Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO *IN VITRO* DE LA FALLA HEPÁTICA AGUDA SOBRE CRÓNICA, PARA EL POSTERIOR ESTUDIO DEL SECRETOMA DERIVADO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMÁTICAS

Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología.

Director: Dr. Marcelo Ezquer

Centro de Medicina Regenerativa; Facultad de Medicina,

Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo

Juan Carlos Montiel Quiroz

Santiago, Chile.

Diciembre, 2022

Facultad de Ciencias de la Vida
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

“Establecimiento de un modelo *in vitro* de la Falla aguda sobre crónica, para el posterior estudio del secretoma derivado de células madre mesenquimáticas”

Juan Carlos Montiel Quiroz

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del director de Memoria de Título Dr. Marcelo Ezquer. Laboratorio de Medicina Regenerativa de la Universidad del Desarrollo.



Prof. Marcelo Ezquer.

Director

Dr. Álvaro A. Elorza

Comisión Evaluadora

Dr. Alejandro Erices Ocampo

Comisión Evaluadora

Dr Juan Antonio Valdés

Director de Carrera Ingeniería en Biotecnología

Santiago, Chile. Diciembre 2022

Agradecimientos

Primeramente agradezco a mi director de memoria, el Dr Marcelo Ezquer por permitirme ser parte del grupo de trabajo de su laboratorio y por guiarme con su gran experiencia durante este último proceso como estudiante de pregrado.

También agradezco al todo el equipo del laboratorio de Medicina Regenerativa de la Universidad del Desarrollo, ya que desde el primer día de trabajo fui tratado de la mejor manera y siempre me dieron ayuda si es que la solicitaba. En especia quería agradecer mis tutores Barbara Cuadra, Leo Vásquez y yia-lin por haberme enseñado sobre las técnicas que desarrolle durante mi memoria de título, con una destacable dedicación e interés para que yo aprendiera de la mejor manera.

Agradezco infinitamente a mi familia y amigos por haberme apoyado en todo el proceso, los que han sido un pilar fundamental durante todo el proceso

Finalmente agradezco al financiamiento de Fondecyt Regular 1200308, por otorgar un aporte económico el cual colaboró en el desarrollo de la presente memoria de título, y por financiar la investigación para ampliar el conocimiento sobre nuevos tratamientos para la ACLF.

Tabla de contenidos

Índice de figuras ……... VI

Índice de tablas …….……...…..…. VII

Resumen ……..…….….…..... 1

Abstract…….……..…….…..….. 2

1. Introducción……..……..……..…..... 3

1.1 Falla Hepática Aguda sobre Crónica…….…….…. 3

1.2 Incidencia……..... 3

1.3 Fisiopatología…….…….….3

1.4 Tratamientos…….…….....5

1.5 Células madre mesenquimáticas…….……..…6

1.6 Secretoma derivado de MSC precondicionadas como una alternativa para el tratamiento del ACLF…….…….....7

1.7 Sistemas in vitro de screening…….……..……....8

2. Hipótesis. …….……..9

3. Objetivo general…….…….……...…...9

4. Objetivos específicos. …….…...9

5. Materiales y métodos……...……..…..10

5.1 Expansión y estimulación de células madre mesenquimáticas humanas derivadas de tejido adiposo……...10

5.2 Líneas celulares……..10

5.3 Estimulación de monocitos……11

5.4 Protocolo de estímulo de Monocitos y evaluación del efecto del MSC-S……11

5.5 Diferenciación de monocitos a macrófagos…….. 12

5.6 Protocolo de activación de macrófagos……... 12

5.7 Evaluación de marcadores de superficie por citometría de flujo…….. .12
5.8 Extracción de ARN y RT-qPCR……... 13
5.9 Co-cultivo Transwell de monocitos THP-1 y hepatocitos HepG2……..... 14
5.10 Co-cultivo Transwell de macrófagos y hepatocitos HepG2……... 15
5.11 Evaluación de la lisis celular……,.. 15
5.12 Análisis estadístico…….…..... 16

6. Resultados……..... 17
6.1 Objetivo específico 1: Determinar si la administración de MSC-S en el medio de cultivo aumenta la sobrevida de los hepatocitos y disminuye la respuesta inflamatoria en un sistema de cultivo transwell compuesto por monocitos/hepatocitos ..……..... 17
6.1.1 Objetivo específico 1.1: Establecer un protocolo de cultivo y estímulo inflamatorio para los monocitos ……..... 17
6.1.2 Objetivo específico 1.2: Determinar si la administración de MSC-S en el medio de cultivo aumenta la sobrevida de los hepatocitos y disminuye la respuesta inflamatoria en un sistema de cultivo transwell compuesto por monocitos/hepatocitos.....18
6.1.3. Evaluar si la administración de MSC-S disminuye la respuesta inflamatoria en el sistema de cultivo transwell monocito/hepatocito…….....21
6.2. Objetivo específico 2: Determinar si la administración de MSC-S en el medio de cultivo aumenta la sobrevida de los hepatocitos y disminuye la respuesta inflamatoria en un sistema de cultivo transwell compuesto por macrófagos/hepatocitos. ….....24
6.2.1 Objetivo específico 2.1: Establecer un protocolo de diferenciación de monocitos a macrófagos…….....24
6.2.2. Objetivo específico 2.2: Evaluar si la administración de MSC-S aumenta la sobrevida de los hepatocitos en un sistema transwell macrófagos/hepatocitos. ….....28
6.2.3. Objetivo específico 2.3: Evaluar si la administración de MSC-S disminuye la respuesta inflamatoria en el sistema de cultivo transwell macrófagos/hepatocitos. 31

7. Discusión y Conclusiones.……..... 32

8. Bibliografía…….....37

Índice de figuras

Figura 1: El estímulo de células THP-1 con LPS indujo un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. …….……..…… 18

Figura 2: La incorporación de MSC-S reduce la liberación de LDH de las células hepáticas HepG2 en sistema co-cultivo transwell con monocitos THP-1……..……..... 19

Figura 3: El MSC-S no produjo cambios en la relación de la expresión Bax/Bcl-2 de las células hepáticas HepG2 en sistema co-cultivo transwell con monocitos THP-1…….….. 20

Figura 4: El MSC-S induce la expresión de Lipocalina 2 en las células Hepática HepG2…… 21

Figura 5: El estímulo de células THP-1 con LPS y tratadas con MSC-S indujo un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias …….…..……. 23

Figura 6: Los 2 protocolos de diferenciación con PMA inducen a los monocitos THP-1 a un fenotipo de macrófago ……..…….…….. 25

Figura 7: Los 2 protocolos de diferenciación con PMA inducen a cambios en los marcadores de membrana de los monocitos THP-1 asociados a macrófagos.....,.... 26

Figura 8: El estímulo de macrófagos con LPS o LPS+INF-γ indujo un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias.…… 27

Figura 9: Los hepatocitos incubados en sistema transwell con macrófagos activados, no producen liberación de LDH al medio de cultivo ……..….... 29

Figura 10: El estímulo de IFN-γ + LPS induce a una disminución en la expresión de Lipocalina 2 en las células HepG2 …….…….30

Figura 11: El MSC-S induce la expresión de Lipocalina 2 en las células Hepática HepG2 en cultivo transwell con macrófagos ……..……..… 30

Figura 12: EL MSC-S no induce ningún cambio en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos estimulados.…….. 31

Índice de tablas

Tabla 1: Anticuerpos utilizados para citometría de flujo 13

Tabla 2 Secuencia de los primers utilizados para la rt-qPCR 14

Abreviaturas

LPS	Lipoporisacárido
TNF-a	Factor de necrosis tumoral
IFN-y	Interferón gamma
IL-17	Interleucina 17
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHE	Virus de la Hepatitis E
Nf-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IL-1a	Interleucina 1 alfa
IL-8	Interleucina 8
IL-6	Interleucina 6
CCL2	Proteína 1 quimioatrayente de monocitos
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL-10	Interleucina 10
TGB-b1	Factor de crecimiento transformante beta 1
ARN	Ácido ribonucleico
mARN	ARN mensajero
D-gal	D-galactosa

Resumen

La insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF) es un síndrome complejo, caracterizado por un deterioro agudo de la función hepática, una respuesta inflamatoria local y sistémica exacerbada de alta mortalidad.

Durante la ACLF, se produce la pérdida del ambiente tolerogénico hepático, mediante la activación de las células de Kupffer que adquieren un perfil pro-inflamatorio, caracterizado por la secreción de citoquinas y factores quimiotácticos que llevan al infiltrado y activación de los monocitos en circulación, generando una falla sistémica.

Actualmente no existen tratamientos específicos para la ACLF, teniendo como únicas opciones el soporte hepático y el trasplante hepático como alternativa terapéutica cuando se desencadena la falla hepática.

El secretoma de células madre mesenquimáticas (MSC-S) está compuesto por un amplio espectro de moléculas con actividad trófica, pro-angiogénica y anti-inflamatoria, por lo que han sido propuestos como una nueva alternativa terapéutica para esta patología. En nuestro laboratorio, resultados preliminares en un modelo murino de ACLF indican que la administración de MSC-S disminuye la respuesta inflamatoria y la lesión hepática, aumentando la sobrevida de los animales.

En el presente trabajo nos propusimos estandarizar un modelo *in vitro* de co-cultivo monocito/hepatocito y macrófago/hepatocito, para determinar de manera más rápida y económica, que en el modelo animal, que molécula(s) presente(s) en el MSC-S podrían dar cuenta de su efecto terapéutico sobre la ACLF, por tal motivo planteamos como hipótesis que la administración del MSC-S precondicionado induce una respuesta hepatoprotectora y anti-inflamatoria.

En primer lugar, montamos un sistema de co-cultivo transwell monocitos/hepatocitos, en el cual se pudo inducir una respuesta inflamatoria por LPS, lo que afectó la viabilidad de los hepatocitos presentes en el sistema. Al co-incubar estas células con MSC-S, se observó una mayor viabilidad de los hepatocitos, indicando que el sistema podría ser una buena herramienta para estudiar los componentes presentes en el MSC-S con actividad terapéutica.

En segundo lugar, establecimos el co-cultivo transwell entre macrófagos/hepatocitos. En este caso, se estandarizaron protocolos de diferenciación a partir de monocitos, así como de estímulos. Aunque los estímulos evaluados (LPS y LPS-IFNγ) indujeron una respuesta inflamatoria en los macrófagos, no se vio afectada la viabilidad de los hepatocitos. Por este motivo, hasta el momento, el sistema de co- cultivo macrófago/hepatocito, que establecimos, no sería un buen modelo para estudiar los componentes terapéuticos presentes en el MSC-S.

Abstract

Acute-on-Chronic Liver Failure (ACFL) is a complex síndrome, characterized by acute deterioration of liver function, an exacerbated local and systemic inflammatory response, and high mortality.

During ACLF, the los of the hepatic tolerogenic environment occurs, through the activation of Kupffer cells that acquire a pro-inflamatory profile, characterized by the secretion of cytokines and chemotactic factors that lead to the infiltration and activation of circulating monocytes, generating a systemic failure.

Currently, there are no specific treatments for ACLF, although liver transplantation is the therapeutic alternative when liver failure is triggered.

The mesenchymal stem cell secretome (MSC-S) is composed of a wide spectrum of molecules with trophic, pro-angiogenic and anti-inflammatory activity, which is why they have been proposed as a new therapeutic alternative for this pathology. In our laboratory, preliminary results in a murine modelo f ACLF indicate that the administration of MSC-S decreases the inflammatory responde and liver injuty, increasing the survival of the animals.

In the present work we set out to standardize an in vitro model of monocyte/hepatocyte and macrophage/hepatocyte co-culture, to determine in a faster and cheaper way, than in the animal model, which molecule or molecule are present in the MSC-S and could account for its therapeutic effect on ACLF. For this reason, we hypothesize that the administration of preconditioned MSC-S induces a hepatoprotective and anti-inflammatory response.

First, we set up a monocyte/hepatocyte transwell co-culture system, in which an inflammatory response could be induced by LPS, which affected the viability of the hepatocytes present in the system. By co-incubating these cells with MSC-S, a greater viability of hepatocytes was observed, indicating that the system could be a Good tool to study the components present in MSC-S with therapeutic activity.

Finally, we established transwell co-culture between macrophages/hepatocytes. In this case, differentiation protocols were standardized from monocytes, as well as from stimuli. Although the stimuli tested (LPS and LPS-IFNγ) induced an inflammatory response in macrophages, hepatocytes viability was not affected. For this reason, until now, the macrophage/hepatocyte co-culture system that we established would not be a Good model to study the therapeutic components present in MSC-S.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Falla Hepática Aguda sobre Crónica

La falla hepática aguda sobre crónica (ACLF) es un síndrome complejo caracterizado por un deterioro agudo de la función hepática en pacientes con una enfermedad hepática crónica compensada o descompensada preexistente de cualquier etiología (Jalan et al., 2012).

Aunque los mecanismos que desencadenan el ACLF, no son del todo conocidos, una respuesta inflamatoria local y sistémica exacerbada, asociada a la pérdida de hepatocitos por apoptosis y/o necrosis que llevan a la falla hepática, son los rasgos patognomónicos de la enfermedad. El ACLF se caracteriza por una rápida progresión, compromiso multiorgánico y alta mortalidad a los 28 días una vez iniciado el componente agudo (Moreau, 2016; Sarin et al., 2019).

La mortalidad de los pacientes con ACLF es independiente de la causa precipitante, siendo la intervención clínica temprana el factor más importante en la evolución clínica y pronóstico de la enfermedad (Sarin et al., 2019: Shen et al., 2022). Por este motivo, los esfuerzos actuales, están puestos en descifrar los mecanismos fisiopatológicos del ACLF y en el desarrollo de estrategias terapéuticas que puedan disminuir la respuesta inflamatoria, el daño tisular y promover la regeneración hepática.

1.2 Incidencia

De acuerdo con el estudio CANONIC, donde se estudiaron 1383 pacientes de países europeos, el ~31% de los pacientes hospitalizados por falla hepática, desarrollaron ACLF donde un 20% lo presentaba al momento de ser ingresados. Además, se determinó que los pacientes afectados por el síndrome presentan una mortalidad a los 28 días del 23% al 74% dependiendo del número de órganos afectados (Moreau et al., 2013; Sarin et al., 2019).

Actualmente existe otro estudio en desarrollo de este mismo nivel llamado Acute on Chronic Liver Failure in Latin America (ACLARA, 2018) el cual busca determinar la prevalencia y caracterizar los mecanismos del ACLF en Latino América. En Chile (al igual que el resto de los países de la región), el ACLF estaría presente entre el 24 al 40% de los pacientes hospitalizados con cirrosis que desarrollan la falla hepática.

En nuestro país, se identificó que en el 57% de los casos de ACLF, el efecto precipitante de la falla aguda se trata de infecciones bacterianas, mientras que en el 40% de los casos no ha sido posible identificar el evento precipitante que desencadena la falla aguda (Queiroz, 2021).

1.3 Fisiopatología

Si bien los hepatocitos componen el principal tipo celular del parénquima hepático, el hígado también alberga una población abundante de macrófagos residentes, denominados células de Kupffer, que funcionan como los fagocitos dominantes y componen más del 80% de los macrófagos del cuerpo en condiciones basales. Las

células de Kupffer expresan altos niveles de receptores scavengers, y son fundamentales para la remoción de microbios y antígenos circulantes (Pombinho et al., 2018).

En el hígado también hay otros tipos de células inmunes, en menor proporción, como las células mieloides que pueden ser neutrófilos o células dendríticas; y células linfoides, como las células T o las células natural killer, que modulan parte de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa (Triantafyllou et al., 2018).

Bajo condiciones normales, el hígado presenta un microambiente tolerogénico frente a los antígenos exógenos, pero no patognomónicos, así como a bajos niveles de endotoxemia. Este mecanismo, protege al huésped frente a las frecuentes exposiciones a los antígenos de la dieta y componentes bacterianos derivados del microbioma comensal del intestino, que se puede encontrar en el torrente sanguíneo (Han, 2002).

El ACLF puede ser caracterizado como una analogía al concepto **PIRO** utilizado en la sepsis, el cual establece que un paciente con ACLF se categoriza en 4 dominios: predisposición (**P**); lesión o evento inductor (**I**); respuesta (**R**); y falla multiorgánica (**O**) (Angus et al., 2003; Gerlach et al., 2003; Vincent, Opal, et al., 2003; Vincent, Wendon, et al., 2003, Alam et al, 2017).

Predisposición: Hace referencia a los factores fisiopatológicos crónicos, causados mayoritariamente por el abuso de alcohol, infecciones virales (VHB, VHE, etc), esteatohepatitis, enfermedades metabólicas y daño hepático generado por drogas (Bajaj, 2013; Sarin et al., 2009), que conducen al desarrollo de cirrosis y pérdida del medio inmune tolerogénico del hígado.

Inducción: Corresponde a los eventos precipitantes que desencadenan la falla aguda, los cuales pueden ser clasificados como exógenos y endógenos. Los principales agentes exógenos son los microorganismos bacterianos, estos cuentan moléculas ubicadas en su envoltura nuclear denominadas pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), que son reconocidas por receptores denominados pattern-recognition receptors (PRRs), presentes tanto en macrófagos como hepatocitos (Abbas et al., 2015; Triantafyllou et al., 2018).

Al producirse la unión entre los PAMPs y los PRRs, se activa una cascada de señales intracelulares que activan factores de transcripción, como el Nf-κβ, que, a su vez, induce la transcripción de genes que codifican citoquinas y quimioquinas implicadas en el proceso inflamatorio (Hernaez et al., 2017; Mezzano, 2018).

Como inductores endógenos, existen otro tipo de moléculas llamadas danger-associated molecular patterns (DAMPs). Los DAMPs, son productos liberados de la necrosis o ruptura de la matriz celular, como el DNA, proteínas s100, entre otros. Al ser reconocidos por los PRRs se induce a una respuesta inflamatoria aséptica (Arroyo et al., 2016; Moreau, 2016).

Respuesta inmunológica: Se compone de dos fases, fase de iniciación y fase de propagación.

En la fase de iniciación, las células de Kupffer después del reconocimiento de PAMPs/DAMPs, se activan e inician una respuesta pro-inflamatoria, con una polarización a un perfil M1 (pro-inflamatorio) caracterizado por la secreción de citoquinas como IL-8 (participa de la producción de moléculas de adhesión (ICAM-1), estimula la angiogénesis y amplifica la inflamación local); IL-6 (participa en la fase aguda de la inflamación, y estimula la producción de proteínas e inmunoglobulinas); TNF-α (participa en el proceso de apoptosis y

estimula la fase aguda de la respuesta inflamatoria) (García De Lorenzo et al., 2000; Duan et al., 2022). Además, se produce la secreción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y quimiocinas como la CCL2, que amplifican la señal pro-inflamatoria y aumentan el reclutamiento de células derivadas de la médula ósea hacia el hígado, principalmente neutrófilos y monocitos (Heymann et al., 2016; Kubes et al., 2012). Las citoquinas liberadas por las células de Kupffer también pueden reclutar otros subconjuntos de células inflamatorias, como eosinófilos, células dendríticas (CD) y células T (Heymann et al., 2016).

En la fase de propagación, luego de la liberación de monocitos a la circulación, ocurre una infiltración de monocitos al hígado, donde se diferencian en macrófagos con un perfil pro-inflamatorio, aumenta el número de las células pro-inflamatorias productoras de IL-17 (Th17) y disminuyen las células T reguladoras anti-inflamatorias (Treg), generando un círculo de retroalimentación positiva que lleva a la lesión tisular (Gustot et al., 2015; Hernaez et al., 2017; Jalan et al., 2012).

Falla multiorgánica: el reclutamiento de células efectoras impulsa a una mayor producción de citoquinas, las cuales, al ser liberadas a la circulación sistémica provocan el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica, contribuyendo a la disfunción endotelial y alteraciones en la microcirculación, lo que da como resultado que distintos órganos y sistemas pierdan su funcionalidad, comenzando por el riñón, siguiendo con el cerebro, pulmón, sistema circulatorio y sistema de coagulación (Triantafyllou et al., 2018; Vincent et al., 1996).

En el estudio CANONIC se observó que los pacientes con ACLF presentaban un aumento en los parámetros inflamatorios, con aumento de proteína C reactiva y leucocitos, y citoquinas pro-inflamatorias, que incluyen IL-6, IL-8, TNF-a, MCP-1, etc, en comparación con pacientes con cirrosis descompensada y pacientes sanos (Moreau et al., 2013).

De este modo, aunque aún quedan aspectos por entender, se postula que los pacientes con ACLF presentan un estado inflamatorio exacerbado local y sistémico, que se traduce en aumento de estrés oxidativo, necrosis tisular y daño microvascular, provocando falta de irrigación y eventualmente una falla multiorgánica (Llopis et al., 2016).

1.4 Tratamiento

Actualmente, no existen tratamientos específicos para los pacientes con ACLF que desarrollan falla hepática. La identificación temprana de los factores precipitantes es importante, sin embargo, no ha sido relacionado con una disminución del agravamiento del síndrome. El pilar de la terapia actual consiste en el soporte de la función hepática, hasta que pueda ser realizado el trasplante de hígado (Abbas et al, 2022). Sin embargo, estos pacientes no son evaluado como de alta prioridad en las listas de espera, por ser considerados “demasiado enfermos para un trasplante”, limitando aún más la posibilidad de tratamiento.

En ese sentido, las terapias basadas en células madre están surgiendo como una alternativa novedosa para el tratamiento de las enfermedades hepáticas, en particular el uso de células madre mesenquimáticas (Bravo Neira et al., 2019; Martínez Carreño et al., 2018).

1.5 Células madre mesenquimáticas

Las células madre mesenquimáticas (MSC) son células indiferenciadas adultas, que tienen alto potencial de proliferación *in vitro*, así como la capacidad de diferenciarse a células del linaje mesodérmico.

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha establecido los siguientes requisitos para definir a las MSC de origen humano (Dominici et al., 2006).

. Adherirse al plástico y proliferar en condiciones básicas de cultivo.

. En ensayos *in vitro* y bajo protocolos de estímulo definidos, diferenciarse en adipocitos, osteocitos o condrocitos.

. Expresar marcadores de superficie como CD29, CD13, CD105, CD73 y CD90.

. No presentar marcadores de superficie característicos de otros linajes celulares como CD235a, CD31 y CD45.

Originalmente se postuló que el principal mecanismo de acción de las MSC para promover la regeneración tisular consistía en su capacidad de llegar a los tejidos lesionados y diferenciarse en células del parénquima, sin embargo, en la actualidad se ha llegado al consenso de que una vez administradas, ya sea en forma local o sistémica, las MSC generan un microambiente pro-regenerativo mediante la secreción paracrina de factores, a los que se denominado secretoma (Fiore et al., 2018; Kusuma et al., 2017; Ratajczak, 2017; Katagiri et al., 2022).

Los constituyentes principales del secretoma (también denominado medio condicionado) incluyen microvesículas (MVs) y un amplio espectro de proteínas solubles, compuestas principalmente por factores de crecimiento y citoquinas (HGF, IGF-I, IL-1b, IL-6, IL-10 y TGF- β1, etc.) (Vizoso et al., 2017).

Las MVs son una familia de estructuras subcelulares constituidas por membrana plasmática, que dependiendo su origen pueden clasificarse como exosomas o vesículas extracelulares. En su interior contienen moléculas bioactivas como proteínas, lípidos, mRNA y miRNAs (Lee Y et al., 2012).

Los resultados experimentales obtenidos tras el uso de secretoma de MSC pueden ser a raíz de una de las fracciones o a la combinación de ambos constituyentes (Vizoso et al., 2017).

De acuerdo con la bibliografía, los efectos observados después de la administración de MSC pueden ser categorizados bajo alguno de los siguientes mecanismos: *i)* efectos anti-apoptóticos y/o anti-necróticos y estimulación directa de la proliferación celular; *ii)* inmunomodulación y *iii)* estabilización del microambiente redox (Vizoso et al., 2017).

Por otro lado, ha sido descripto que las MSC son capaces de sensar el microambiente y cambiar el patrón de secreción de biomoléculas, de acuerdo con las necesidades especiales del tejido dañado.

En los últimos años se ha reportado que esta respuesta puede ser producida *in vitro* mediante el precondicionamiento de las MSC con diversos estímulos que reproducen algunos componentes de la lesión tisular y modulan su acción paracrina. Este proceso lleva a la sobre regulación de la expresión y secreción de

diversas moléculas necesarias para reducir el daño y/o inducir la regeneración tisular. En este sentido, ha sido reportado que la reprogramación de las MSC con hipoxia o agentes miméticos de hipoxia como Deferoxamina (DFX), estimula la secreción moléculas pro-angiogénicas y factores anti-apoptóticos (Oses et al., 2017). En el mismo sentido, el uso de LPS o IFN-γ induce la secreción de moléculas con actividad anti-inflamatoria (Quintanilla et al, 2019). De esta forma, este tipo de estrategias, podrían ser utilizadas para inducir la producción y secreción de una combinación y relación apropiada de factores tróficos específicos para una patología determinada, aumentando la efectividad de la terapia.

El uso de secretoma derivado de MSC (MSC-S) proporciona ventajas clave sobre las aplicaciones basadas en MSC vivas: (a) resuelve consideraciones de seguridad, como la formación de émbolos y transmisión de infecciones (Ankrum, 2010); (b) su dosificación y potencia puede ser estandarizado de mejor manera (c); su almacenamiento puede realizarse en lotes, sin pérdida de la actividad biológica del producto por un tiempo razonable y con la disponibilidad de uso inmediato para el tratamiento de afecciones agudas (Konala et al., 2016; Webber & Clayton, 2013); (d) su producción es más económica, dado que las células pueden ser usadas en más de una ronda de producción y su administración clínica requiere instalaciones más simples; (e) el producto biológico puede modificarse para obtener composiciones definidas, más efectivas para distintas patologías (Oses et al, 2017).

1.6 Secretoma derivado de MSC precondicionadas como una alternativa para el tratamiento del ACLF

Teniendo en cuenta que el ACLF se caracteriza por una respuesta inflamatoria exacerbada, y la capacidad de las MSC de modular la respuesta inmune, en el Centro de Medicina Regenerativa de la Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo, ha sido implementado un protocolo de precondicionamiento *in vitro* de MSC humanas derivadas de tejido adiposo, mediante la incubación con TNF-α/INFγ (Quintanilla et al, 2019), el cual induce un aumento significativo en la expresión y secreción de componentes anti-inflamatorios como IL-5, IL-10, TGF-B1, IDO y TSG6 (Ezquer F et al., 2019).

Alternativamente, se estableció un modelo de ACLF en ratas, en el cual se indujo la falla crónica (cirrosis) mediante la administración intra peritoneal (*i.p*) de suero porcino 2 veces por semana, durante 11 semanas. Posteriormente se indujo la falla aguda mediante la administración de Lipopolisacárido (LPS) intravenosa (*i.v.*) y D-galactosamina (D-Gal) (*i.p.*). (F. Li et al., 2017). Este modelo experimental de ACLF reproduce la respuesta inflamatoria exacerbada que se observa en humanos y presenta una mortalidad del 80% en las ratas con ACLF dentro de las 72 horas de inducida la falla aguda.

En el laboratorio se evaluó la administración sistémica de MSC-S, 30 minutos después de inducida la falla aguda. Los animales que recibieron secretoma derivado de MSC precondicionadas con TNF-α/INFγ mostraron un aumento significativo en la supervivencia (20% en ACLF vs. 65% en ACLF + MSC-S). Este efecto en los

animales tratados con MSC-S, se vio acompañado de un incremento de la expresión hepática de citoquinas anti-inflamatorias y disminución de la tasa de apoptosis de los hepatocitos (Huang et al., 2021) .

Como primera aproximación, para identificar las moléculas presentes en el MSC-S responsables del efecto observado, se realizó la proteómica comparativa (MSC naive *vs.* MSC precondicionadas) junto con la identificación de los miRNA. En estos estudios, se utilizaron secretomas provenientes de MSC de tres donantes, encontrando una homología en cantidad e identidad de los componentes superior al 80%. Se identificaron más de 300 proteínas y 250 miRNA, muchos de los cuales podrían mediar en forma directa o indirecta los efectos terapéuticos observados.

1.7 Sistemas in vitro de screening

Algunos trabajos de análisis de datos han comenzado a diseñar redes de interacción molecular que permitirían realizar una primera aproximación, tanto para identificar las moléculas responsables de los efectos terapéuticos observados en los modelos pre-clínicos, como las vías de señalización blanco en el huésped (Zhang J et al., 2021).

Si bien estas aproximaciones *in silico* son muy útiles para identificar la/las moléculas candidatas responsables de mediar los efectos observados, finalmente son los estudios funcionales, los que permiten confirmar su participación. Teniendo en cuenta la complejidad y costo que implica establecer el modelo animal de ACLF, es que, en el presente trabajo, se buscó establecer un sistema *in vitro* más práctico y económico, que permita un sistema inicial de búsqueda de moléculas candidatas, antes de su confirmación en el modelo animal.

Para establecer el modelo *in vitro* se evaluaron distintos protocolos de cultivo de hepatocitos, ya que estas representan las células más abundantes del parénquima hepático, y monocitos, células del sistema inmune generadas en la médula ósea, que se encuentran en la circulación y migran a los tejidos lesionados, donde se diferencian a macrófagos (Varol et al., 2009). Complementariamente se utilizaron células de Kupffer, macrófagos residentes, las cuales son las células más numerosas del sistema inmune en el hígado y cumplen funciones esenciales para la homeostasis hepática (Triantafyllou et al., 2018). Tanto los monocitos como los macrófagos tienen un rol fundamental en la respuesta inflamatoria inicial del ACLF (Triantafyllou et al., 2018).

A partir de estos antecedentes, nos planteamos el establecimiento de un sistema de cultivo transwell monocito/hepatocito y macrófago/hepatocito que permita desarrollar una respuesta inflamatoria, que afecte la viabilidad de los hepatocitos. Mientras que la presencia de MSC-S en el medio de cultivo prevendría esta respuesta, para lo cual se estableció la siguiente hipótesis de trabajo:

2. HIPÓTESIS

La administración de secretoma derivado de células madre mesenquimáticas humanas precondicionadas, induce una respuesta hepatoprotectora y anti-inflamatoria, en un modelo *in vitro* de co-cultivo monocito/hepatocito y macrófago/hepatocito.

3. OBJETIVO GENERAL

Establecer un modelo *in vitro* de co-cultivo monocito/hepatocito y macrófago/hepatocito que permita evaluar el efecto hepatoprotector y anti-inflamatorio del secretoma derivado de MSC humanas.

4. OBJETIVOS ESPECIFICOS

4.1 Determinar si la administración de MSC-S en el medio de cultivo aumenta la sobrevida de los hepatocitos y disminuye la respuesta inflamatoria en un sistema de cultivo transwell compuesto por monocitos/hepatocitos

4.1.1. Establecer un protocolo de cultivo y estímulo inflamatorio para los monocitos.

4.1.2. Evaluar si la administración de MSC-S aumenta la sobrevida de los hepatocitos en el sistema de cultivo transwell monocito/hepatocito.

4.1.3. Evaluar si la administración de MSC-S disminuye la respuesta inflamatoria en el sistema de cultivo transwell monocito/hepatocito.

4.2. Determinar si la administración de MSC-S en el medio de cultivo aumenta la sobrevida de los hepatocitos y disminuye la respuesta inflamatoria en un sistema de cultivo transwell compuesto por macrófagos/hepatocitos.

4.2.1 Establecer un protocolo de diferenciación de monocitos a macrófagos.

4.2.2. Evaluar si la administración de MSC-S aumenta la sobrevida de los hepatocitos en un sistema transwell macrófagos/hepatocitos.

4.2.3. Evaluar si la administración de MSC-S disminuye la respuesta inflamatoria en el sistema de cultivo transwell macrófagos/hepatocitos.

En caso de poder aprobar nuestra hipótesis de trabajo, contaremos con un sistema *in vitro* de screening en el que evaluar el efecto hepatoprotector de alguno/s componentes presentes en el secretoma derivado de las MSC precondicionadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Expansión y estimulación de células madre mesenquimáticas humanas derivadas de tejidoadiposo

Para la expansión de células madre mesenquimáticas humanas derivadas de tejido adiposo (MSC) y obtención del secretoma, se descongelaron criotubos con $2x10^6$ células en pasaje 3, en un baño termorregulado a 37°C. Se resuspendieron en medio de cultivo mínimum esential medium alpha (α-MEM) (Gibco #12000022) suplementado con 15% de suero fetal bovino (FBS) (HyClone #SH3039603) y 0,16 mg/ml de gentamicina (Sanderson #75MF0990), que se centrifugó a 400 g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se homogenizó el pellet en medio α-MEM, y se sembraron en dos botellas de cultivo T-175 (Falcon #353112).

Las células se incubaron por 3 días a 37°C con 5% CO2. Cuando alcanzaron una confluencia del 80%, (al tercer día) se lavaron las botellas de cultivo con 5 ml de PBS (Gibco #70011-044), se aspiró el PBS 1X y se agregó tripsina 0,25x (Gibco #15400054), dejándolas incubar a 37°C con 5% CO2 por 7 minutos. Una vez que se despegaron las células, la tripsina fue inactivada mediante la adición de α-MEM suplementado con 10% de FBS. Se recuperaron las células, llevándolas a un tubo Falcon para centrifugarlas a 400 g por 10 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron en α-MEM suplementado con 10% de FBS para luego sembrarlas en 5 botellas de cultivo por 4 días hasta obtener una confluencia del 80%. Las células obtenidas se contaron en cámara de Neubauer y se sembraron a una densidad 120.000 células por placa de 10 cm (Corning) (200 placas) con α-MEM suplementado con 10% de FBS y se incubaron por 3 días.

Para la estimulación se utilizaron las citoquinas TNF-α (210-TA; R&D Systems) e IFN-γ (285-IF; R&D Systems) previamente reconstituidas, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se aspiró el sobrenadante a las placas con MSC y se le agregó a cada placa 5 ml α-MEM suplementado con 10% FBS más 10 ng/mL de TNF-α y 15 ng/mL de IFN-γ. Posteriormente se estimularon por 40 horas. a 37°C con 5% CO2. Finalizada la estimulación se aspiró el medio de cultivo para realizar 2 lavados con 10 ml de Buffer fosfato salino (PBS) 1x y se dejó incubar por 2 días con 5,5 ml de α-MEM sin rojo fenol (Gibco #02891/41061-029), FBS o gentamicina.

Para la recolección del secretoma estimulado con citoquinas, se recuperó el medio de cada placa en tubos Falcón y se centrifugó a 400g por 10 minutos.

Se traspasó el sobrenadante a un nuevo falcon de 50 ml y se centrifuga a 5000g por 30 minutos, para luego filtrar el sobrenadante con pirinolas de 0,2 µM. El secretoma fue concentrado 30 veces V/V utilizando filtros Amicon con poros de 3kDa, se realizaron alícuotas con el secretoma proveniente de $1x10^6$ MSC y se congeló a -80°C hasta su uso.

5.2 Líneas celulares.

Se utilizó la línea monocítica humana THP-1 entre los pasajes 7 al 14, la cual fue cultivada en suspensión en medio Dulbecco´s modified Eagle´s medium (DMEM) Sigma (Cat D6429-1L) con 10% de FBS y 0,16 mg/ml

de gentamicina y se incubaron a 37°C y 5% CO2.

Como línea celular hepática se utilizaron las células HepG2 entre los pasajes 6-16. Estas células derivan de un carcinoma hepatocelular (ECCA N°85011430), y fueron cultivadas en DMEM suplementado con 10% de FBS y 0,16 mg/ml de gentamicina a 37°C y 5% CO2.

5.3 Estimulación de monocitos.

Se cultivaron 400.000 células THP-1 por pozo en una placa de 24 pocillos en medio en DMEM suplementado con 10% de FBS y 0,16 mg/ml de gentamicina a 37°C y 5% CO2.

Luego de 24 horas se cambió el medio de cultivo para eliminar las células muertas, agregándoles el medio nuevo con los estímulos. Las células fueron estimuladas con LPS en las dos concentraciones más reportadas en la literatura 1 µg/ml y 0,01 µg/ml (Granitzny et al., 2017), para luego por qPCR medir los niveles de expresión de IL-8, IL-6 y TNF-α.

Estos estímulos fueron incubados por 24 horas, ya que, en el modelo animal de ratas con ACLF utilizado por la Universidad del Desarrollo, demostró que este es el tiempo suficiente para saber si el animal sobrevivirá o no.

5.4 Protocolo de estímulo de Monocitos y evaluación del efecto del MSC-S.

Se cultivaron 400.000 células THP-1 por pozo en una placa de 24 pocillos en medio en DMEM suplementado con 10% de FBS y 0,16 mg/ml de gentamicina a 37°C y 5% CO2. 24 horas después ocurre la activación y el tratamiento con MSC-S, donde se volvió a cambiar el medio de cultivo, esta vez utilizando medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 0,16 mg/ml de gentamicina sin FBS,, a 37°C y 5% CO2.

Las células fueron estimuladas con dos concentraciones de LPS 1 µg/ml y 0,01 µg/ml (Granitzny et al., 2017). Y se evaluó el MSC-S derivado de MSC obtenidas de 2 donantes (MSC-S 1 y MSC-S 2). En todos los experimentos realizados, se utilizó el secretoma concentrado de 1x10^6 MSC para estimular 12x10^6 de células (Quintanilla et al, 2019). Posteriormente se evaluó el nivel de expresión de IL-8, IL-6 y TNF-α por RT-qPCR.

Se establecieron los siguientes grupos experimentales de acuerdo con el estímulo que recibió durante 24 horas cada uno de los monocultivos.:

Grupo 1: Control (DMEM sin estimulo)

Grupo 2: MSC-S 1

Grupo 3: MSC-S 2

Grupo 4: LPS 1 ug/ml

Grupo 5: LPS 0,01 ug/ml

Grupo 6: LPS 1 ug/ml + MSC-S 1

Grupo 7: LPS 0,01 ug/ml + MSC-S 1

Grupo 8: LPS 1 ug/ml + MSC-S 2

Grupo 9: LPS 0,01 ug/ml + MSC-S 2

Los sobrenadantes se extrajeron y se guardaron a -80°C, mientras que a las células HepG2 adheridas se les adiciono Trizol para realizar extracción de ARN.

5.5 Diferenciación de monocitos a macrófagos.

Para la diferenciación de las células THP-1 a macrófagos se evaluaron 2 protocolos reportados previamente en la literatura.

Protocolo 1 (Lund et al., 2016): Se cultivaron 400.000 células por pozo en una placa de 24 pocillos con forbol 12- miristato 13-acetato (PMA) 25 nM en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de FBS y 0,16 mg/ml de gentamicina a 37°C y 5% CO2 durante 48 horas. (periodo de diferenciación).

Protocolo 2 (Pinto et al., 2020): Se cultivaron 400.000 células por pozo en una placa de 24 pocillos con PMA 50 nM en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de FBS y 0,16 mg/ml de gentamicina a 37°C y 5% CO2 durante 72 horas. (periodo de diferenciación).

Terminando el periodo de diferenciación, en ambos protocolos, las células se dejaron en reposo, en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% FBS y 0,16 mg/m de gentamicina por 24 horas. Se observó que el 99% de las células presentaron un fenotipo adherente y mostraron una morfología típica de los macrófagos.

5.6 Protocolo de activación de macrófagos.

Para la activación de los macrófagos, se realizó un lavado con 1 ml de PBS y se agregó 500 µl de medio DMEM sin rojo fenol ni FBS, suplementado con 0,16 mg/ml de gentamicina.

Se evaluaron 2 estímulos de activación i) LPS y LPS IFN-y˙en dos concentraciones reportadas en la literatura

Estímulo 1: LPS 1 µg/ml y LPS 0,01 µg/ml (Granitzny et al., 2017; Rose et al., 2016).

Estímulo 2: LPS 0,1 µg/ml + IFN-y˙20 ng/ml y LPS 0,01 µg/ml + IFN-y˙20 ng/ml (Baxter et al., 2020).

Las células se dejaron a 37°C y 5% CO2 por 24 horas. con los medios para activación, para luego analizar la expresión de IL-6, IL-8 y TNF-α por RT-qPCR.

5.7 Evaluación de marcadores de superficie por citometría de flujo.

Para confirmar la diferenciación de las células THP-1 a macrófagos, se evaluó la presencia de marcadores específicos de cada fenotipo celular, por citometría de flujo. Se recuperaron los monocitos THP-1 y macrófagos, agregando acutasa para despegarlos de la placa de cultivo (solo en el caso de los macrófagos). Luego, las células fueron centrifugadas a 600g por 5 minutos a 4°C, y resuspendidas en 50 ul de PBS 1X suplementado con 2% de FBS. Se agregó 1 µl de Fc Block a cada tubo (human trustain FCX; Biolegend #422301) y se dejó incubando por 20 minutos a 4°C.

Luego se lavó con 500 µl de PBS 1X suplementado con 2% de FBS, se centrifugó a 600g por 5 minutos a 4°C,

se botó el sobrenadante y se resuspendió en 50 µl de mix de PBS 1X suplementado con 2% de FBS y los anticuerpos correspondientes (Tabla 1), para luego incubar por 20 minutos a 4°C en oscuridad.
Se volvió a lavar con 500 µl de PBS 1X suplementado con 2% de FBS, se botó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de PBS suplementado con 2% de FBS.
Las muestras fueron filtradas con NITAL y adquiridas en un citómetro (Cyan ADP).

Marcador	Código	Fluoróforo	Marca
CD11b	301305	PE	Biolegend
CD32	303113	PECy7	Biolegend
Fc Block	422301		Biolegend

Tabla 1: Tabla de anticuerpos utilizados para citometría de flujo, con sus respectivos códigos, fluoróforos y marca.

5.8 Extracción de ARN y RT-qPCR

Para la extracción de ARN se utilizó el reactivo trizol (Invitrogen #15596026) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se adicionó 500 µl de trizol por cada pocillo con células, dejando a temperatura ambiente por 5 minutos, luego se agregó 100 µl de cloroformo y se agitó por 30 segundos, dejándolo a t° ambiente por 3 minutos para luego centrifugar a 12000 g por 15 minutos a 4°C, esto permite que el homogeneizado se separe en una capa acuosa superior y clara (que contiene ARN), una interfase (fracción proteica) y una capa orgánica inferior roja (que contiene el ADN). Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo eppendorf y se agregó 250 µl de isopropanol, se agitó los tubos suavemente, precipitando el ARN, para luego guardarlos a -20°C por un mínimo de1 hora.
Posteriormente, se centrifugó a 12000g por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 500 µl de etanol al 75%, para luego centrifugar a 7500g por 5 minutos a 4°C. Nuevamente se descartó el sobrenadante y se colocaron los tubos boca abajo para así eliminar todos los restos de etanol. Posteriormente, se adicionó 15 µl de H_2O libre de nucleasas, se calentó a 60°C por 5 minutos, se resuspendió y se guardó a -20°C hasta su uso. La cuantificación de ARN extraído se realizó con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo).
Luego de haber procesado el ARN precipitado, se eliminaron los posibles restos de ADN contaminante utilizando el protocolo de digestión con DNasa 1 (Invitrogen #18068-015) siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, se realiza una reacción que contiene 1 µg de ARN cuantificado, 1 µl de Buffer 10x, 1 ul de Dnasa y H2O libre de nucleasa hasta un volumen final de 10 µl. La mezcla se mantiene a 25°C por 15 minutos, para luego agregarle 1 µl de EDTA 25 mM y calentarlo por 10 minutos a 65°C inactivando la Dnasa 1.
Para la obtención de cDNA se utilizó el kit MMLV reverse transcriptase (Invitrogen), donde a cada muestra de RNA se le adicionaron 2 ul de Oligo DT y se calentó a 70°C por 10 minutos, a continuación a cada muestra se le adiciono 9 ul de una reacción que incluía 1 ul de DNTP, 4 ul de Buffer 5X, 2 ul DTT, 1 ul de RNasa, 1

ul de M-MLVRT. La mezcla se calentó a 42°C por 60 minutos. Para inactivar la reacción se calentó a 70°C por 15 minutos. Las muestras se guardaron a -20°C.

La reacción de qPCR fue realizada usando el kit LC FS DNA Master SYBR Green (Roche), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se utilizaron primers específicos (Tabla 2), y un termociclador Ligth-Cycler 1.5 thermocycler (Roche). Se realizó el análisis de las curvas de melting para confirmar la presencia de solo un amplificado y se realizó un gel de agarosa para confirmar el tamaño del amplificado. La cuantificación relativa fue realizada por el método del Δ ΔCT como se ha descrito en la literatura (Schmittgen TD & Livak KJ, 2008) Los niveles de expresión fueron normalizados frente al nivel de expresión de GAPDH y albumina y expresados como veces de cambio en relación con el grupo control.

Nombre del amplificado	Sense	Antisense
IL-6	cct gaa cct tcc aaa gat ggc	ttca cca ggc aag tct cct ca
Gapdh	ctg ggc tac act gag cac c	aag tgg tcg ttg agg gca atg
IL-8	ttt tgc caa gga gtg cta aag a	aac cct ctg cac cca gtt ttc
IL-10	tac ggc gct gtc atc gat tt	cac tca tgg ctt tgt aga tgc ctt
Lipocalina 2	cca cct cag acc tga tcc ca	ccc ctg gaa ttg gtt gtc ctg
Bax	ccc gag agg tct ttt tcc gag	cca gcc cat gat ggt tct gat
Bcl-xl	gag ctg gtg gtt gac ttt ctc	agg gac tga atc gga gat gga
Albúmina	ttt atg ccc cgg aac tcc ttt	agt ctc tgt ttg gca gac gaa
TNF-α	cct ctc tct aat cag ccc tct g	gag gac ctg gga gta gat gag
IL-5	acc ttg gca ctg ctt tct act	ccc ctt gca cag ttt gac tc
Bcl-2	ggt ggg gtc atg tgt gtg g	cgg ttc agg tac tca gtc atc c

Tabla 2: Secuencia de los primers utilizados para la rt-qPCR

5.9 Co-cultivo Transwell de monocitos THP-1 y hepatocitos HepG2.

Utilizamos el protocolo descripto por Granitzny et al (Granitzny et al., 2017). Se sembraron 500.000 células HepG2 en el compartimiento inferior del sistema Transwell, en una placa de 12 pocillos, en medio DMEM suplementado con 0,16 mg/ml de gentamicina con FBS y sin rojo fenol,, a 37°C y 5% CO2.

24 horas después se cambió el medio de cultivo, para eliminar las células hepáticas que no se adhirieron, y se sembraron 50.000 células THP1 en el compartimiento superior del sistema Transwell, ya que la relación entre monocitos y hepatocitos en condiciones basales en el hígado es de 1:10 (Jaeschke et al., 2007) Las células se separaron mediante una membrana con poros de 3 micrones que permitió el intercambio de producto de secreción. El volumen de medio utilizado en el compartimiento superior fue de 0,5 ml, mientras que en el inferior se utilizó 1,5 ml, dando un volumen total de 2 ml.

24 horas después ocurre la activación, donde se volvió a cambiar el medio de cultivo, esta vez utilizando medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 0,16 mg/ml de gentamicina sin FBS, a 37°C y 5% CO2.

Se establecieron los siguientes grupos experimentales de acuerdo con el estímulo que recibió cada uno de los

co-cultivos:

Grupo 1: Control (DMEM sin estimulo)

Grupo 2: LPS 1 ug/ml

Grupo 3: LPS 0,1 ug/ml

Grupo 4: LPS 1 ug/ml + MSC-S

Grupo 5: LPS 0,1 ug/ml + MSC-S

Grupo 6: MSC-S

Los estímulos fueron mantenidos durante 24 horas y los sobrenadantes se extrajeron y guardaron a -80°C, mientras que a las células HepG2 adheridas se lesadiciono Trizol para realizar extracción de ARN.

5.10 Co-cultivo Transwell de macrófagos y hepatocitos HepG2.

Se sembraron 3,5 x 10^5 células THP1 en el compartimiento superior del sistema Transwell (12 pocillos), donde fueron diferenciadas a macrófagos utilizando protocolo 1 (ver sección 5.4). Dos días después se sembraron 7,5 x 105 células HepG2 en el compartimiento inferior, todo esto en medio DMEM suplementado con 0,16 mg/ml de gentamicina sin FBS y sin rojo fenol a 37°C y 5% CO2. El volumen de medio utilizado en el compartimiento superior fue de 0,5 ml, mientras que en el inferior se utilizó 1,5 ml, dando un volumen total de 2 ml.

La proporción de macrófagos y hepatocitos en el hígado es aproximadamente 1:4, pero para nuestro modelo se utilizó la proporción 1:2, ya que en la literatura se describe que el sistema de co-cultivo logra una mayor producción de citoquinas en presencia de LPS y reproduciría una condición de inflamación aguda (Jaeschke et al., 2007).

El día de activación, se evaluaron los siguientes grupos experimentales, estimulados durante 24 horas:

Grupo 1: Control (DMEM sin estímulo)

Grupo 2: LPS 1 µg/ml

Grupo 3: LPS 0,1 µg/ml e IFNγ 20 ng/ml (Baxter et al., 2020)

Los sobrenadantes se extrajeron y se guardaron a -80°C, mientras que a las células HepG2 adheridas se les adicionó Trizol para realizar extracción de ARN.

5.11 Evaluación de la liberación de lactato deshidrogenasa.

Se realizó el ensayo CytoTox-ONETM (Promega # G7890) el cual es un método fluorométrico homogéneo para estimar el número de células que sufrieron lisis de su membrana celular (necrosis) presentes en las placas. Este mide la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de las células con una membrana dañada. Al sobrenadante extraído de los ensayos anteriores, se le adicionó el mix de reacción en pocillo de placa negra en relación 1:1, luego de 10 minutos a temperatura ambiente se adiciona solución stop en relación 1:2 (50 µl de solución stop en 100 µl de medio de cultivo). Se midió la fluorescencia a 560/590 nm utilizando el dispositivo Modulus Microplate.

5.12 Análisis estadístico

Las evaluaciones estadísticas se realizaron utilizando el software GraphPad Prism.

Para todos los experimentos se utilizó ANOVA ONEway con un pos-test Sidak´s y la significancia se estableció en $p < 0,05$, todos los datos se presentan como media ± STD. Los análisis estadísticos y el n de cada grupo experimental se presentan en la leyenda de las figuras. Los experimentos se repitieron al menos 3 veces.

RESULTADOS

Objetivo específico 1: Determinar si la administración de MSC-S en el medio de cultivo aumenta la sobrevida de los hepatocitos y disminuye la respuesta inflamatoria en un sistema de cultivo transwell

Objetivo específico 1.1: Establecer un protocolo de cultivo y estímulo inflamatorio para los monocitos

Como fue mencionado previamente, los monocitos tienen un rol fundamental en el inicio y propagación de la respuesta inflamatoria. Es ese sentido, en la literatura encontramos diversos protocolos de activación, basados principalmente en el uso de distintas concentraciones de LPS (Granitzny et al., 2017).

Como un primer paso, para establecer un modelo *in-vitro* de co-cultivo monocito/hepatocito, estandarizamos el protocolo de cultivo y estímulo de monocitos, para lo cual utilizamos la línea celular de monocitos humanos THP-1. Se evaluó la respuesta inflamatoria después del estímulo con 2 concentraciones de LPS, 1 µg/ml y 0,01 µg/ml, lo que simula la infección bacteriana, que puede desencadenar la respuesta inflamatoria aguda (Granitzny et al., 2017) (figura 1). Como indicador del proceso de activación, evaluamos la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-8 y TNF-α, después de 24 y 48 horas de incubación.

El nivel de expresión de las 3 citoquinas aumentó con respecto al grupo control con las dos concentraciones de LPS estudiadas. Se observó una expresión dosis dependiente a las 24 horas, mientras que a las 48 horas si bien se mantiene un aumento de la expresión, no se encontraron diferencias entre las dos concentraciones de LPS utilizadas.

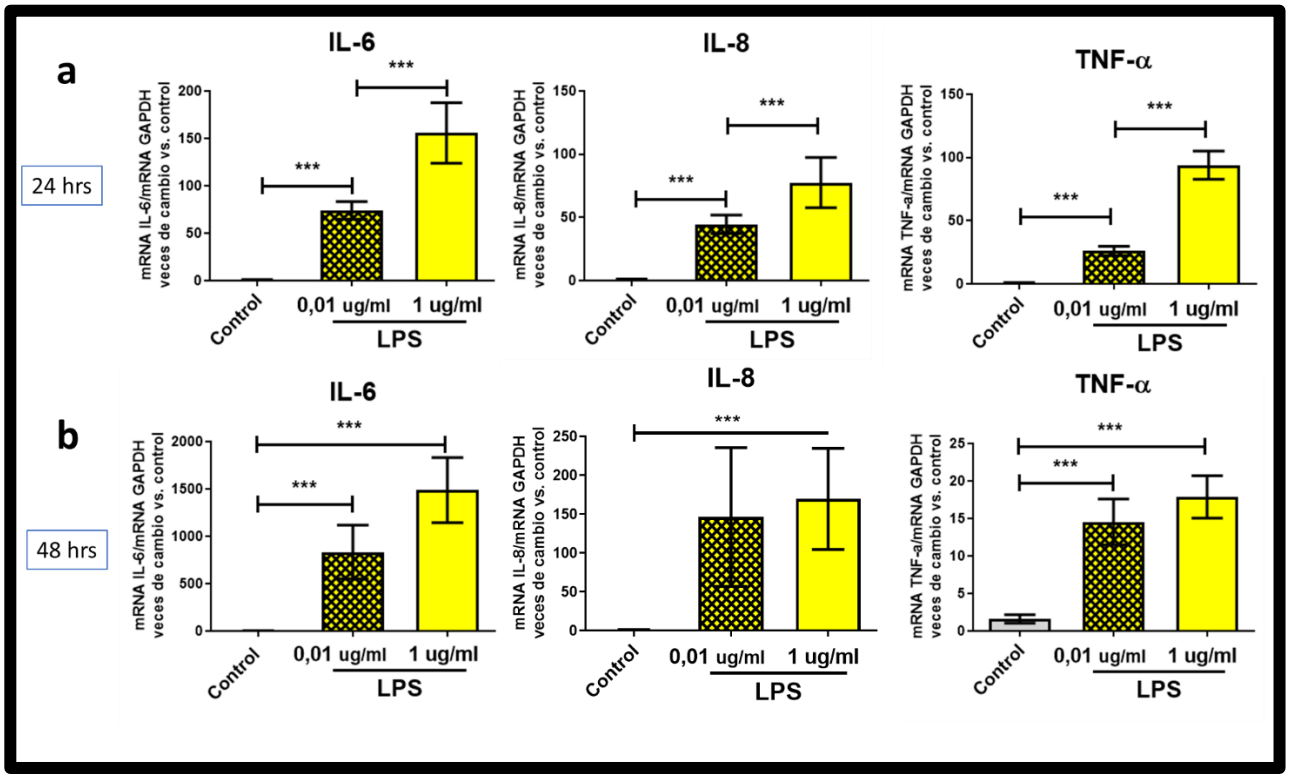

Figura 1: El estímulo de células THP-1 con LPS indujo un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. La línea de monocitos humanos THP-1, fue estimulada con 2 concentraciones de LPS (0,01 µg/ml y 1 µg/ml). La expresión de IL-6, IL-8 y TNF-α fue evaluada por RT-qPCR después de (a) 24 horas y (b) 48 horas de estímulo. Los resultados fueron normalizados por la expresión de GAPDH y expresados como veces de cambio con respecto al grupo control. Las barras representas la media ± STD n=4. ($p<0,05$)

El aumento dosis dependiente de la expresión de las tres citoquinas estudiadas tras 24 horas de estímulo con LPS, nos permitió validar el protocolo utilizado a continuación.

Objetivo específico 1.2: Evaluar si la administración de MSC-S aumenta la sobrevida de los hepatocitos en el sistema de cultivo transwell monocito/hepatocito.

Una vez establecido el protocolo de estímulo de los monocitos THP-1, realizamos el co-cultivo en sistema transwell, para determinar si el MSC-S tiene un efecto hepatoprotector en el modelo *in vitro* propuesto, 50.000 células THP-1 activadas con LPS (1 µg/ml) fueron incubadas en el compartimento superior del sistema transwell con 500.000 células de la línea hepática HepG2 en el compartimento inferior, en presencia o no de MSC-S. Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, la relación de monocitos y hepatocitos es 1:10, reproduciendo la condición basal de un hígado. (Jaeschke et al., 2007).

Se ha descrito que el proceso de apoptosis/necrosis induce daño de la membrana plasmática produciendo la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio, por lo cual, un mayor nivel de LDH en el medio de cultivo, se correlaciona con mayor índice de muerte celular (Santaló et al, 2003).

En el mismo sentido, Bax y Bcl-2 corresponden a una familia de proteínas que constituyen un punto clave en la vía intrínseca de la apoptosis celular, mientras que Bax tiene actividad pro-apoptótica, Bcl-2 tiene efectos anti-apoptóticos. Por lo cual, mientras mayor sea el nivel de la relación Bax/BCL2, habrá una mayor susceptibilidad a la apoptosis (Jeong et al., 2019; Nazeri et al., 2020; M. Park et al., 2018).

En el presente estudio, la muerte de los hepatocitos fue determinada mediante la cuantificación de la liberación de LDH en el medio de cultivo, mientras que la relación de la expresión de Bax/Bcl2, fue evaluada por RT-qPCR. Las células HepG2 en monocultivo en cada condición de cultivo, fueron utilizadas como control.

Como se observa en la figura 2 el sistema transwell representa una condición de estrés para las células hepáticas, dado que independientemente de la activación de las células THP-1 con LPS se observa un aumento significativo de la liberación de LDH al medio de cultivo. Interesantemente, la presencia de MSC-S, previno significativamente la liberación de LDH asociado a un menor número de células hepáticas dañadas en ambas condiciones (condición basal o LPS), indicando un posible efecto hepatoprotector del MSC-S.

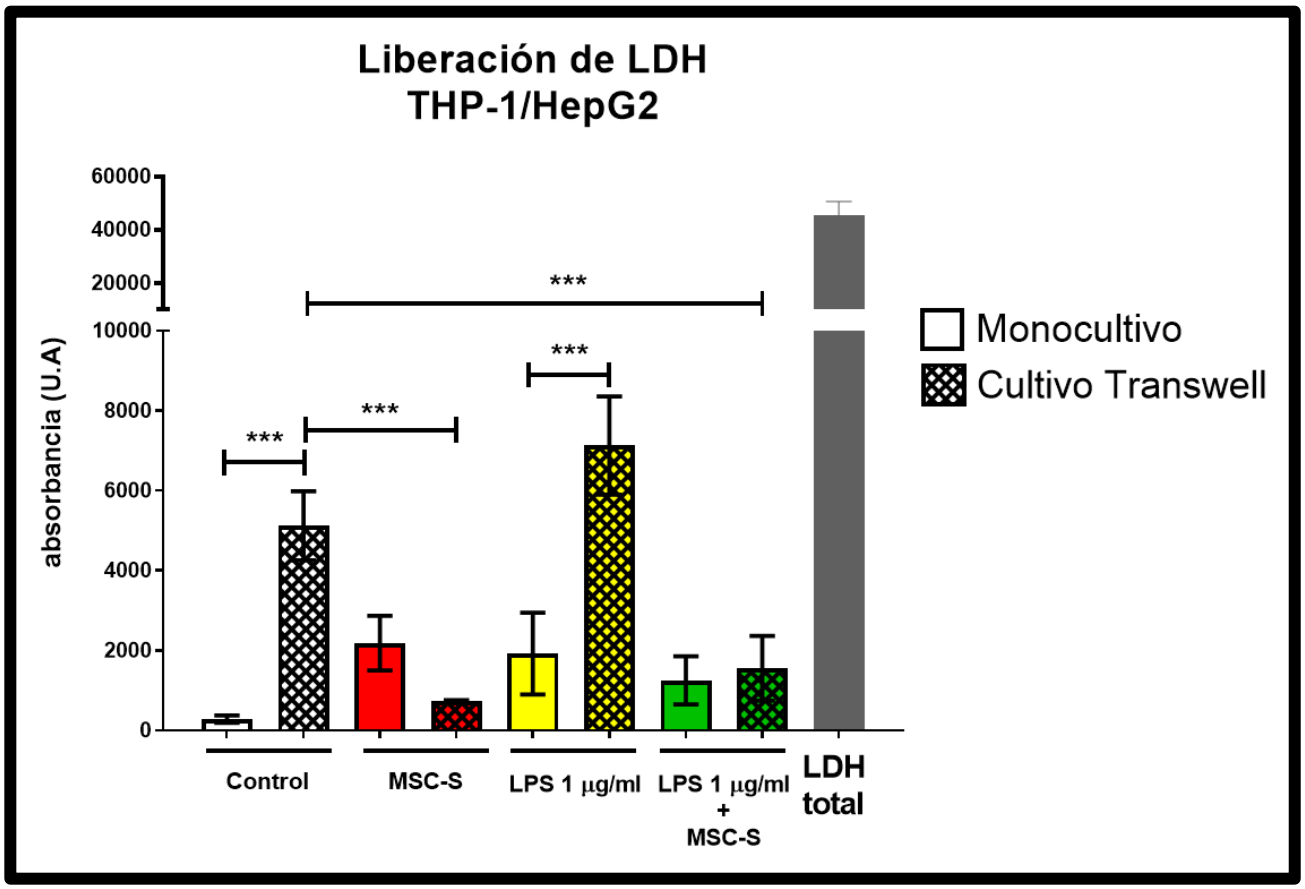

Figura 2: La incorporación de MSC-S reduce la liberación de LDH de las células hepáticas HepG2 en sistema co-cultivo transwell con monocitos THP-1: Monocitos (THP-1) fueron incubados (compartimento superior), con células hepáticas (HepG2) (compartimento inferior), en un sistema transwell que solo permite el intercambio de moléculas. Las células fueron tratadas con LPS 1 µg/ml solo o co-incubadas con MSC-S durante 24 horas. El nivel de LDH en el medio de cultivo se determinó utilizando el sistema de detección fluorimétrico Cyto Tox-ONETM. Como control, se utilizaron células hepáticas en monocultivo bajo las mismas condiciones de tratamiento. Mientras que células incubadas con tritón X-100 0.1% fueron utilizadas como control de la máxima liberación de LDH. Las barras representas la media ± STD n=4. ($p<0,05$).

Al analizar los niveles de expresión de Bax y Bcl-2 en las células hepáticas y establecer su cociente (indicador de apoptosis) (figura 3), pudimos apreciar una disminución de la relación (Bax/Bcl-2) en las células hepáticas en sistema transwell, independientemente del tratamiento al que fueron expuestas, incluyendo la presencia de MSC-S en el medio de cultivo.

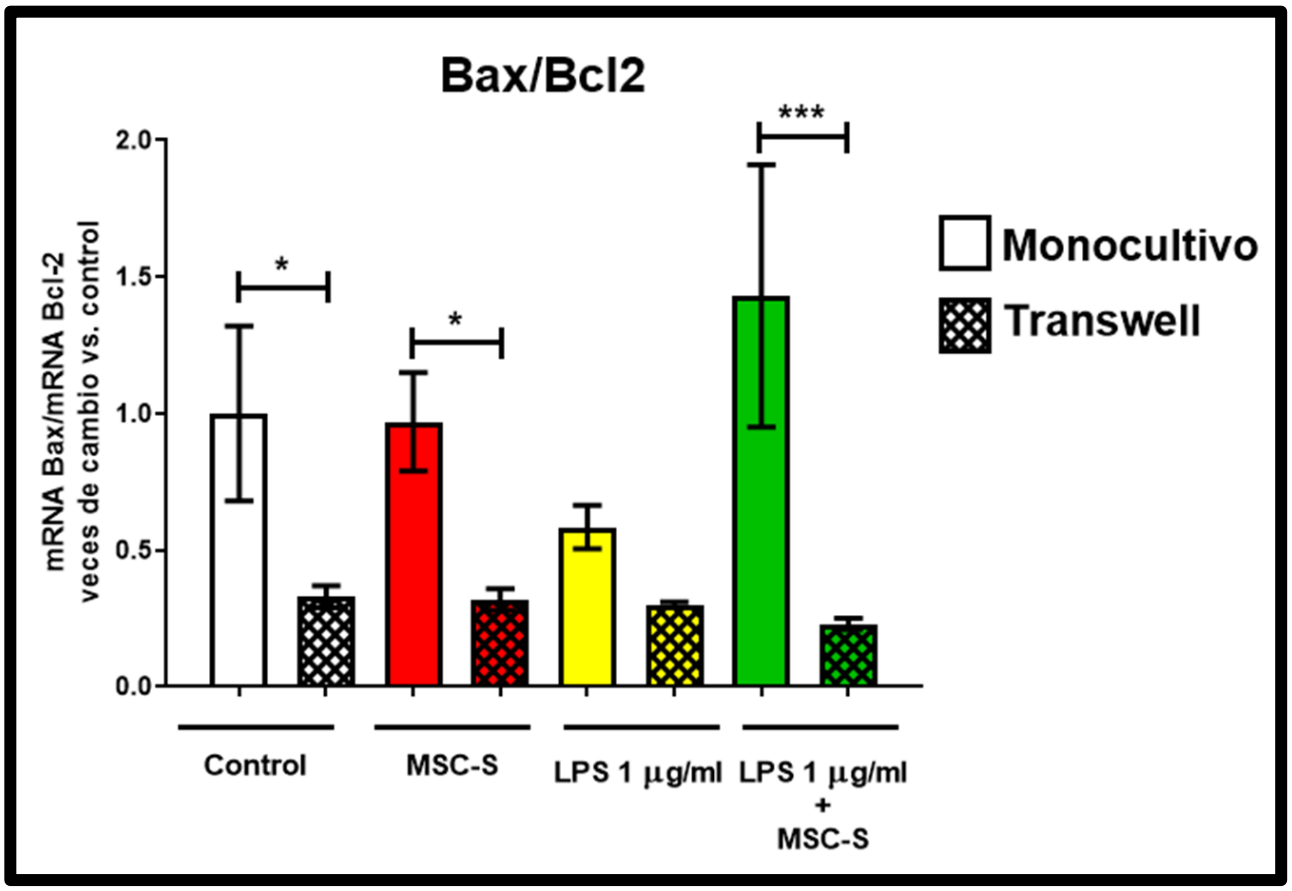

Figura 3: El MSC-S no produjo cambios en la relación de la expresión Bax/Bcl-2 de las células hepáticas HepG2 en sistema co-cultivo transwell con monocitos THP-1: Monocitos (THP-1) fueron incubados (compartimento superior), con células hepáticas (HepG2) (compartimento inferior), en sistema transwell que solo permite el intercambio de moléculas. Las células fueron tratadas con LPS 1 µg/ml solo o co-incubadas con MSC-S durante 24 horas. La relación de la expresión de Bax y Bcl-2 fue determinada por RT-qPCR, mientras que, como control, se utilizaron células hepáticas en monocultivo bajo las mismas condiciones de tratamiento. Las barras representas la media ± STD, y fue expresado como veces de cambio con respecto al grupo control. n=4. ($p<0,05$).

Finalmente, analizamos el nivel de expresión de Lipocalina 2 (LCN-2) en los hepatocitos. Esta proteína es secretada por hepatocitos en respuesta a un entorno pro-inflamatorio (IL-1b, IL-6 o TNF-α) o frente a moléculas pro-apoptóticas (LPS, ácido retinoico o glucocorticoides) regulando la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y reduciendo los niveles de caspasa-3 escindida, además ha sido asociada a un aumento de la proliferación celular y sobrevida de los hepatocitos (Borkham et al., 2013).

Como se puede observar en la figura **4** el cultivo en sistema transwell induce la expresión de LCN-2 en las células hepáticas independientemente del estímulo al que fueron sometidas. Sin embargo, este aumento es significativamente mayor en los grupos que fueron expuestos al MSC-S. Interesantemente, cuando observamos la expresión basal de los grupos de células hepáticas en monocultivo, también se observa un aumento significativo de la expresión de LCN-2 en las células hepáticas expuestas a MSC-S.

En concordancia con los resultados presentados en la figura **3** este resultado podría indicar que el sistema de co-cultivo transwell representa una condición de estrés para las células hepáticas, donde de acuerdo con lo

reportado en la literatura (Borkham et al., 2013), el aumento de la expresión de LCN-2 constituye una respuesta de defensa frente a esta condición. El hecho de que el MSC-S produzca un aumento en su expresión, aún en los cultivos 2D, podría indicar un efecto directo de algunos componentes del MSC-S sobre su expresión.

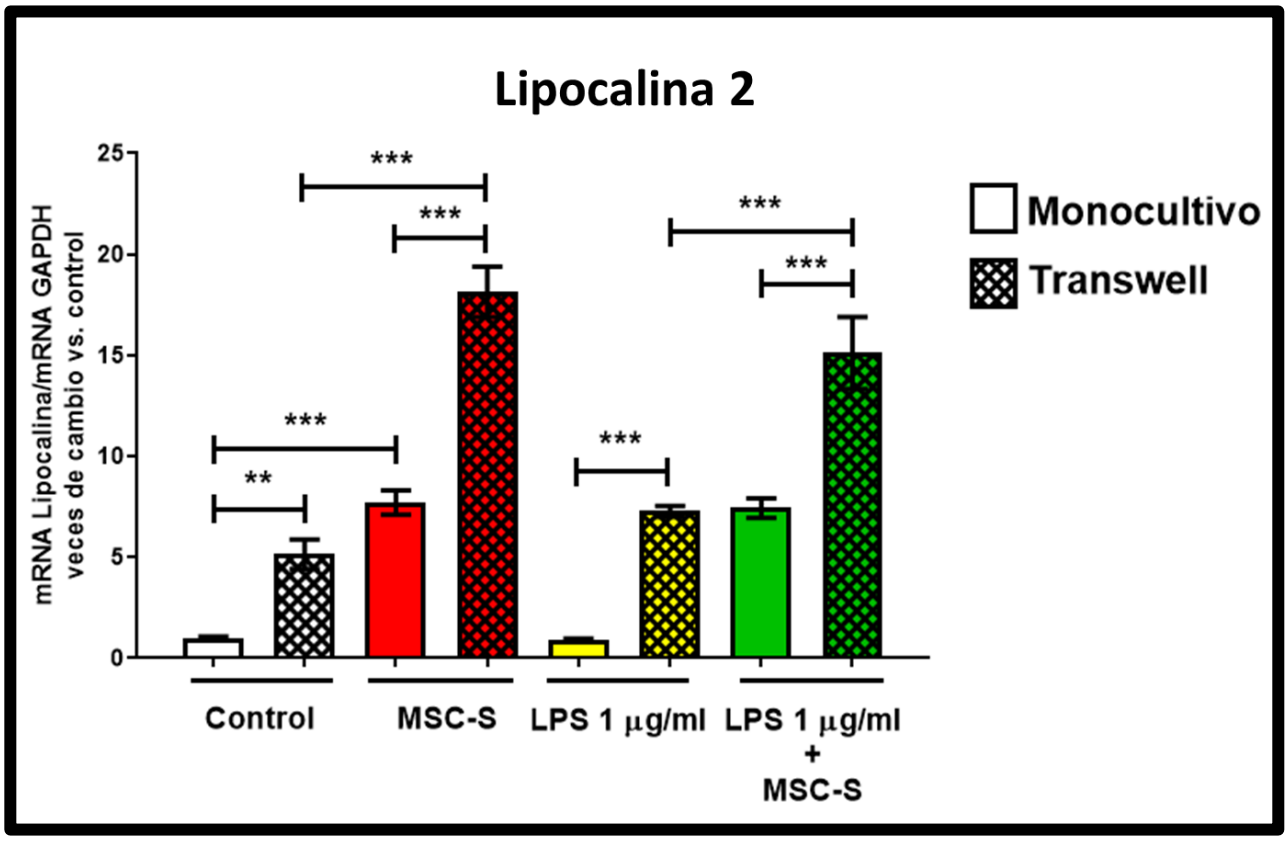

Figura 4: El MSC-S induce la expresión de Lipocalina 2 en las células Hepática HepG2: Monocitos (THP-1) fueron incubados (compartimento superior), con células hepáticas (HepG2) (compartimento inferior), en sistema transwell que solo permite el intercambio de moléculas. Las células fueron tratadas con LPS 1 µg/ml solo o co-incubadas con MSC-S durante 24 horas. La expresión de Lipocalina-2 fue determinada por RT-qPCR, mientras que, como control, se utilizaron células hepáticas en monocultivo bajo las mismas condiciones de tratamiento. Las barras representas la media ± STD, y se expresan como veces de cambio respecto al grupo control n=4. ($p<0,05$).

Objetivo específico 1.3 Evaluar si la administración de MSC-S disminuye la respuesta inflamatoria en el sistema de cultivo transwell monocito/hepatocito.

Para determinar si el MSC-S es capaz de reducir la respuesta inflamatoria, se evaluó la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias luego de la activacion de los monocitos THP-1, en el sistema de co-cultivo, en presencia de MSC-S. Sin embargo, el fondo permeable del compartimento superior, no perimitio recuperar el material suficiente para la cuantificación.

Alternativamente como una aproximacion experimental, evaluamos la modulacion de la expresion de IL-6, IL-8 y TNF-α en monocitos THP-1 expuestos a LPS con MSC-S en condiciones de cultivo 2D.

Sorpresivamente y en contra de los resultados que esperábamos, la presencia de MSC-S en el medio de cultivo produjo un aumento significativo en la expresión de IL- 6 e IL-8 con respecto a los grupos que tienen solo LPS

(figura 5). Para confirmar el resultado, y descartar que el efecto pudiera estar relacionado a la composición particular del secretoma utilizado, se evaluó el secretoma derivado de MSC de un segundo donante, con resultados similares.

Esto es concordante con los estudios de proteómica y caracterización de micRNA en el secretoma mencionados anteriormente, que indican una homología en composición y abundancia relativa de las moléculas, superior al 80% entre el secretoma obtenido de MSC provenientes de 3 donantes.

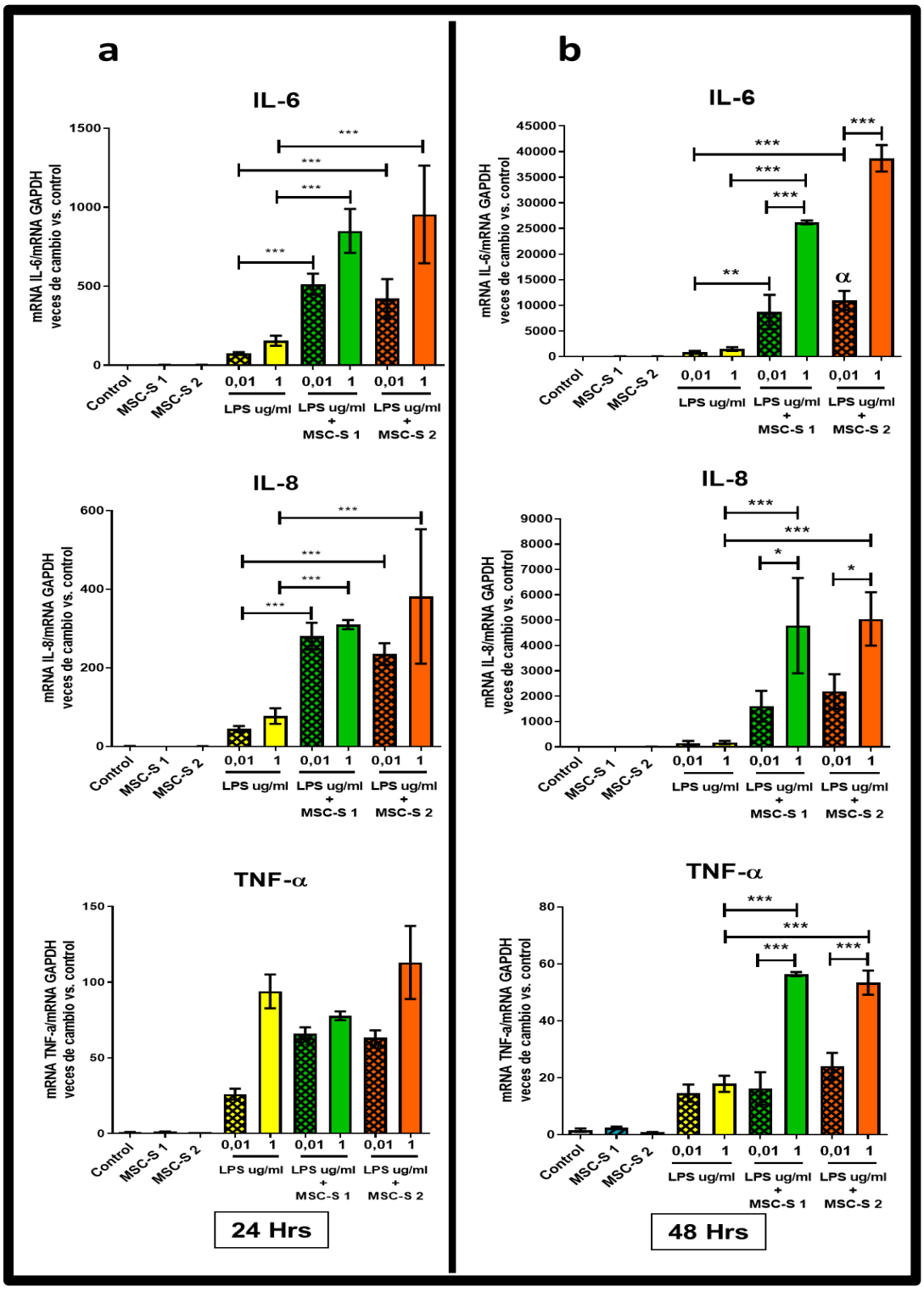

Figura 5: El estímulo de células THP-1 con LPS y tratadas con MSC-S indujo un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. La línea de monocitos humanos THP-1, fue estimulada con 2 concentraciones de LPS (0,01 µg/ml y 1 µg/ml) solos o en presencia de MSC-S. La expresión de IL-6, IL-8 y TNF-α fue evaluada por RT-qPCR después de (a) 24 horas y (b) 48 horas de estímulo. Los resultados fueron normalizados por la expresión de GAPDH y expresados como veces de cambio con respecto al grupo control. Las barras representas la media ± STD n=4. ($p<0,05$).

Objetivo 2 Determinar si la administración de MSC-S en el medio de cultivo aumenta la sobrevida de

los hepatocitos y disminuye la respuesta inflamatoria en un sistema de cultivo transwell compuesto por macrófagos/hepatocitos.

Objetivo específico 2.1: Establecer un protocolo de diferenciación de monocitos a macrófagos.

Al ocurrir un daño en el hígado, los macrófagos, células del sistema inmune que cumplen la función de fagocitar partículas extrañas, son activadas y comienzan a secretar citoquinas que participan en la inflamación tisular y moléculas que inducen apoptosis en hepatocitos, como enzimas lisosomales y radicales libre de oxígeno (Clària, J et al., 2008), además las reservas de macrófagos aumentan a través del reclutamiento de monocitos que maduran *in situ* a macrófagos (Sarin et al., 2019), ocurriendo una respuesta exacerbada que induciría a la muerte de otros tipos celulares como los hepatocitos (Triantafyllou et al., 2018). A raíz de este proceso, se determinó utilizar macrófagos diferenciados a partir de monocitos y células hepáticas y su cultivo en el sistema transwell previamente descrito.

El primer desafío, fue establecer un protocolo que nos permitiera diferenciar monocitos THP-1 a macrófagos. Si bien la mayor parte de los trabajos reportados se basan en el uso de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), existe una gran variabilidad respecto a la concentración utilizada de esta droga (desde 6 nM hasta 500 nM), así como en el tiempo de exposición (entre 3 y 72 horas) (Pinto et al., 2020).

Los monocitos y macrófagos pueden adquirir características fenotípicas y funcionales particulares, dependiendo del microambiente en el que se encuentren (Pinto et al., 2020). De esta forma, se ha descripto que las concentraciones más altas de PMA (junto con tiempos de exposición más largos), generarían una diferenciación de monocitos a macrófagos más eficiente, pero con células comprometidas a un perfil pro-inflamatorio. Por el contrario, concentraciones más bajas de PMA (y tiempos de exposición más cortos), generarían macrófagos M0, pero en una eficiencia más baja, donde en algunos casos se produce la desdiferenciación a monocitos (Spano et al., 2013).

A partir de los antecedentes bibliográficos, se seleccionaron 2 protocolos de diferenciación para ser evaluados experimentalmente (ver protocolos 5.5). Se evaluaron las siguientes características, como criterio de diferenciación:

1) Morfología: Mientras que los monocitos THP-1 son células esféricas que crecen en suspensión, los macrófagos crecen adheridos al plástico de la placa de cultivo y poseen una morfología poligonal.

2) Marcadores de membrana: Los monocitos presentan el marcador de superficie CD32, que desaparece al diferenciarse a macrófagos. Por el contrario, los macrófagos diferenciados expresan CD11b que está ausente en monocitos.

3) Aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias frente a un estímulo definido.

Lo primero que se realizo fue el análisis de la morfología celular mediante microscopía óptica, de los dos

protocolos de diferenciación.

Se puede comprobar que en ambos protocolos utilizados los monocitos adquieren la morfología esperada (adherencia al plástico y forma poligonal) (figura 6)

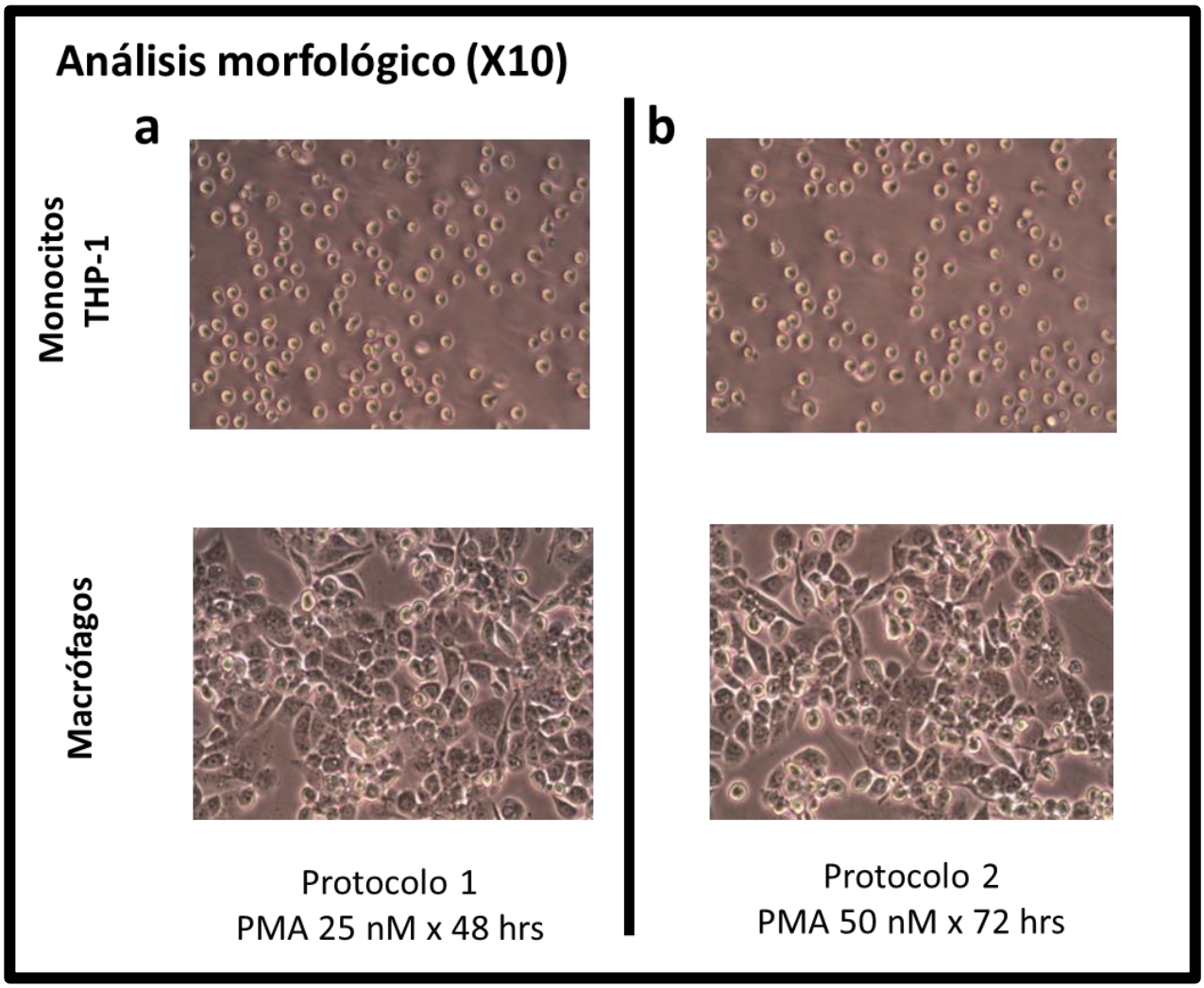

Figura 6: Los 2 protocolos de diferenciación con PMA inducen a los monocitos THP-1 a un fenotipo de macrófago: Análisis morfológico por microscopía óptica de células THP-1 y macrófagos, donde se puede observar (a) monocitos sin estimular (control) y estimulados con el protocolo de diferenciación 1 que utiliza PMA 25 nM por 48 horas, (b) macrófagos diferenciados de monocitos utilizando el protocolo 2, que utiliza PMA 50 nM por 72 horas.

Se analizó el marcador de membrana CD32 (figura 7) presente en los monocitos y que desaparece en el proceso de diferenciación, junto con el marcador CD11b que se adquiere en la última condición.

Como se puede observar en la figura 10, el marcador de membrana CD32 de monocitos solo se aprecia en las células THP-1, mientras que al utilizar los 2 protocolos de diferenciación, los niveles del marcador CD32 disminuye y aumenta el marcador CD11b en los macrófagos.

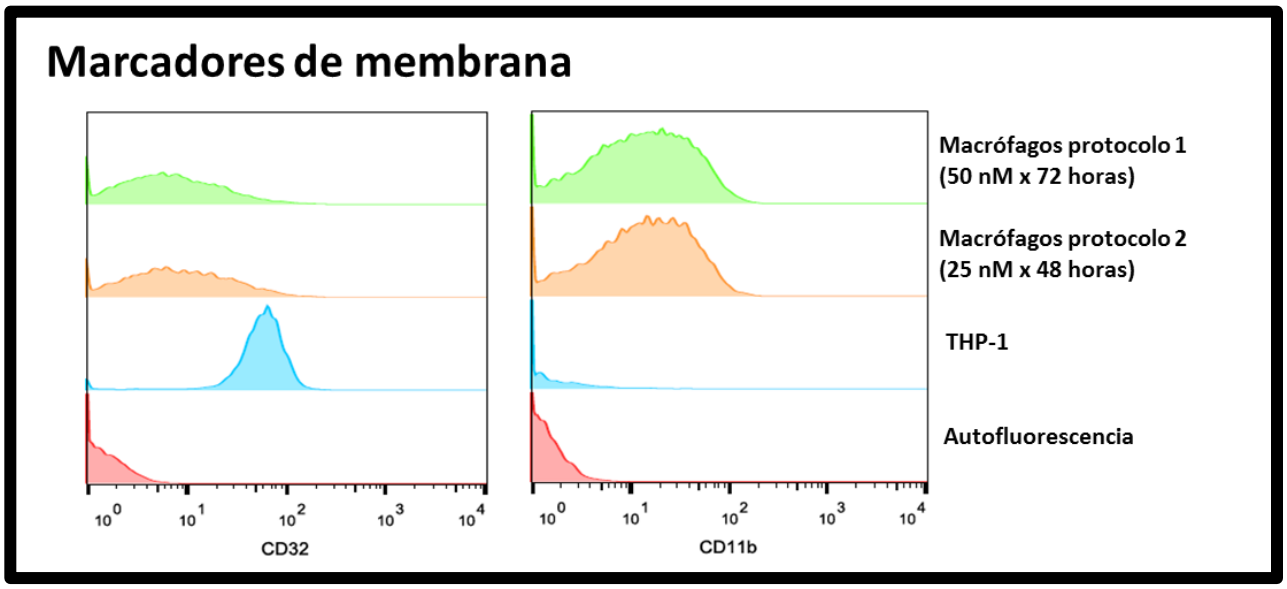

Figura 7: Los 2 protocolos de diferenciación con PMA inducen a cambios en los marcadores de membrana de los monocitos THP-1 asociados a macrófagos: Análisis por citometría de flujo de los marcadores de superficie CD32, a la izquierda, donde solo se expresó en células THP-1 y no en macrófagos, al contrario que CD11b, a la derecha, que solo se expresó en macrófagos.

En la literatura hay reportados múltiples protocolos de estímulo para los macrófagos diferenciados, seleccionamos los que utilizan LPS por lo cual nos quedamos con 2 protocolos (LPS o LPS + IFN-γ) (Granitzny et al., 2017; Rose et al., 2016; Baxter et al., 2020).

Las células fueron estimuladas por 24 horas y luego se evaluó la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-8, IL-6 y TNF-α.

Se observo que los dos protocolos de estímulo produjeron inducción similar de citoquinas pro-inflamatorias, independientemente del protocolo de diferenciación utilizado. (figura 8).

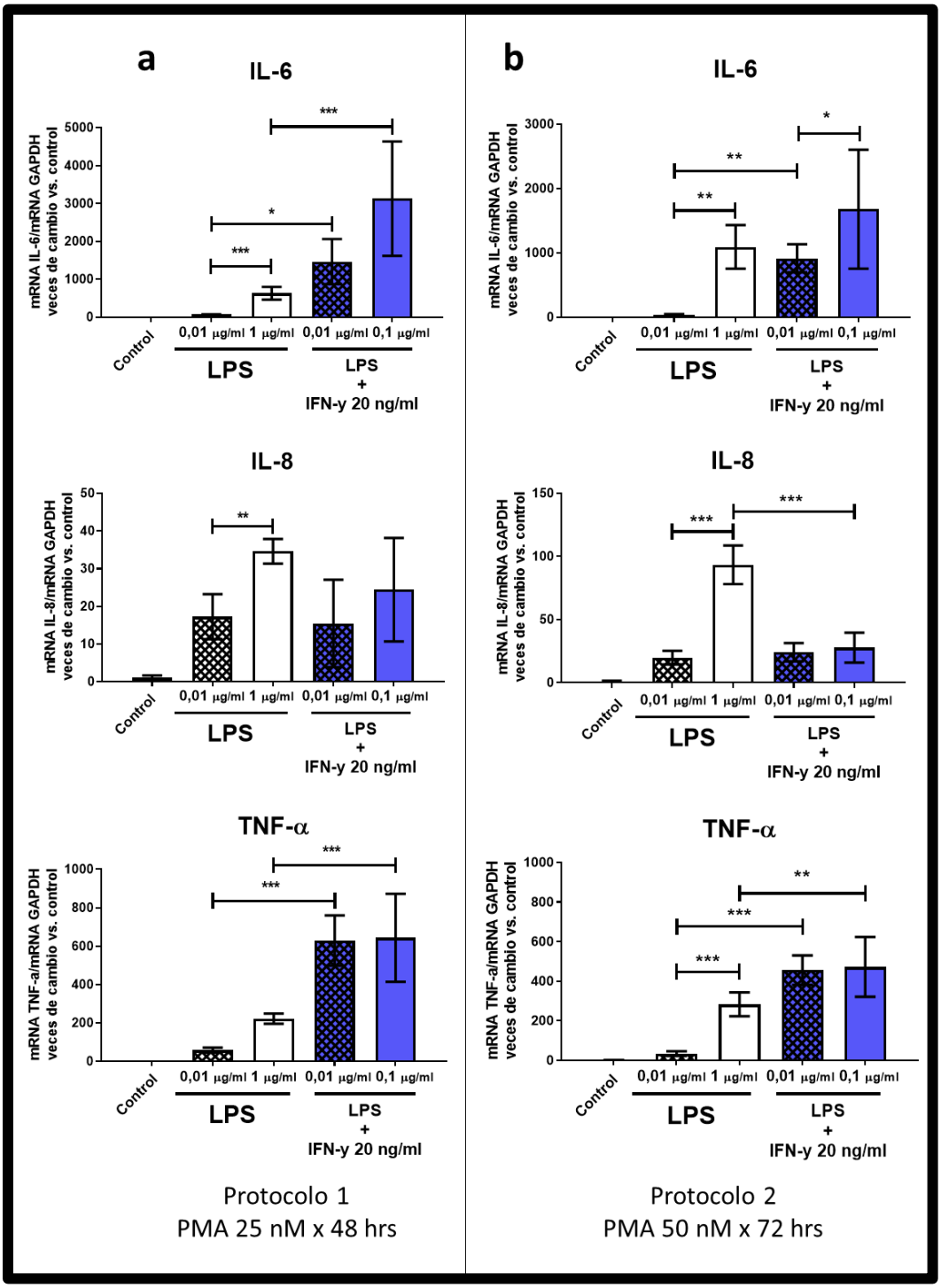

Figura 8: El estímulo de macrófagos con LPS o LPS+INF-γ indujo un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias: Los macrófagos diferenciados de monocitos THP-1 con 2 protocolos de diferenciación, fueron estimulados con LPS (0,01 µg/ml y 1 µg/ml) o LPS (0,1 y 0,01 µg/ml) + INF-γ 20 ng/ml. La expresión de IL-6, IL-8 y TNF-α fue evaluada por RT-qPCR después de 24 horas de estímulo. Los resultados fueron normalizados por la expresión de GAPDH y expresados como veces de cambio con respecto al grupo control. Las barras representas la media ± STD n=4. ($p<0,05$)

Al comparar los criterios de diferenciación entre los dos protocolos, no se observaron diferencias que nos permitieran suponer que uno era mejor. Finalmente utilizamos el protocolo 1 (25nM PMA x24 horas) porque temporalmente se ajustaba mejor para realizar los cultivos transwell (5 días de trabajo).

Objetivo específico 2.2: Evaluar si la administración de MSC-S aumenta la sobrevida de los hepatocitos en un sistema transwell macrófagos/hepatocitos.

Luego de haber establecido un protocolo de diferenciación, se estableció el sistema de cultivo transwell entre macrófagos y células hepáticas HepG2 para así determinar si el MSC-S tiene un efecto hepatoprotector. Se sembraron 350.000 células THP-1 en el compartimiento superior del sistema transwell donde fueron diferenciadas a macrófagos. En el compartimiento inferior se sembraron 500.000 células de la línea hepática HepG2, para ser activadas con IFN-γ 20 ng/ml + LPS 0,1 µg/ml o Solo LPS 1 µg/ml, en presencia o no de MSC-S. Como se nombró en los protocolos 5.10, la relación de macrófagos y hepatocitos es 1:2, reproduciendo la condición de inflamación aguda. (Jaeschke et al., 2007).

Se midió la liberación de LDH en el sobrenadante en monocultivos de hepatocitos y co-cultivos con macrófagos estimulados con LPS o LPS + IFN-γ. Como se puede observar en la figura 9 no se encontraron cambios significativos en la liberación de LDH, indicando que los macrófagos activados no estarían induciendo muerte en los hepatocitos. Al no observar cambios en la viabilidad celular, no se realizó la prueba de co-incubación con MSC-S.

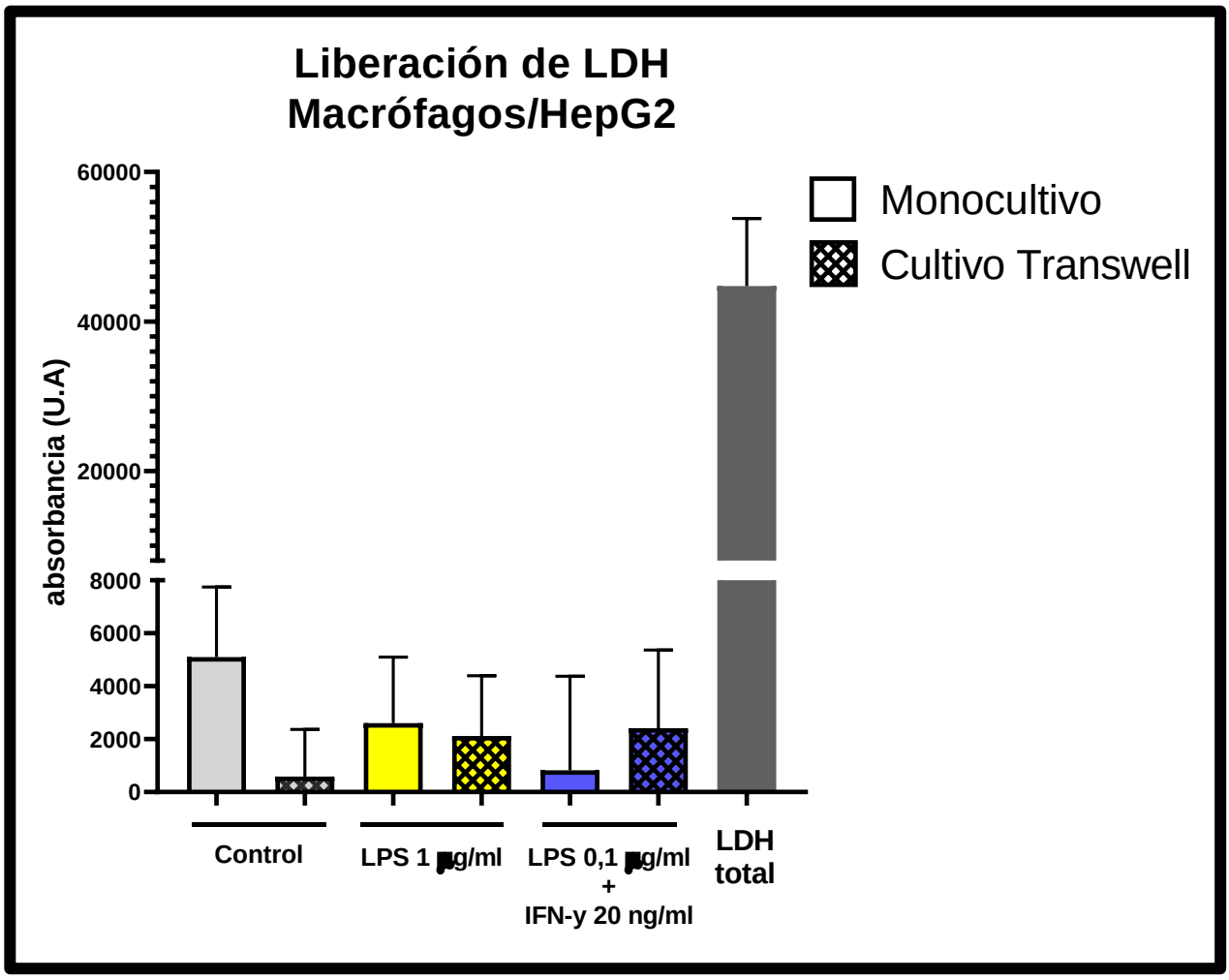

Figura 9: Los hepatocitos incubados en sistema transwell con macrófagos activados, no producen liberación de LDH al medio de cultivo: Macrófagos fueron incubados (compartimento superior), con células hepáticas (HepG2) (compartimento inferior), en un sistema transwell que solo permite el intercambio de moléculas. Las células fueron tratadas con LPS 1 µg/ml o LPS 0,1 µg/ml + IFN-γ 20 ng/ml durante 24 horas. El nivel de LDH en el medio de cultivo se determinó utilizando el sistema de detección fluorimétrico Cyto Tox-ONETM. Como control, se utilizaron células hepáticas en monocultivo bajo las mismas condiciones de tratamiento. Mientras que células incubadas con tritón X-100 0.1% fueron utilizadas como control de la máxima liberación de LDH. Las barras representas la media ± STD n=4. ($p<0,05$).

Al no ocurrir un cambio en los niveles de la liberación de LDH, asociado a necrosis celular, evaluamos la relación de la expresión Bax/Bcl-2 que está asociada a la activación temprana de procesos apoptóticos, por lo cual se sembraron células HepG2 como monocultivo y en sistema transwell junto con macrófagos y se les agregaron los estímulos previamente mencionados, para luego medir por RT-qPCR la relación Bax/Bcl-2 (figura 10).

Al utilizar solo LPS como medio de estímulo no se vio efecto en los niveles de expresión de la relación Bax/Bcl-2, mientras que con IFN-γ + LPS la relación Bax/Bcl2 tiende a aumentar en monocultivo pero no afecta los niveles en el cultivo transwell.

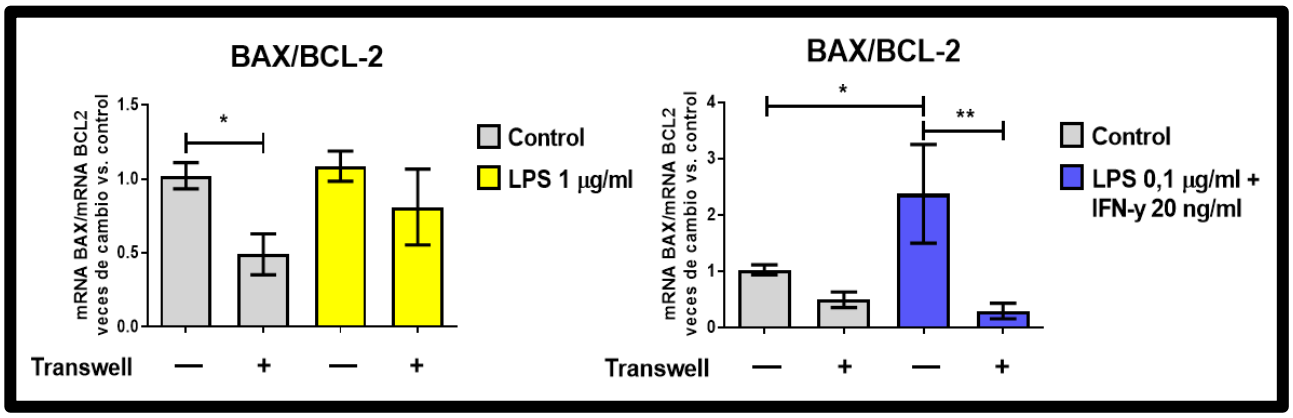

Figura 10: **El estímulo de IFN-γ + LPS induce a una disminución en la expresión de Lipocalina 2 en las células HepG2:** Macrófagos fueron incubados (compartimento superior), con células hepáticas (HepG2) (compartimento inferior), en sistema transwell que solo permite el intercambio de moléculas. Las células fueron tratadas con a) LPS 1 µg/ml o b) LPS 0,1 µg/ml + INF-γ 20 ng/ml durante 24 horas. La expresión de Bax/Bcl-2 fue determinada por RT-qPCR, mientras que, como control, se utilizaron células hepáticas en monocultivo bajo las mismas condiciones de tratamiento. Las barras representan la media ± STD n=4. ($p<0,05$).

Analizamos el nivel de expresión de Lipocalina 2 (LCN-2) en los hepatocitos en el cultivo transwell con macrófagos, en donde, al observar la figura 11, el cultivo en sistema transwell induce la expresión de LCN-2 en las células hepáticas independientemente del estímulo al que fueron sometidas al igual que el sistema transwell con monocitos. De la misma forma, encontramos un aumento significativo en los grupos que fueron expuestos a MSC-S.

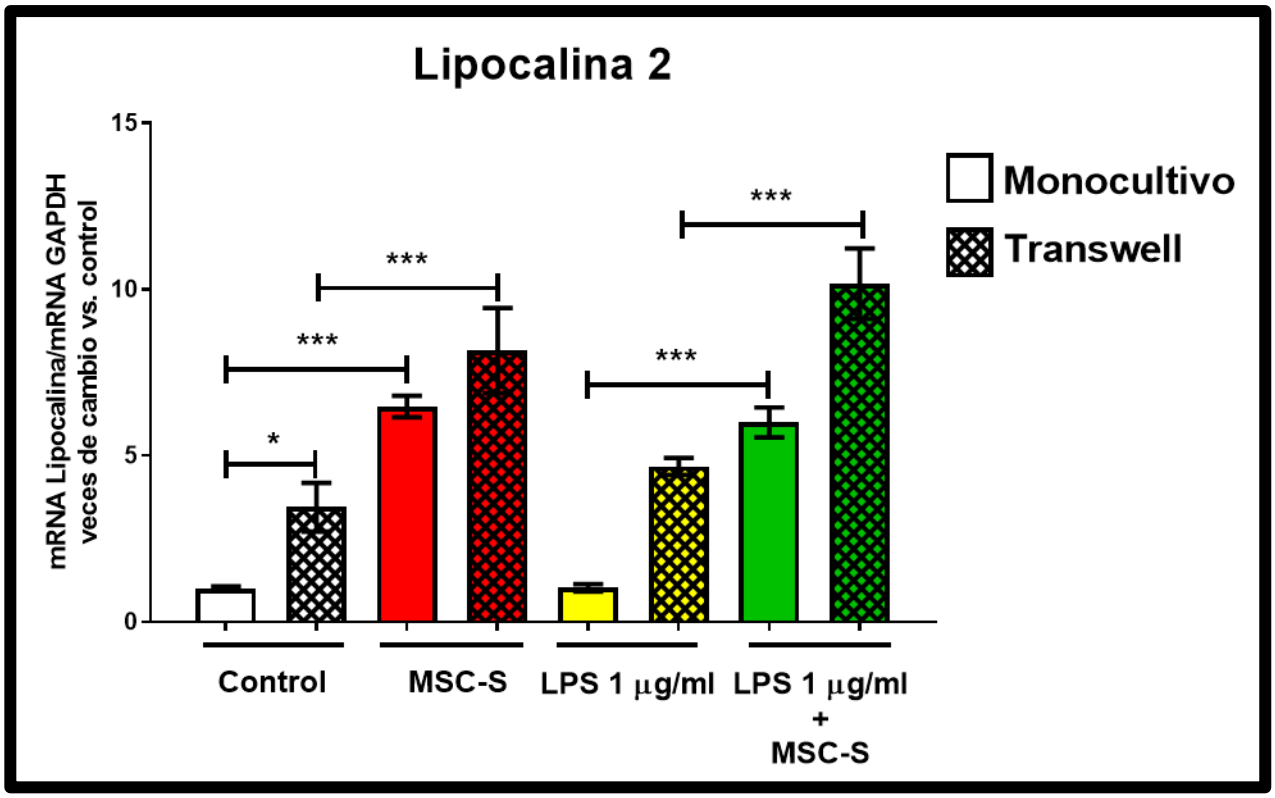

Figura 11: El MSC-S induce la expresión de Lipocalina 2 en las células Hepática HepG2 en cultivo transwell con macrófagos: Macrófagos fueron incubados (compartimento superior), con células hepáticas (HepG2) (compartimento inferior), en sistema transwell que solo permite el intercambio de moléculas. Las células fueron tratadas con LPS 1 µg/ml solo o co-incubadas con MSC-S durante 24 horas. La expresión de Lipocalina-2 fue determinada por RT-qPCR, mientras que, como control, se utilizaron células hepáticas en monocultivo bajo las mismas condiciones de tratamiento. Las barras representas la media ± STD, y se expresan como veces de cambio respecto al grupo control n=4. ($p<0,05$).

Objetivo específico 2.3: Evaluar si la administración de MSC-S disminuye la respuesta inflamatoria en el sistema de cultivo transwell macrófagos/hepatocitos

Finalmente se midieron los niveles de expresión de las citoquinas pro-inflamatorias en los macrófagos al ser tratadas con dos estímulos, LPS (1 µg/ml o 0,01 µg/ml) o LPS + IFN-γ (20 ng/ml) (figura 12), en donde se puede apreciar que existe un aumento significativo en la expresión de todas las citoquinas evaluadas con respecto al grupo control, y que el tratamiento con MSC-S no produce cambios significativos en la respuesta Interesantemente el estímulo compuesto por LPS + IFN-γ induce un aumento mayor en la expresión de citoquinas en comparación con LPS solo.

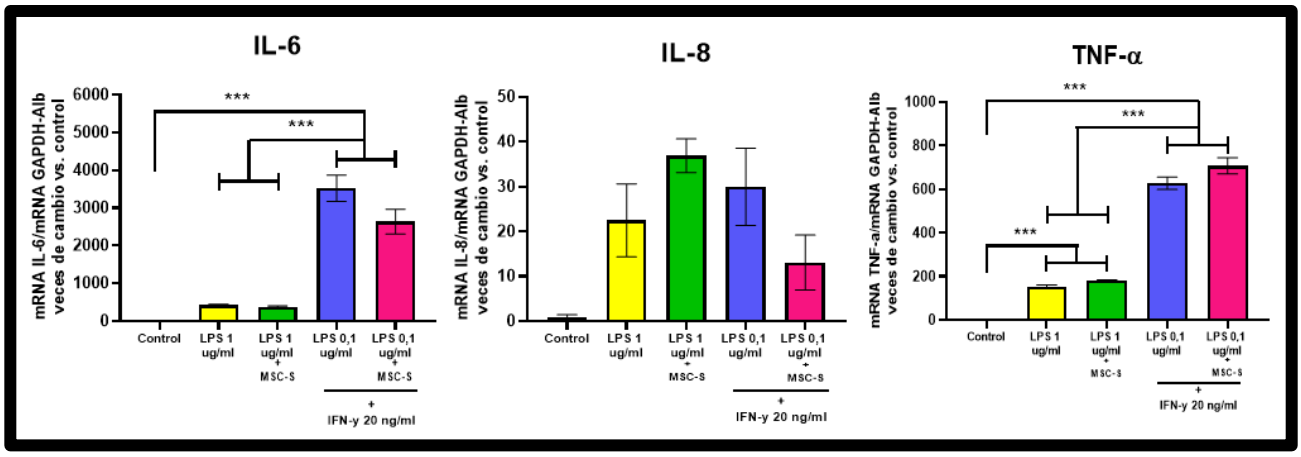

Figura 12: EL MSC-S no induce ningún cambio en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos estimulados. Los macrófagos fueron estimulados con LPS 1 µg/ml o LPS 0,1 µg/ml + IFN-γ 20 ng/ml, solos o en presencia de MSC-S. La expresión de IL-6, IL-8 y TNF-α fue evaluada por RT-qPCR después de 24 horas de estímulo. Los resultados fueron normalizados por la expresión de GAPDH y expresados como veces de cambio con respecto al grupo control. Las barras representan la media ± STD n=4. ($p<0,05$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

La ACLF es un síndrome grave con alta mortalidad que se desarrolla en pacientes con una enfermedad hepática crónica previa, y se desencadena por un evento precipitante que provoca la falla aguda de la función hepática y se encuentra asociado a un mayor riesgo de desarrollo de insuficiencia multiorgánica (Moreau, 2016). Si bien los mecanismos fisiopatológicos no son del todo conocidos, la enfermedad se caracteriza por una respuesta inflamatoria exacerbada y una tormenta de citoquinas, mediada en gran parte por la activación de macrófagos y monocitos, asociado al daño del tejido hepático (Triantafyllou et al., 2018).

Como tratamiento contra la ACLF para reducir la mortalidad de los pacientes, se están investigado nuevos tratamientos, entre los cuales, el uso de MSC, específicamente su secretoma, ha mostrado aumentar la sobrevida tras la administración sistémica en un modelo de ratas con ACLF (Huang et al., 2021), sin embargo, dado que el secretoma está compuesto por gran cantidad de moléculas (proteínas, mRNA, miRNA, lípidos), es difícil determinar el/los factores responsables, si no se cuenta con modelos *in vitro* de screening, más simples que la evaluación en animales.

En el presente trabajo, establecimos un modelo *in vitro* de co-cultivo que reproduce la respuesta inflamatoria del ACLF, a partir de los principales tipos celulares que participan en esta respuesta, con el fin de poder caracterizar en una etapa posterior, los factores presentes en el MSC-S que pudieran participar de los efectos hepatoprotectores observados en el modelo animal.

Para establecer el modelo de co-cultivo se utilizaron monocitos o macrófagos junto con hepatocitos, utilizando células HepG2, línea celular derivadas de un carcinoma hepatocelular, uno de los modelos celulares más utilizados para el estudio del hígado (Aguillón et al., 2019). Como monocitos utilizamos células THP-1, provenientes de una leucemia monocítica aguda. La obtención de macrófagos se realizó estimulando estas células con PMA. (Lund et al., 2016; Pinto et al., 2020).

Teniendo en cuenta que el factor precipitante que se presenta con mayor frecuencia en la ACLF es la infección bacteriana, utilizamos LPS como agente desencadenante de la activación de los monocitos (Granitzny et al., 2017), mientras que para los macrófagos, adicionalmente fueron estimulados con LPS + IFN-ɣ (Baxter et al., 2020). Los monocitos y macrófagos al ser activados secretan citoquinas pro-inflamatorias como IL-8, IL-6 y TNF- α, las cuales regulan la producción de moléculas de adhesión, estimulan la angiogénesis y amplifican la inflamación local (García De Lorenzo et al., 2000). Por lo que la expresión de estas citoquinas fue utilizada como marcador de activación.

En nuestro trabajo logramos establecer un protocolo de estímulo de monocitos con LPS a distintas concentraciones, siendo a las 24 horas de estímulo, donde encontramos una activación significativa y dosis dependiente Estos resultados concuerdan con protocolos previamente reportados por Granitzny y col. (Granitzny et al., 2017).

Una vez estandarizado el protocolo de cultivo de los monocitos, se evaluó el co-cultivo con sistema transwell

entre monocitos y hepatocitos, a fin de poder validar la interacción entre los dos tipos celulares y la modulación de esta respuesta por parte del MSC-S (Granitzny et al., 2017).

En primer lugar, identificamos el nivel de necrosis celular en las células hepáticas, al ser co-cultivadas con monocitos activados con LPS, así como el posible efecto protector del MSC-S, (Saad, B et al., 2011; Hamilton, R. et al., 2018)

Se ha descrito que al utilizar LPS 20 ug/ml en células THP-1, 20 veces la concentración que nosotros utilizamos en nuestro experimento, los niveles de LDH no aumentan, (Pfalzgraff et al., 2017) demostrando que LPS no afecta los niveles de LDH en hepatocitos y monocitos en monocultivo (figura 2), pero como ocurre un aumento significativo de LDH en los grupos transwell con respecto a los monocultivo es posible que los monocitos se hayan activado en consecuencia de que estas células están censando DAMPS producidos por los hepatocitos muertos, induciendo algún grado de necrosis en los hepatocitos adheridos. Interesantemente, al co-incubar con MSC-S el modelo transwell, los niveles de LDH disminuyen significativamente, mostrando tener un efecto protector en los hepatocitos y monocitos.

En forma complementaria, analizamos la relación de los niveles de expresión de Bax/Bcl-2, una familia de proteínas clave en la vía apoptótica celular. Dado que Bax participa formando un heterodímero con Bcl-2, que desestabiliza la membrana mitocondrial, un aumento de esta relación, está asociado a activación de la apoptosis celular (Jeong et al., 2019; Nazeri et al., 2020; M. Park et al., 2018). Si bien hay una clara tendencia en la reducción de esta relación en los grupos transwell en comparación con los grupos de monocultivos, no se puede apreciar que exista una diferencia en los grupos de cada modelo de cultivo. Esta falta de correlación en los niveles de LDH y Bax/Bcl-2 podría deberse a variados factores, el primero es que estamos midiendo los niveles de mRNA, por lo tanto sería recomendable medir los niveles proteicos de esta familia de proteínas. Alternativamente hay que tener en cuenta que si bien las moléculas evaluadas son las más representativas, la familia está conformada por un amplio abanico de moléculas pro- y anti apoptóticas, por lo que no podemos descartar que se produzcan cambios en otras moléculas relacionadas (Burlacu, 2003; Kren et al., 1996). En forma complementaria, se deberían evaluar otros miembros de esta familia ya que tampoco podemos descartar que la muerte celular se produzca solo por necrosis, aunque para confirmarlo sería recomendable evaluar la actividad caspasa en las células bajo estudio.

Evaluamos el nivel de expresión de Lipocalina (LCN-2) en los hepatocitos. Esta glicoproteína es producida en las células hepáticas en respuesta a procesos inflamatorios e infecciosos y otras formas de estrés celular (Borkham et al., 2013; Kienzl et al., 2015; Hu, Y et al., 2015). Además LCN-2 cumple una función protectora en los hepatocitos ya que en un estudio *in vivo* demostraron que en ratones LCN-2 -/-, al administrarles LPS, aumentan los niveles de IL-6, IL-1β y TNF-α en el hígado de manera significativa con respecto al grupo control además de aumentar los índices de daño hepático y muerte en hepatocitos (Borkham et al., 2013). Mientras que al haber mayores niveles de LCN-2, se obtiene una mayor viabilidad en los ratones tratados con LPS y menor cantidad de hepatocitos apoptóticos (Hu, Y et al., 2015).

Se ha descrito que la producción de LCN-2 ocurre por un aumento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-6, IL-1b y TNF-α, las cuales, como IL-6 activa la vía de señalización de STAT3, la cual se une al promotor de LCN-2, activando la producción de este (Xu et al., 2015). En nuestro estudio pudimos observar que el establecimiento del sistema transwell produce un aumento en la expresión de LCN-2 en los hepatocitos en comparación con el monocultivo en todas las condiciones de cultivo, por lo cual esta respuesta estaría mediada por la comunicación Hepatocito- monocitos, y probablemente, mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-6 por parte los monocitos (Fernández, C. 2018), aumentando la activación de la vía STAT3 y la ruta que inducen a la expresión de genes implicados en la respuesta de la fase aguda, como la LCN-2 (Xu et al., 2015).

Al utilizar LPS como estimulo, los niveles de mRNA de LCN-2 no cambiaron de forma significativa en comparación al control (figura 4) en coincidencia con lo observado en la evaluación de LDH. Interesantemente, la presencia de MSC-S en el medio de cultivo, indujo un aumento de la expresión de LCN-2 en los hepatocitos en todas las condiciones evaluadas. , este resultado concuerda con el hecho de que el MSC-S tiene componentes que simulan la producción de LCN-2, las cuales podrían ser las citoquinas proinflamatorias, como la IL-6 o IL-8, que se ha descrito que al utilizar MSC-S (no estimulado) tiene moléculas de estas citoquinas. (García Contreras, M et al., 2021).

Dado que los niveles de citoquinas pro-inflamatorias aumentan de manera exacerbada en la ACLF, decidimos evaluar la administración de MSC-S en el medio de cultivo de monocitos activados, para determinar si era capaz de disminuir la expresión de citoquinas inflamatorias

En contra de los resultados que esperábamos, observamos un aumento en la expresión de IL-6, IL-8 y TNF-α cuando el MSC-S se encontraba en el medio de cultivo. Similar respuesta ha sido reportada en estudios in vitro donde microglías son estimulada con secretoma derivado de MSC aumentando la expresión de IL-6 e IL-8 (García Contreras, M et al., 2021). Esta respuesta estaría mediada por citoquinas como IL-1b, IL-6 e IL-8 presentes ya sea en forma soluble o en microvesículas del secretoma, que inducirían a la producción de estas citoquinas y que además, su presencia afectaría los niveles de expresión (Vizoso et al., 2017). Este aumento exacerbado de citoquinas proinflamatorias por parte de los monocitos tratados con MSC-S estaría induciendo a los hepatocitos a secretar LCN-2, haciendo un efecto protector, disminuyendo los niveles de LDH.

Los resultados previos, sugieren que hemos establecido un modelo de cultivo *in vitro*, donde se observa la respuesta inflamatoria por parte de los monocitos, la comunicación celular entre los dos tipos celulares y la muerte de los hepatocitos, en el contexto inflamatorio. Interesantemente, la prueba piloto, indica que la co-incubación con MSC-S tendría un efecto protector sobre los hepatocitos, puesto en evidencia por la disminución de liberación de LDH en el medio de cultivo y el aumento en la expresión de LCN-2 en las células hepáticas. Este modelo *in vitro* permitiría realizar en el futuro, un screening de las moléculas identificadas en el MSC-S y que podrían estar mediando el efecto hepatoprotector observado en el modelo *in vivo*.

En la segunda parte del trabajo, buscamos establecer un sistema de co-cultivo transwell entre macrófagos y

hepatocitos (Granitzny et al., 2017), para lo cual en primer lugar se estandarizó el protocolo de diferenciación de monocitos a macrófagos a partir de células THP-1. Esto se debe a que, existen una gran variabilidad en la literatura respecto a los protocolos de diferenciación reportados, los que influyen en el fenotipo y características funcionales de los macrófagos que se obtienen (Pinto et al., 2020).

Se evaluaron 2 protocolos de diferenciación (Lund et al., 2016; Pinto et al., 2020). Con ambos se alcanzó un grado de diferenciación equivalente en los marcadores evaluados: i) cambio morfológico; ii) marcadores de superficie y iii) expresión de citoquinas. Para los estudios posteriores se decidió utilizar el protocolo 1 (PMA 25 nm por 48 horas) debido a que los tiempos de trabajo se podían adaptar mejor al ser menos días.

Terminada la estandarización de los protocolos de diferenciación, se evaluó la viabilidad en el sistema transwell de los macrófagos activados con los hepatocitos. Se estimuló con LPS solo o en combinación con IFN-γ, esto debido a que cuando ocurre la ACLF y aumenta el daño tisular, los linfocitos TCD4+ y *natural killer* secretan IFN-γ, que activa los macrófagos y su capacidad fagocítica (Alam et al., 2017).

Al evaluar la viabilidad de los hepatocitos a partir de la liberación de LDH, no se observó diferencia significativa en ninguno de los grupos experimentales con relación a las células sin tratamiento. Esto podría deberse a que se produce la liberación de moléculas o estímulos distintos a los producidos en los monocitos, que no producen efecto en la viabilidad de la células HepG2. (Aguillón et al., 2019).

Al no haber un cambio en los niveles de liberación de LDH, se midieron los niveles de la relación Bax/Bcl-2 sin utilizar MSC-S, para ver si estaría produciendo activación de las vías apoptóticas entre macrófagos y hepatocitos (Jeong et al., 2019; Nazeri et al., 2020; M. Park et al., 2018), en donde se puede apreciar que no existen cambios en los niveles al utilizar LPS o IFN-γ con respecto al control.

AL medir los niveles de LCN-2 en el modelo de co-cultivo entre macrófagos y hepatocitos al ser tratados con LPS y MSC-S, se obtuvo un aumento significativo en el transwell con respecto al grupo control, esto podría deberse a que la relación con los macrófagos estaría induciendo a la producción de LCN-2 por la vía STAT 3 (Xu et al., 2015), además podría deberse a que se ha descrito que los macrófagos secretan citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6 (Fernández, C. 2018), la cual se ha comprobado que induce a la producción de LCN-2, la cual podría estar haciendo un efecto protector en los hepatocitos.

Finalmente se midieron los niveles de expresión de las citoquinas proinflamatorias en los macrófagos activados con LPS e IFN-γ y si al co-incubar las células con MSC-S se reducían estos niveles, pero no se obtuvo ningún cambio en los niveles de estas citoquinas, dando a entender que el MSC-S no estaría afectando los macrófagos en la producción o reducción de citoquinas proinflamatorias en comparación con los monocitos.

Para concluir se obtuvo un modelo *in vitro* transwell de ACLF entre monocitos y hepatocitos que tiene niveles significantes de necrosis al estar entre ellos, y estos niveles disminuyeron de manera significativa al utilizar MSC-S, mostrando que es un buen agente protector de hepatocitos, además aumentaron los niveles de expresión de las citoquinas pro-inflamatorias y LCN-2.

Con respecto al modelo de macrófagos y hepatocitos no se cumplió el objetivo, ya que no ocurrió muerte en

los hepatocitos ya sea por necrosis o apoptosis como en la ACLF, aunque al utilizar MSC-S aumentaron los niveles de LCN-2 y las citoquinas como en el modelo de monocitos y hepatocitos, por lo que, como se nombró anteriormente, se podría cambiar el modelo celular de hepatocito a uno más susceptible.

Cabe destacar que solo se evaluaron posibles factores precipitantes que desencadenen la falla aguda, dejando como proyección identificar factores que desencadenen la falla crónica de los hepatocitos. Se propone evaluar los compuestos Fas-L y D-Gal en hepatocitos, ya que se ha demostrado que aumentan su mortalidad (Chen et al., 1999; L. Li et al., 2018).

Bibliografía

Abbas N, Rajoriya N, Elsharkawy AM, Chauhan A. Acute-on-chronic liver failure (ACLF) in 2022: have novel treatment paradigms already arrived? Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2022 Jul;16(7):639-652. doi: 10.1080/17474124.2022.2097070. Epub 2022 Jul 7. PMID: 35786130.

Abbas, A. K., Licthan, A. H., & Pillai, S. ,. (2015). Inmunología celular y molecular (8a ed. Madrid).

ACLARA. (2018). Prevalence, epidemiology, characterization and mechanisms of acute-on-chronic liver failture (ACLF) in Latin America. Comparasion with data from other regional studies (Europe and Asian). https://aclarastudy.com/en

Aguillón, J., Loango-Chamorro, N., & Landazuri, P. (2019). Liver cell models for studying lipid metabolism. Literature review. In Revista Facultad de Medicina (Vol. 67, Issue 1, pp. 109–116). Universidad Nacional de Colombia. https://doi.org/10.15446/revfacmed.v67n1.64964

Alam, A., Chun Suen, K., & Ma, D. (2017). Acute-on-chronic liver failure: recent update. Journal of biomedical research, 31(4), 283–300. https://doi.org/10.7555/JBR.30.20160060

Angus, D. C., Burgner, D., Wunderink, R., Mira, J. P., Gerlach, H., Wiedermann, C. J., & Vincent, J. L. (2003). The PIRO concept: P is for predisposition. Critical Care, 7(3), 248–251. https://doi.org/10.1186/cc2193

Ankrum, J., & Karp, J. M. (2010). Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. Trends in Molecular Medicine, 16(5), 203–209. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.02.005

Arroyo, V., Moreau, R., Kamath, P. S., Jalan, R., Ginès, P., Nevens, F., Fernández, J., To, U., García- Tsao, G., & Schnabl, B. (2016). Acute-on-chronic liver failure in cirrhosis. Nature Reviews Disease Primers, 2, 1–18. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.41

Bajaj, J. S. (2013). Defining acute-on-chronic liver failure: Will east and west ever meet? In Gastroenterology (Vol. 144, Issue 7, pp. 1337–1339). W.B. Saunders. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.024

Baxter, E. W., Graham, A. E., Re, N. A., Carr, I. M., Robinson, J. I., Mackie, S. L., & Morgan, A. W. (2020). Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFNγ+LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. Journal of Immunological Methods, 478. https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112721

Borkham, E., van de Leur, E., Zimmermann, H. W., Karlmark, K. R., Tihaa, L., Haas, U., Tacke, F., Berger, T., Mak, T. W., & Weiskirchen, R. (2013). Protective effects of lipocalin-2 (LCN2) in acute liver injury suggest a novel function in liver homeostasis. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 1832(5), 660–673. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.01.014

Bravo Neira, A. G., Álvarez Ordoñez, W. J., Villacreses Vásquez, E. G. V., & Delgado Conforme, W. A. (2019). Terapias celulares avanzadas en hepatologías: Terapia con células madre en enfermedad hepática en etapa terminal e insuficiencia hepáticaent. Revista Científica Mundo de La Investigación y El Conocimiento, 3.

Clària, J., Horrillo, R., Martínez-Clemente, M., Morán-Salvador, E., Titos, E., González-Périz, A., & Ferré, N. (2008). Mecanismos básicos de lesión hepatocelular. Papel de los mediadores lipídicos de inflamación [Basic mechanisms of hepatocellular injury. Role of inflammatory lipid mediators]. Gastroenterologia y hepatologia, 31(10), 682–692. https://doi.org/10.1016/S0210-5705(08)75816-3

Dominici, M., le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.Cytotherapy, 8(4), 315–317.

https://doi.org/10.1080/14653240600855905

Duan Y, Pan X, Luo J, Xiao X, Li J, Bestman PL, Luo M. Association of Inflammatory Cytokines With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Front Immunol. 2022 May 6;13:880298. doi: 10.3389/fimmu.2022.880298. PMID: 35603224; PMCID: PMC9122097.

Ezquer, F., Quintanilla, M. E., Morales, P., Ezquer, M., Lespay-Rebolledo, C., Herrera-Marschitz, M., & Israel, Y. (2019). Activated mesenchymal stem cell administration inhibits chronic alcohol drinking and suppresses relapse-like drinking in high-alcohol drinker rats: Inhibition of chronic and relapse-like alcohol drinking. Addiction Biology, 24(1), 17–27. https://doi.org/10.1111/adb.12572

Fernández, C (2018). Fuente celular de la interleucina (IL)-6 y su relevancia en la regeneración hepática. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de medicina. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III.

Fiore, E. J., Domínguez, L. M., Bayo, J., García, M. G., & Mazzolini, G. D. (2018). Taking advantage of the potential of mesenchymal stromal cells in liver regeneration: Cells and extracellular vesicles as therapeutic strategies. In World Journal of Gastroenterology (Vol. 24, Issue 23, pp. 2427–2440 Baishideng Publishing Group Co. https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i23.2427

García Contreras, M., Thakor, AS Las células madre mesenquimatosas derivadas del tejido adiposo humano y sus vesículas extracelulares modulan la microglía humana activada por lipopolisacáridos. Descubrimiento de la muerte celular. 7 , 98 (2021). https://doi.org/10.1038/s41420-021-00471-7

García De Lorenzo, A., López Martínez, J., & Sanchez Castilla, M. (2000). Respuesta inflamatoria sistémica: definiciones, marcadores inflamatorios y posibilidades terapéuticas. http://www.medintensiva.org/

Gerlach, H., Dhainaut, J. F., Harbarth, S., Reinhart, K., Marshall, J. C., & Levy, M. (2003). The PIRO Concept: R is for response. Critical Care, 7(3), 256–259. https://doi.org/10.1186/cc2195

Granitzny, A., Knebel, J., Müller, M., Braun, A., Steinberg, P., Dasenbrock, C., & Hansen, T. (2017).Evaluation of a human in vitro hepatocyte-NPC co-culture model for the prediction of idiosyncratic drug-induced liver injury: A pilot study. Toxicology Reports, 4, 89–103. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.02.001

Gustot, T., Fernandez, J., Garcia, E., Morando, F., Caraceni, P., Alessandria, C., Laleman, W., Trebicka, J., Elkrief, L., Hopf, C., Sol ıs-Munoz, P., Saliba, F., Zeuzem, S., Albillos, A., Benten, D., Luis Montero-Alvarez, J., Teresa Chivas, M., Concepci on, M., ordoba, J. C., … Arroyo, V. (2015).Clinical Course of Acute-on-Chronic Liver Failure Syndrome and Effects on Prognosis. https://doi.org/10.1002/hep.27849/suppinfo

Hamilton, R. F., Wu, Z., Thakkar, M., Holian, A., & Mitra, S. (2018). Modification of nano-silver bioactivity by adsorption on carbon nanotubes and graphene oxide. Inhalation toxicology, 30(11-12), 429–438. https://doi.org/10.1080/08958378.2018.1547334

Hernaez, R., Solà, E., Moreau, R., & Ginès, P. (2017). Acute-on-chronic liver failure: An update. Gut, 66(3), 541–553. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312670

Heymann, F., & Tacke, F. (2016). Immunology in the liver-from homeostasis to disease. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 13(2), 88–110. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.200

Hu, Y., Xue, J., Yang, Y., Zhou, X., Qin, C., Zheng, M., Zhu, H., Liu, Y., Liu, W., Lou, G., Wang, J., Wu, S., Chen, Z., & Chen, F. (2015). Lipocalin 2 Upregulation Protects Hepatocytes from IL1-β-Induced Stress. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 36(2), 753–

762. https://doi.org/10.1159/000430135

Huang, Y.-L., Cuadra, B., Silva, V., Molina, C., Ezquer, F., & Ezquer, M. (2021). Mesenchymal stem cells secretome reduce liver injury and improve survival rate in a murine model of Acute on Chronic Liver Failure. Chilean Society for Cell Biology "2021 Colloquium series in Cell Biology: Young Investigators" FONDECYT 1211223.

Jaeschke, H. (2007). Kupffer cells. In J. Rodés, J.-P. Benhamou, A. Blei, J. Reichen, & M. Rizzetto (Eds.),Textbook of hepatology: Hepatology from basic science to clinical practice (3rd ed., pp. 36–42).

Jalan, R., Stadlbauer, V., Sen, S., Cheshire, L., Chang, Y. M., & Mookerjee, R. P. (2012). Role of predisposition, injury, response and organ failure in the prognosis of patients with acute-on-chronic liver failure: A prospective cohort study. Critical Care, 16(6). https://doi.org/10.1186/cc11882

Jeong, Y., Lim, J. W., & Kim, H. (2019). Lycopene inhibits reactive oxygen species-mediated nf-kb signaling and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. Nutrients, 11(4). https://doi.org/10.3390/nu11040762

Katagiri, W., Takeuchi, R., Saito, N., Suda, D., & Kobayashi, T. (2022). Migration and phenotype switching of macrophages at early-phase of bone-formation by secretomes from bone marrow derived mesenchymal stem cells using rat calvaria bone defect model. Journal of Dental Sciences, 17(1), 421–429. https://doi.org/10.1016/j.jds.2021.08.012

Kienzl Wagner, K., Moschen, A. R., Geiger, S., Bichler, A., Aigner, F., Brandacher, G., Pratschke, J., & Tilg, H. (2015). The role of lipocalin-2 in liver regeneration. Liver International, 35(4), 1195–1202. https://doi.org/10.1111/liv.12634

Konala, V. B. R., Mamidi, M. K., Bhonde, R., Das, A. K., Pochampally, R., & Pal, R. (2016). The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. In Cytotherapy (Vol. 18, Issue 1, pp. 13–24). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.008

Kubes, P., & Mehal, W. Z. (2012). Sterile inflammation in the liver. Gastroenterology, 143(5), 1158– 1172. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.09.008

Kusuma, G. D., Carthew, J., Lim, R., & Frith, J. E. (2017). Effect of the Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Paracrine Signaling: Opportunities to Engineer the Therapeutic Effect. In Stem Cells and Development (Vol. 26, Issue 9, pp. 617–631). Mary Ann Liebert Inc. https://doi.org/10.1089/scd.2016.0349

Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJ. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. Hum Mol Genet. 2012 Oct 15;21(R1):R125-34. doi: 10.1093/hmg/dds317. Epub 2012 Aug 7. PMID: 22872698.

Li, L., Yin, H., Zhao, Y., Zhang, X., Duan, C., Liu, J., Huang, C., Liu, S., Yang, S., & Li, X. (2018).Protective role of puerarin on LPS/D-Gal induced acute liver injury via restoring autophagy. In Am J Transl Res (Vol. 10, Issue 3). www.ajtr.org

Llopis, M., Cassard, A. M., Wrzosek, L., Boschat, L., Bruneau, A., Ferrere, G., Puchois, V., Martin, J. C., Lepage, P., le Roy, T., Lefèvre, L., Langelier, B., Cailleux, F., González-Castro, A. M., Rabot, S., Gaudin, F., Agostini, H., Prévot, S., Berrebi, D., … Perlemuter, G. (2016). Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic liver disease. Gut, 65(5), 830–839. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310585

Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A., & Donnelly, S. (2016). The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. Journal of Immunological Methods, 430, 64–70. https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.01.012

Martínez, M. A., Rodriguez Saenz, A. A., & Munévar-Niño, J. C. (2018). El potencial terapéutico del secretoma de las células troncales. CES Odontología, 31(2), 36–47. https://doi.org/10.21615/cesodon.31.2.4

Mezzano, G. (2018). Artículo de Revisión 16 Falla hepática aguda sobre crónica (ACLF) ¿qué es, que sabemos y hacia dónde vamos? In Gastroenterol. latinoam (Vol. 29).

Moreau, R. (2016). The Pathogenesis of ACLF: The Inflammatory Response and Immune Function. Seminars in Liver Disease, 36(2), 133–140. https://doi.org/10.1055/s-0036-1583199

Moreau, R., Jalan, R., Gines, P., Pavesi, M., Angeli, P., Cordoba, J., Durand, F., Gustot, T., Saliba, F., Domenicali, M., Gerbes, A., Wendon, J., Alessandria, C., Laleman, W., Zeuzem, S., Trebicka, J., Bernardi, M., & Arroyo, V. (2013). Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. Gastroenterology, 144(7). https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.042

Oses, C., Olivares, B., Ezquer, M., Acosta, C., Bosch, P., Donoso, M., Léniz, P., & Ezquer, F. (2017). Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferoxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. PLoS ONE, 12(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178011

Park, M., Lim, J. W., & Kim, H. (2018). Docoxahexaenoic acid induces apoptosis of pancreatic cancer cells by suppressing activation of STAT3 and Nf-κB. Nutrients, 10(11). https://doi.org/10.3390/nu10111621

Pfalzgraff, A., Heinbockel, L., Su, Q., Brandenburg, K., & Weindl, G. (2017). Synthetic anti-endotoxin peptides inhibit cytoplasmic LPS-mediated responses. Biochemical pharmacology, 140, 64–72. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.05.015

Pinto, S. M., Kim, H., Subbannayya, Y., Giambelluca, M., Bösl, K., & Kandasamy, R. K. (2020). Dose- dependent phorbol 12-myristate-13-acetate-mediated monocyte-to-macrophage differentiation induces unique proteomic signatures in THP-1 cells. BioRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.02.27.968016

Pombinho R, Sousa S, Cabanes D. Scavenger Receptors: Promiscuous Players during Microbial Pathogenesis. Crit Rev Microbiol. 2018 Nov;44(6):685-700. doi: 10.1080/1040841X.2018.1493716. Epub 2018 Oct 14. PMID: 30318962.

Queiroz, A. (2021). FHAsC en Latinoamérica: Experiencia del estudio ACLARA. ALEH Congreso 2021.

Quintanilla ME, Ezquer F, Morales P, Santapau D, Berríos-Cárcamo P, Ezquer M, Herrera-Marschitz M, Israel Y. Intranasal mesenchymal stem cell secretome administration markedly inhibits alcohol and nicotine self-administration and blocks relapse-intake: mechanism and translational options. Stem Cell Res Ther. 2019 Jul 8;10(1):205. doi: 10.1186/s13287-019-1304-z. PMID: 31286996; PMCID: PMC6615104.

Ratajczak, M. Z., & Ratajczak, J. (2017). Extracellular Microvesicles as Game Changers in Better Understanding the Complexity of Cellular Interactions—From Bench to Clinical Applications. American Journal of the Medical Sciences, 354(5), 449–452. https://doi.org/10.1016/j.amjms.2017.06.001

Rose, K. A., Holman, N. S., Green, A. M., Andersen, M. E., & Lecluyse, E. L. (2016). Co-culture of Hepatocytes and Kupffer Cells as an in Vitro Model of Inflammation and Drug-Induced Hepatotoxicity. Journal of Pharmaceutical Sciences, 105(2), 950–964. https://doi.org/10.1016/S0022-3549(15)00192-6

Saad, B., Abouatta, B. S., Basha, W., Hmade, A., Kmail, A., Khasib, S., & Said, O. (2011). Hypericum triquetrifolium-Derived Factors Downregulate the Production Levels of LPS-Induced Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor-α in THP-1 Cells. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2011, 586470. https://doi.org/10.1093/ecam/nen056

Sarin, S. K., Kumar, A., Almeida, J. A., Chawla, Y. K., Fan, S. T., Garg, H., Silva, J. H., Hamid, S. S., Jalan, R., Komolmit, P., Lau, G. K., Liu, Q., Madan, K., Mohamed, R., Ning, Q., Rahman, S., Rastogi, A., Riordan, S. M., Sakhuja, P., … Yuen, M. F. (2009). Acute-on-chronic liver failure: Consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL). Hepatology International, 3(1), 269–282. https://doi.org/10.1007/s12072-008-9106-x

Sarin SK, Choudhury A, Sharma MK, Maiwall R, Al Mahtab M, Rahman S, Saigal S, Saraf N, Soin AS, Devarbhavi H, Kim DJ, Dhiman RK, Duseja A, Taneja S, Eapen CE, Goel A, Ning Q, Chen T, Ma K, Duan Z, Yu C, Treeprasertsuk S, Hamid SS, Butt AS, Jafri W, Shukla A, Saraswat V, Tan SS, Sood A, Midha V, Goyal O, Ghazinyan H, Arora A, Hu J, Sahu M, Rao PN, Lee GH, Lim SG, Lesmana LA, Lesmana CR, Shah S, Prasad VGM, Payawal DA, Abbas Z, Dokmeci AK, Sollano JD, Carpio G, Shresta A, Lau GK, Fazal Karim M, Shiha G, Gani R, Kalista KF, Yuen MF, Alam S, Khanna R, Sood V, Lal BB, Pamecha V, Jindal A, Rajan V, Arora V, Yokosuka O, Niriella MA, Li H, Qi X, Tanaka A, Mochida S, Chaudhuri DR, Gane E, Win KM, Chen WT, Rela M, Kapoor D, Rastogi A, Kale P, Rastogi A, Sharma CB, Bajpai M, Singh V, Premkumar M, Maharashi S, Olithselvan A, Philips CA, Srivastava A, Yachha SK, Wani ZA, Thapa BR, Saraya A, Shalimar, Kumar A, Wadhawan M, Gupta S, Madan K, Sakhuja P, Vij V, Sharma BC, Garg H, Garg V, Kalal C, Anand L, Vyas T, Mathur RP, Kumar G, Jain P, Pasupuleti SSR, Chawla YK, Chowdhury A, Alam S, Song DS, Yang JM, Yoon EL; APASL ACLF Research Consortium (AARC) for APASL ACLF working Party.. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific association for the study of the liver (APASL): an update. Hepatol Int. 2019 Jul;13(4):353-390. doi: 10.1007/s12072-019-09946-3. Epub 2019 Jun 6. Erratum in: Hepatol Int. 2019 Nov;13(6):826-828. PMID: 31172417; PMCID: PMC6728300.

Schmittgen, T., Livak, K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc 3, 1101–1108 (2008). https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73

Shen ZX, Wu DD, Xia J, Wang XB, Zheng X, Huang Y, Li BL, Meng ZJ, Gao YH, Qian ZP, Liu F, Lu XB, Shang J, Yan HD, Zheng YB, Gu WY, Zhang Y, Wei JY, Tan WT, Hou YX, Zhang Q, Xiong Y, Zou CC, Chen J, Huang ZB, Jiang XH, Luo S, Chen YY, Gao N, Liu CY, Yuan W, Mei X, Li J, Li T, Zhou XY, Deng GH, Chen JJ, Ma X, Li H. Prevalence and clinical characteristics of autoimmune liver disease in hospitalized patients with cirrhosis and acute decompensation in China. World J Gastroenterol. 2022 Aug 21;28(31):4417-4430. doi: 10.3748/wjg.v28.i31.4417. PMID: 36159019; PMCID: PMC9453760.

Spano, A., Barni, S., & Sciola, L. (2013). PMA withdrawal in PMA-treated monocytic THP-1 cells and subsequent retinoic acid stimulation, modulate induction of apoptosis and appearance of dendritic cells. Cell Proliferation, 46(3), 328–347. https://doi.org/10.1111/cpr.12030

Triantafyllou, E., Woollard, K. J., McPhail, M. J. W., Antoniades, C. G., & Possamai, L. A. (2018). The Role of Monocytes and Macrophages in Acute and Acute-on-Chronic Liver Failure. In Frontiers in Immunology (Vol. 9). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02948

Varol, C., Yona, S., & Jung, S. (2009). Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. In Immunology and Cell Biology (Vol. 87, Issue 1, pp. 30–38). https://doi.org/10.1038/icb.2008.90

Vincent, J. L., Opal, S., Torres, A., Bonten, M., Cohen, J., & Wunderink, R. (2003). The PIRO concept: I is for infection. Critical Care, 7(3), 252–255. https://doi.org/10.1186/cc2194

Vincent, J. L., Wendon, J., Groeneveld, J., Marshall, J. C., Streat, S., & Carlet, J. (2003). The PIRO concept: O is for organ dysfunction. Critical Care, 7(3), 260. https://doi.org/10.1186/cc2196

Vincent, J.-L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., de Mendon~a, A., Bruining, H., Reinhart, C. K., Suter,P. M., Thijs, L. G., de Mendonga, A., & Suter, R. M. (1996). The SOFA (Sepsis.related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. In Intensive Care Med (Vol. 22). Springer-Verlag.

Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. Int J Mol Sci. 2017 Aug 25;18(9):1852. doi: 10.3390/ijms18091852. PMID: 28841158; PMCID: PMC5618501.

Webber, J., & Clayton, A. (2013). How pure are your vesicles? Journal of Extracellular Vesicles, 2(1). https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.19861