

RESUMEN	15
Abreviaturas	19
INTRODUCCIÓN	21
1. Enfermedades inflamatorias inmunomediadas.....	23
1.1. Definición	23
1.2. Tratamientos actuales	24
2. Terapias avanzadas para el tratamiento de enfermedades inmunomediadas: la terapia celular	26
2.1. Origen de las MSC	26
2.2. Fuentes tisulares de MSC	27
2.3. Propiedades terapéuticas de las MSC	28
2.3.1. Propiedades tróficas y angiogénicas de las MSC	28
2.3.2. Propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de las MSC.....	28
2.4. Ensayos clínicos.....	29
2.5. Mecanismo de acción de las MSC: Hipótesis paracrina. .	32
3. Las vesículas extracelulares (EVs)	33
3.1. Definición de EVs	34
3.2. Caracterización de las EVs	36
3.3. Mecanismo de acción.....	37
3.4. Efecto inmunosupresor de las EV	39
3.4.1. Linfocitos T y B.....	39
3.4.2. Células <i>Natural Killer</i> (NK).....	40
3.4.3. Monocitos, macrófagos y células dendríticas.....	40
3.5. Efecto reparador de las EVs	41

3.5.1. El endotelio vascular y las EVs	42
3.5.2. La fibrosis tisular y las EVs.....	42
3.6. Las EVs como producto biológico terapéutico	43
3.6.1. Ventajas de la terapia con EVs frente a la terapia celular....	43
3.6.2. Retos de la terapia con EVs	44
4. Modificaciones en las MSC para aumentar el potencial de las EVs	47
4.1. Modificación del medio de cultivo con factores.....	47
4.2. La hipoxia como desencadenante de respuestas de supervivencia celular	48
4.3. Modificaciones genéticas para aumentar el efecto terapéutico de las EVs.....	49
4.3.1. Sobreexpresión de proteínas	49
4.3.1.1. El Factor Inducible por Hipoxia-1 alpha (HIF-1 α)	50
4.3.1.2. Inmortalización: Telomerasa Transcriptasa Inversa (hTERT)	51
4.3.2. Sobreexpresión de miARNs	53
5. Terapias de MSC-EVs en ensayos clínicos	54
5.1. Enfermedades inmunomediadas	54
5.2. Reparación de heridas	55
5.3. Enfermedades neurológicas	56
5.4. Patologías cardiovasculares.....	57
5.5. Tratamiento de apoyo para el COVID-19	57
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
1. Hipótesis	63
2. Objetivos	63

MATERIAL Y MÉTODOS	65
1. Cultivos celulares	67
1.1. Cultivos primarios	67
1.1.1. Aislamiento de MSC	67
1.1.1.1. Diferenciación y caracterización de MSC	67
1.1.1.2. Ensayo de cariotipo	68
1.1.1.3. Acondicionamiento inflamatorio de las MSC	68
1.1.2. Aislamiento de PBMCs	68
1.1.2.1. Aislamiento de macrófagos	69
1.1.2.2. Aislamiento de neutrófilos	69
1.1.2.3. Aislamiento de células <i>Natural Killer</i>	69
1.1.3. Fibroblastos dérmicos	70
1.1.4. Células endoteliales (HUVEC)	70
1.2. Líneas celulares	71
1.2.1. HEK-293T	71
1.2.2. THP-1	71
2. Modificación genética de las MSC	74
2.1. Producción de partículas virales	74
2.1.1. Transformación de bacterias y extracción de plásmidos	74
2.1.2. Transfección de plásmidos en HEK-293T: generación de partículas lentivirales	74
2.2. Transducción lentiviral de MSC	75
2.2.1. Caracterización de la inmortalización celular con hTERT	76
3. Aislamiento de vesículas extracelulares	76
3.1. Método de extracción: Ultracentrifugación	76

3.2. Caracterización de las EVs	77
3.2.1. Cuantificación mediante nanoparticle tracking análisis.....	77
3.2.2. Ensayo de la actividad acetilcolinesterasa	77
3.2.3. Microscopía electrónica e Inmunooro	77
4. Análisis de expresión génica.....	78
4.1. Extracción de ARN.....	78
4.2. Retrotranscripción.....	78
4.3. RT-qPCR.....	78
5. Análisis de expresión de proteína.....	79
5.1. Citometría de flujo	79
5.1.1. Detección de EVs por citometría de flujo	80
5.2. Inmunodetección	80
5.2.1. Preparación de la muestra	80
5.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	81
5.2.3. Transferencia e inmunodetección	81
5.3. Ensayo con ELISA	82
5.4. Ensayo de inmunodetección por esferas acoplada a citometría de flujo (CBA).....	83
6. Inmunocitoquímica.....	83
7. Ensayo de viabilidad celular.....	84
7.1. Ensayo de viabilidad celular MTT.....	84
7.2. Ensayo de viabilidad celular CCK8	85
7.3. Ensayo de apoptosis celular Anexina V.....	85
8. Ensayo de captación de EVs	85
9. Ensayo de proliferación de linfocitos T	86

10. Ensayo de adhesión celular.....	88
11. Ensayo de citotoxicidad de células NKs.....	88
12. Análisis proteómico de las EVs.....	89
13. Modelos animales.....	89
13.1. Especies murinas	89
13.2. Modelo de hipersensibilidad de tipo IV	89
13.3. Modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobenceno-sulfónico	90
14. Técnicas histológicas	90
14.1. Inclusión del tejido en parafina.....	90
14.2. Desparafinación del tejido	91
14.3. Tinción de Hematoxilina y Eosina	91
14.4. Tinción de Rojo Sirio	92
14.5. Tinción de Inmunofluorescencia	92
15. Análisis estadístico	93
RESULTADOS.....	95
1. Aislamiento de células mesenquimales estromales de pulpa dental.....	97
1.1. Caracterización fenotípica y potencial de diferenciación	97
2. Modificaciones genéticas y primado de las MSC.....	98
2.1. La sobreexpresión del factor HIF-1α aumenta el potencial inmunosupresor de las MSC silvestres	98
2.2. Inmortalización de las MSC.....	99
2.2.1. La inmortalización de las MSC con SV40 disminuye su potencial inmunosupresor	99

2.2.2. La inmortalización con hTERT retrasa la entrada en senescencia de las MSC y aumenta su tiempo de vida in vitro	¡Error! Marcador no definido.
2.3. La inmortalización con hTERT no afecta a las características que definen a las MSC ni a su potencial inmunosupresor	101
2.4. La activación de la vía NF- κ B mediada por TNF- α , IL-1 β y IFN- γ aumenta la actividad inmunoreguladora de las MSC..	104
3. Aislamiento y caracterización de las EVs.....	106
3.1. Caracterización fenotípica y ultraestructural.....	107
3.2. El medio acondicionado con citoquinas aumenta la liberación de EVs por parte de las MSC.....	108
3.3. La sobreexpresión del factor HIF-1 α aumenta la liberación de EVs por parte de las MSC activadas con citoquinas	109
3.4. El medio acondicionado con citoquinas y la sobreexpresión del factor HIF-1 α aumenta el contenido inmunosupresor de las EVs.....	110
3.5. Las EVs son captadas por distintas poblaciones celulares del sistema inmune	113
4. Potencial inmunosupresor y resolutorio de la inflamación de las EV _{MSC-T-HIF^C} <i>in vitro</i>	114
4.1. Las EV _{MSC-T-HIF^C} disminuyen más eficazmente la proliferación de linfocitos T activados respecto a las EV _{MSC-T}	114
4.2. Las EV _{MSC-T-HIF^C} minimizan más significativamente la actividad citotóxica de las células NKs que las EV _{MSC-T}	117

4.3. Las EV_{MSC-T-HIF^C} reducen la activación de las células THP-1 mediada por el LPS	118
4.4. Las EV_{MSC-T-HIF^C} repolarizan los macrófagos M1 hacia un fenotipo M2 de forma más eficiente que las EV _{MSC-T^C}	119
4.4.1. Caracterización fenotípica y funcional de los monocitos diferenciados hacia Mφ1 tratados con EV _s	119
4.4.2. Las EV _{s MSC-T-HIF^C aumentan la eferocitosis de los neutrófilos por parte de los macrófagos.....}	122
4.4.3. Las EV _{s MSC-T-HIF^C aumentan la inmunosupresión de los macrófagos sobre células T}	123
4.5. Las EV_{MSC-T-HIF^C} reducen la inflamación y la adhesión de las PBMC al endotelio activado	124
4.6. Las EV_{MSC-T-HIF^C} reducen la fibrosis mediada por TFG-β en cultivos de fibroblastos.....	126
5. Potencial inmunosupresor de las EV_{MSC-T-HIF^C} <i>in vivo</i>	127
5.1. Las EV_{MSC-T-HIF^C} reducen la inflamación en un modelo de hipersensibilidad retardada de tipo IV	127
5.2. Las EV_{MSC-T-HIF^C} previenen el acortamiento del colón, la inflamación y la fibrosis en un modelo de colitis aguda	131
DISCUSIÓN	137
1. MSC como fuente de EVs	139
2. Uso de EVs en terapias inmunosupresoras	141
3. Potencial inmunosupresor de las EV_{MSC-T-HIF^C} <i>in vitro</i>	144
4. Potencial inmunosupresor de las EV_{MSC-T-HIF^C} <i>in vivo</i>	147
CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFÍA	155