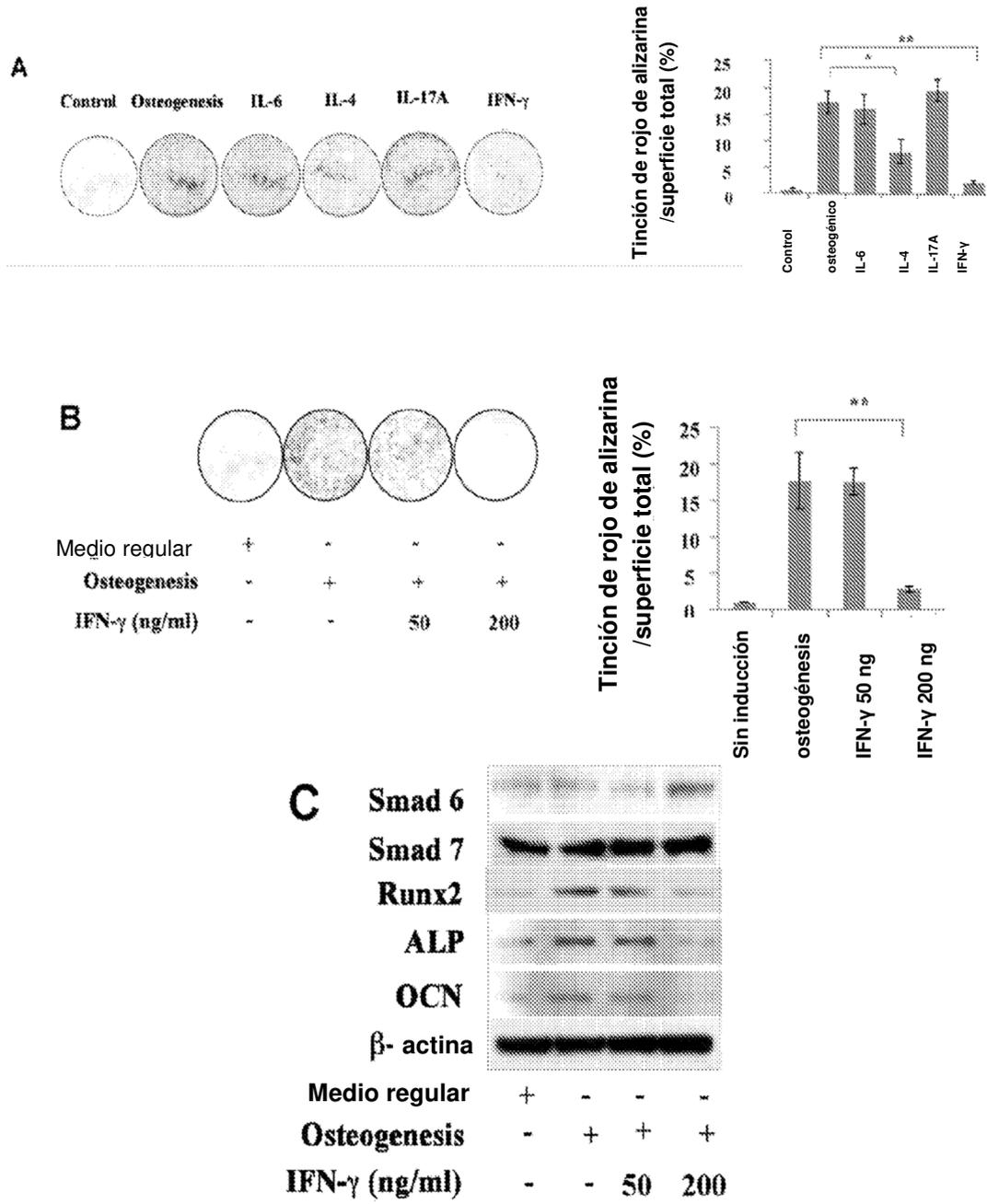


Figura 3A-C

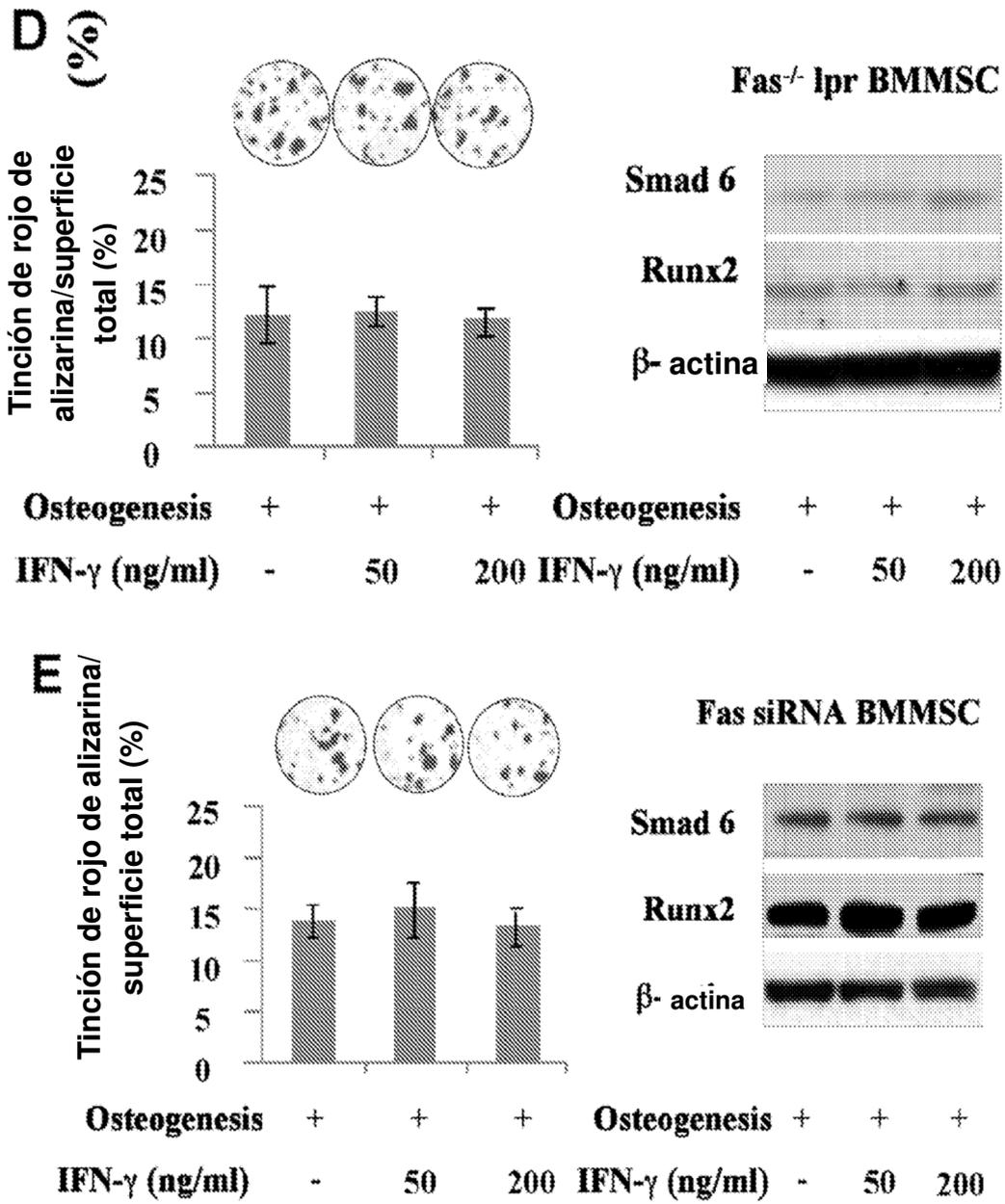


Figura 3D-3E

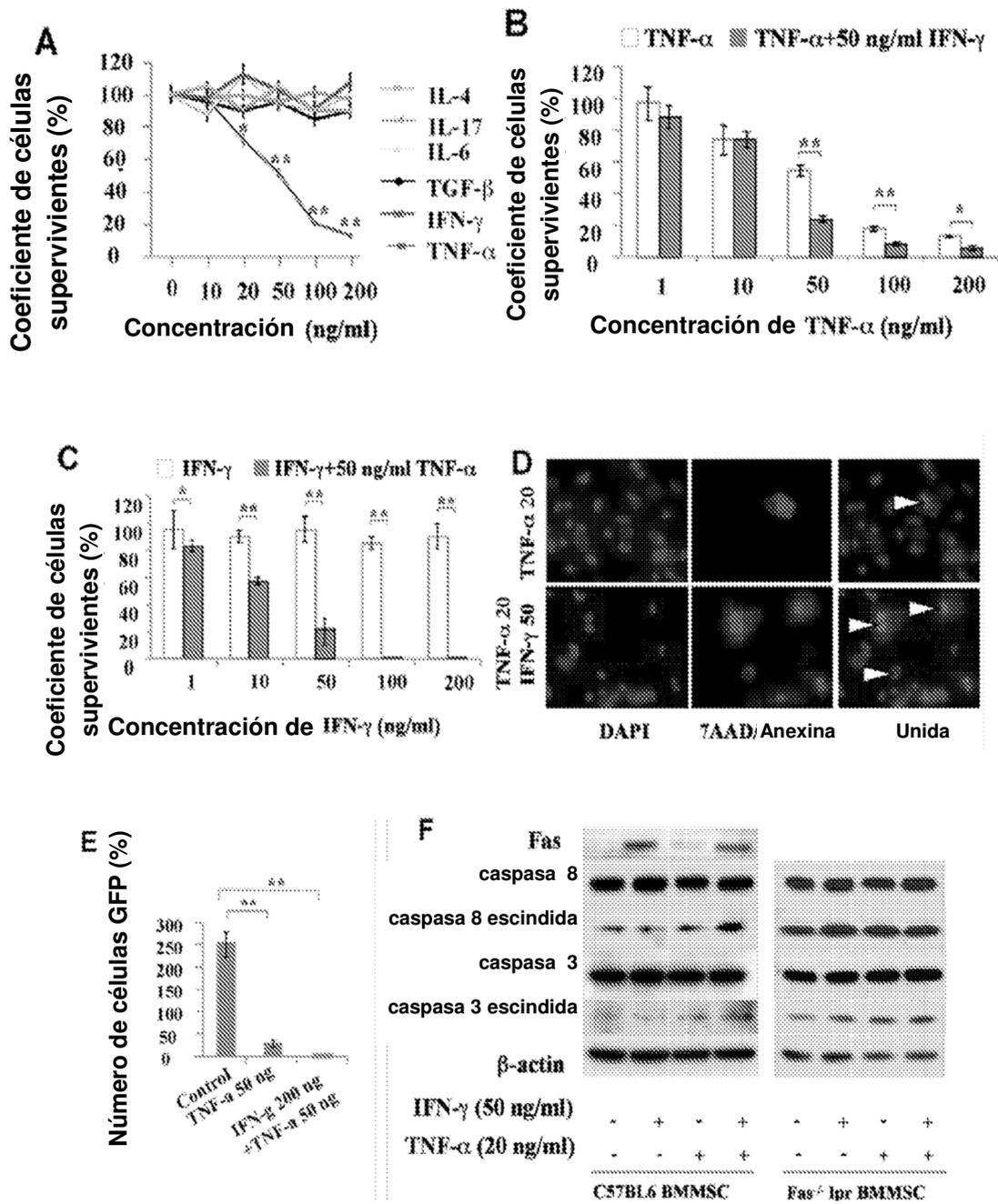


Figura 4A-F

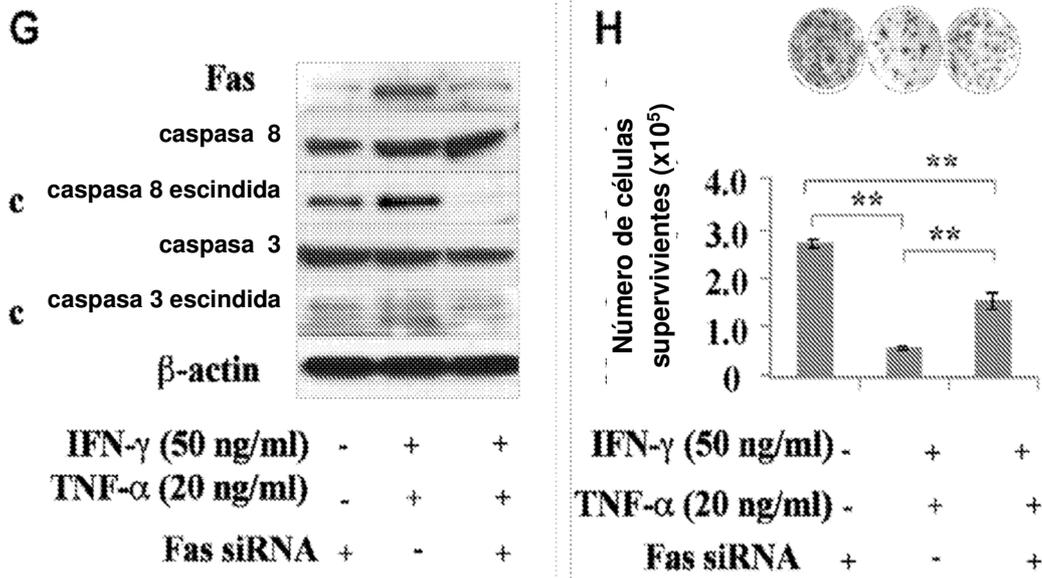


Figura 4G-H

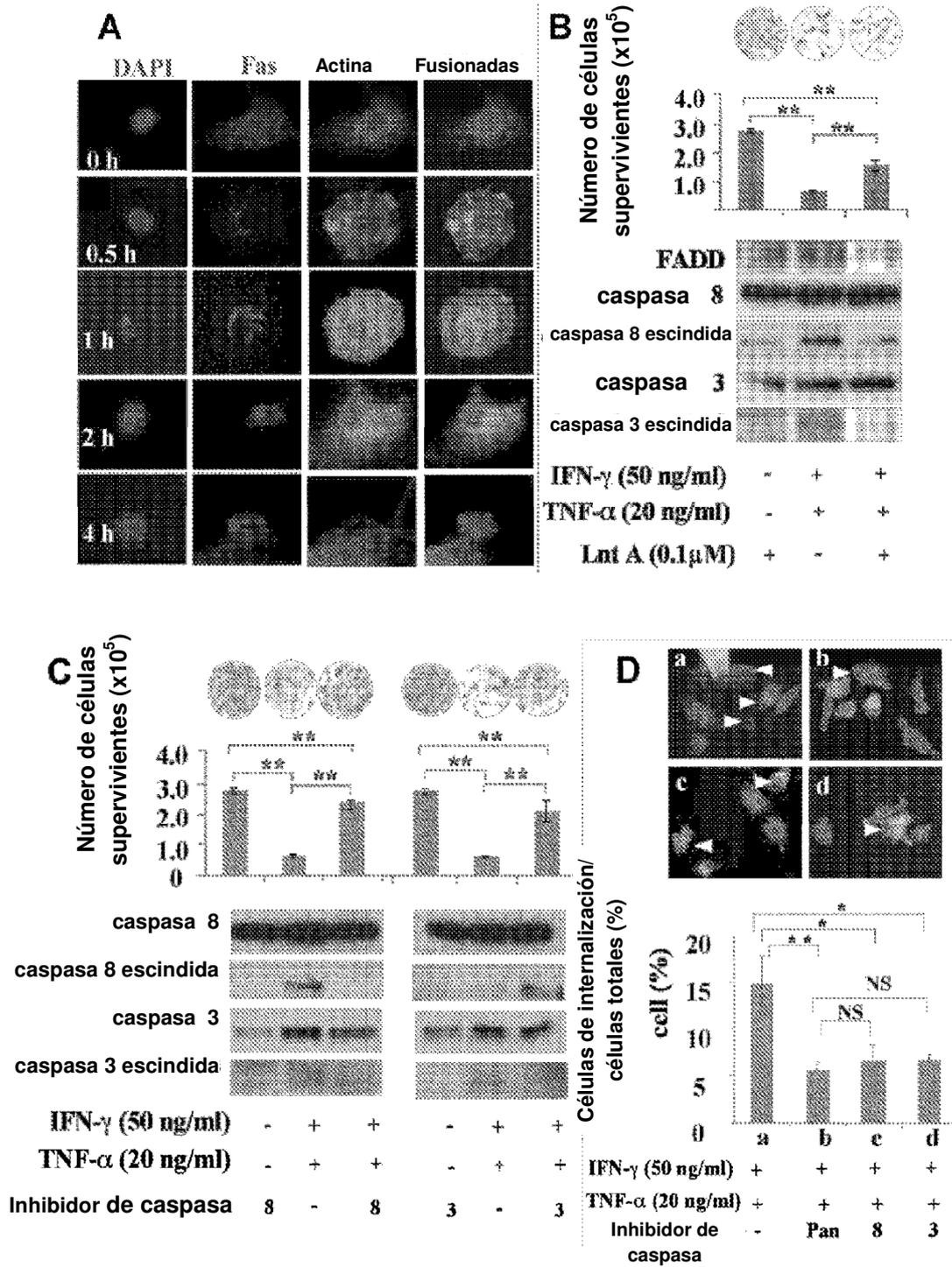


Figura 5A-D

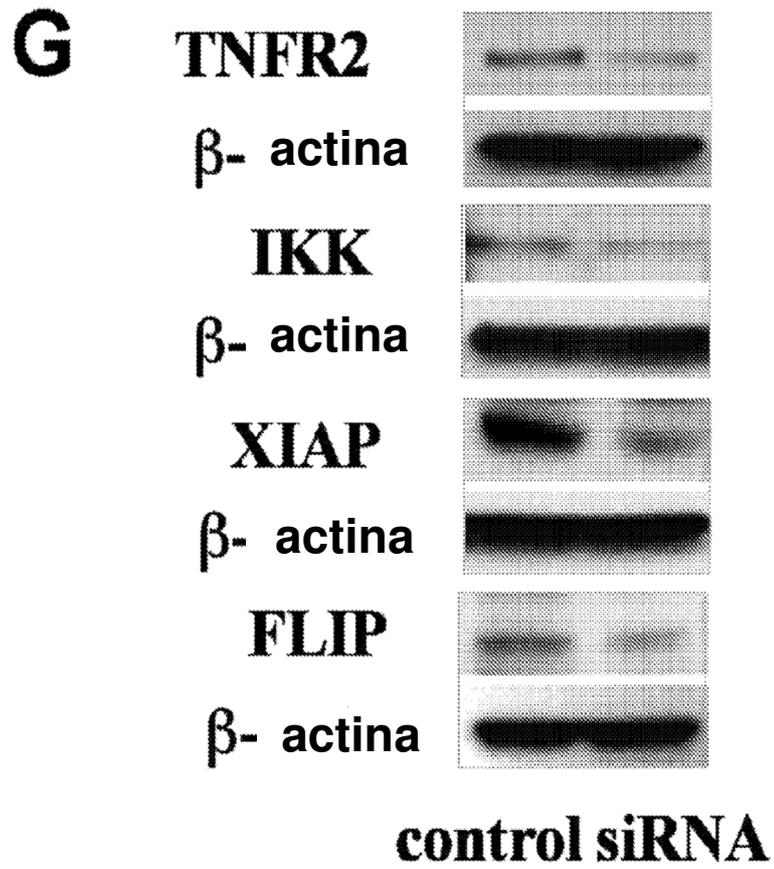
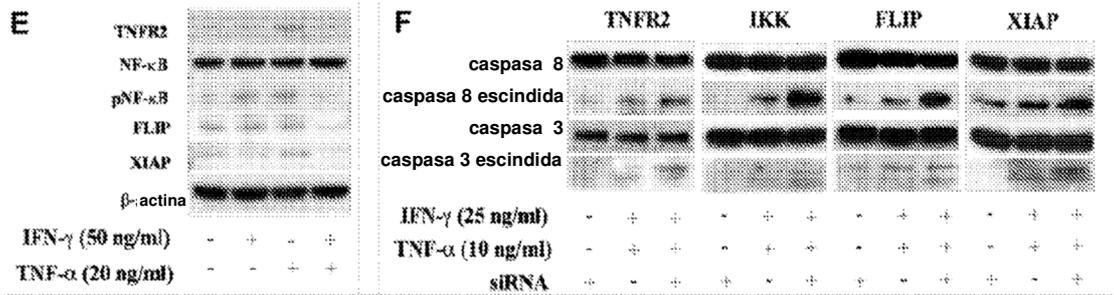


Figura 5E-G

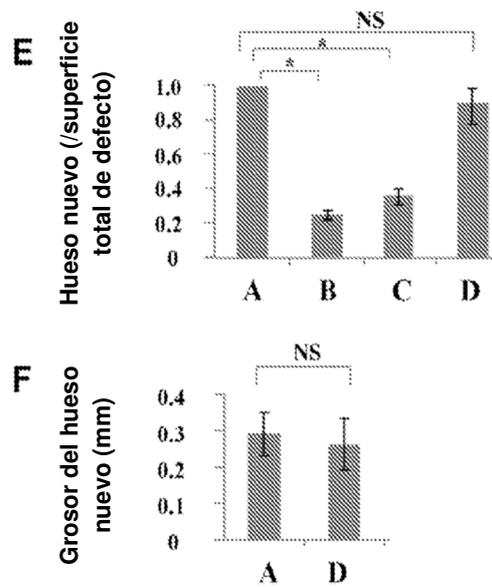
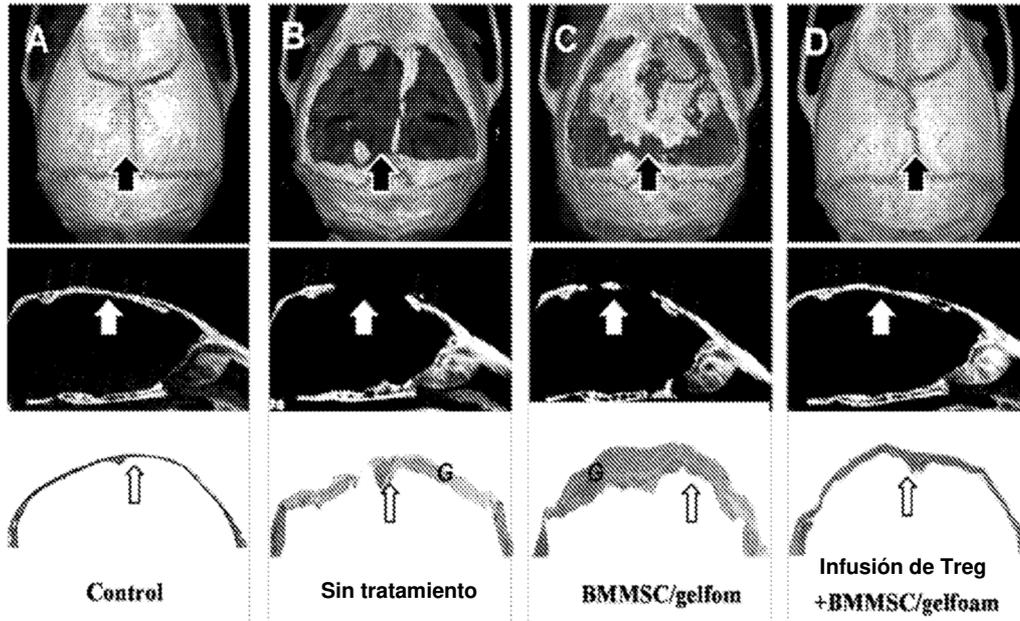


Figura 6A-F

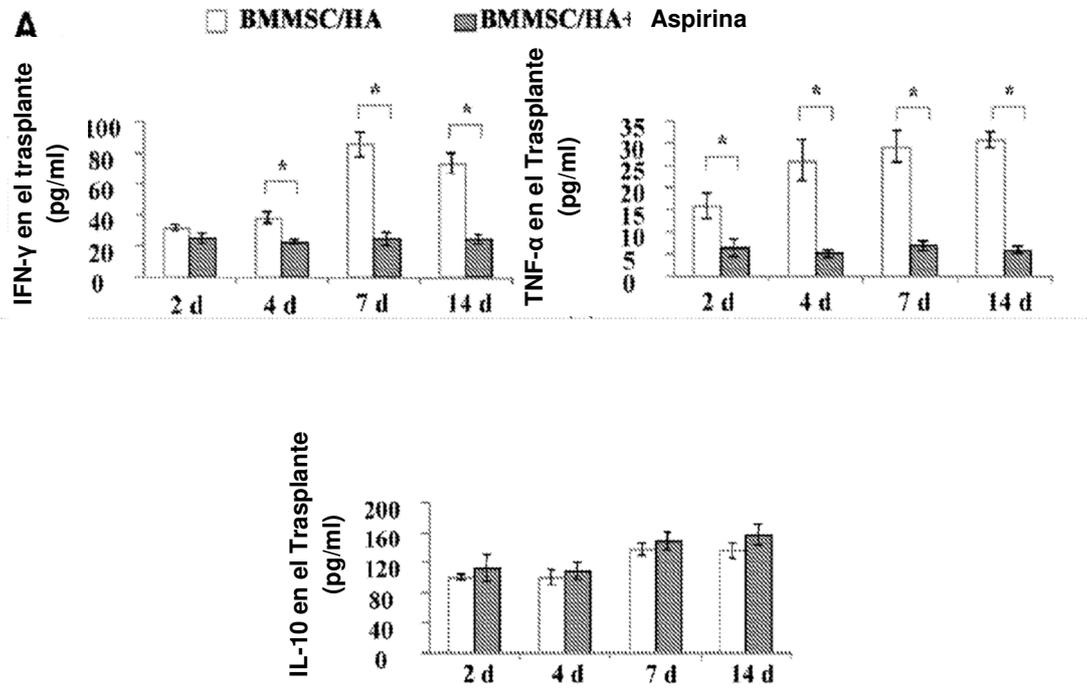


Figura 7A

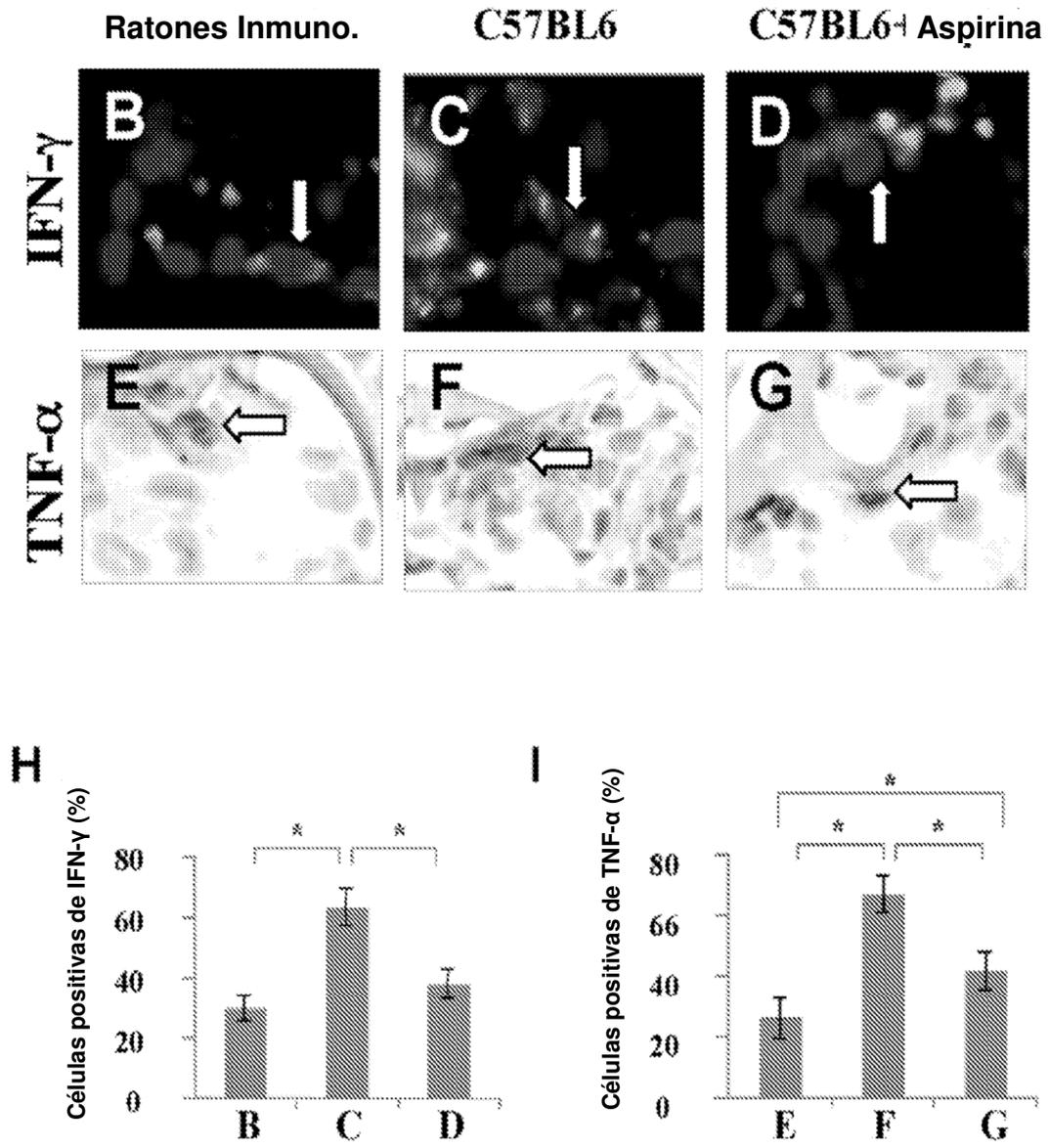


Figura 7b-7i

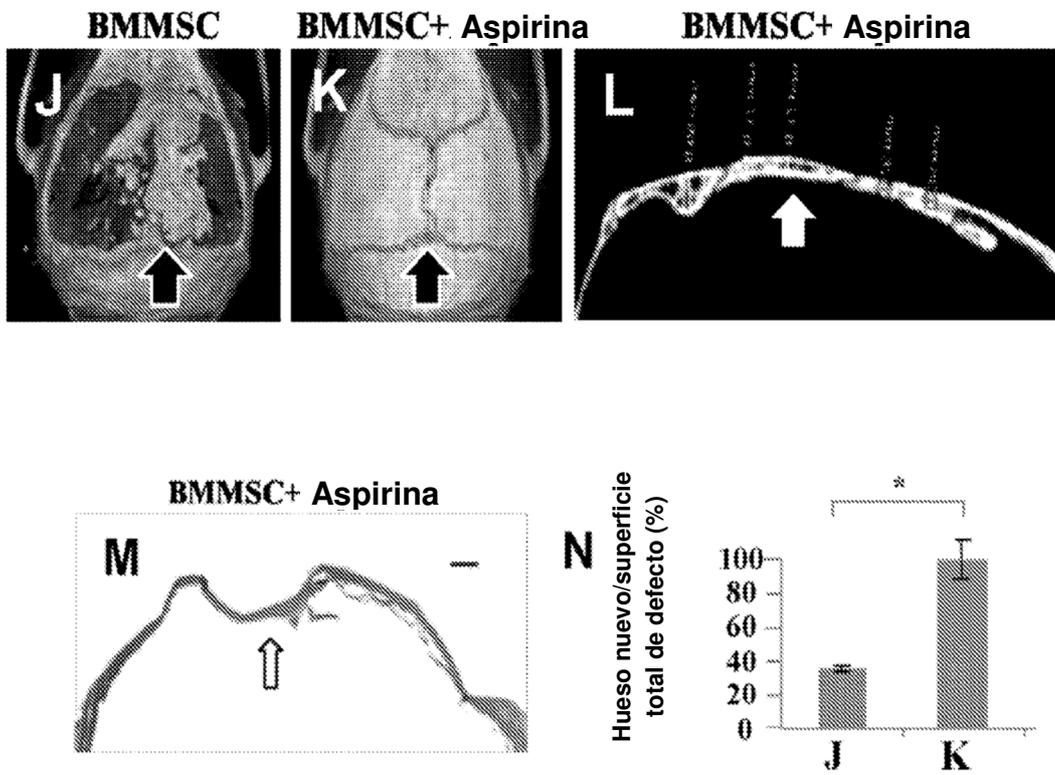


Figura 7J-N

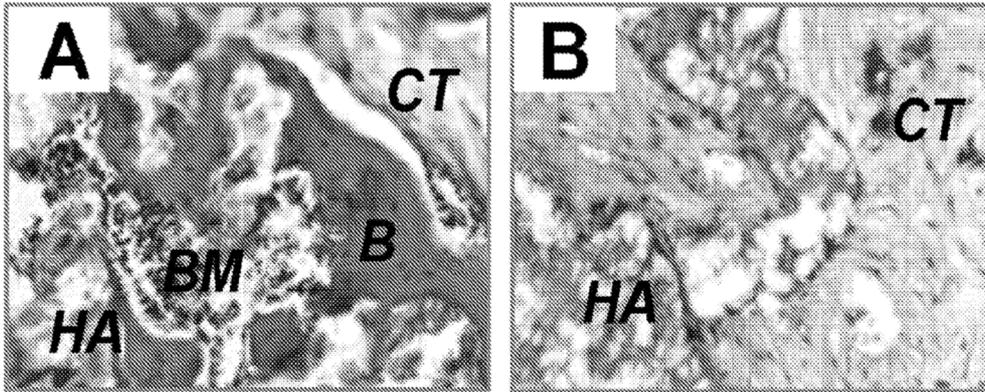


Figura 8A-B

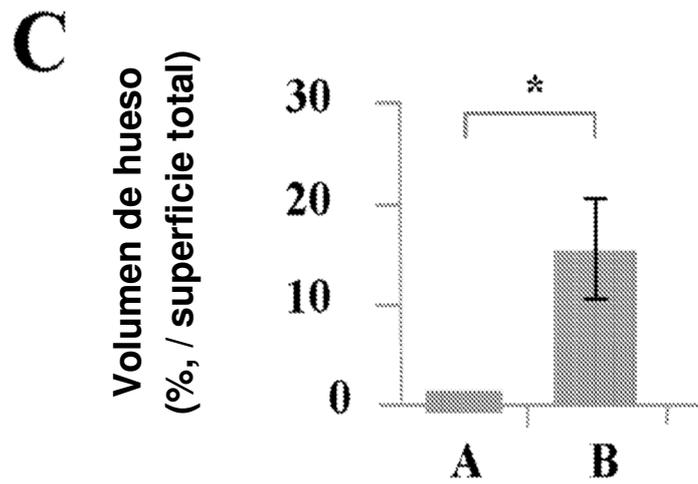
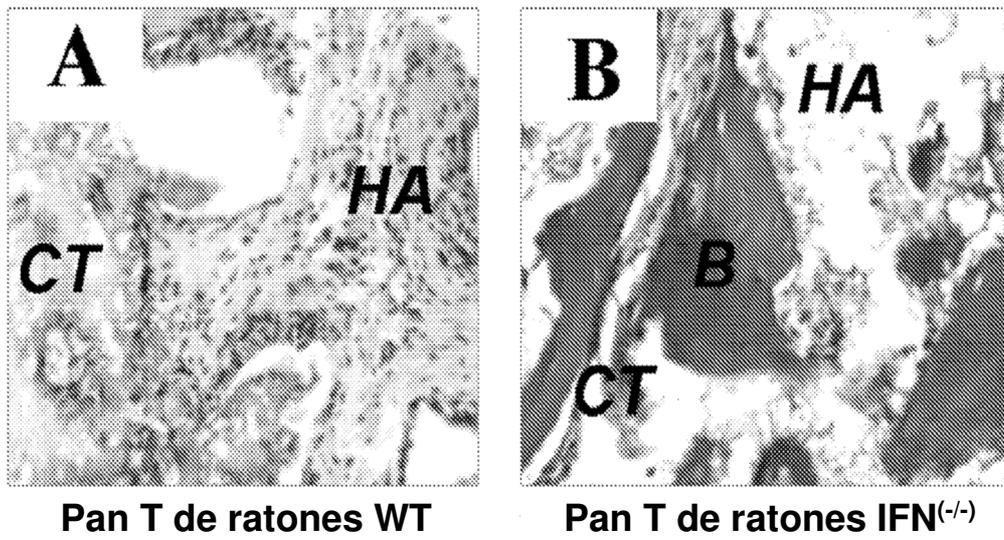


Figura 9A-C

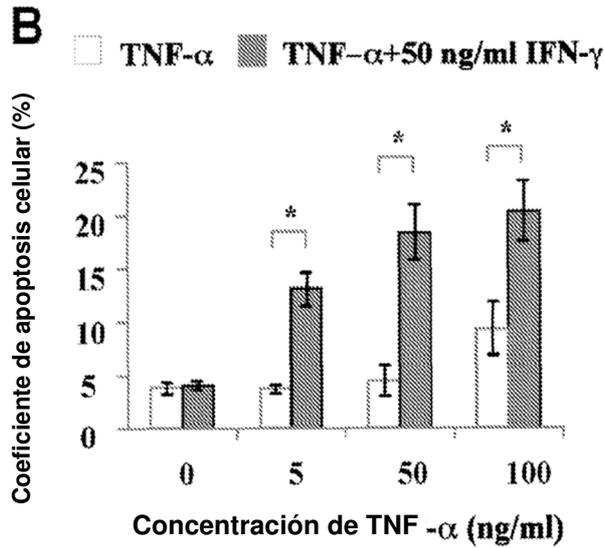
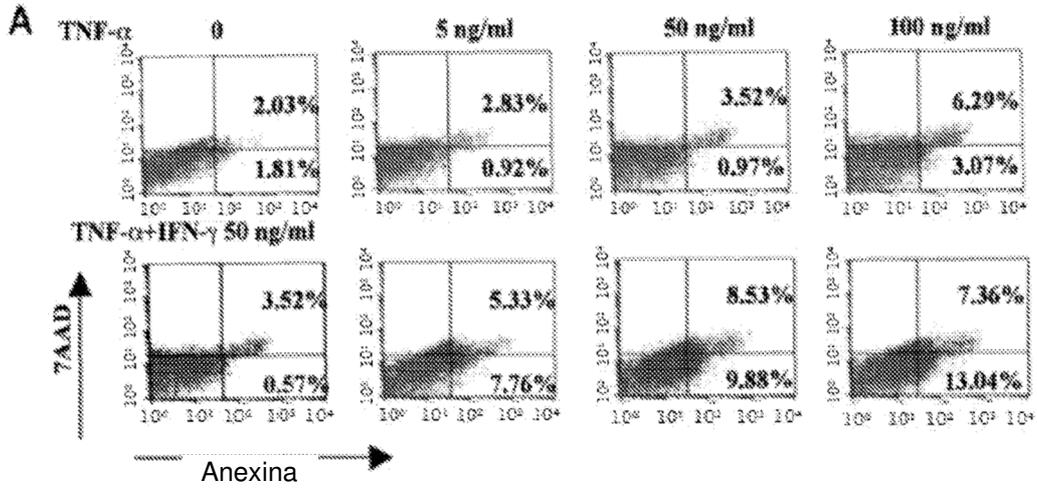


Figura 10A-B

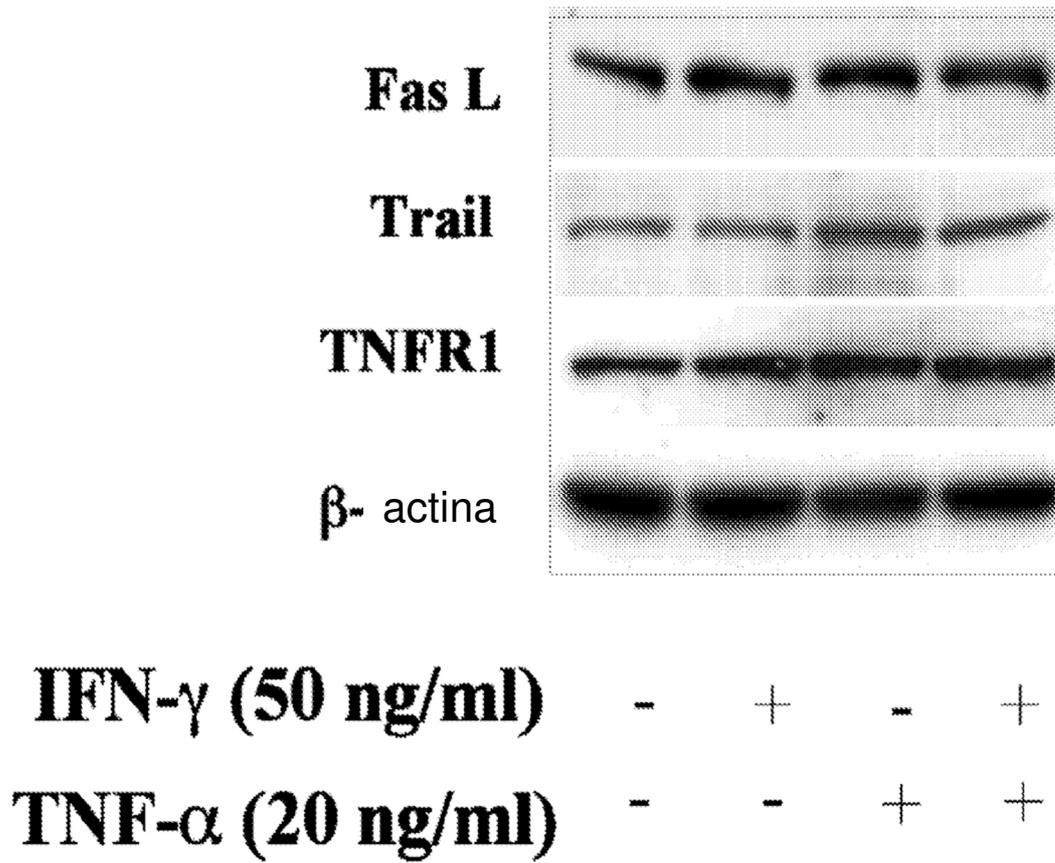


Figura 11

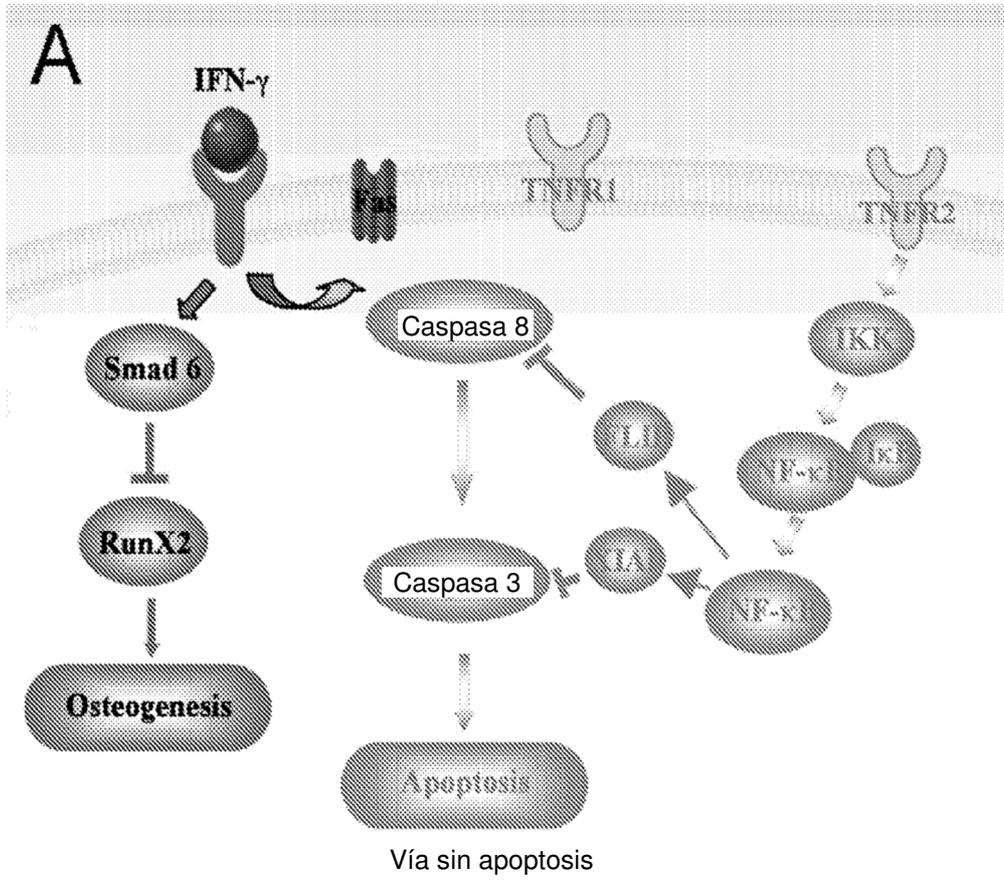


Figura 12A

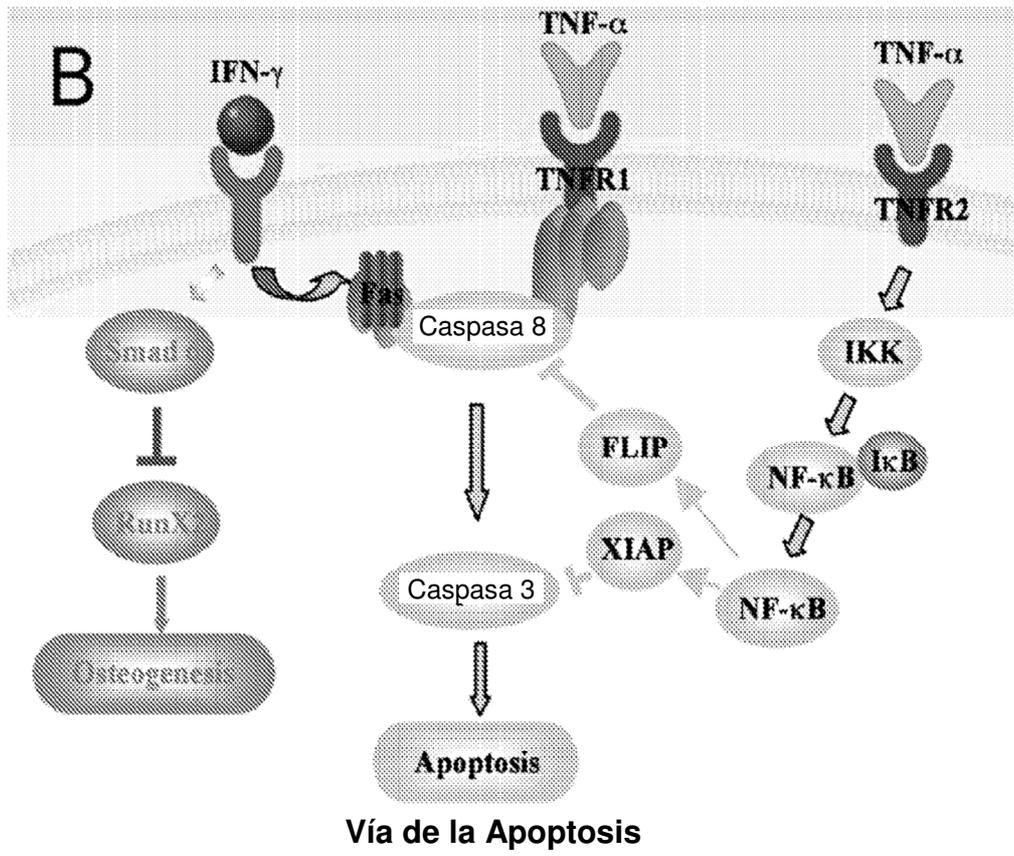


Figura 12B

**A**

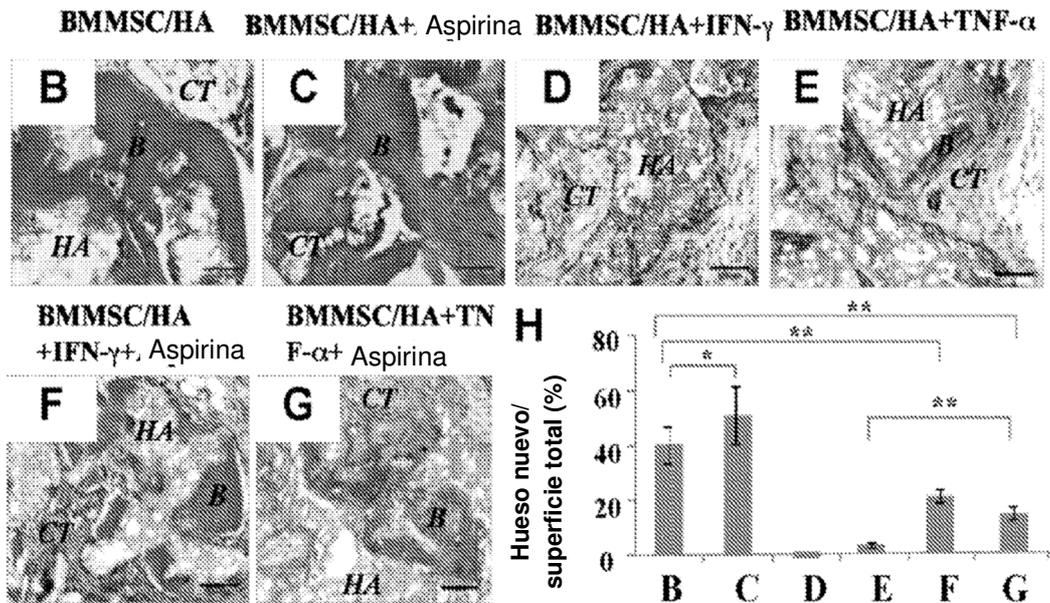
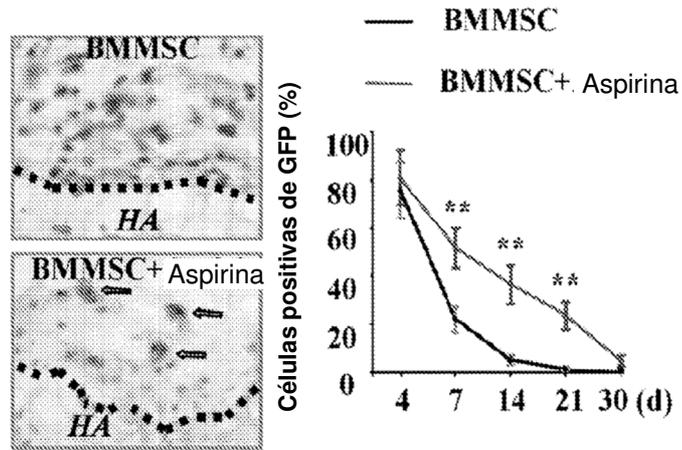


Figura 13A-H

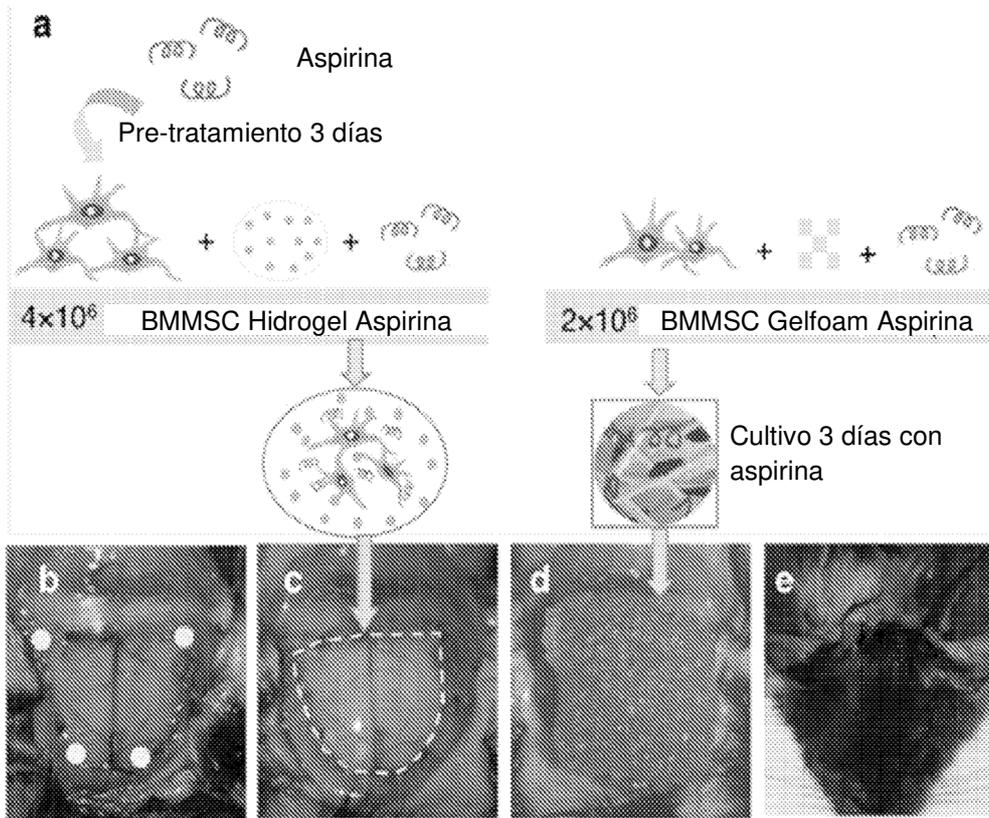


Figura 14