



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Instituto de Investigación  
Sanitaria La Fe

# Terapias innovadoras basadas en vesículas extracelulares derivadas de células madre mesenquimales modificadas genéticamente

**Marta Gómez Ferrer**

Directora de Tesis: Pilar Sepúlveda Sanchís

Co-Director de Tesis: Akaitz Dorronsoro González

Tutora UPV: M<sup>a</sup> Desamparados Pascual-Ahuir Giner

Febrero, 2022



“Un científico en su laboratorio no es un simple técnico:  
también es un niño que se enfrenta a fenómenos naturales que lo  
impresionan como si fueran cuentos de hadas.”

Marie Curie



## AGRADECIMIENTOS

En 2015 comencé mis prácticas del Grado en el laboratorio RETRACAR y siete años después no me arrepiento de haber escogido esta familia para adentrarme en el mundo de la ciencia y formarme como investigadora. Solo tengo palabras de cariño y agradecimiento para todos ellos, los que ya se fueron, los que acaban de llegar y los que siguen día a día al pie de bancada.

En primer lugar, dar las gracias a mi directora de tesis, la Dra. Pilar Sepúlveda, por haber confiado en mi desde el primer momento, por darme la oportunidad de realizar mi tesis en este gran grupo y brindarme de todos los conocimientos que he adquirido en el camino no sólo como investigadora, sino como profesional en muchos otros ámbitos. Por guiarnos durante el camino de aprendizaje, pero dejándonos siempre libertar a la hora de explorar nuevos horizontes. Me voy tremendamente agradecida de toda la experiencia adquirida durante estos años.

Agradecer a mi director Akaitz Dorronsoro, por adentrarme en el maravilloso mundo de la inmunología y de la citometría. Esta tesis es su legado y para mí ha sido un placer realizarla junto a él. Gracias por implicarte en todos mis experimentos, por apoyarme cuando algo no iba bien y buscar una alternativa. Gracias por enseñarme tanto de ciencia y de cultura general.

A María Ciria, con ella empecé mis andadas con la pipeta y ella me enseñó a ser lo más productiva que se puede ser en un laboratorio. Eres la mejor y la más valiente.

A mis niños. Al Dr, Rafiki por enseñarme, por escucharme, por parar lo que estuvieras haciendo siempre que le pedía ayuda, porque no podría haber elegido un mejor compañero de tesis que tú. Estaré siempre para lo que necesites. A Marc Buigues, por engancharnos a todos sus culebrones y por ser la guindilla de todos nuestros planes, siempre con un “chupitet” listo para ahogar cualquier semana negra. A Nacho, eres un chico diez y he podido aprender y reír mucho a tu lado, te deseo mucho albur como futuro doctor. A mi Eleni, por aguantarme en esta última etapa, por formar parte del *team* monocitos y sufrir conmigo delante del citómetro mientras te ponía al día de todos mis royos. Gracias por tu apoyo amiga. A Marta II, por ser tan yo siendo tan tú, llegaste como un terremoto y te has convertido en imprescindible. A Esteleta, por estar ahí en la época de los virus y las biopsias de PBMCs, no habría sido lo mismo sin ti, ni sin tu gran disposición ni tu risa constante. A Marilú, por aportar un poco de locura a la ciencia y ser la mejor tiktoker científica que conozco.

A Imelda, porque como buena post-Doc me ha resuelto mil dudas que me han surgido científica y profesionalmente, por ayudarme en las redacciones de los mails y a desahogarme los días de mucha saturación, eres la mejor compañera de despacho. A Marini, por enseñarme muchísimas cosas a lo largo de toda mi trayectoria en el lab, desde que fui unos de sus patitos y rellenaba puntas hasta bajar a operar mi última tanda de ratones, siempre con una mano dispuesta a ayudar y con un bote de chuches o de kikos para amenizar los días largos. A Rosita, porque siempre está disponible para cualquier consulta que le hagas, por gestionar tan bien los pedidos, por no quejarse nunca de nosotros y por hacer unas tartas de naranja espectaculares. A Amparito, por ser ejemplo a seguir de todos, porque es a la primera que veo por las mañanas y siempre tiene una sonrisa, además de ser nuestro médico personal. A Delia porque también puso su granito de arena en mi aprendizaje y estuvo cuando se le necesitaba. A los suecos Sandra y Hernán, por los buenos tiempos del CIPF.

Sois todos estupendos como profesionales y como personas, me llevo un gran recuerdo de todos estos años, los cuales no habrían sido lo mismo sin ninguno de vosotros. Ha sido una grata experiencia. ¡GRACIAS!

Finalmente, mil gracias a mis padres, por guiarme siempre hacia la mejor versión de mí, por apoyar todas mis decisiones y por interesarse siempre por mis experimentos en el laboratorio sin tener muy claro de que iban. Nunca podré devolveros todo el cariño y fuerza que me habéis dado. A mi hermano César, por ser fuente de inspiración y por creer tanto en mí, eso me empuja siempre hacia arriba. A Ferchito, por aguantarme en todas mis versiones y hacerme la vida más fácil a su lado.

Os quiero mucho.

<b>RESUMEN .....</b>	<b>13</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>1. Enfermedades inflamatorias inmunomediadas.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1. Definición .....</b>	<b>21</b>
<b>1.2. Tratamientos actuales .....</b>	<b>22</b>
<b>2. Terapias avanzadas para el tratamiento de enfermedades inmunomediadas: la terapia celular .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Origen de las MSC .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Fuentes tisulares de MSC .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3. Propiedades terapéuticas de las MSC .....</b>	<b>26</b>
2.3.1. Propiedades tróficas y angiogénicas de las MSC .....	26
2.3.2. Propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de las MSC.....	26
<b>2.4. Ensayos clínicos.....</b>	<b>27</b>
<b>2.5. Mecanismo de acción de las MSC: Hipótesis paracrina..</b>	<b>30</b>
<b>3. Las vesículas extracelulares (EVs) .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Definición de EVs .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2. Caracterización de las EVs .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3. Mecanismo de acción.....</b>	<b>35</b>
<b>3.4. Efecto inmunosupresor de las EV .....</b>	<b>37</b>
3.4.1. Linfocitos T y B.....	37
3.4.2. Células <i>Natural Killer</i> (NK).....	38
3.4.3. Monocitos, macrófagos y células dendríticas.....	38
<b>3.5. Efecto reparador de las EVs .....</b>	<b>39</b>

3.5.1. El endotelio vascular y las EVs .....	40
3.5.2. La fibrosis tisular y las EVs.....	40
<b>3.6. Las EVs como producto biológico terapéutico .....</b>	<b>41</b>
3.6.1. Ventajas de la terapia con EVs frente a la terapia celular....	41
3.6.2. Retos de la terapia con EVs .....	42
<b>4. Modificaciones en las MSC para aumentar el potencial de las EVs .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Modificación del medio de cultivo con factores.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2. La hipoxia como desencadenante de respuestas de supervivencia celular .....</b>	<b>46</b>
<b>4.3. Modificaciones genéticas para aumentar el efecto terapéutico de las EVs.....</b>	<b>47</b>
4.3.1. Sobreexpresión de proteínas .....	47
4.3.1.1. El Factor Inducible por Hipoxia-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) .....	48
4.3.1.2. Inmortalización: Telomerasa Transcriptasa Inversa (hTERT)	49
4.3.2. Sobreexpresión de miARNs .....	51
<b>5. Terapias de MSC-EVs en ensayos clínicos .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1. Enfermedades inmunomediadas .....</b>	<b>52</b>
<b>5.2. Reparación de heridas .....</b>	<b>53</b>
<b>5.3. Enfermedades neurológicas .....</b>	<b>54</b>
<b>5.4. Patologías cardiovasculares.....</b>	<b>55</b>
<b>5.5. Tratamiento de apoyo para el COVID-19 .....</b>	<b>55</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>59</b>
<b>1. Hipótesis .....</b>	<b>61</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>61</b>

<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
<b>1. Cultivos celulares .....</b>	<b>65</b>
<b>1.1. Cultivos primarios .....</b>	<b>65</b>
1.1.1. Aislamiento de MSC .....	65
1.1.1.1. Diferenciación y caracterización de MSC .....	65
1.1.1.2. Ensayo de cariotipo .....	66
1.1.1.3. Acondicionamiento inflamatorio de las MSC .....	66
1.1.2. Aislamiento de PBMCs .....	66
1.1.2.1. Aislamiento de macrófagos .....	67
1.1.2.2. Aislamiento de neutrófilos .....	67
1.1.2.3. Aislamiento de células <i>Natural Killer</i> .....	67
1.1.3. Fibroblastos dérmicos .....	68
1.1.4. Células endoteliales (HUVEC) .....	68
<b>1.2. Líneas celulares .....</b>	<b>69</b>
1.2.1. HEK-293T .....	69
1.2.2. THP-1 .....	69
<b>2. Modificación genética de las MSC .....</b>	<b>72</b>
<b>2.1. Producción de partículas virales .....</b>	<b>72</b>
2.1.1. Transformación de bacterias y extracción de plásmidos .....	72
2.1.2. Transfección de plásmidos en HEK-293T: generación de partículas lentivirales .....	72
<b>2.2. Transducción lentiviral de MSC .....</b>	<b>73</b>
2.2.1. Caracterización de la inmortalización celular con hTERT .....	74
<b>3. Aislamiento de vesículas extracelulares .....</b>	<b>74</b>
<b>3.1. Método de extracción: Ultracentrifugación .....</b>	<b>74</b>

<b>3.2. Caracterización de las EVs .....</b>	<b>75</b>
3.2.1. Cuantificación mediante nanoparticle tracking análisis.....	75
3.2.2. Ensayo de la actividad acetilcolinesterasa .....	75
3.2.3. Microscopía electrónica e Inmunooro .....	75
<b>4. Análisis de expresión génica.....</b>	<b>76</b>
<b>4.1. Extracción de ARN.....</b>	<b>76</b>
<b>4.2. Retrotranscripción.....</b>	<b>76</b>
<b>4.3. RT-qPCR.....</b>	<b>76</b>
<b>5. Análisis de expresión de proteína.....</b>	<b>77</b>
<b>5.1. Citometría de flujo .....</b>	<b>77</b>
5.1.1. Detección de EVs por citometría de flujo .....	78
<b>5.2. Inmunodetección .....</b>	<b>78</b>
5.2.1. Preparación de la muestra .....	78
5.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	79
5.2.3. Transferencia e inmunodetección .....	79
<b>5.3. Ensayo con ELISA .....</b>	<b>80</b>
<b>5.4. Ensayo de inmunodetección por esferas acoplada a     citometría de flujo (CBA).....</b>	<b>81</b>
<b>6. Inmunocitoquímica.....</b>	<b>81</b>
<b>7. Ensayo de viabilidad celular.....</b>	<b>82</b>
<b>7.1. Ensayo de viabilidad celular MTT.....</b>	<b>82</b>
<b>7.2. Ensayo de viabilidad celular CCK8 .....</b>	<b>83</b>
<b>7.3. Ensayo de apoptosis celular Anexina V.....</b>	<b>83</b>
<b>8. Ensayo de captación de EVs .....</b>	<b>83</b>
<b>9. Ensayo de proliferación de linfocitos T .....</b>	<b>84</b>

<b>10. Ensayo de adhesión celular.....</b>	<b>86</b>
<b>11. Ensayo de citotoxicidad de células NKs.....</b>	<b>86</b>
<b>12. Análisis proteómico de las EVs.....</b>	<b>87</b>
<b>13. Modelos animales.....</b>	<b>87</b>
<b>13.1. Especies murinas .....</b>	<b>87</b>
<b>13.2. Modelo de hipersensibilidad de tipo IV .....</b>	<b>87</b>
<b>13.3. Modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobenceno-sulfónico .....</b>	<b>88</b>
<b>14. Técnicas histológicas .....</b>	<b>88</b>
<b>14.1. Inclusión del tejido en parafina.....</b>	<b>88</b>
<b>14.2. Desparafinación del tejido .....</b>	<b>89</b>
<b>14.3. Tinción de Hematoxilina y Eosina .....</b>	<b>89</b>
<b>14.4. Tinción de Rojo Sirio .....</b>	<b>90</b>
<b>14.5. Tinción de Inmunofluorescencia .....</b>	<b>90</b>
<b>15. Análisis estadístico .....</b>	<b>91</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>93</b>
<b>1. Aislamiento de células mesenquimales estromales de pulpa dental.....</b>	<b>95</b>
<b>1.1. Caracterización fenotípica y potencial de diferenciación</b>	<b>95</b>
<b>2. Modificaciones genéticas y primado de las MSC.....</b>	<b>96</b>
<b>2.1. La sobreexpresión del factor HIF-1<math>\alpha</math> aumenta el potencial inmunosupresor de las MSC silvestres .....</b>	<b>96</b>
<b>2.2. Inmortalización de las MSC.....</b>	<b>97</b>
2.2.1. La inmortalización de las MSC con SV40 disminuye su potencial inmunosupresor .....	97

2.2.2. La inmortalización con hTERT retrasa la entrada en senescencia de las MSC y aumenta su tiempo de vida in vitro .....	98
<b>2.3. La inmortalización con hTERT no afecta a las características que definen a las MSC ni a su potencial inmunosupresor .....</b>	<b>99</b>
2.4. La activación de la vía NF- $\kappa$ B mediada por TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ y IFN- $\gamma$ aumenta la actividad inmunoreguladora de las MSC..	102
<b>3. Aislamiento y caracterización de las EVs.....</b>	<b>104</b>
3.1. Caracterización fenotípica y ultraestructural.....	105
3.2. El medio acondicionado con citoquinas aumenta la liberación de EVs por parte de las MSC.....	106
3.3. La sobreexpresión del factor HIF-1 $\alpha$ aumenta la liberación de EVs por parte de las MSC activadas con citoquinas .....	107
3.4. El medio acondicionado con citoquinas y la sobreexpresión del factor HIF-1 $\alpha$ aumenta el contenido inmunosupresor de las EVs.....	108
3.5. Las EVs son captadas por distintas poblaciones celulares del sistema inmune .....	111
<b>4. Potencial inmunosupresor y resolutorio de la inflamación de las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> <i>in vitro</i>.....</b>	<b>112</b>
4.1. Las EV <sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> disminuyen más eficazmente la proliferación de linfocitos T activados respecto a las EV <sub>MSC-T</sub> .....	112
4.2. Las EV <sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> minimizan más significativamente la actividad citotóxica de las células NKs que las EV <sub>MSC-T</sub> .....	115

<b>4.3. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub></b> reducen la activación de las células THP-1 mediada por el LPS .....	<b>116</b>
<b>4.4. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub></b> repolarizan los macrófagos M1 hacia un fenotipo M2 de forma más eficiente que las EV <sub>MSC-T<sup>C</sup> .....</sub>	<b>117</b>
4.4.1. Caracterización fenotípica y funcional de los monocitos diferenciados hacia Mφ1 tratados con EV <sub>s</sub> .....	117
4.4.2. Las EV <sub>s MSC-T-HIF<sup>C</sup> aumentan la eferocitosis de los neutrófilos por parte de los macrófagos.....</sub>	120
4.4.3. Las EV <sub>s MSC-T-HIF<sup>C</sup> aumentan la inmunosupresión de los macrófagos sobre células T .....</sub>	121
<b>4.5. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub></b> reducen la inflamación y la adhesión de las PBMC al endotelio activado .....	<b>122</b>
<b>4.6. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub></b> reducen la fibrosis mediada por TFG-β en cultivos de fibroblastos.....	<b>124</b>
<b>5. Potencial inmunosupresor de las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub></b> <i>in vivo</i> .....	<b>125</b>
<b>5.1. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub></b> reducen la inflamación en un modelo de hipersensibilidad retardada de tipo IV .....	<b>125</b>
<b>5.2. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub></b> previenen el acortamiento del colón, la inflamación y la fibrosis en un modelo de colitis aguda .....	<b>129</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>135</b>
<b>1. MSC como fuente de EVs .....</b>	<b>137</b>
<b>2. Uso de EVs en terapias inmunosupresoras .....</b>	<b>139</b>
<b>3. Potencial inmunosupresor de las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub></b> <i>in vitro</i> .....	<b>142</b>
<b>4. Potencial inmunosupresor de las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub></b> <i>in vivo</i> .....	<b>145</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>153</b>



## RESUMEN

Las células mesenquimales estromales (MSC) poseen una serie de cualidades inmunológicas, pro-angiogénicas y regenerativas que las convierten en un excelente candidato para el tratamiento de diversas patologías. A pesar de las pruebas contundentes obtenidas en modelos preclínicos que demuestran la actividad terapéutica de las MSC, los ensayos clínicos no han podido mostrar hasta ahora un beneficio consistente, probablemente debido a deficiencias metodológicas y a la falta de estandarización, así como a la variabilidad genética intrínseca a los estudios en humanos. Debido a ello, ha sido necesario profundizar en los mecanismos responsables del beneficio terapéutico y rediseñar las estrategias clínicas. En los últimos años, se ha observado que la reparación tisular mediada por las MSC se produce de forma paracrina, y se ha constatado que las vesículas extracelulares (EVs) secretadas por las MSC ( $EV_{MSC}$ ) son capaces de recapitular las propiedades inmunosupresoras de las células parentales. Además, las estrategias terapéuticas basadas en vesículas tienen grandes ventajas en términos de bioseguridad y producción en condiciones de grado clínico, reduciendo significativamente el coste de dichas terapias. Sin embargo, la dosis efectiva en grandes mamíferos, incluidos los humanos, es bastante elevada y la producción industrial de EVs se ve dificultada en parte, por la senescencia proliferativa que afecta a las MSC durante la expansión celular masiva.

En este trabajo hemos intentado solventar los principales escollos de la terapia con EVs incrementando su potencial inmunosupresor y reduciendo por tanto la dosis efectiva. Este incremento se ha conseguido gracias a la sobreexpresión del factor inducible por hipoxia 1- $\alpha$  y al desarrollo de un medio de acondicionamiento en cultivo basado en citoquinas. Además, la inmortalización de las células secretoras mediante la transducción del gen de la telomerasa humana ha permitido tanto la estandarización del producto como su producción a gran escala. La eficacia de estas EVs ha sido testada en diferentes poblaciones celulares *in vitro*: linfocitos T, monocitos, células *Natural Killer*, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos; y en dos modelos de ratón: hipersensibilidad retardada y colitis aguda inducida por TNBS.

En conclusión, hemos desarrollado una fuente de EVs de larga duración que secreta grandes cantidades de vesículas con mayor capacidad inmunosupresora y antiinflamatoria, facilitando un producto terapéutico más estándar y fácil de producir para el tratamiento de enfermedades inflamatorias inmunomediadas.

## SUMMARY

Mesenchymal stromal cells (MSC) possess several immunological, pro-angiogenic and regenerative qualities that make them an excellent candidate for the treatment of various pathologies. Despite compelling evidence from preclinical models demonstrating the therapeutic activity of MSCs, clinical trials have so far failed to show consistent benefit, probably due to methodological shortcomings and lack of standardisation, as well as the genetic variability intrinsic to human studies. As a result, it has been necessary to further investigate the mechanisms responsible for therapeutic benefit and to redesign clinical strategies. In recent years, it has been observed that MSC-mediated tissue repair occurs in a paracrine pathway, and it has been confirmed that extracellular vesicles (EVs) secreted by MSC ( $EV_{MSC}$ ) are able to recapitulate the immunosuppressive properties of the parental cells. Moreover, vesicle-based therapeutic strategies have great advantages in terms of biosafety and production under clinical-grade conditions, significantly reducing the cost of such therapies. However, the effective dose in large mammals, including humans, is quite high and the industrial production of EVs is hampered in part by the proliferative senescence that affects MSC during massive cell expansion.

In this work, we have attempted to overcome the main challenges of EVs therapy by increasing their immunosuppressive potential and thus reducing the effective dose. This increase has been achieved by overexpression of hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  and the development of a cytokine-based culture conditioning medium. In addition, immortalization of secretory cells by transduction with the human telomerase gene has allowed both product standardisation and large-scale production. The efficacy of these EVs has been tested in different cell populations *in vitro*: T lymphocytes, monocytes, Natural Killer cells, macrophages, endothelial cells and fibroblasts; and in two mouse models: delayed-type hypersensitivity and TNBS-induced acute colitis.

In conclusion, we have developed a long-lasting source of EVs that secretes large amounts of vesicles with enhanced immunosuppressive and anti-inflammatory capacity, providing a more standard and easier-to-produce therapeutic product for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases.

## RESUM

Les cèl·lules mesenquimals estromals (MSC) posseeixen una sèrie de qualitats immunològiques, pro-angiogèniques i regeneratives que les converteixen en un excel·lent candidat per al tractament de diverses patologies. Tot i les proves contundents obtingudes en models preclínic que demostren l'activitat terapèutica de les MSC, els assaigs clínics no han pogut mostrar fins ara un benefici consistent, probablement degut a deficiències metodològiques i a la manca d'estandardització, així com a la variabilitat genètica intrínseca als estudis en humans. A causa d'això, ha calgut aprofundir en els mecanismes responsables del benefici terapèutic i redissenyar les estratègies clíniques. En els últims anys, s'ha observat que la reparació tissular intervinguda per les MSC es produeix de forma paracrina, i s'ha constatat que les vesícules extracel·lulars (EVs) secretades per les MSC ( $EV_{MSC}$ ) són capaços de recapitular les propietats immunosupressores de les cèl·lules parentals. A més, les estratègies terapèutiques basades en vesícules tenen grans avantatges en termes de bioseguretat i producció en condicions de grau clínic, reduint significativament el cost d'aquestes teràpies. No obstant això, la dosi efectiva en grans mamífers, inclosos els humans, és bastant elevada i la producció industrial de les EVs es veu dificultada en part, per la senescència proliferativa que afecta les MSC durant l'expansió cel·lular massiva.

En aquest treball hem intentat solucionar els principals esculls de la teràpia amb EVs incrementant el seu potencial immunosupressor i reduint per tant la dosi efectiva. Aquest increment s'ha aconseguit gràcies a la sobreexpressió del factor induïble per hipòxia 1-alpha i a el desenvolupament d'un mitjà de condicionament en cultiu basat en citoquines. A més, la immortalització de les cèl·lules secretores mitjançant la transducció del gen de la telomerasa humana ha permès tant l'estandardització del producte com la seva producció a gran escala. L'eficàcia d'aquestes EVs ha estat testada en diferents poblacions cel·lulars *in vitro*: limfòcits T, monòcits, cèl·lules *Natural Killer*, macròfags, cèl·lules endotelials i fibroblasts; i en dos models de ratolí: hipersensibilitat retardada i colitis aguda induïda per TNBS.

En conclusió, hem desenvolupat una font de EVs de llarga durada que secreta grans quantitats de vesícules amb major capacitat immunosupressora i antiinflamatòria, facilitant un producte terapèutic més estàndard i fàcil de produir per al tractament de malalties inflamatòries immunomediades.



## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	<i>Allophycocyanin</i> (Aloficocianina)
APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i> (Célula presentadora de antígenos)
ARN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido desoxirribonucleico mensajero
ATP	Adenine-Triphosphate
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
c	<i>Cytokine conditioning</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Assay</i>
CCK8	<i>Cell Counting Kit 8</i>
CCL-	<i>CC motif chemokine ligand</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
COL-1A	<i>Collagen 1A</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
CxCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DC	<i>Dendritic cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EF-1 $\alpha$	<i>Elongation Factor 1 alpha</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EICH	Enfermedad de injerto contra huésped
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EVs	<i>Extracellular Vesicle</i> (Vesícula extracelular)
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	Green Fluorescent Protein
HCl	<i>Hydrochloric acid</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia inducible factor-1 alpha</i>
HLA-G	<i>Human leukocyte antigen</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cells</i>
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1	<i>Intercellular adhesión molecule 1</i>
ICF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IDO	<i>Indoleamina 2,3-dioxygenasa</i>
IFN- $\gamma$	<i>Interferon-gamma</i>
Ig	<i>Immunoglobulin</i> (Anticuerpo)
IL-	<i>Interleukin</i>
IL-RA	<i>Interleukin 1 receptor antagonist</i>

IMID	<i>Immune-mediated inflammatory disease</i> (Enfermedades inflamatorias inmunomediadas)
IP	Ioduro de propidio
iPSC	<i>induced Pluripotent Stem Cell</i>
ISCT	<i>International Society for Cell Therapy</i>
kDa	<i>kilo Dalton</i>
KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
LB	Lysogeny Broth
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MHC I	<i>Major histocompatibility complex I</i>
MHC II	<i>Major histocompatibility complex II</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i> (Célula madre mesenquimal)
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
MVB	<i>Multivesicular bodies</i>
MΦ	<i>Macrophage</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cell</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Nitric Oxid
°C	Grados Celsius
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PD-L1	<i>Programed death ligand 1</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PFA	Paraformaldehido
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>
rh	<i>Recombinant Human</i>
RIPA	<i>Cell lysis buffer</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SDF	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SSC	<i>Side-scatter</i>
TBS	Tris-buffered saline
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
Treg	<i>Regulatory T cell</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WB	<i>Western blot</i>
α-SMA	<i>Alpha-Smooth Muscle Actin</i>

# INTRODUCCIÓN



# 1. Enfermedades inflamatorias inmunomediadas

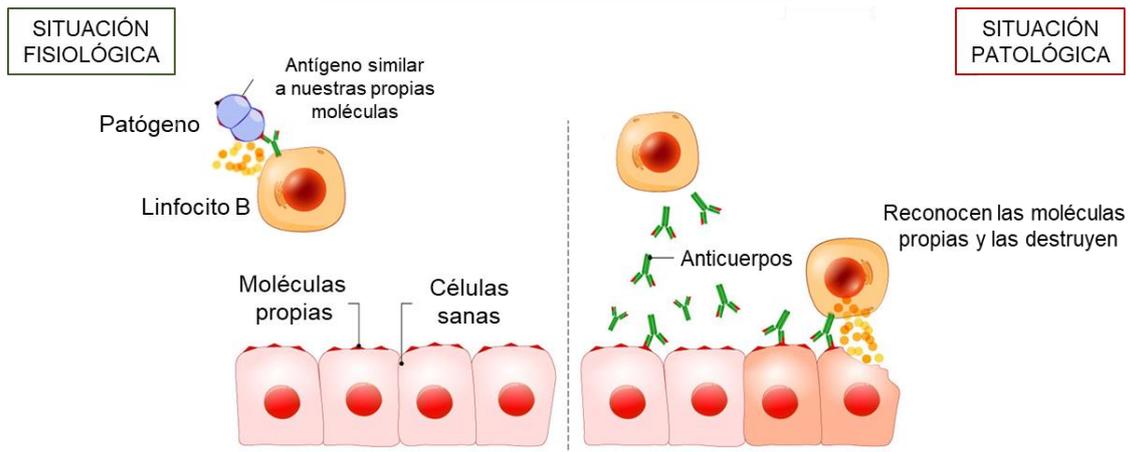
## 1.1. Definición

Nuestro sistema inmunitario es un compendio de procesos biológicos responsable de la defensa del cuerpo contra una gran variedad de patógenos, desde virus hasta parásitos, así como de células cancerosas y cuerpos extraños como astillas de madera o espinas de vegetales, distinguiéndolos del propio tejido sano del organismo [1]. En mamíferos existen dos tipos de mecanismos inmunitarios complementarios: el sistema inmunitario innato que proporciona una respuesta preconfigurada a amplios grupos de situaciones y estímulos, y el sistema inmunitario adaptativo, que proporciona una respuesta adaptada a cada estímulo y que aprende a reconocer los elementos patogénicos [2], [3]. Así pues, las cuatro propiedades esenciales del sistema inmune son el reconocimiento y la discriminación entre lo propio y lo ajeno, la activación de las vías que eliminan a los patógenos, y la memoria inmunológica a largo plazo [4].

Las enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMID, del inglés *Immune-mediated inflammatory diseases*) son un grupo de enfermedades que comparten una inflamación crónica sistémica causada por una alteración del sistema inmune, que puede afectar a diferentes órganos y que provoca entre otras, distintas enfermedades cardiovasculares, neuromusculares e infecciosas [5]. Aunque cada IMID afecta a diferentes tejidos y órganos, los mecanismos desencadenados por la enfermedad son similares. En general, las IMID son enfermedades de etiología desconocida, aunque se piensa que los factores genéticos y ambientales aumentan los niveles de riesgo de estas patologías. De hecho, casi el 10% de la población sufre una IMID a lo largo de la vida.

Las enfermedades autoinmunes son el subconjunto más destacado de las IMID. Estos desordenes están causados por un fallo en los mecanismos de tolerancia inmunológica: el sistema de defensa natural del organismo no puede distinguir entre las células propias y foráneas (bacterias, por ejemplo) o alteradas (células tumorales), lo que hace que el cuerpo ataque por error a las células “normales” [6], [7]. Hay más de 80 tipos de enfermedades autoinmunes que afectan a distintas partes del cuerpo, de las más conocidas encontramos: la diabetes de tipo 1, la artritis reumatoide, la psoriasis, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple y el lupus.

## ENFERMEDADES AUTOINMUNES



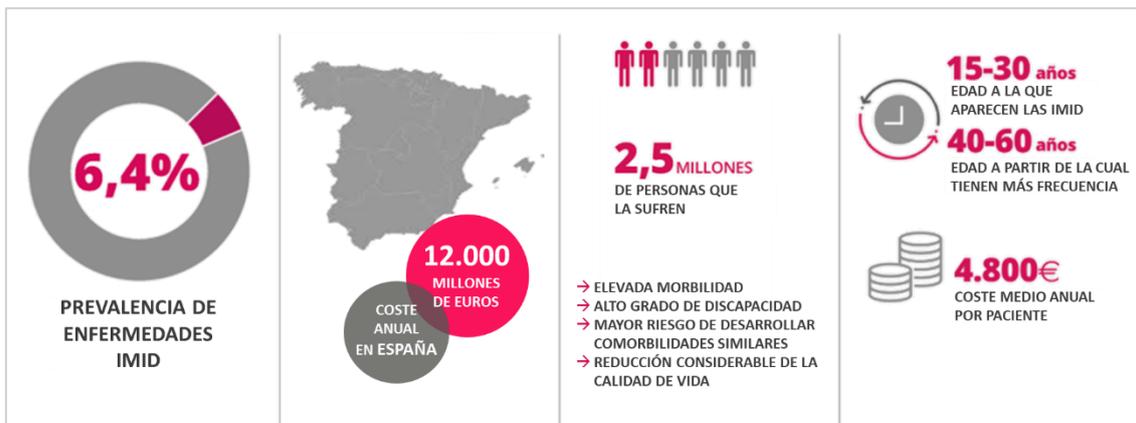
**Figura 1. Etiología de las enfermedades autoinmunes.** En una situación fisiológica el sistema inmunitario reconoce diversos antígenos de los patógenos y reaccionan frente a ellos para eliminarlos. En las enfermedades autoinmunes, hay un desajuste del sistema inmunológico que hace que las células inmunitarias reaccionen frente a proteínas propias del organismo al identificarlas como antígenos. Se produce una situación patológica que provoca que el sistema inmunitario ataque a órganos y tejidos sanos del cuerpo. Adaptación de *Arthritis National Research Foundation*.

### 1.2. Tratamientos actuales

En general, la prevalencia estimada de las IMID en la sociedad occidental alcanza entorno a un 7% [8]. En España hay más de 2,5 millones de personas mayores de 16 años afectadas por estos trastornos crónicos y, aunque a menudo es posible controlar los síntomas debilitantes, mediante agentes inmunosupresores, muchas veces los efectos secundarios de estos fármacos son bastante dañinos, generando un alto impacto en su calidad de vida [9]. En muchos casos, las IMID suponen un elevado coste socioeconómico y en muchas poblaciones desarrolladas se encuentran entre las principales causas de morbilidad, discapacidad y mortalidad. Entre los diversos efectos secundarios que provocan los fármacos inmunosupresores encontramos en primer lugar las dolencias gastrointestinales como llagas en la boca, diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal. También pueden provocar erupciones cutáneas, sensibilidad al sol, cambios en la visión, cataratas, cefaleas, anemia, presión arterial alta y alteración del azúcar en sangre. Muchos de estos fármacos también pueden causar daños en el hígado, los riñones, los músculos, los huesos e incluso provocan infertilidad masculina. Además, hay que tener en cuenta que algunos de ellos pueden interactuar con muchos otros medicamentos.

A parte de estas dolencias, todos los fármacos inmunosupresores dan lugar a una inmunosupresión sistémica aumentando la exposición a infecciones oportunistas tanto bacterianas como víricas. Es por ello, por lo que los pacientes que sufren una IMID en ocasiones tienen que tomar antibióticos de manera continua, con las implicaciones

secundarias que eso conlleva. Por otra parte, deben evitar el uso de ciertas vacunas o vacunarse de ciertas patologías por precaución, como la hepatitis B o C.



**Figura 2. Enfermedades inflamatorias inmunitarias.** Gráfico que muestra la situación actual de las IMID en cuanto a prevalencia y coste económico y social. Adaptación de Proyecto IMID ([www.imid.es/](http://www.imid.es/))

A pesar de que los fármacos inmunosupresores siguen siendo el "estándar de oro" de la atención sanitaria actual, ya que sin ellos los pacientes no podrían aguantar los graves síntomas que producen las enfermedades autoinmunes, todas las afecciones que generan acaban desgastando a los pacientes y alejándolos del resto de la sociedad. Por ello, se ha impulsado el desarrollo de estrategias más específicas que reduzcan el riesgo de inmunodepresión sistémica y los efectos secundarios. Muchos investigadores están tratando de descubrir cómo volver a poner el sistema inmunitario del lado de los pacientes. A medida que se van aclarando los mecanismos que subyacen a las IMID, también lo hacen las oportunidades de nuevos tratamientos. La terapia basada en células madre, por su parte, podría atenuar los efectos producidos por la actividad inmunitaria errante, ya que tienen la capacidad única de modular el sistema inmunitario desactivando las respuestas patológicas y aliviando las consecuencias principalmente inflamatorias a través de mediadores que actúan localmente y no suprimen la respuesta inmunitaria de todo el organismo del paciente. En algunas IMID, modular el sistema inmunitario debería permitir que los tejidos afectados se recuperen de forma natural. En otras, como la diabetes de tipo 1, detener el ataque podría ser sólo la mitad del tratamiento: una vez restaurado el sistema inmune, los tejidos dañados podrían necesitar ser reemplazados para restaurar la función normal, pero ya no volverían a dañarse de nuevo.

## 2. Terapias avanzadas para el tratamiento de enfermedades inmunomediadas: la terapia celular

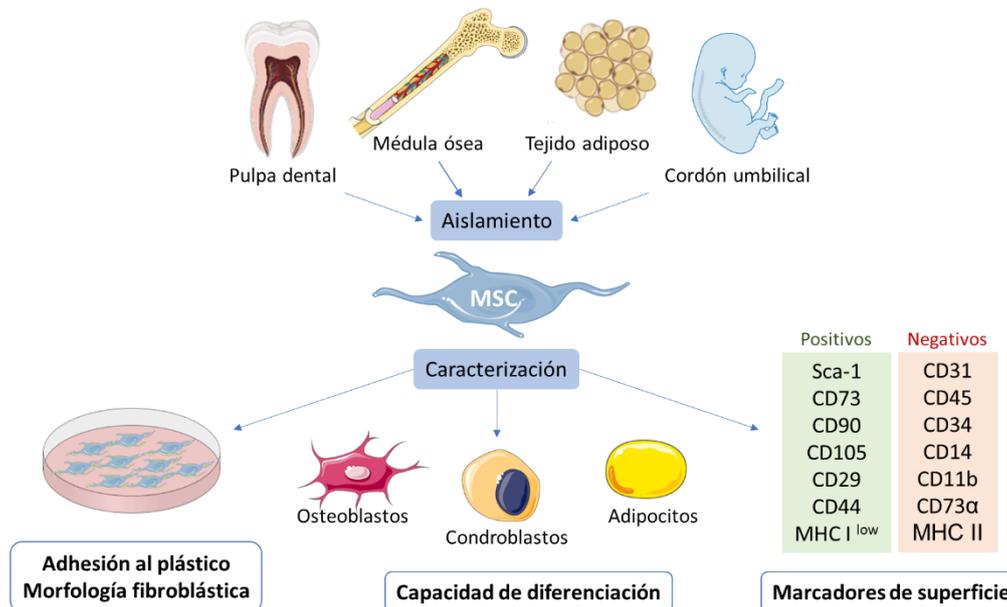
### 2.1. Origen de las MSC

En la década de los 60, Friedenstein *et al.* identificaron una población de células estromales derivadas de médula ósea similares a los fibroblastos con las siguientes características: capacidad clonal o de formación de colonias *in vitro* (CFU-F, del inglés *Colony Forming Unit-Fibroblast*), adherencia al plástico, gran potencial de proliferación y capacidad de autorrenovación y diferenciación [10]. Las observaciones de Friedenstein permitieron descubrir un tipo específico de células primarias, denominadas a partir de 1991 células madre mesenquimales (MSC) por su potencial para diferenciarse en distintos linajes del tejido mesodérmico: adipocitos, osteoblastos y condrocitos [11]. En esa década se comenzó a trabajar en el aislamiento de las MSC y en el estudio de su naturaleza multipotencial, estos trabajos dieron lugar a un artículo clave en el campo de las células madre, publicado en Science en 1999, en el que se demostraba la diferenciación a distintos linajes de poblaciones clonales de MSC humanas y que ha sido citado en más de 16.000 publicaciones [12].

El uso del término célula madre mesenquimal ha sido debatido durante mucho tiempo, ya que faltan datos convincentes *in vivo* que apoyen la capacidad "stemness", es decir, la supervivencia a largo plazo con capacidad de autorrenovación y multipotencia de esta población [13]. Lo más probable es que las MSC pertenezcan a una población celular heterogénea compuesta por células madre auténticas, que constituyan sólo un pequeño porcentaje y en su mayoría, por su progenie (con capacidad de diferenciación multipotente, pero sin las características destacadas de las células madre) y posiblemente también por células senescentes [14]. Basándose en esta concepción, el Comité de Células Madre Mesenquimales y Tisulares de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, del inglés *International Society for Cellular Therapy*) propuso que las células adherentes al plástico, deberían denominarse "células estromales mesenquimales multipotentes", mientras que el término "células madre mesenquimales" debería reservarse para un subconjunto de estas células que muestren actividad de células madre según criterios claramente establecidos [14].

En 2006, la ISCT propuso unos criterios básicos para definir las células estromales mesenquimales multipotentes humanas. Además de sus propiedades de adherencia plástica en condiciones de cultivo estándar y de su capacidad de diferenciación tri-linaje en osteoblastos, condrocitos y adipocitos; más del 95% de la población de MSC es positiva para los tres marcadores de superficie específicos CD73,

CD90 y CD105 y no expresan CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ni el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II [15]. Aunque se ha identificado una amplia gama de marcadores positivos que describen a las MSC, no se ha indicado ningún marcador único como específico.



**Figura 3. Aislamiento, expansión y diferenciación de las MSC.** Las MSC pueden aislarse de diversos tejidos humanos como la médula ósea, el cordón umbilical, el tejido adiposo o la pulpa dentaria. Tras la expansión *in vitro*, las MSC pueden caracterizarse según las directrices establecidas por la ISCT. Morfológicamente, las MSC son similares a los fibroblastos, crecen como cultivos adherentes y expresan un panel de marcadores positivos y negativos. Además, las MSC tienen el potencial de diferenciarse en adipocitos, condrocitos, osteoblastos y otros tipos de células.

## 2.2. Fuentes tisulares de MSC

Tras su descubrimiento inicial en la médula ósea, las MSC se han aislado y caracterizado a partir de varios tejidos adultos; como el adiposo [16], la pulpa dentaria [17], la dermis [18], el líquido sinovial [19] o el periostio [20], y perinatales; como el cordón umbilical, la placenta y el líquido amniótico [21], [22], entre otros. Conocer la abundancia relativa de MSC en todo el cuerpo podría ser relativamente asequible gracias a los recientes hallazgos de que la mayoría, si no todas, son de origen perivascular [23], [24]. Las MSC y los pericitos comparten dos marcadores fenotípicos de superficie, la molécula de adhesión celular del melanoma (CD146) y el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR) [23]. Se plantea la hipótesis de que los pericitos son la fuente *in vivo* de las MSC, con receptores celulares expuestos hacia el lumen endotelial de los vasos sanguíneos para controlar y reaccionar a las señales sistémicas [25], [26]. La amplia distribución de los precursores perivascuales de las MSC explicaría su capacidad de responder rápidamente a las lesiones detectando y secretando quimioquinas localmente en respuesta a las lesiones, infecciones o enfermedades en todos los tejidos vascularizados del cuerpo [27].

Hay que tener en cuenta que las MSC aisladas de diferentes tejidos son un grupo relativamente heterogéneo de células cuyo potencial de diferenciación, proliferación y expresión de marcadores de superficie celular puede variar considerablemente entre las distintas fuentes de origen [28]. Se ha sugerido que estas diferencias son principalmente el resultado de la influencia directa de los microambientes específicos en los cuales residen [29].

## 2.3. Propiedades terapéuticas de las MSC

Los mecanismos clave de las MSC como candidatas para la terapia celular son: eficacia a la hora de dirigirse a los sitios de lesión (*homing*, término en inglés), potencial de diferenciación celular y regeneración de tejidos, producción de factores tróficos y potencial inmunomodulador. Cabe destacar que, para una determinada enfermedad, es probable que múltiples mecanismos contribuyan de forma coordinada al efecto terapéutico de las MSC.

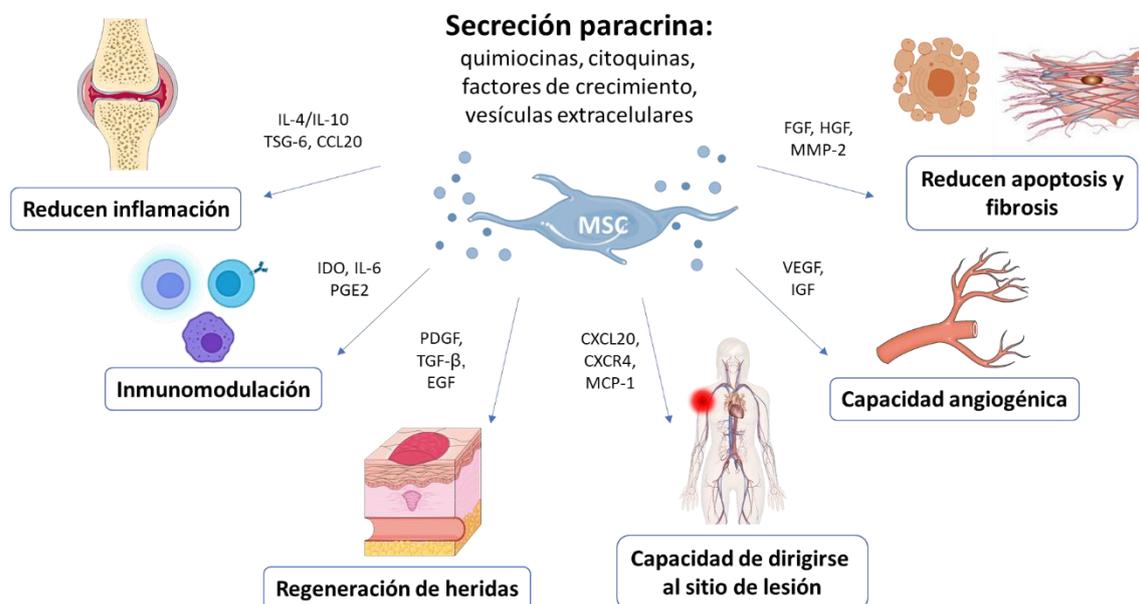
### 2.3.1. Propiedades tróficas y angiogénicas de las MSC

La principal propiedad trófica de las MSC es la secreción de factores de crecimiento y otras quimioquinas para inducir la proliferación celular y la angiogénesis. Las MSC expresan proteínas mitógenas como el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), el TGF- $\beta$ , el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF-2) y el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) para aumentar la división de los fibroblastos, los epitelios y las células endoteliales [30]. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el IGF-1, el EGF y la angiopoyetina-1 se liberan para reclutar células de linaje endotelial e iniciar la vascularización. Los efectos tróficos como el factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF), el factor derivado de las células estromales (SDF-1) y la proteína inflamatoria de los macrófagos (MIP)-1 alfa y beta, también son liberados por las MSC y aumentan la migración de macrófagos, queratinocitos y células endoteliales reduciendo el tejido cicatricial y permitiendo la resolución de la herida [31].

### 2.3.2. Propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de las MSC

En muchas patologías, las condiciones inflamatorias en el lugar de la lesión impiden los procesos naturales de reparación. Las MSC ayudan a modular el entorno regenerativo mediante mecanismos antiinflamatorios e inmunomoduladores. En respuesta a moléculas inflamatorias como la interleuquina-1 (IL-1), la IL-2, la IL-12, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), las MSC secretan una serie de factores de crecimiento y proteínas antiinflamatorias con complejos

mecanismos de retroalimentación entre los numerosos tipos de células inmunitarias [32], [33]. Las citoquinas inmunomoduladoras clave incluyen la prostaglandina 2 (PG2), el TGF- $\beta$ 1, el HGF, el SDF-1, el óxido nítrico (NO), la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la IL-4, la IL-6, la IL-10, el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1RA) y el receptor soluble del TNF- $\alpha$ . Las MSC impiden la proliferación y la función de muchas células inmunitarias inflamatorias, incluidas las células T, las células asesinas naturales (NK, del inglés *Natural Killer*), las células B, los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas [34]. Numerosos trabajos han demostrado que las MSC adultas pueden modular la respuesta inmunitaria a través de los siguientes mecanismos: 1) la supresión de la proliferación de células T, además de la secreción de citoquinas y la citotoxicidad al regular el equilibrio Th1/Th2 [35]; 2) la diferenciación de linfocitos hacia el fenotipo T regulador (Tregs) [36]; 3) la inhibición de la proliferación de células B y la modulación de la secreción de anticuerpos y producción de moléculas co-estimuladoras [37]; 4) la inhibición de la maduración, la activación y la presentación de antígenos por parte de las células dendríticas [38]; 5) la inhibición de la activación de los macrófagos M1 proinflamatorios promoviendo la polarización de M1 a M2 (fenotipo resolutivo) [39]; y por último 6) la supresión de la proliferación y la actividad citotóxica de las células NK por la IL-12 y la IL-15 [40].



**Figura 4. Propiedades de las MSC y su modo de acción.** Las MSC modulan el sistema inmunitario del huésped, secretando diversos factores tróficos. De este modo, reducen la inflamación, promueven la angiogénesis y evitan la apoptosis y la fibrosis. Además, estimulan las células madre locales para desarrollar nuevos tejidos.

## 2.4. Ensayos clínicos

Como se ha comentado anteriormente, las MSC en nuestro organismo, participan activamente en (1) la supresión de la vigilancia inmunitaria del tejido lesionado

para impedir las reacciones autoinmunes; (2) la reparación de heridas y la regeneración de tejidos; y (3) la angiogénesis [41]. Sin embargo, si la lesión es extensa y/o se padece una patología crónica, la acción natural de las MSC puede ser insuficiente y, por tanto, es necesario complementarla con un tratamiento basado en su administración local o sistémica [42]. Las propiedades mencionadas combinadas con la capacidad intrínseca de las MSC para dirigirse a los tejidos lesionados, las han convertido en excelentes candidatas para las terapias avanzadas de enfermedades inflamatorias e isquémicas [43], [44].

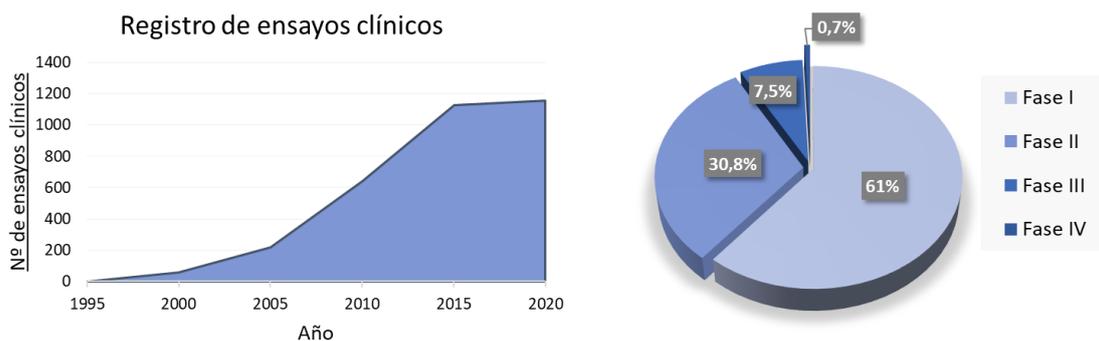
La medicina regenerativa tiene como objetivo reparar y posiblemente sustituir las células, tejidos u órganos enfermos para, en última instancia, recuperar su función normal. Aunque el término nació en una conferencia en 1992, no comenzó a usarse hasta 1999 y a partir de ahí la medicina regenerativa se convirtió rápidamente en la gran promesa en el ámbito de la atención sanitaria [45]. La terapia con células madre es un subtipo de la medicina regenerativa que describe el proceso de introducir células troncales con capacidad para diferenciarse en los tipos celulares específicos que se necesitan para reparar los tejidos enfermos [46]. En este sentido, a partir de 1998 se comenzaron a aislar con éxito células madre embrionarias (ES) pluripotentes humanas a partir de la masa celular interna de embriones tempranos. Aunque las ES proporcionaron una poderosa herramienta para la investigación biológica, ya que pueden dar lugar a casi todos los linajes celulares [47], los problemas éticos relacionados con su aislamiento descartaron su uso en terapias clínicas y se promovió la investigación en la búsqueda de alternativas. En 2006 Shinya Yamanaka diseñó una forma de crear células madre pluripotentes mediante la reprogramación de células adultas ordinarias insertando cuatro genes clave y las llamó células madre pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés *induced pluripotent stem cells*) [48]. Las iPSC comparten muchas propiedades con las células ES evitando los problemas morales. Sin embargo, las células iPSC al igual que las ES no pueden utilizarse con fines terapéuticos por su potencial en la formación de teratomas [49].

Debido a la limitación del uso de células ES e iPSC en la clínica, se desarrolló un gran interés por las MSC ya que están libres tanto de las preocupaciones éticas como de la formación de teratomas. Los doctores Lazarus y Gerson, oncohematólogos de profesión, fueron los primeros en realizar un ensayo clínico con MSC como células de apoyo durante los trasplantes de HSC en 1995 [50], lo que supuso un elemento clave en la aceptación de las MSC como posible terapia celular por su seguridad en humanos. Además, las MSC indiferenciadas expresan niveles bajos o medios de antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I y niveles muy bajos de HLA de clase II lo que

reduce su reconocimiento por parte del sistema inmunitario del receptor [51]. Esta propiedad confiere a las MSC del donante una capacidad inmunoprivilegiada que evita que sean detectadas por el sistema inmunitario del huésped en terapias alogénicas. Sin embargo, recientemente se ha observado que el antígeno de clase I está presente en niveles detectables y la expresión del antígeno de clase II puede ser inducida por el IFN- $\gamma$  [52]. A su vez, se han publicado varios trabajos que muestran el rechazo de las MSC alogénicas y respuestas inmunitarias crónicas en estudios con animales y en ensayos clínicos con humanos [53].

El número de ensayos clínicos con MSC alogénicas y autólogas ha ido aumentando desde 2004, para tratar numerosas enfermedades inflamatorias inmunomediadas, tales como la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), algunas neoplasias hematológicas y el rechazo tras un trasplante de órgano sólido. Así mismo, también se han estudiado como terapia frente a diversas enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus de tipo 1, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Crohn y el lupus. Finalmente el uso de MSC también se ha probado en enfermedades cardiovasculares y neurológicas, así como en la cura de heridas refractarias o para contrarrestar defectos en los huesos y en los cartílagos [54].

A pesar del gran entusiasmo con el que comenzó el uso de las MSC en entornos clínicos, pronto saltaron las dudas sobre su eficacia real y comenzaron a surgir numerosas cuestiones científicas a resolver antes del establecimiento de normas clínicas y reglamentos gubernamentales para su aprobación clínica. Entre las dificultades a la hora de instaurar la terapia celular con MSC como una tecnología clínica madura encontramos los problemas técnicos a los que se enfrenta el desarrollo de un producto celular vivo, agravados por la gran heterogeneidad presente en los ensayos clínicos. Estos son: 1) la variabilidad de MSC derivadas de diferentes fuentes y edades; 2) la falta de protocolos consistentes en cuanto al método de aislamiento, el cultivo celular, las condiciones de expansión y la criopreservación y por último; 3) la versatilidad en la dosis celular, las modificaciones celulares y la frecuencia y modo de transfusión [55].



**Figura 5. Ensayos clínicos con MSC.** Estadística de la evolución de los ensayos clínicos registrados con MSC desde el primer ensayo clínico. Se observa una pendiente a partir de 2005 que se estabiliza en 2015, cuando comenzó a cuestionarse su eficacia. Distribución de los ensayos clínicos de MSC registrados por fase. Adaptación de Rodríguez-Fuentes *et. al.* (2021)

De hecho, solo dos terapias basadas en MSC han sido aprobadas para el tratamiento de dos afecciones en un número limitado de países: (1) la EICH en Canadá, Japón y Nueva Zelanda y (2) las fístulas perianales en adultos con la enfermedad de Crohn en la Unión Europea [56]. En 2009, Osiris Therapeutics (EE. UU.) completó el primer gran ensayo de fase III, de MSC alogénicas derivadas de médula ósea para el tratamiento de la EICH refractaria a los esteroides (NCT00366145) y su comercialización fue aprobada en 2012 bajo el nombre Prochymal™ [57]. Hasta esa fecha las células madre hematopoyéticas (HSC) eran la única terapia con células madre establecida. Seis años más tarde, en 2018, es aprobado el segundo fármaco de MSC, elaborado por la empresa Tigenix/Takeda, para el tratamiento de la fístula anal enterocutánea refractaria relacionada con la enfermedad de Crohn (NCT02336230), bajo el nombre de Alofisel® [43].

Sin embargo, un aspecto positivo de todos los ensayos clínicos realizados hasta la fecha, es que no se ha informado de eventos adversos directamente relacionados con la infusión de MSC, lo que apoya la investigación adicional para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas basadas en estas células [56].

	<b>Alofisel® (darvadstrocel)</b>	<b>Remestemcel-L (Prochymal™)</b>
<b>Indicaciones clínicas</b>	Fístulas perianales en <b>enfermedad de Crohn</b>	<b>EICH</b> pediátrica refractaria a los esteroides
<b>Fuente</b>	MSC de tejido adiposo <b>alogénicas</b>	MSC de médula ósea <b>alogénicas</b>
<b>Dosis celular</b>	<b>120 millones</b> de células por vía intralesión en un solo ciclo de tratamiento (24 mL dentro y alrededor de la lesión)	<b>2 millones células/kg</b> dos veces a la semana durante 4 semanas
<b>Empresa</b>	Takeda (Tigenix)	Mesoblast, Inc.
<b>Completado</b>	Noviembre 2019	Febrero 2018
<b>Referencia</b>	NCT01541579	NCT02336230

**Tabla 1. Diseños de los productos clínicos con MSC aprobados:** estudio de Alofisel y Remestemcel.

## 2.5. Mecanismo de acción de las MSC: Hipótesis paracrina.

Después de varios años de ensayos clínicos inconsistentes y de falta de eficacia inequívoca, se ha demostrado que las MSC no se diferencian en otros linajes *in vivo* en condiciones normales, si no que acuden a los lugares de lesión, donde liberan componentes regenerativos e inmunorreguladores [58]. De esta manera las MSC actuarían como almacenes de “medicamentos naturales” regulados por el nicho en el

que se encuentran [42]. Estos factores bioactivos secretados suprimen el sistema inmunitario local, inhiben la fibrosis (formación de cicatrices) y la apoptosis, potencian la angiogénesis y estimulan la mitosis y la diferenciación de las células reparadoras o células madre intrínsecas al tejido. Estos efectos son distintos de la diferenciación directa de las MSC en tejido reparador [59].

La secreción de factores citoprotectores por parte de las MSC fue descrita por primera vez por Gnecci [60], [61]. En este trabajo observaban cómo el trasplante de MSC podía prevenir el remodelado ventricular y restablecer la función cardíaca en menos de 72 horas tras un infarto de miocardio quirúrgico. En un periodo tan extremadamente breve, no era posible la diferenciación miogénica e integración estructural de las células trasplantadas en el miocardio isquémico. Por lo que se planteó un mecanismo primario indirecto alternativo, la capacidad de las MSC de producir una serie de factores tróficos e inmunomoduladores que contribuyeran a la protección del miocardio tras una lesión isquémica, promoviendo la supervivencia celular y reduciendo la inflamación.

Un número creciente de estudios también ha sugerido que los factores solubles liberados por las MSC son un requisito clave de sus propiedades inmunorreguladoras [62]. De hecho, se ha observado que los factores solubles recogidos en el co-cultivo de MSC y linfocitos podían suprimir la proliferación de linfocitos sin necesidad de contacto célula-célula [63]. A su vez, el medio condicionado por las MSC también aumenta significativamente la migración de macrófagos y la proliferación de queratinocitos y células endoteliales en la herida, mejorando así la curación de la misma [31].

A pesar de que estudios previos en el campo han muestran la expresión y la función de varios factores paracrinos, todavía carecemos de un perfil completo de los factores paracrinos expresados por las MSC y las células adyacentes *in vivo*, especialmente de manera espacio-temporal, debido a la dificultad técnica para analizar la expresión y la secreción de esos factores paracrinos *in vivo*.

### **3. Las vesículas extracelulares (EVs)**

La actividad paracrina de las MSC podría considerarse como una nueva perspectiva terapéutica para desarrollar una alternativa segura y potencialmente más ventajosa a la terapia basada en las células. En particular, dentro del contenido paracrino secretado por las MSC, las vesículas extracelulares (EVs, del inglés *Extracellular Vesicles*) se han posicionado como la estrategia terapéutica libre de células de elección.

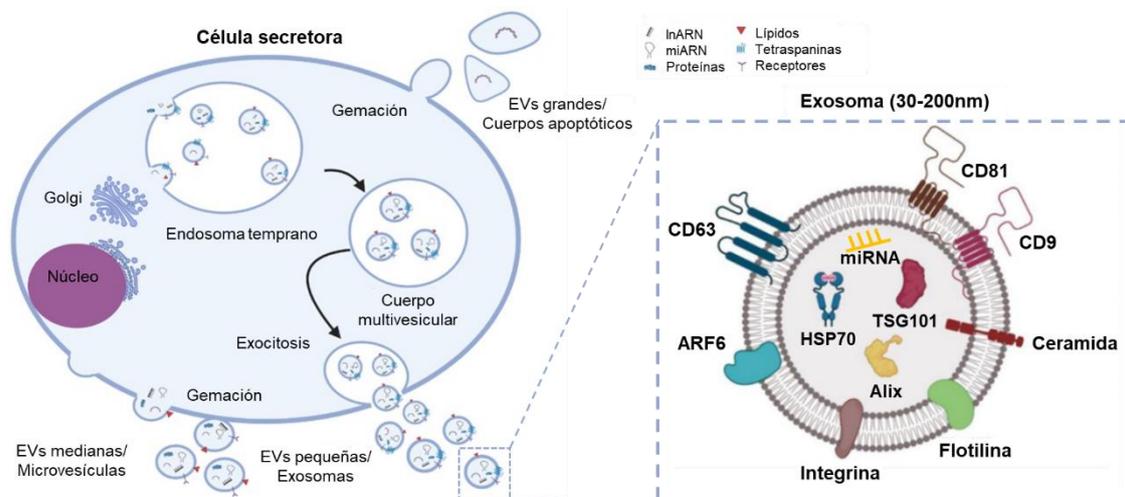
### 3.1. Definición de EVs

Las EVs son pequeñas partículas bioactivas de entre 30-1000 nm de diámetro, delimitadas por una membrana de bicapa lipídica que son liberadas activamente por las células [64]. Las EVs tienen un papel clave en la comunicación intercelular y son capaces de transportar una carga diversa de diferentes quimioquinas, citoquinas, factores de crecimiento, receptores de membrana, lípidos, proteínas de choque térmico y miARNs, entre otros [65].

En función de su biogénesis, diámetro y marcadores moleculares las EVs se han clasificado en: exosomas derivados del endosoma (30-200 nm), microvesículas derivadas de la membrana plasmática (100-1000 nm) y cuerpos apoptóticos (1000-3000 nm) liberados en condiciones de estrés celular mediado por la apoptosis.

A pesar que las EVs fueron descubiertas hace más de 40 años, el estudio sobre los mecanismos de acción tanto de los exosomas como de las microvesículas ha cobrado importancia en la última década, ya que intervienen en la transmisión de señales biológicas entre células sanas para regular una amplia gama de procesos biológicos. Además, también se ha demostrado la participación de estas vesículas una serie de mecanismos fisiopatológicos implicados en diversas enfermedades [66]. Sin embargo, los exosomas y las microvesículas difieren en su tamaño, biogénesis y marcadores. Por un lado, los exosomas son generados por vía endosomal, en concreto, se forman por la gemación hacia dentro de la membrana de los endosomas tempranos, que al madurar dan lugar a los cuerpos multivesiculares (MVBs, del inglés *MultiVesicular Bodies*). Los MVBs se fusionan con la membrana plasmática de la célula para liberar su contenido al espacio extracelular, incluyendo los exosomas [67]. La biogénesis de los exosomas ocurre dentro de los MVBs. La regulación de la formación y liberación de los MVBs y por tanto de los exosomas se realiza a través de la vía de los complejos de clasificación endosómica necesarios para el transporte (ESCRT, del inglés *Endosomal sorting complexes required for transport*) [68]. Aunque el mecanismo exacto aún no se conoce del todo, parece que la formación de MVBs puede ser estimulada por diversos factores y la célula puede ajustar la producción de exosomas según sus necesidades. Existen proteínas no específicas que se encuentran en todos los tipos de exosomas, independientemente de las células de las que procedan: tetraspaninas (CD63, CD81 y CD9); proteínas relacionadas con el transporte de los exosomas y su unión a las células diana como GTPasas, anexinas, flotilinas y proteínas de choque térmico (Hsp70, Hsp90) y finalmente proteínas necesarias para la generación de MVBs como Alix o TSG101 [69]. Otro rasgo que caracteriza a los exosomas es que pueden aislarse por centrifugación a 100.000 xg y pueden concentrarse en la interfaz de capas de sacarosa

de 0,8 y 2,7M. Por otro lado, las microvesículas, surgen de la gemación de la membrana plasmática hacia el exterior mediante la reorganización de fosfolípidos y el aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  que activa una serie de cascadas enzimática [70]. La ruta de formación de las microvesículas requiere de componentes del citoesqueleto, como la actina y los microtúbulos, junto con motores moleculares (kinesinas y miosinas) y maquinaria de fusión (SNARE y factores de unión) [71]. Al igual que en el caso de los exosomas, los marcadores de las microvesículas pueden entenderse en base a su biogénesis, son principalmente proteínas del citoesqueleto, de choque térmico, integrinas y tetraspaninas.



**Figura 6. Biogénesis, secreción y composición de las EVs.** Los exosomas se generan dentro de cuerpos multivesiculares donde se cargan específicamente con diversas moléculas y posteriormente se liberan en el espacio extracelular. Las microvesículas se forman a partir de la gemación de la membrana celular. Los cuerpos apoptóticos se generan a partir de células apoptóticas. Los exosomas poseen marcadores específicos como las tetraspaninas (CD9, CD81, CD63), integrinas, flotilinas, ceramidas, GTPasas, proteínas de choque térmico (HSP70), proteínas implicadas en su biogénesis (ALIX y TSG101) y miARNs. Adaptada Tsiapalis *et. al.* (2020) y D. Hade *et. al.* (2021).

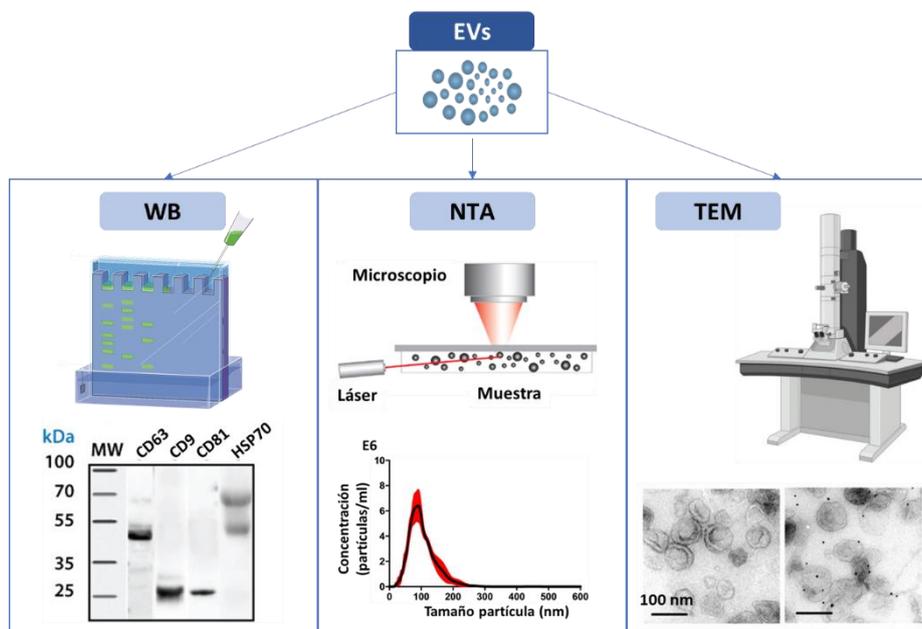
Dado que la discriminación exacta entre microvesículas y exosomas se ve dificultada por la falta de métodos fiables de separación y caracterización, y que existen considerables solapamientos en su tamaño y en sus características fenotípicas, se utiliza el término general de vesículas extracelulares para referirse a estos dos tipos de vesículas [72].

Un paso importante en la evolución del campo de las EVs fue la creación de la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares en 2011 (ISEV, del inglés *International Society of Extracellular Vesicles*) con el objetivo de unificar la nomenclatura y las metodologías de las EVs. La ISEV ha sugerido que el término EV se utilice preferentemente para describir las vesículas preparadas a partir de fluidos corporales y cultivos celulares [65].

El conocimiento de los procesos celulares que rigen la biología de las EVs es esencial para determinar las funciones fisiológicas y patológicas de estas vesículas, así como las aplicaciones clínicas que implican su uso y/o análisis.

### 3.2. Caracterización de las EVs

Como inicialmente no había métodos acordados para caracterizar las fracciones de EVs purificadas, el ISEV publicó un documento en el que se definían algunos criterios mínimos recomendados para su caracterización [73]. Estos criterios incluyen, por una parte, el análisis semicuantitativo de la composición proteica de las EV, comúnmente analizado por la técnica del inmunodetección para las proteínas marcadoras típicas de las EVs, como son CD9, CD63, CD81, Alix o TSG101. Por otra parte, para calcular la distribución del tamaño, la concentración y analizar la trayectoria de las EVs, se utiliza el equipo de Análisis de seguimiento de partículas, conocido como NTA (del inglés, *Nanoparticles Track Analysis*), que utiliza las propiedades tanto de la dispersión de luz como del movimiento browniano de las nanopartículas cuando están suspendidas en líquido. Por último, el tamaño y morfología de las partículas también se analiza a través de la microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés, *Transmission Electron Microscopy*). Esta última metodología también permite el empleo del etiquetado con partículas de oro unidas a anticuerpos, técnica conocida como *immunogold*, que permite obtener información sobre las proteínas de superficie de las EVs [74].



**Figura 7. Métodos de caracterización de las EVs.** Inmunodetección (WB) de los marcadores típicos de las EVs. Medida de la dispersión de la luz y del movimiento browniano de partículas en un medio de suspensión mediante el Análisis del seguimiento de nanopartículas (NTA). Microscopio electrónico de transmisión (TEM) e imágenes de micrografías de EVs y una inmuno-oro contra marcadores de EVs.

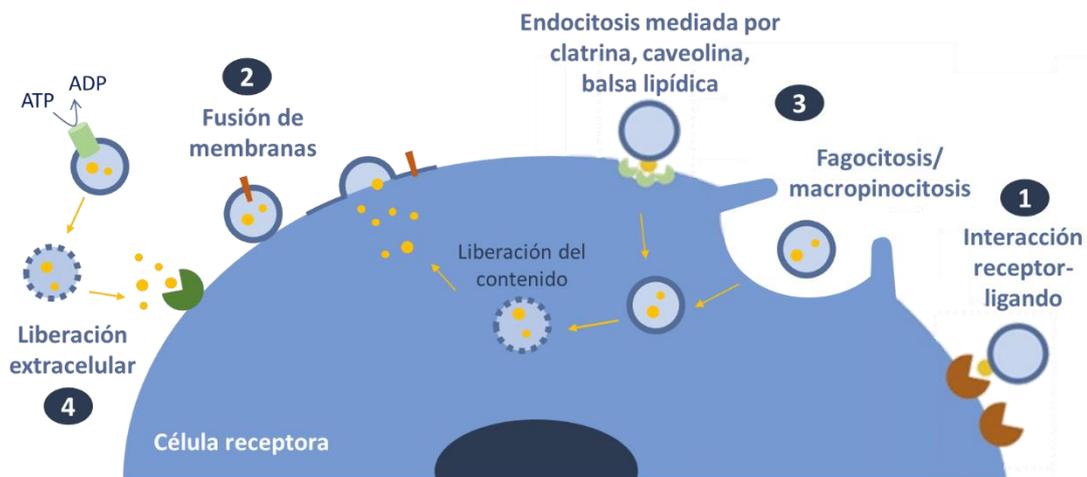
### 3.3. Mecanismo de acción

Las EVs como vesículas liberadas por MVB al fusionarse con la membrana celular fueron descritas por primera vez por Pan y Johnstone en 1983, gracias a unos estudios ultraestructurales detallados que demostraban su implicación durante la diferenciación de los glóbulos rojos inmaduros [75]. Inicialmente, se pensó que la liberación de EVs representaba un mecanismo de eliminación por el cual las células se deshacían de proteínas y otras moléculas no deseadas [76]. Sin embargo, en 1996, Raposo et al. demostraron que las EVs estimulan las respuestas inmunitarias adaptativas [77]. Tras años de investigación posterior, la liberación de EVs ha emergido como un importante mediador de la comunicación entre células que no sólo participa en el proceso fisiológico normal, sino que también desempeña un papel en el desarrollo y la progresión de enfermedades. Además, se han detectado en todos los fluidos corporales: orina, saliva, bilis, líquido sinovial, líquido cerebroespinal, fluido broncoalveolar, nasal, uterino, amniótico, sangre, leche materna, heces, plasma seminal...[78].

Las EVs proporcionan a los organismos un mecanismo de comunicación intercelular a corta y larga distancia a través de diferentes mecanismos de acción:

- Mecanismo de interacción con receptores de membrana: las EVs llevan en su membrana lipídica combinaciones de ligandos que se unen a diferentes receptores de la superficie celular diana. Esto sería similar a lo que ocurre durante la interacción entre dos células, pero sin la necesidad de un contacto directo célula-célula.
- Mecanismo de fusión: las EVs se funden con las membranas de las células diana, proporcionándoles moléculas y lípidos de superficie diferentes y, por tanto, adquiriendo nuevas propiedades. Cabe destacar que la fusión de membranas requiere una fluidez similar entre ambas, tanto las EVs como las membranas plasmáticas muestran la misma fluidez a pH 5,0, sin embargo la fusión directa de las EVs con la membrana plasmática puede estar limitada a condiciones de pH ácido [79].
- Mecanismo de captación: las EVs al fundirse con las células diana, pueden liberar su contenido de proteínas y miARNs al citosol. En la mayoría de los casos, la captación parece producirse a través de la fagocitosis y su alcance puede depender de la capacidad fagocítica de la célula receptora [80]. La macropinocitosis y la endocitosis mediada por *lipid-rafts* (balsas lipídicas), caveolinas o clatrininas pueden representar una vía alternativa a través de la cual las EVs pueden transferir su contenido [81].

- **Mecanismo de liberación extracelular:** las EVs han demostrado ser portadoras de importantes mediadores solubles, como citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas... que deben salir de la EV para llevar a cabo su función en la célula diana. La estimulación con ATP extracelular de receptores purinérgicos (P2Rs) presentes en los EVs provoca la lisis de las microvesículas y la liberación del contenido intravesicular. Así, el ATP extracelular podría participar en la liberación de las moléculas solubles transportadas por las EVs en 2 pasos cruciales: primero a nivel de la liberación de las vesículas, segundo a nivel de la entrega del contenido de las vesículas [82].



**Figura 8. Mecanismo de acción de las vesículas extracelulares sobre las células diana.** Las EVs utilizan una serie de mecanismos para modular el comportamiento de las células receptoras, entre los que se incluyen: 1) la interacción de las proteínas de la membrana de la vesícula con los receptores de la membrana plasmática de la célula diana, estimulando cascadas de señalización intracelular; 2) la fusión de la membrana de la EV con la membrana plasmática, entregando la carga de la EV directamente al citosol y proporcionando lípidos y receptores de membrana; 3) la fagocitosis y la macropinocitosis de las EVs y la endocitosis mediada por clatrina, caveolina o *lipid rafts* dependiente de interacciones específicas entre ligando y receptor; 4) la liberación extracelular del contenido de las vesículas mediada por la acción de receptores purinérgicos. Adaptada Huang-Doran *et. al.* (2017)

Como se ha comentado anteriormente, las EVs son compuestos bioactivos y en ellas ocurren reacciones enzimáticas que modifiquen el contenido. Es concebible, por tanto, que cuando una molécula funcional es entregada por las EVs pueda ser más activa que en su forma soluble. Los análisis proteómicos han revelado que tanto las metaloproteinasas de matriz ancladas a la superficie celular como las solubles están presentes en las EVs procedentes de cultivos celulares y fluidos corporales [83]. Algunas de estas metaloproteinasas son proteolíticamente activas, lo que sugiere que pueden alterar el contenido de las EVs [83]. Además, las EVs también contienen sustancias lipolíticas activas, como las fosfolipasas, que dan lugar a la formación de mediadores lipídicos bioactivos (ácidos grasos y prostaglandinas), que pueden interactuar con los receptores periféricos acoplados a proteínas G y con los receptores

nucleares de las células diana [84]. Por supuesto, estos procesos han de estar muy regulados, como todos los demás modos de comunicación intercelular [64].

Además, como las EVs se cargan de las moléculas de sus células de origen y tienen funciones especializadas en procesos tanto fisiológicos como patológicos, existe un interés creciente en posibles aplicaciones clínicas como biomarcadores de distintos tipos de cáncer, patologías cardiovasculares y neurológicas, infecciones y enfermedades autoinmunes, entre otras [85].

### 3.4. Efecto inmunosupresor de las EV

Varios estudios preclínicos y clínicos han demostrado que las EVs pueden recapitular gran parte de los efectos terapéuticos de las células MSC cuando son trasplantadas. De hecho, varios estudios muestran que las EVs secretadas por las MSC, también nombradas como MSC-EVs modulan la actividad de diferentes células inmunitarias tanto *in vitro* como *in vivo* [86].

#### 3.4.1. Linfocitos T y B

Los linfocitos T son células inmunitarias altamente especializadas que forman parte de la inmunidad adaptativa y su actividad juega un papel importante en la aparición y el desarrollo de las IMID. Al igual que las MSC, se ha visto que las EVs derivadas de estas células también disminuyen la proliferación de los linfocitos T, tanto las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup>. Las MSC-EVs expresan moléculas inmunosupresoras como el PD-L1 (*Programmed death ligand 1*), la galectina-1 y TGF-β1, que ayudan a inhibir la proliferación de linfocitos autoreactivos e inducen la secreción de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10, el TGF-β y el PGE2. Las MSC-EVs potencian la señalización tolerogénica al promover la generación de Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), la apoptosis de las células T activadas y la secreción de la citoquina inmunosupresora IL-22 [87], [88]. Las MSC-EVs también modifican el balance Th1/Th2 hacia el fenotipo antiinflamatorio Th2 [89].

Los linfocitos B participan en la inmunidad adaptativa humoral mediante la secreción de anticuerpos y citoquinas [90]. Las MSC-EVs reducen los componentes de la vía de señalización PI3K/AKT, inhibiendo la propagación y reduciendo viabilidad de las células B [91]. Otro efecto de las MSC-EVs sobre las células B es la inhibición dependiente de dosis de la producción de IgM, IgG e IgA, junto con la supresión de la proliferación y maduración de estas células [92]. Además, las MSC-EVs pueden aumentar la población Bregs (CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>) mediante la transferencia de TGF-β, PGE2 e IL1RA y reducir la maduración de las células B memoria (CD27<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) [93], [94].

### 3.4.2. Células *Natural Killer* (NK)

Las células NK son células linfoides con un papel central en la respuesta innata contra las infecciones virales y las células cancerosas, aunque recientemente se ha visto que también pueden regular la respuesta inmune adaptativa. Se ha observado que las MSC-EVs impiden la proliferación y la activación inducida por la IL-2 de las células NK y suprimen su desgranulación citotóxica *in vitro* [95]. En varios modelos *in vivo* se ha visto como las MSC-EVs reducían la migración y el infiltrado de las células NKs, así como la liberación de quimioquinas (CCL2, CCL21, TLR-2 y CX3CL1) asociadas al reclutamiento de estas células hacia los tejidos de lesión, mostrando efectos protectores y antiinflamatorios [96], [97]. Estos efectos parecen estar mediados por la expresión de TGF- $\beta$  en la superficie de las EVs. Otras moléculas contenidas en las MSC-EVs y asociadas a efectos antiinflamatorios sobre las células NK son la IL-10 y el HLA-G [98].

### 3.4.3. Monocitos, macrófagos y células dendríticas

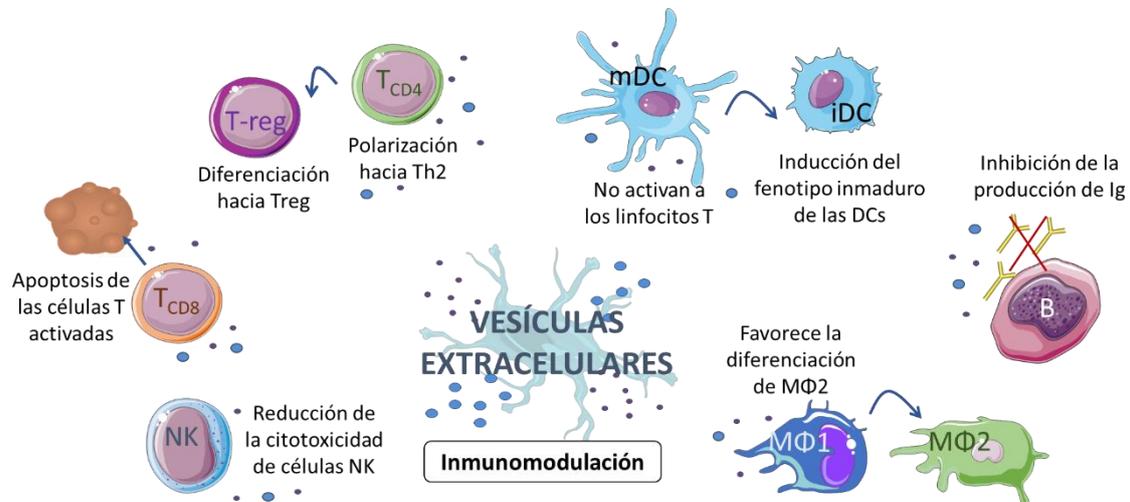
Los monocitos son un tipo de leucocitos producidos por la médula que circulan por la sangre hasta trasladarse a todos los tejidos donde se diferencian hacia macrófagos (M $\Phi$ ) o células dendríticas (DCs).

Los M $\Phi$  son células fagocitarias con importantes funciones tanto en condiciones fisiológicas como en la respuesta inmunitaria de primera línea. Son células extremadamente plásticas, con la capacidad de diferenciarse en dos subtipos antagonistas pero complementarios. Los macrófagos M1 (M $\Phi$ 1) son células activadas clásicas que secretan gran cantidad de factores proinflamatorios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, los macrófagos M2 (M $\Phi$ 2) son células activadas alternativamente y que producen citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y factores tróficos. Datos recientes apoyan una contribución de las MSC-EVs en la modulación del equilibrio M1/M2. Por ejemplo, las MSC-EV pueden dificultar la activación de los M $\Phi$ 1 proinflamatorios en favor de los M $\Phi$ 2 pro-resolutivos, lo que promueve la reducción de VEGF, IFN- $\gamma$ , IL-12 y TNF- $\alpha$ , así como a el aumento de IL-10 [96]. Además, las MSC-EVs también aumentan la producción de IL-22 e IL-23 y PGE2, lo que conduce a la reducción de la respuesta Th17 [99], [100]. Las MSC-EVs también pueden reducir la expresión de quimioquinas como CXCL1, CCL2 y CCL5 impidiendo la activación y el reclutamiento de M $\Phi$ 1 [101], [102].

Las DCs son células presentadoras de antígenos (APCs) que actúan como reguladores centrales de la respuesta inmune adaptativa. Las DCs pueden encontrarse en estado de reposo o activo. En reposo son APCs inmaduras (iDCs) que expresan bajos niveles de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 y CD86) y de citoquinas

inmuno-estimuladoras y poseen una gran capacidad para captar antígenos. La activación y maduración de las DCs (mDCs) depende de diferentes estímulos como bacterias, virus o tejidos dañados. En estado activado, las DCs son potentes inductores de la respuesta mediada por los linfocitos T y muestran una elevada expresión de MHC de clase II, señales co-estimuladoras, el receptor de quimioquina C-C tipo 7 (CCR7) así como citoquinas inmuno-estimuladoras [103]. Las MSC-EVs muestran efectos inmunosupresores sobre las mDCs principalmente inhibiendo su activación, lo que conduce a una disminución en la actividad de las células T. Las DCs de pacientes con diabetes tipo 1 tratadas con MSC-EVs adquirieron un fenotipo inmaduro, caracterizado por una baja expresión de marcadores de activación y una mayor producción de IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  y PGE2. Las DCs tratadas con MSC-EVs también inhibieron la respuesta inflamatoria del subconjunto Th17 e indujeron la producción de Tregs [104]. Otros estudios muestran como el tratamiento con MSC-EVs da lugar a DCs reguladoras anérgicas, que expresan IL-10 y que suprimen el desarrollo de células Th1 y Th17 [105].

Todos estos hallazgos han sido corroborados por diferentes estudios independientes demostrando que las EVs derivadas de las MSC poseen una potente capacidad de inmunoregulación similar a la de las células de las cuales derivan.



**Figura 9. Efecto inmunomodulador de las EVs derivadas de MSC.** Las EVs liberadas por las MSC modulan la respuesta inmunitaria reduciendo la inflamación: promueven la apoptosis de células T activadas; reducen la proliferación y citotoxicidad de las células NK; favorecen la polarización de los linfocitos cooperadores hacia el fenotipo Th2 e inducen la diferenciación de linfocitos T reguladores; inhiben la maduración de las células dendríticas evitando que éstas activen a los linfocitos T; reducen la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B; favorecen la polarización de los M $\Phi$ 2.

### 3.5. Efecto reparador de las EVs

Los investigadores se han centrado en el potencial de las EVs no sólo por sus efectos antiinflamatorios sino también por su capacidad a la hora de remodelar la matriz extracelular y favorece la angiogénesis en la reparación de los tejidos [106].

### 3.5.1. El endotelio vascular y las EVs

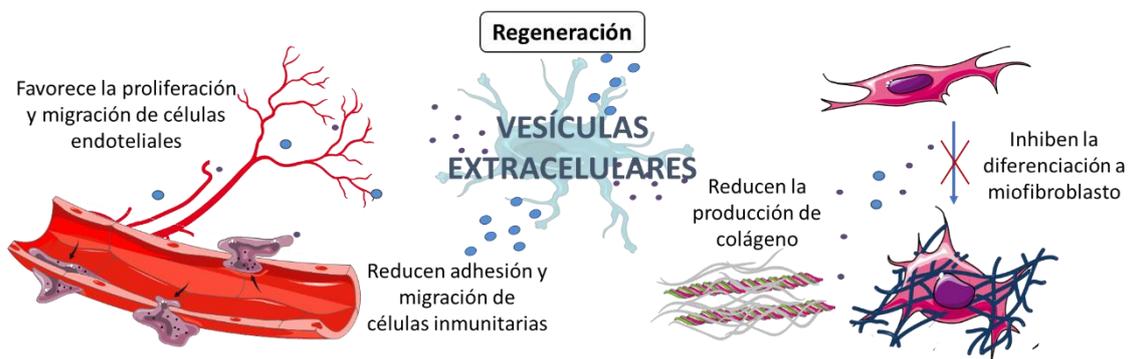
Una regeneración adecuada requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos durante el proceso de curación de heridas en los distintos tejidos. Este es un proceso fundamental para el suministro de oxígeno, nutrientes y factores de crecimiento a los tejidos dañados [107]. Diversos trabajos han demostrado que las células endoteliales tratadas con MSC-EVs *in vitro* muestran un aumento en la proliferación y la migración de células endoteliales favoreciendo la angiogénesis [108], [109]. La actividad angiogénica de las MSC-EVs ha sido investigada en numerosos trabajos, en relación con su aplicación para el tratamiento de diversas patologías como úlceras de piel crónicas en su mayoría diabéticas [110], infartos de miocardio [111], isquemias de miembro [112] o disfunciones neurovasculares como sucede en la esclerosis múltiple [113], entre otras.

Por otra parte, el endotelio vascular controla la adhesión y la migración de las células inflamatorias y, en este sentido, regula y se ve afectado por los factores inflamatorios [114]. La barrera endotelial está controlada por las uniones célula-célula, incluyendo las uniones adherentes, así como las uniones estrechas [115]. Además, existen otro tipo de moléculas de adhesión asociadas a la barrera endotelial que también intervienen en la integridad de la barrera. Durante un proceso inflamatorio, las proteínas de unión sufren modificaciones postraduccionales o cambios conformacionales, lo que altera la integridad de la barrera y aumenta la permeabilidad. Entre las múltiples formas de modificaciones postraduccionales, la fosforilación es la mejor caracterizada; por ejemplo, la fosforilación de VE-cadherina/catenina por proteínas quinasas conduce a la disociación de las uniones adherentes [116]. Las EVs derivadas de las MSC (MSC-EVs) han demostrado ser una terapia prometedora para atenuar la permeabilidad vascular pulmonar y la lesión pulmonar en el shock hemorrágico [117]. En un modelo de síndrome de dificultad respiratoria aguda, se observó como la estimulación inflamatoria provocaba un aumento de la permeabilidad endotelial, mientras que el tratamiento con MSC-EVs restauró la integridad de la barrera y los niveles normales de fosforilación oxidativa [118].

### 3.5.2. La fibrosis tisular y las EVs

La fibrosis se considera la principal causa de discapacidad e incluso la muerte asociada a muchas enfermedades [119]. En realidad, la fibrosis es una reacción protectora necesaria en la reparación del tejido celular dañado; el problema sobreviene cuando los fibroblastos permanecen en su estado de activación incluso cuando el proceso inflamatorio se ha completado, lo que contribuye al desarrollo de la inflamación crónica, que se traduce en una cicatrización irreversible y una reducción de la función del órgano [120]. Los principales cambios de la fibrosis incluyen la migración y

proliferación de fibroblastos y la acumulación de matriz extracelular [121]. La dificultad para revertir el progreso de la fibrosis ha impulsado la aparición de nuevos métodos terapéuticos. En la actualidad, el tratamiento de enfermedades fibróticas con MSC-EVs está en el punto de mira. Se ha demostrado que las EVs derivadas de diferentes fuentes de MSC mejoran la fibrosis crónica en diferentes modelos animales, principalmente a través de la reducción de la deposición de colágeno, que regula la respuesta inmune; la inhibición de la diferenciación hacia miofibroblastos y la proliferación/supervivencia de las células vecinas. El TGF- $\beta$  es una forma común de inducir la fibrosis en la mayoría de los ensayos *in vitro* [122]. Se ha observado que los MSC-EVs suprimen la diferenciación de los miofibroblastos mediante la inhibición de la vía TGF- $\beta$ /Smad2 durante la cicatrización de la herida [123]. En otro estudio los MSC-EVs redujeron la formación de cicatrices mediante la regulación de las proporciones de colágeno, TGF- $\beta$ 1 y metaloproteinasas y la diferenciación de los fibroblastos [124]. El mecanismo de acción de las MSC-EVs sobre la vía de señalización TGF $\beta$ /Smad ha sido comúnmente estudiado en el tratamiento de diversas enfermedades fibróticas, como la fibrosis de pulmón, hígado, riñón, piel y corazón [125].



**Figura 10. Efecto regenerador de las EVs derivadas de MSC.** Las MSC-EVs afectan al microambiente inflamado de diferentes maneras. Por una parte, promueven la angiogénesis para garantizar suministro de oxígeno y nutrientes a las células que se han visto comprometidas por el exceso de inflamación y reducen la adhesión y migración de las células inflamatorias al sitio de lesión. Por otro lado, favorecen la diferenciación de macrófagos resolutivos de la inflamación, remodelan la matriz extracelular y evitan la formación de miofibroblastos, estos procesos previenen de la fibrosis crónica.

### 3.6. Las EVs como producto biológico terapéutico

Como herramienta terapéutica libre de células, las EVs proporcionan una potencial oportunidad para superar los límites existentes de la terapia celular en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y de carácter inflamatorio.

#### 3.6.1. Ventajas de la terapia con EVs frente a la terapia celular

Las MSC-EVs ofrecen varias ventajas clave sobre los productos celulares, pero garantizando actividades terapéuticas comparables, que justifican los esfuerzos por trasladar las EVs a la clínica. En primer lugar, gracias a su pequeño tamaño

(normalmente inferior a 200 nm), las EVs pueden esterilizarse por filtración. Esto reduce altamente el riesgo de contaminación biológica que posee la terapia celular. En consecuencia, los requisitos reglamentarios para la producción en grado clínico podrían ser menos restrictivos [126]. En segundo lugar, las EVs son mucho más fáciles de manipular que las células. La congelación, descongelación y almacenamiento parecen ser menos críticas para las EVs que para las células. Esto lleva a que el producto basado en EVs puede producirse y almacenarse de manera más uniforme y estándar que las terapias celulares [127]. En tercer lugar, al no ser elementos vivos, las propiedades funcionales de las MSC-EVs no pueden ser alteradas por los factores ambientales una vez alcanzan el sitio de lesión, por lo que pueden definirse con mayor precisión. Sin embargo, se ha visto que las características y funciones biológicas de las células pueden verse afectadas y reprogramadas por el entorno [128]. Además, en comparación con los productos celulares, las EVs no se autorreplican y, por tanto, carecen de potencial endógeno de formación de tumores. Aunque la terapia con MSC parece ser segura, como células autorreplicantes que son, sigue habiendo riesgo de producir tumores [129]. En cuarto lugar, las EVs son transportadoras naturales de moléculas bioactivas que pueden llegar a una amplia gama de tejidos tras su administración sistémica, gracias a su capacidad de atravesar capilares y alcanzar así los lugares de lesión más profundos. También son capaces de llegar al sistema nervioso central, ya que se ha informado de que atraviesan la barrera hematoencefálica [130]. Dado que las EVs están formadas por una membrana bicapa lipídica con un núcleo acuoso, pueden cargarse con moléculas (fármacos) tanto hidrofílicas como lipofílicas. Además, esta bicapa protege su contenido de la degradación *in vivo*, evitando así los problemas asociados a la rápida descomposición de las moléculas solubles. Estas moléculas pequeñas, incluidos los microARN podrían cargarse en preparaciones purificadas de EVs por electroporación o por disrupción química o aplicarse a las MSC e incorporarse durante la biogénesis de las EVs [131]. Finalmente, debido a su pequeño tamaño y a una menor expresión de moléculas de histocompatibilidad de membrana que las MSC, las EVs tienen una menor posibilidad de rechazo inmunológico [132] y de ser eliminadas por el sistema reticuloendotelial [133].

### 3.6.2. Retos de la terapia con EVs

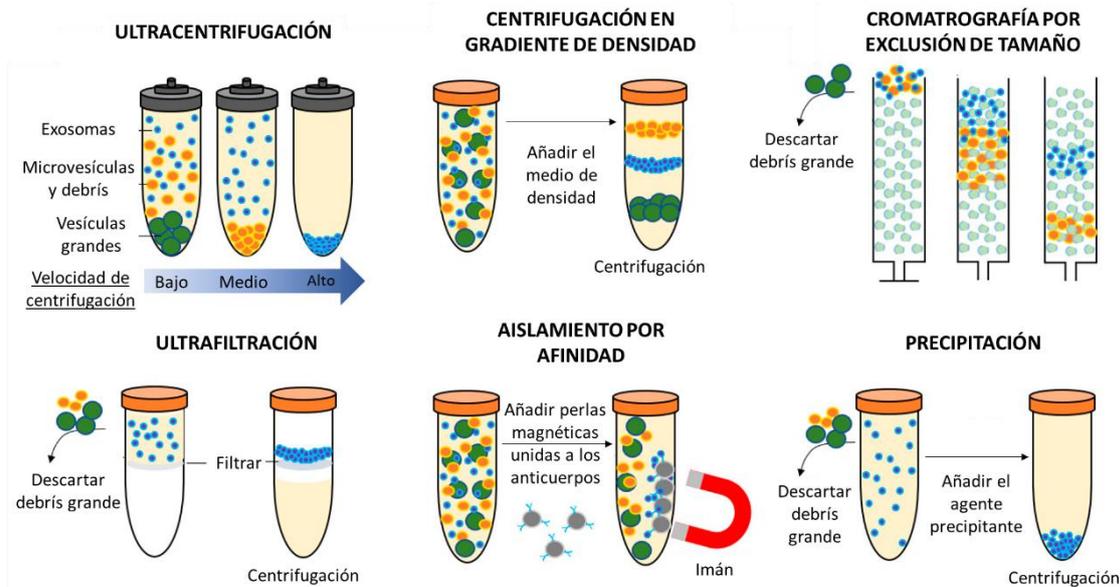
A pesar de los alentadores hallazgos obtenidos con las EVs, siguen existiendo varios retos para que las EVs derivadas de las MSC sean clínicamente útiles. La dosis efectiva utilizada en modelos animales es muy alta y los efectos observados son modestos. Para llevar a clínica la terapia basada en EVs va a ser de gran importancia

investigar en metodologías que permitan un escalado estable, rápido, económico y que cumplan con las guías legislativas GMP (del inglés *Good Manufacturing Practice*).

Por un lado, aunque las MSC son relativamente fáciles de expandir *in vitro*, su crecimiento en cultivo es finito y sus propiedades biológicas pueden alterarse con pases repetidos, por lo que hay que aislar periódicamente nuevas biopsias de MSC, con un impacto significativo en los costes de derivación, ensayo y validación [134]. Para facilitar la producción de MSC-EVs a gran escala y que sea lo más estándar posible podrían utilizarse estrategias como la inmortalización de MSC por selección natural o por modificación genética [135]. Para aumentar la cantidad de EVs aisladas, también se podrían utilizar biorreactores para cultivar las MSC. Un pequeño número de estudios han documentado aumentos significativos en el rendimiento de EVs de las células cultivadas en sistemas de biorreactores en comparación con los frascos de cultivo de tejidos convencionales. Sin embargo, el cultivo en biorreactores plantea problemas, como la adecuación del suministro de oxígeno, el esfuerzo de cizallamiento hidrodinámico, la acumulación de subproductos metabólicos o el equilibrio del pH, que pueden repercutir en la eficacia terapéutica. Pero una vez estuvieran controlados estos parámetros, que dependen del tipo de célula, tendríamos una fuente de EVs en condiciones verificadas lo que beneficiaría a la estandarización del producto [136]. Además, dado que las EVs se aíslan de los medios condicionados por las células, el cultivo de MSC en medios libres de suero también es de gran importancia para limitar la actividad biológica extraña dentro del producto terapéutico final [137].

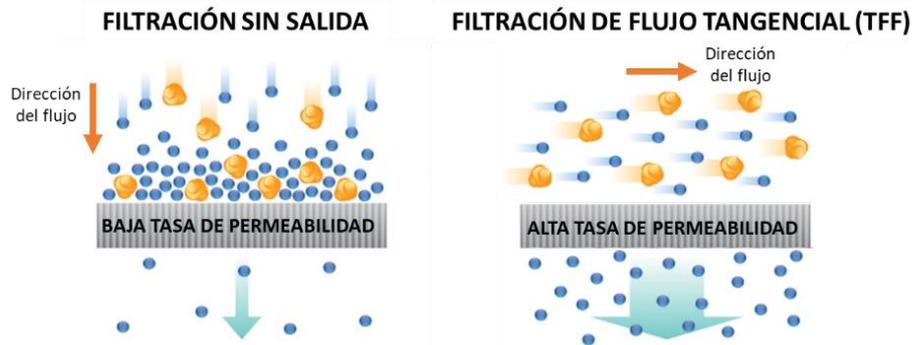
Por otro lado, para mejorar la pureza de las preparaciones de MSC-EVs es necesario optimizar las técnicas en el aislamiento y concentración de las vesículas, eliminando los agregados de proteínas contaminantes, los restos celulares y el material genético. En la actualidad hay varios métodos disponibles, sin embargo, no existe una tecnología vanguardista para aislar EVs en grandes cantidades para uso en clínica.

Existen seis métodos principales de aislamiento: ultracentrifugación diferencial, centrifugación en gradiente de densidad, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), ultrafiltración, precipitación y método de captura basado en la inmunidad.



**Figura 11. Los principales métodos para aislar EVs.** Partículas azules: exosomas; partículas naranjas: microvesículas; partículas verdes: desechos grandes. A) La separación por ultracentrifugación se basa en el tamaño. Los desechos de gran tamaño y las microvesículas se recogen antes en el fondo del tubo al centrifugar con velocidades más bajas. Los exosomas al ser más pequeños necesitan velocidades más elevadas. B) La separación por centrifugación en gradiente de densidad se basa en la densidad. Los exosomas se desplazan hasta su densidad de equilibrio en el medio de centrifugación. C) La cromatografía de exclusión por tamaño utiliza una matriz porosa que separa en función del tamaño. Los componentes solubles y las partículas más pequeñas que el tamaño de los poros entran temporalmente en la matriz porosa y, por tanto, eluyen más tarde que las partículas más grandes que el tamaño de los poros. D) En la ultrafiltración, las proteínas solubles y las partículas más pequeñas que el corte de peso molecular del filtro (por ejemplo, 100 kDa) son capaces de atravesar el filtro, mientras que los exosomas se recogen en el líquido retenido por el filtro. E) En el aislamiento por afinidad, los exosomas se capturan en función del inmunofenotipo o de los ligandos específicos de la superficie. Los exosomas suelen capturarse utilizando un anticuerpo monoclonal o un ligando específico para exosomas conjugado con nanopartículas magnéticas y capturado por imanes. F) En la precipitación, la adición de un agente precipitante induce la aglutinación de los exosomas y los grumos pueden recogerse por centrifugación. Al realizar el método (C, D, F) es necesario separar los restos grandes (por ejemplo, mediante centrifugación a baja velocidad) y descartarlos antes del aislamiento de los exosomas. Adaptada Wang *et. al.* (2020)

A pesar de que la ultracentrifugación sigue siendo el más utilizado actualmente, el rendimiento y logística de la técnica la hacen poco útil para la producción a nivel clínico [138]. Curiosamente, muchos grupos de investigación han demostrado que la EVs aislada mediante filtración de flujo tangencial (TFF, del inglés *Tangential flow filtration*) seguida de SEC da lugar a un mayor rendimiento al tiempo que preserva las propiedades biofísicas y funcionales de las EVs [139], [140], [141]. La TFF es un tipo de ultrafiltración que se caracteriza por producir un flujo que se mueve paralelo al filtro, a diferencia del filtro convencional conocido como sin salida, en el que el producto fluye perpendicularmente al filtro y es propenso a la obstrucción. Esto permite que los sólidos se mantengan en solución y minimiza la acumulación de partículas sobre la membrana. Se trata de mejorar las técnicas de aislamiento para conseguir un aislamiento eficaz en el tiempo, fácil de operar y capaz de proporcionar EVs con la pureza e integridad adecuadas y deseables para las aplicaciones clínicas.



**Figura 12. Métodos de filtración.** Partículas azules: proteínas y moléculas muy pequeñas <150 nm; partículas naranjas: EVs y pequeñas moléculas >150 nm. A) Filtración sin salida, el flujo perpendicular hace que los EVs y partículas de más de 150 nm se acumulen en la membrana, reduciendo la tasa de permeabilidad. B) Filtración de flujo tangencial, flujo cruzado elimina las acumulaciones de la superficie de la membrana, aumentando la tasa de permeado. La tecnología de flujo cruzado mejorar la vida útil de la membrana al ayudar a evitar el ensuciamiento irreversible. Adaptación de <https://synderfiltration.com/>.

## 4. Modificaciones en las MSC para aumentar el potencial de las EVs

Para sortear algunas de las limitaciones de la terapia basada en MSC-EVs en el tratamiento de las IMID, se ha propuesto incrementar el potencial de las MSC como fuente de vesículas a través de modificaciones genéticas y/o modificación de las condiciones de cultivo con factores o moléculas con actividad biológica

### 4.1. Modificación del medio de cultivo con factores

Las propiedades inmunosupresoras de las MSC están profundamente influenciadas por los estímulos presentes en su microambiente local, y la naturaleza de estas señales determina fundamentalmente los efectos inmunomoduladores de las MSC [63], [142], [143]. Esta dependencia del contexto se ve respaldada por el hecho de que las MSC muestran una mayor eficacia en modelos preclínicos de una enfermedad inflamatoria establecida en comparación con su administración preventiva antes de que se desarrolle la inflamación [144]. Por esta razón, se han propuesto varias estrategias para activar las MSC y mejorar su potencial terapéutico (término que se conoce como *priming*, del inglés) [145]. Estas estrategias tienen como objetivo recapitular el microambiente al que las MSC están expuestas en una situación de inflamación en el organismo, derivada de una infección o una patología [146]. Como era de esperar, el secretoma de las MSC y, por tanto las MSC-EVs también, se ve afectado por las estrategias de acondicionamiento, modulando su carga y sus propiedades inmunosupresoras [147].

Un estudio previo demostró que la estimulación de las MSC con lipopolisacáridos (LPS) aumentaba la secreción de las EVs y mejoraba su potencial inmunosupresor. Estas MSC-EVs aumentaban la polarización de los macrófagos M2 y favorecían la

curación de las heridas cutáneas diabéticas tras su aplicación [148]. El LPS es un componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias, por lo que las MSC detectan y responde ante él como si se tratara de una infección.

Estudios recientes demuestran que las MSC estimuladas con citoquinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  o la IL-6 simulan un entorno inflamatorio, potenciando eficazmente las funciones terapéuticas y secretoras de las MSC. Se ha visto como EVs derivadas de MSC tratadas con IL-1 $\beta$  tenían mayores efectos inmunomoduladores, al aumentar moléculas inmunosupresoras como el miR-146a [149]. Por otro lado, las MSC cultivadas en presencia de TNF- $\alpha$  y TFG- $\beta$  condujeron a una disminución significativa de la expresión de citoquinas en glóbulos blancos y a un fuerte aumento de la diferenciación de Tregs que, a su vez, ejercieron un efecto antiinflamatorio [150], [151]. Otro estudio demostró cómo las MSC-EVs aisladas en presencia de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  mostraban un aumento de los niveles de miR-34a y miR-146a, que son potenciales factores antiinflamatorios, que sesgan la diferenciación de los macrófagos hacia el fenotipo M2 [152].

## **4.2. La hipoxia como desencadenante de respuestas de supervivencia celular**

Las MSC, dentro del organismo, suelen encontrarse en nichos dónde las concentraciones de oxígeno oscilan entre el 2-9% de O<sub>2</sub>, mientras que las condiciones estándar de laboratorio para el cultivo de estas células suelen usar la concentración de O<sub>2</sub> ambiental (20%). Se ha demostrado que estas condiciones perjudican la función de las MSC, reduciendo su proliferación, diferenciación, expresión de marcadores de célula madre y aumentando las especies reactivas del oxígeno [153]. Además, la hipoxia también es un factor clave en aquellas zonas donde se ha producido una lesión [154]. La “hipoxia inflamatoria” es el resultado de la activación de la cascada de coagulación, sumado a un consumo de O<sub>2</sub> por parte de las células inflamatorias migratorias (monocitos y neutrófilos), la proliferación celular local y la activación de oxigenasas que se expresan en múltiples tipos de células en el microambiente inflamatorio [155].

La reducción de la tensión de O<sub>2</sub> juega un papel importante en la proliferación, diferenciación y características regenerativas e inmunoreguladoras de las MSC, regulando la expresión de diferentes genes a través del factor inducible por hipoxia-1alpha (HIF-1 $\alpha$ ) [156]. Se ha demostrado que las condiciones de hipoxia e isquemia alteran las características de las MSC con respecto a la función de las EVs.

En 2012, se observó por primera vez que las EVs derivadas de MSC cultivadas en hipoxia promovían la proliferación de las células endoteliales *in vitro*, mejorando la recuperación del flujo sanguíneo en un modelo de rata con isquemia en la extremidad posterior [157]. Desde entonces, muchas investigaciones han demostrado los efectos de las MSC-EVs cultivadas en hipoxia aumentando la migración y promoviendo la formación de tubos por parte de las células endoteliales [158], [159], [160]. El acondicionamiento por hipoxia también ha demostrado aumentar la producción de EVs y que éstas tengan una actividad superior en la protección cardíaca al estimular la neovascularización [161].

Los MSC-EVs cultivados en hipoxia también tienen funciones inmunomoduladoras. En un modelo de ratón de lesión pulmonar aguda inducida por endotoxina, las MSC-EVs aisladas en hipoxia redujeron el nivel de glóbulos blancos y neutrófilos en el líquido broncoalveolar mientras que los niveles de CXCL2 también disminuyeron [162]. Las MSC sembradas en hipoxia pasan por una reprogramación glicolítica, que resulta en la producción de EVs antiinflamatorias y está relacionada con la polarización de macrófagos M2 y la inducción de Tregs [147]. Finalmente, en un modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer, las MSC-EVs cultivadas en hipoxia inhibieron la activación de los astrocitos y la microglía y promovieron la transformación de la microglía en células dendríticas, lo que produjo un efecto neuroprotector *in vivo*. Además, las EVs disminuyeron la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) y aumentaron la de citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10). El resultado fue una mejora en el deterioro cognitivo rescatando la disfunción sináptica gracias a la regulación de las respuestas inflamatorias [163].

### **4.3. Modificaciones genéticas para aumentar el efecto terapéutico de las EVs**

A pesar de los efectos terapéuticos de las MSC-EVs, resulta muy útil para su traslado a la clínica mejorar el potencial de las EVs secretadas a partir de modificaciones genéticas en las MSC y entender los mecanismos subyacentes a dichas mejoras. En la actualidad, los investigadores están intentando desarrollar MSC optimizadas terapéuticamente mediante la sobreexpresión de proteínas y miARNs.

#### **4.3.1. Sobreexpresión de proteínas**

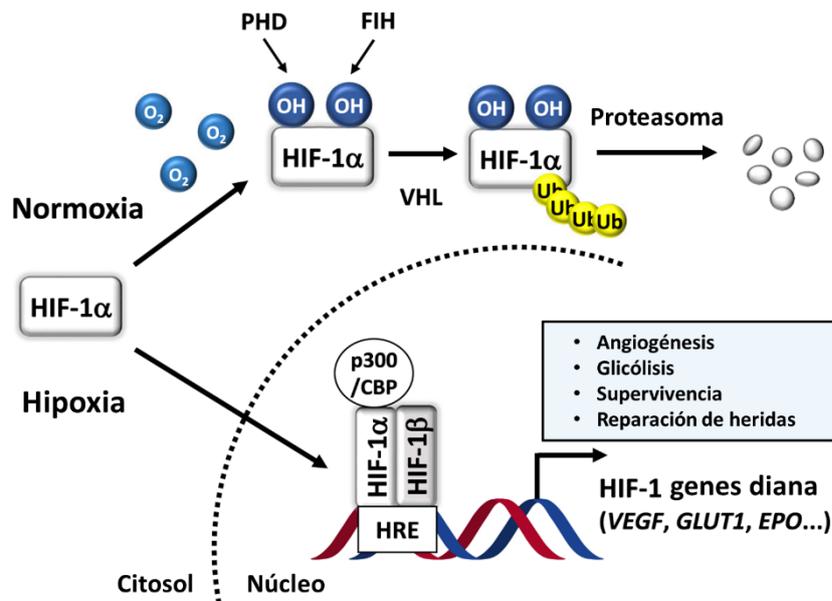
La mayor parte de las proteínas que se han sobreexpresado en las MSC han sido factores de transcripción y moléculas de señalización. Por ejemplo, se han sobreexpresado moléculas de señalización como Akt en las MSC para aumentar la eficacia de las EVs secretadas en la regeneración cardíaca. Se ha visto como estas EVs

albergan niveles más altos de AKt, lo que provoca una aceleración en la proliferación, la migración y la formación de vasos cuando se añaden sobre células endoteliales [164]. Asimismo, los EVs secretados de MSC que sobreexpresan CXCR4 promovieron la formación de tubos por parte de las HUVEC y ejercieron un efecto cardioprotector a través de la vía de señalización Akt en un modelo de rata con infarto de miocardio [165]. También se ha visto que EVs derivados de MSC que sobreexpresanIDO aumentan el número de Tregs, disminuyen el número de células T CD8<sup>+</sup> y los niveles de citoquinas proinflamatorias y promueven la tolerancia inmunológica en aloinjertos cardíacos [166]. Por último, MSC-EVs que sobreexpresan SDF-1 inhiben la apoptosis de las células del miocardio y promueven la regeneración de la microvasculatura endotelial cardíaca *in vivo* [167]. Otro estudio demostró que la sobreexpresión del factor de transcripción GATA-4 en MSC aumentaba la capacidad de sus EVs mejorando la función cardíaca [168].

#### 4.3.1.1. El Factor Inducible por Hipoxia-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ )

Los mecanismos moleculares que subyacen a la capacidad de las células a la hora de adaptarse a las variaciones en el suministro de oxígeno son tan relevantes en el campo de la medicina y la bioquímica que en 2019 se le otorgó el Premio Nobel de Fisiología o Medicina a William Kaelin Jr., Sir Peter Ratcliffe y Gregg Semenza Semenza por sus investigaciones sobre el factor de transcripción HIF-1 [169].

HIF-1 es un factor de transcripción heterodimérico que consta de dos subunidades: HIF-1 $\alpha$  regulado por el oxígeno y HIF-1 $\beta$  expresado de forma constitutiva. En una situación de normoxia, HIF-1 $\alpha$  es hidroxilado y marcado con ubiquitina para ser destruido en el proteosoma, mientras que, en situaciones de hipoxia, las concentraciones de oxígeno disponibles disminuyen notablemente y las hidroxilasas PHD y FIH dejan de funcionar. La subunidad HIF-1 $\alpha$  no se degrada y puede translocarse al núcleo, uniéndose a la subunidad HIF-1 $\beta$  y dando lugar a HIF-1. La forma heterodimérica HIF-1 se une a la secuencia del elemento de respuesta a la hipoxia (HRE, del inglés *Hypoxia Response Element*), estimulando la transcripción de cerca de 200 genes que afectan a las respuestas celulares al estrés, entre los que se encuentran el VEGF, la eritropoyetina, la angiopoyetina, el transportador de la glucosa (GLUT-1) y el PDGF [170]. Mediante el trabajo combinado de estos tres investigadores, se demostró que la expresión génica como respuesta a los cambios de oxígeno está directamente acoplada a los niveles de oxígeno en la célula animal, lo que permite que se produzcan respuestas celulares inmediatas a la falta de oxígeno mediante la acción del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ .



**Figura 13. Mecanismo molecular de la señalización del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1).** En normoxia, HIF-1 $\alpha$  es hidroxilado por la prolil-4-hidroxilasa (PHD) y el factor inhibidor de HIF-1 (FIH), e interactúa con la ubiquitina ligasa von Hippel-Lindau (VHL), lo que provoca su degradación por el proteosoma. Por el contrario, HIF-1 $\alpha$  se acumula y se transloca al núcleo en condiciones de hipoxia, dando lugar a la formación de un heterodímero HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$ . HIF-1 se une entonces al elemento de respuesta a la hipoxia (HRE) junto con p300/CBP, que activa la expresión de cientos de genes, entre ellos el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el transportador de glucosa 1 (GLUT1) y la eritropoyetina (EPO). Adaptada Ikeda and Kakeya (2021).

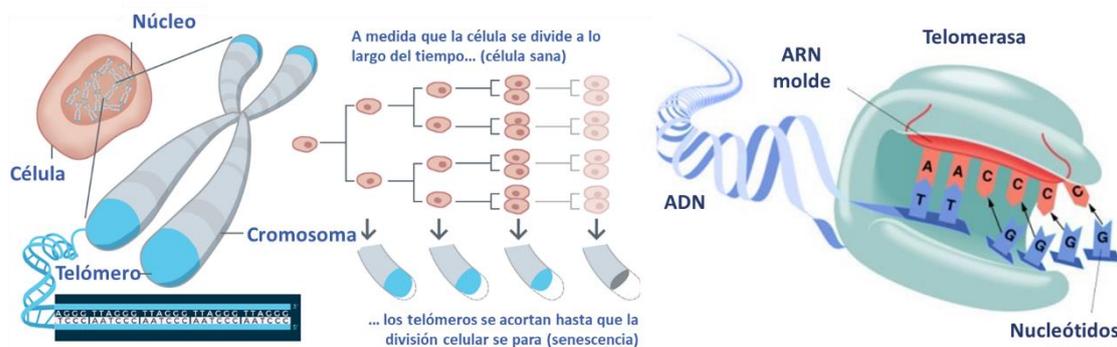
Como acabamos de señalar, el factor HIF-1 $\alpha$  se estabiliza durante la isquemia y regula al alza una serie de genes relacionados con la proliferación, supervivencia y el potencial reparador e inmunomodulador de las MSC [171], [172]. Nuestro grupo de investigación trabaja desde hace muchos años sobreexpresando el factor HIF-1 $\alpha$  en las MSC (MSC-HIF) para potenciar su efecto terapéutico [173]. En 2013, demostramos que las MSC-HIF tienen mayor capacidad a la hora de inducir la angiogénesis, disminuir la fibrosis del tejido huésped y mejorar la función cardíaca en un modelo experimental de infarto agudo de miocardio [173]. Más tarde, observamos que las MSC-HIF tienen mayor capacidad inmunosupresora sobre diferentes poblaciones celulares inmunes, incluyendo células dendríticas, células NK y monocitos [174]. Finalmente, nuestro grupo también observó que las EVs derivados de MSC-HIF tenían una mayor actividad angiogénica en comparación con las EVs aumentando su potencial para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la isquemia [175]. Un estudio similar realizado por otro grupo, demostró que las MSC-EVs que sobreexpresaban HIF-1 $\alpha$  eran capaces de promover la regeneración ósea y de reducir la necrosis avascular de la cabeza del fémur inducida por esteroides [176].

#### 4.3.1.2. Inmortalización: Telomerasa Transcriptasa Inversa (hTERT)

Las MSC son células primarias que tienen una capacidad de expansión limitada y acaban entrando en senescencia celular tras un número limitado de divisiones, lo que

obliga a sustituir las células parentales continuamente [177], [178]. Varios estudios han mostrado que las características biológicas de las MSC varían según los donantes y que poblaciones heterogéneas dificultan los procesos de estandarización y fabricación. Por ello, resulta interesante obtener una fuente de MSC-EVs constante y duradera. Para evitar la senescencia celular, muchos investigadores han optado por la inmortalización de las MSC. Se han generado MSC inmortalizadas induciendo la sobreexpresión de c-Myc. La producción de EVs a partir de estas células inmortalizadas, es escalable bajo estrictas condiciones GMP, lo que permite que estas EVs puedan llegar a ser utilizadas en la clínica [179].

Otro enfoque para aumentar el rendimiento del aislamiento de las EVs por parte de las MSC es inmortalizarlas mediante la sobreexpresión de la telomerasa transcriptasa inversa (hTERT). Los telómeros son estructuras especializadas que se encuentran en los extremos de los cromosomas y su función consiste en proteger el ADN. Los ciclos de proliferación celular acortan los telómeros por la incapacidad de las ADN polimerasas de replicar completamente los extremos lineales de los cromosomas. La hTERT está especializada en la adición de repeticiones teloméricas de ADN en los extremos de los cromosomas compensando la pérdida de repeticiones teloméricas. La telomerasa funciona como una ribonucleoproteína, que consta de un componente integral de ARN telomérico (TR), además de la subunidad catalítica, la transcriptasa inversa [180]. El mecanismo molecular de la telomerasa tiene importancia para evitar la senescencia replicativa de las MSC en cultivo *in vitro*.

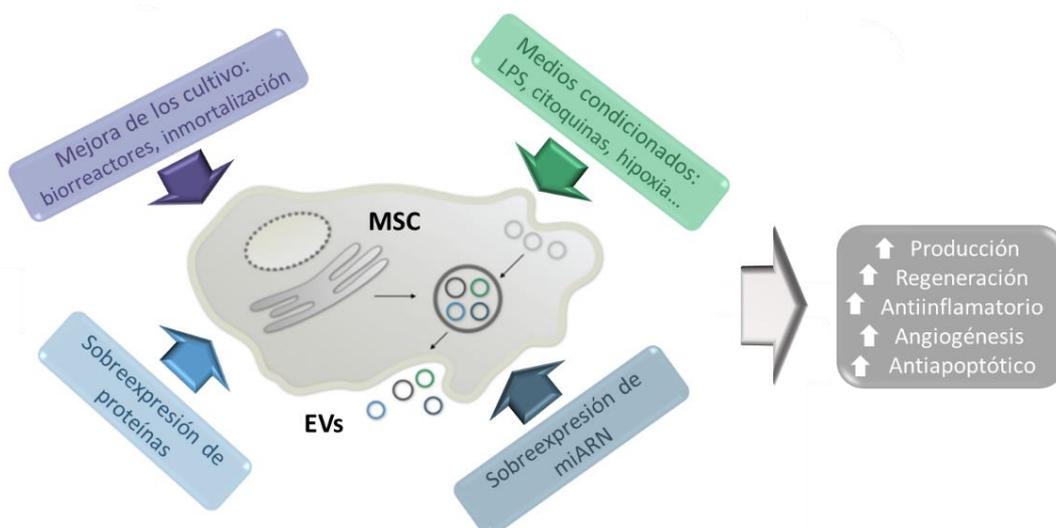


**Figura 14. Mecanismo molecular del acortamiento de los telómeros y de la acción de la telomerasa.** Los telómeros están formados por ADN de secuencia única el cual se repite varias veces al final de los cromosomas. A medida que la célula se replica, estas secuencias se van acortando hasta que, después de muchas repeticiones, los telómeros se vuelven críticamente cortos, conduciendo a una inestabilidad genómica. Un telómero corto actúa como señal para que la célula deje de dividirse y entre en un estado de protección llamado senescencia. La enzima telomerasa funciona al final de los cromosomas. Está formada por un componente de ARN que sirve como molde y una subunidad catalítica encargada de unirse al molde y polimerizar el extremo del ADN sintetizando la repetición telomérica. Adaptada de [abbexa.com/htert](http://abbexa.com/htert)

#### 4.3.2. Sobreexpresión de miARNs

Los miARN son ARN monocatenario de longitud de entre 21 y 25 nucleótidos que participan en la regulación transcripcional y postranscripcional, modulando la expresión de otros genes, por lo que su uso podría ofrecer una opción novedosa para el tratamiento de muchas enfermedades. Sin embargo, el avance de la terapia con miARNs se ha visto obstaculizado por los inconvenientes en la entrega de los miARNs a los órganos objetivo. Los EVs han surgido como un vehículo eficaz para la entrega de miARN, por lo que muchos investigadores han estado diseñando MSC para cargar miARN en EVs y han visto potentes efectos terapéuticos.

Las EVs aisladas de MSC que sobreexpresaban miR-let7c mostraron un potente efecto antifibrótico regulando significativamente la expresión de TFG- $\beta$  en un modelo de lesión renal y fibrosis hepática en ratones [181]. Las EVs derivadas de MSC que sobreexpresaban el miR-122, han mostrado un potencial terapéutico en la fibrosis hepática, ya que este miARN es capaz de regular negativamente la proliferación de las células hepáticas [182]. También se han examinado los efectos regenerativos de los miARNs suministrados por MSC-EVs. En un modelo de ratón de hepatitis autoinmune se utilizaron EVs derivadas de MSC que sobreexpresaban miR-223. Estas EVs podían prevenir la lesión hepática reduciendo la expresión de citoquinas y la actividad del inflammasoma NRLP3 y de la caspasa-1 [183]. Además, un estudio sobre EVs derivadas de MSC que sobreexpresan el miR-140-5p mostró una mayor regeneración del tejido cartilaginoso y una reducción de la osteoartritis de la rodilla en un modelo de rata [184]. A su vez las EVs derivadas de MSC que sobreexpresan el miR-126 curaron los defectos de la piel en un modelo de rata diabética [185].



**Figura 15. Aumento del potencial terapéutico de las EVs derivadas de MSC.** Se puede mejorar la producción y el potencial terapéutico de las EVs mediante modificaciones en las células progenitoras: mejorando las técnicas de cultivo, aumentando los estímulos externos sobre los perfiles de secreción y

potenciando las funciones generadoras e inmunomoduladoras de las células productoras de las EVs mediante modificaciones genéticas. Adaptada Park *et. al.* (2019)

## 5. Terapias de MSC-EVs en ensayos clínicos

Recapitulando, distintos estudios preclínicos han descrito varias características terapéuticas de las MSC-EVs. En primer lugar, se ha visto que EVs derivadas de MSC aceleran los procesos de regeneración de tejidos regulando la proliferación y la apoptosis de las células endógenas [186], [187]. En segundo lugar, las EVs de MSC también actúan sobre distintas poblaciones de células inmunitarias, facilitando la atenuación de la inflamación excesiva y el retorno a la homeostasis [188], [189], [190]. Por último, se ha observado que las MSC-EVs inducen la angiogénesis mediante la estimulación de varias vías de señalización celular [175], [111]. Gracias a estos prometedores resultados y a la seguridad y eficacia de su aplicación, las MSC-EVs se están evaluando en diversos ensayos clínicos. Aunque hay pocos estudios publicados que demuestren la eficacia clínica de las MSC-EVs, actualmente hay 15 ensayos clínicos dirigidos a diversas enfermedades (<http://www.clinicaltrials.gov/>). Uno de estos ensayos está evaluando la seguridad y viabilidad de los MSC-EVs en pacientes con cáncer de páncreas (NCT03608631). En los 14 restantes, los MSC-EVs se están evaluado en patologías donde la desregulación del sistema inmunitario interviene en el inicio o en el empeoramiento de la enfermedad.

### 5.1. Enfermedades inmunomediadas

Aproximadamente entre el 35 y el 50% de los pacientes sufren EICH tras un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas. Esto se debe a que las células madre hematopoyéticas del donante perciben a los distintos órganos del cuerpo del paciente como extraños y los atacan [191]. Entre el 40-76% de los pacientes que padecen EICH crónica presentan como síntoma sequedad en los ojos [192]. La queratoconjuntivitis seca está causada por la infiltración linfocítica alrededor de las glándulas lagrimales, lo que provoca la degeneración del tejido y su mal funcionamiento. Dado que los inmunosupresores como los corticosteroides o la ciclosporina A suprimen de forma inespecífica el sistema inmunitario y no son adecuados en todos los pacientes, las MSC se han considerado una terapia alternativa para tratar el ojo seco en esta patología [193]. En diciembre de 2019 fue registrado un ensayo clínico que evalúa la eficacia terapéutica de las MSC-EVs para aliviar el síntoma del ojo seco (NCT04213248). El objetivo de este ensayo es analizar las respuestas de los indicadores de la enfermedad, como la cantidad de lágrimas o el grado de daño en el tejido tras el tratamiento con EVs aplicadas en forma de gotas oculares en lugar de inyección intravascular.

La diabetes mellitus de tipo 1 (DMT1) es una conocida enfermedad autoinmune que requiere tratamiento de por vida. Los síntomas incluyen pérdida de peso, agotamiento, picor en la piel y visión borrosa. Las células inmunitarias del organismo atacan a las células pancreáticas por razones desconocidas, afectando negativamente a la producción de insulina y al posterior metabolismo de la glucosa. Como todavía no existe un tratamiento específico, los pacientes con DMT1 requieren inyecciones diarias de insulina o la instalación de una bomba de insulina para mantener un rango normal de niveles de glucosa en sangre [194]. Para hacer frente a la ausencia de fármacos específicos para tratar la DMT1, se han explorado las EVs como tratamiento. Tras demostrar su efecto terapéutico regenerando los islotes pancreáticos y aumentando la producción de insulina en dos modelos murinos de diabetes [195] [196], actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico que evalúa los efectos de infusiones intravenosas repetidas de MSC-EVs en pacientes con DMT1 (NCT02138331).

La periodontitis es una grave infección de las encías que daña el tejido blando y que, sin tratamiento, puede destruir el hueso que sostiene los dientes. El crecimiento de microbiota patógena contribuye a la generación de autoanticuerpos y a la alteración de la respuesta inmunitaria [197]. Se ha observado que las MSC-EVs restauran la función regenerativa de las células de la encía, la cual está comprometida por las infecciones bacterianas [198], y corrigen el desequilibrio en la proporción Th17/Treg en modelos experimentales de periodontitis crónica [199]. En la actualidad, la eficacia terapéutica de las EVs se está evaluando en un estudio clínico para aliviar la inflamación gingival y el daño tisular en pacientes de entre 18 y 50 años (NCT04270006).

El síndrome de disfunción orgánica múltiple (SDOM) consiste en la presencia de alteraciones en la función de dos o más órganos. El SDOM está causado generalmente por sepsis y se relaciona con el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Puede tener diversas causas, entre las que se encuentran: quemaduras, infecciones, traumatismos o complicaciones postoperatorias [200]. Hay un ensayo en marcha para testar la seguridad y la eficacia de los EVs sobre la respuesta inmunitaria a corto y largo plazo en pacientes que desarrollan SDOM. Para ello, se está evaluando en los pacientes la concentración de citoquinas, las reacciones alérgicas como erupciones, picor y choque anafiláctico y los posibles fallos orgánicos (NCT04356300).

## 5.2. Reparación de heridas

Aunque la cicatrización de las heridas es un fenómeno fisiológico complejo, las MSC-EVs han demostrado contribuir al proceso de reparación promoviendo la proliferación y la diferenciación las células epidérmicas e induciendo la diferenciación

de las células inmunitarias hacia un fenotipo resolutivo. La epidermólisis bullosa (EB) es una enfermedad caracterizada por la fragilidad de la piel y la formación de ampollas en respuesta a un traumatismo mecánico [201]. Uno de los subtipos de esta enfermedad está promovida por la falta de colágeno tipo VII (COL7A1) y se ha observado que sus síntomas pueden aliviarse con MSC-EVs porque proporcionan la falta de colágeno e inducen a los fibroblastos del huésped a producir esta proteína [202]. Con estos prometedores resultados se puso en marcha un estudio clínico de fase I/IIA para comprobar la seguridad y la viabilidad de una aplicación tópica de EVs derivadas de MSC en la EB. Se evaluará la toxicidad limitante de la dosis y la recesión del tamaño de la herida en 10 participantes (NCT04173650).

Las MSC-EVs también se han aplicado a la curación de heridas de distintos órganos. El agujero macular idiopático (AM) puede llegar a inducir el desprendimiento de la retina. Aunque el tratamiento mediante microcirugía ocular es efectivo en la mayoría de pacientes, aquellos con AM particularmente grandes y de larga duración tienen un mal pronóstico después de la cirugía [203]. En estos casos, se están estudiando tratamientos alternativos o complementarios para la recuperación funcional y física de la AM. En 2018 se llevó a cabo un estudio clínico en el *Medical University Hospital* de Tianjin, China (NCT03437759) que evaluaba la inyección intravítrea de MSC-EVs, donde se observaron mejoras de la función visual de los pacientes e incluso en algunos casos un cierre macular completo [204].

### 5.3. Enfermedades neurológicas

La evidencia de que las EVs pueden atravesar la barrera hematoencefálica, ha puesto a estas vesículas en el punto de mira como candidatos terapéuticos para enfermedades neurológicas y trastornos mentales [205]. Se ha observado que el tratamiento con MSC-EVs en un modelo de enfermedad de Alzheimer reduce la activación de astrocitos, lo que disminuye la expresión de mediadores proinflamatorios y aumenta los niveles de mediadores antiinflamatorios reduciendo la acumulación de placas amiloides [206]. Un grupo del *Neurological Associates of West* en Los Ángeles, ha iniciado dos ensayos separados dirigidos a la neuralgia craneofacial (NCT04202783) y a la depresión, la ansiedad y la demencia provocadas por enfermedades neurodegenerativas (NCT04202770). A su vez, otro grupo del Hospital Ruijin en China, ha iniciado un ensayo clínico de fase I/II para explorar la seguridad y la eficacia de los MSC-EVs para el tratamiento de la demencia leve o moderada debida al Alzheimer (NCT04388982).

## 5.4. Patologías cardiovasculares

Aunque las tasas de mortalidad han disminuido drásticamente en las dos últimas décadas, las enfermedades cardiovasculares y circulatorias siguen siendo reconocidas como las principales causas de muerte en todo el mundo [207]. Debido a la pérdida de cardiomiocitos en las cardiopatías isquémicas, los investigadores se han centrado en la importancia de la medicina regenerativa para prevenir este tipo de enfermedades. Diferentes estudios han analizado el comportamiento con MSC-EVs en modelos de infarto de miocardio observando como este tratamiento inhibía la fibrosis y la inflamación del tejido, mejoraron la función cardíaca [208], [209]. De acuerdo con el hallazgo de que los MSC-EVs promueven la remodelación cardíaca favoreciendo la angiogénesis y modulando la respuesta proinflamatoria, un estudio clínico reciente de la Universidad de Ciencias Médicas de Isfahan, en Irán, está explorando el uso de estas vesículas para mejorar la función cardíaca en pacientes con infarto agudo (NCT03384433).

## 5.5. Tratamiento de apoyo para el COVID-19

Recientemente, la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), causada por la infección rápida y generalizada del nuevo SARSCoV-2 (coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo), se ha convertido en la mayor amenaza general tanto para la salud pública global como para la economía mundial. La infección por el SARS-CoV-2 altera la función del sistema inmunitario del paciente. Las células efectoras inmunitarias desreguladas secretan grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, lo que da lugar a la llamada "tormenta de citoquinas" [210]. El aumento de la secreción de citoquinas y la posterior infiltración del tejido pulmonar por parte de células inmunitarias activadas, como monocitos y neutrófilos inflamatorios, desencadena el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), que está ampliamente reconocido como uno de los factores mortales más críticos del COVID-19 [211]. Por lo tanto, se necesita urgentemente un tratamiento eficaz de apoyo para prevenir la tormenta de citoquinas inducida por la COVID-19.

Como hemos descrito a lo largo del manuscrito, la característica más destacada de las MSC y de las EVs derivadas de ellas es su capacidad inmunomoduladora. Aunque la producción de EVs en la actualidad supone una técnica económicamente ineficiente en comparación con las MSC, poseen una ventaja para el tratamiento de las enfermedades de las vías respiratorias al no quedarse atrapadas en los alveolos pulmonares a diferencia de las MSC inyectadas por vía intravenosa. Además, con un tamaño inferior a los 200 nm, las EVs pueden aplicarse por inhalación en forma de aerosol conservando su función inmunomoduladora [212].

Actualmente, hay cuatro ensayos clínicos que exploran el uso de MSC-EVs como tratamiento de apoyo para pacientes infectados por COVID-19. El primero se diseñó para explorar el potencial terapéutico de la inhalación en aerosol de MSC-EVs en pacientes con enfermedad grave en Shanghái, China (NCT04276987). La seguridad de este tratamiento se está evaluando en otro estudio clínico llevado a cabo en el mismo hospital (NCT04313647). Otro estudio dirigido en Rusia está probando si la inhalación de MSC-EVs puede suprimir la respuesta excesiva del sistema inmunitario al virus y estimular los procesos regenerativos (NCT04602442). Por último, el "ExoFlo" es un estudio aprobado por la FDA en fase II que se está realizando en 15 centros hospitalarios de los Estados Unidos. En este ensayo se está evaluando la administración intravenosa de MSC-EVs como tratamiento para el SDRA moderado y grave en 120 pacientes con COVID-19 (NCT04493242) [213].

Patología	Tratamiento	Localización	Última actualización	Referencia
Ojo seco pacientes con EICH crónica	UCMSC-exo; 10µg/gota; 4 gotas/día, 14 días	Centro oftalmológico de Zhongshan, Guangdong, China	Febrero 2020	NCT042113248
Diabetes mellitus tipo I (DMT1)	CBMSC-exo; 2 inyecciones, 1.5 × 10 <sup>9</sup> /kg/i.v.	Sahel Teaching Hospital, Sahel, El Cairo, Egipto	Mayo 2014	NCT021388331
Periodontitis	autoADMSC-exo Inyección en bolsas periodontales	Universidad de Beni-Suef, Bani Suwayf, Egipto Universidad de El Cairo, El Cairo, Egipto	Febrero 2020	NCT04270006
Fallo multiorgánico	UCMSC-exo 150mg/i.v./día durante 14 días	Universidad Médica de Fujian, Fujian, China	Mayo 2020	NCT04356300
Agujeros maculares	UCMSC-exo 50-20µg/10µl PBS; inyección intravítrea	Tianjin Medical University Hospital, Tianjin, China	Abril 2021	NCT03437759
Epidermólisis Bullosa Distrófica (aprobado FDA producto farmacéutico)	AGLE 102; aloMSC-exo 6 pautas, cada 14 días	Aegle therapeutics, Miami, Florida, EE.UU.	Enero 2021	NCT04173650
Neuralgia craneofacial	Exo concentrado (45µg); Inyec. Epineural Exo no concentrado (15µg); Inyec. i.v.	Neurological Associates of West LA, Santa Mónica, California, EE.UU.	Marzo 2021	NCT04202783
Depresión refractaria Trastornos de ansiedad Enfermedades neurodegenerativas	Líquido amniótico-aloMSC-exos 15 cc de solución no concentrada	Neurological Associates of West LA, Santa Mónica, California, EE.UU.	Marzo 2021	NCT04202770
Alzheimer	AloADMSCs-Exos (gotas nasales) 5, 10 o 20µg; 2/semana; 12 semanas	Hospital Ruijin Escuela de Medicina de la Universidad Jiao Tong de Shanghai, China	Junio 2021	NCT04388982
Trastornos cerebrovasculares isquémico agudo	AloMSC-exo enriquecido con miR-124 Inyec. intraparenquimal	Saeed Oraei Yazdani, Teherán, Irán, República Islámica	Junio 2021	NCT03384433
COVID-19	AloADMSC-exo inhalación/día; 2x10 <sup>8</sup> exos/dosis	Hospital Ruijin Escuela de Medicina de la Universidad Jiao Tong de Shanghai, China	Septiembre 2020	NCT04276987
COVID-19 (voluntarios sanos)	AloADMSC-exo Aerosoles 2x10 <sup>8</sup> , 4x10 <sup>8</sup> , 8x10 <sup>8</sup> , 12x10 <sup>8</sup> , 16x10 <sup>8</sup> exos/dosis	Hospital Ruijin Escuela de Medicina de la Universidad Jiao Tong de Shanghai, China	Agosto 2021	NCT04313647
COVID-19	MSC-exo inhalación 2 /día durante 10 días; 0,5-2x10 <sup>10</sup> exos/dosis	Medical Centre Dinasty, Samara, Russian Federation (COVID-19EXO)	Noviembre 2020	NCT04491240
COVID-19 (aprobado FDA producto farmacéutico)	Zofin (Organicell Flow) 5x10 <sup>11</sup> exos/dosis; 3 inyec. i.v. cada 4 días	Landmark Hospital, Naples, Florida, EE.UU. Landmark Hospital, Athens, Georgia, EE.UU.	Febrero 2021	NCT04384445
COVID-19	MSC-exo inhalación 2 /día durante 10 días; 0,5-2x10 <sup>10</sup> exos/dosis	Medical Centre Dinasty, Samara, Federación Rusa (COVID-19EXO2)	Octubre 2020	NCT04602442

**Tabla 2. Ensayos clínicos con vesículas extracelulares de MSC.** Azul: enfermedades inmuno-mediadas; Naranja: reparación de heridas; Gris: enfermedades neurológicas; Rojo: patologías cardiovasculares; Verde: tratamiento de apoyo contra el COVID-19.



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## 1. Hipótesis

Las MSC han sido consideradas las candidatas más prometedoras usadas en terapias avanzadas para el tratamiento de múltiples enfermedades. En los últimos años, las vesículas derivadas de las MSC han reproducido las propiedades terapéuticas de las células, aportando ventajas en su producción y utilización como fármaco. Sin embargo, el uso de EVs como terapia establecida aún supone un reto y es importante continuar investigando en esta área con el fin de implementar la terapia basada en EVs derivadas de MSC. A la luz de los estudios explicados en el apartado de introducción, hemos postulado la siguiente hipótesis:

La modificación genética y el cultivo bajo condiciones inflamatorias de las MSC incrementan la cantidad y el efecto inmunosupresor y regenerador de las vesículas que liberan, potenciando el uso y la estandarización de estas EVs como terapia innovadora para el tratamiento de patologías donde el sistema inmunitario desempeña un papel importante en el inicio o desarrollo de dicha enfermedad.

## 2. Objetivos

Con el fin de corroborar nuestra hipótesis, hemos planteado una serie de objetivos:

- Aumentar del potencial inmunosupresor de las MSC y de las EVs derivadas de ellas mediante la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$ .
- Generar una línea inmortalizada de MSC que evite el cambio de biopsia continuamente aumentando así la estandarización del producto.
- Generar un medio de acondicionamiento que permita a las MSC encontrarse en un ambiente similar a una situación inflamatoria potenciando sus cualidades.
- Aislar y caracterizar las EVs derivadas de MSC inmortalizadas y potenciadas por modificación genética y acondicionamiento inflamatorio.
- Analizar la capacidad inmunosupresora, antiinflamatoria y antifibrótica de las EVs *in vitro*.
- Analizar la capacidad terapéutica de las EVs en modelos animales de patologías relacionados con las enfermedades inflamatorias inmunomediadas.



# MATERIAL Y MÉTODOS



# 1. Cultivos celulares

## 1.1. Cultivos primarios

### 1.1.1. Aislamiento de MSC

Las células de pulpa dentaria (DP, del inglés *Dental Pulp*) fueron obtenidas de terceros molares humanos, los cuales fueron extraídos por razones ortodónticas a donantes sanos y jóvenes (18-21 años) quienes proporcionaron previamente su consentimiento informado. Después de la extracción, el molar se sumergió en una solución fisiológica que contenía antibióticos para eliminar cualquier contaminación por los gérmenes presentes en la cavidad bucal. Se fracturó la corona dental por la mitad de forma sagital y el tejido de la pulpa dentaria fue aislado y procesado en condiciones estériles. La pulpa se troceó en fragmentos pequeños ( $<1 \text{ mm}^3$ ) antes de digerirla en una solución de 3 mg/mL de Colagenasa/Dispasa® (Merk; Kenilworth, NJ, US) durante 90 minutos a 37°C. Los explantes digeridos se sembraron en una placa de 35 cm y se cultivaron con medio de cultivo de MSC (Tabla 1) en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% CO<sub>2</sub> y normoxia). Para conseguir que los explantes se adhirieran bien al plástico, se les añadió el volumen suficiente para cubrir las células, pero evitar que los explantes flotarán. Las células no adherentes fueron eliminadas a las 48h después del plaqueo inicial. El medio se cambió cada 3 días. Cuando los explantes alcanzaron la confluencia, tras 10-12 días, fueron tripsinizados y subcultivados a una densidad de  $2.5 \times 10^3$  células por cm<sup>2</sup> en medio de cultivo.

#### 1.1.1.1. Diferenciación y caracterización de MSC

Para comprobar que las células que habíamos aislado eran MSC y posteriormente, que las modificaciones genéticas no afectaban a las características que define a una MSC descritas por la ISCT se les hizo un fenotipado mediante citometría de flujo. En primer lugar, se analizaron marcadores de superficie, las células fueron teñidas con anticuerpos contra marcadores de la estirpe hematopoyética, leucocitaria y monocítica (CD34, CD45 y CD14) así como contra marcadores propios de células madre mesenquimales (CD73, CD90 y CD105). Las células no teñidas se usaron como control negativo.

Las células mesenquimales tienen la capacidad de diferenciarse a tejido óseo y adiposo. Con objeto de testar si las células aisladas poseían esta capacidad de diferenciación y las modificadas genéticamente a posteriori la conservaban, las MSC se sembraron a una densidad celular de  $1.5 \times 10^4$  cél./cm<sup>2</sup> para la diferenciación osteogénica y de  $2.5 \times 10^4$  cél./cm<sup>2</sup> para la diferenciación adipogénica. A las 24h se les añadió medio de diferenciación osteogénico/adipogénico (Tabla 2). El medio se renovó cada 2 días

hasta completar los 21 días de diferenciación. Los controles fueron cultivados con medio completo. Tras finalizar la diferenciación se analizó el porcentaje de MSC diferenciadas a hueso mediante la tinción de rojo alizarina (Merk), la cual tiñe depósitos de calcio presente en la matriz celular. El porcentaje de MSC diferenciadas a adipocitos se realizó mediante citometría de flujo, la presencia de gotas lipídicas en el citoplasma genera un aumento de complejidad intracelular en el parámetro SSC (*Side-scatter*), lo que permite diferenciar las células diferenciadas [214].

#### 1.1.1.2. Ensayo de cariotipo

Tras la inmortalización de las MSC quisimos comprobar que no se había producido alteraciones cromosómicas. El análisis cromosómico de las MSC inmortalizadas se llevó a cabo a partir células en fase 45 por el Laboratorio de citogenética y biología molecular del Instituto de Investigación Sanitaria la Fe. Alrededor de  $2 \times 10^7$  células sembrada a un 80% de confluencia, fueron bloqueadas en metafase con 50 ng/mL de demecolcina (Sigma-Aldrich; Darmstadt, Alemania) a 37°C durante 5 h. Las células se levantaron de la placa de cultivo con tripsina y se centrifugaron a 300 x g durante 5 min. El pellet se resuspendió en 10 mL de solución hipotónica (cloruro de potasio 0,075 M) y se incubó a 37°C durante 10 min. Tras una segunda centrifugación, las células se fijaron (3:1 solución de Metanol: Ácido acético; Sigma-Aldrich) y se tiñeron con tinción Giemsa (Sigma-Aldrich) sobre un portaobjetos, durante 5 minutos. Finalmente se lavaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. Los portaobjetos se montaron y se examinaron utilizando un microscopio óptico con un aumento de 100X. Los cromosomas se clasificaron según el cariotipo estándar humano.

#### 1.1.1.3. Acondicionamiento inflamatorio de las MSC

Las MSC fueron activadas con citoquinas proinflamatorias para imitar una situación inflamatoria: IFN- $\gamma$  (50 ng/mL) (R&D; Mineápolis, MN, US), TNF $\alpha$  (10 ng/mL) (R&D) e IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) (Peprotech, London, UK) (Tabla 3).

#### 1.1.2. Aislamiento de PBMCs

Se obtuvo sangre a partir de donantes sanos tras consentimiento informado del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana y del Banco de Sangre del Hospital Universitari Politècnic La Fe, Valencia, España. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad generado con Histopaque™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los linfocitos, monocitos y plaquetas no son lo suficientemente densos para penetrar en las capas del medio de Histopaque. Estas células se concentran en una banda en la interfase de la muestra, lo que permite su fácil recuperación. Las PBMCs

se cultivaron en medio RPMI completo (Tabla 1) en suspensión a una densidad de  $2 \times 10^6$  cél./ml en condiciones estándar de cultivo ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  y normoxia).

#### 1.1.2.1. Aislamiento de macrófagos

Para aislar los monocitos, las PBMCs se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^6$  cél./ $\text{cm}^2$  durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Las células no adherentes fueron lavadas dos veces con PBS. Los monocitos se cultivaron con medio de diferenciación de macrófagos M1 o M2 (Tabla 2) en condiciones estándar de cultivo ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  y normoxia). Renovando el medio cada dos días. A día 5 los macrófagos diferenciados son activados con 10 ng/mL de LPS (Tabla 3).

#### 1.1.2.2. Aislamiento de neutrófilos

La sangre obtenida a partir de los donantes se diluyó 1:1 en PBS y se centrifugó en un gradiente de densidad generado por Lympholyte-H®. Este gradiente permite la eliminación de eritrocitos y células muertas de la sangre humana, separando en dos fases claramente diferenciadas por una parte los granulocitos (neutrófilos en su mayoría) y por otra parte los linfocitos y monocitos. Los neutrófilos se cultivaron 24h en PBS en condiciones estándar de cultivo ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  y normoxia) antes de su uso.

#### 1.1.2.3. Aislamiento de células *Natural Killer*

Partiendo de las PBMCs en suspensión, las células *Natural Killer* se aislaron mediante selección positiva. Previamente a su aislamiento, las PBMCs se mantuvieron en cultivo durante una semana con RPMI completo (Tabla 1) suplementado con 20 ng/mL de IL-2 e IL-15 para estimular y enriquecer el número de NKs en el cultivo, el medio se reemplazó cada dos días (Tabla 3). Para el aislamiento, en primer lugar, se incubaron 5  $\mu\text{g}$  de anticuerpo monoclonal anti-CD56 biotinilado (ThermoFisher Scientific) junto con 25  $\mu\text{L}$  de Dynabeads™ Biotin Binder ( $1 \times 10^7$  bolas magnéticas recubiertas de estreptavidina) durante 30 min a temperatura ambiente en agitación y rotación suaves. Se lavaron con TBS-T mediante el uso de un imán para eliminar el exceso de anticuerpo 3 veces. En segundo lugar, se incubaron las bolas magnéticas unidas al anticuerpo junto con  $1 \times 10^7$  PBMCs resuspendidas en 100  $\mu\text{L}$  de Tampón de aislamiento durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$  y en agitación y rotación suaves. Mediante el uso de un imán, eliminamos las células que no habían sido retenidas y les dimos un par de lavados con PBS. La fracción positiva se analizó por citometría de flujo para comprobar su pureza, marcando las células con el anticuerpo anti-CD56 y el anti-CD3.

Las NKs aisladas se cultivaron en suspensión a una concentración de  $3 \times 10^5$  células en un pocillo de p24 por triplicado. Las NKs fueron sembradas en medio RPMI completo condicionado con 20 ng/mL de IL-2 y 20ng/mL de IL-15 para su estimulación,

en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% CO<sub>2</sub> y normoxia) (Tabla 3). Dos de los pocillos fueron tratados con 15 µg/mL de distintos tipos de EVs al mismo tiempo que se indujo la estimulación. Las NKs se mantuvieron con la misma concentración de citoquinas cada dos días. Pasado una semana se procedió a la extracción de ARN.

### 1.1.3. Fibroblastos dérmicos

Los fibroblastos dérmicos que se han utilizado en este trabajo fueron aislados previamente en el laboratorio a partir de biopsias de piel humanas procedentes de lipectomías mediante consentimiento informado [215] y se cultivaron en DMEM/F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) completo (Tabla 1).

Para los ensayos de fibrosis, un día antes de la estimulación, los fibroblastos se sembraron a una concentración de  $8 \times 10^4$  cél/mL en placas p24 (por cuadruplicado) en medio DMEM/F12 con 10 µg/mL de ciprofloxacino pero libre de FBS, ya que el FBS induce la fibrosis. Al día siguiente, tres de los pocillos fueron estimulados con TGF-β (10 ng/mL; R&D) durante 24 h en medio DMEM/F12 con antibiótico y libre de FBS (Tabla 3). Dos de estos pocillos se trataron con 15 µg/mL de distintos tipos de EVs al mismo tiempo que se indujo la fibrosis. Un pocillo se dejó con DMEM/F12 con antibiótico y libre de FBS como control negativo. Al día siguiente, se procedió a sacar proteína o a realizar una inmunofluorescencia.

### 1.1.4. Células endoteliales (HUVEC)

Para los experimentos realizados en endotelio hemos usado la línea celular HUVEC (del inglés, *Human umbilical vein endothelial cells*), son células comerciales derivadas del endotelio de venas del cordón umbilical. Estas células se crecen a una densidad entre  $2.5 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  cél/cm<sup>2</sup>, en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% CO<sub>2</sub> y normoxia) y con el medio de cultivo Endothelial Cell Growth Medium-2 (EGM-2) BulletKit™ (Lonza, Basel, Switzerland) (Tabla 1).

Para los ensayos de activación del endotelio, se sembraron  $5 \times 10^4$  HUVEC por pocillo en una p24 (por cuatriplicado). Al día siguiente, a tres pocillos se les añadió 10 ng/mL de TNF-α (R&D) y 10 ng/mL de IL-1β (Peprotech) en medio EGM-2 (Tabla 3). Dos de estos pocillos dos fueron tratados con 15 ng/mL de distintos tipos de EVs al mismo tiempo que la activación con las citoquinas. Un pocillo se dejó con medio EGM completo como control negativo. Transcurridas 24h se procedió a sacar ARN o a realizar una inmunofluorescencia.

## 1.2. Líneas celulares

### 1.2.1. HEK-293T

La línea celular HEK 293T consiste en células embrionarias provenientes de riñón humano (ATCC® CRL-3216™ [www.atcc.org](http://www.atcc.org)). Son células que se transfectan fácilmente, por lo que se han usado ampliamente como células productoras de virus. Las células se mantuvieron en medio DMEM alto en glucosa (4,5 mg/mL) completo (Tabla 1) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y condiciones de normoxia.

### 1.2.2. THP-1

La THP-1 es una línea celular inmortalizada derivada de monocitos humanos. Para los experimentos de este manuscrito se utilizó en concreto la línea THP1-XBlue™-CD14 (Invivogen, San Diego, CA, USA.). Las células THP1-XBlue™-CD14 expresan de forma estable un gen reportero de la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) inducible por NF-κB y AP-1. Además, las células THP1-XBlue™-CD14 expresan de forma estable el CD14, un antígeno de diferenciación específico de los macrófagos que interactúa con varios TLR. Tras la estimulación de los TLR, las células THP1-XBlue™-CD14 activan factores de transcripción y posteriormente la secreción de SEAP, que es fácilmente cuantificable cuando se utiliza QUANTI-Blue™, un medio que se vuelve púrpura/azul en presencia de SEAP. En nuestro caso se usó el LPS como ligando del TLR4.

Para el ensayo, fueron sembradas  $1 \times 10^5$  cél. por pocillo de p96 en 200 µL de RPMI completo (Tabla 1). A cada pocillo se añadió 10 ng/mL de LPS (Tabla 3), menos al control negativo que se añadió 20 µL de PBS. En los experimentos funcionales se añadieron 15 µg/mL de distintos tipos de EVs a cada pocillo. Uno de los pocillos con LPS se dejó como control positivo. Las células se incubaron durante 24 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y condiciones de normoxia. Al día siguiente se preparó el QUANTI-Blue™ siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 180 µL de QUANTI-Blue™ por pocillo en una placa de p96 y se añadieron 20 µL de los sobrenadantes de las THP-1 que habían sido cultivadas con LPS y tratadas con EVs durante 24 h. La placa se mantuvo en agitación durante 5 h y se determinaron los niveles de SEAP utilizando un espectrofotómetro a 620-655 nm.

#### **Medios de cultivo celular completos**

<i>Tipo celular</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Concentración</i>	<i>Casa comercial</i>
MSC	DMEM 1mg/mL de glucosa		Gibco-Invitrogen

	FBS (lote testado)	10 %	Corning
	Ciprofloxacino	10 µg/mL	Sigma-Aldrich
PBMCs Linfocitos T Células NK Monocitos Neutrófilos THP1	RPMI-1640		Gibco-Invitrogen
	FBS	10 %	Corning
	L-glutamina	2 mM	Sigma-Aldrich
	Piruvato	2 mM	Gibco
	Ciprofloxacino	10 µg/mL	Sigma-Aldrich
HUVEC	EBM™ Basal Medium		Lonza
	EGM™ SingleQuots™ Supplement Pack		Lonza
Fibroblastos dérmicos	DMEM/F12		Gibco-Invitrogen
	Ciprofloxacino	10 µg/mL	Sigma-Aldrich
HEK 293T	DMEM 4'5mg/ml de glucosa		Gibco-Invitrogen
	FBS	10 %	Corning
	Ciprofloxacino	10 µg/mL	Sigma-Aldrich

Tabla 1. Medios de cultivo completos utilizados según el tipo de célula.

### Medios de cultivo para la diferenciación celular

<i>Medio de diferenciación</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Concen-tración</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Referencia</i>
<i>Osteogénico</i>	Medio de cultivo de MSC			
	Dexametasona	100 nM	Sigma-Aldrich	D4902
	Ácido ascórbico	50 µM	Sigma-Aldrich	A4544
	Glicerol 2-fosfato	10 mM	Sigma-Aldrich	G9891
<i>Adipogénico</i>	Medio de cultivo de MSC			
	Dexametasona	1 µM	Sigma-Aldrich	D4902
	Indometacina	200 µM	Sigma-Aldrich	I7378
	3-isobutil-1-metilxantina	500 µM	Sigma-Aldrich	I5879
<i>Diferenciación MΦ2</i>	RPMI completo			
	GM-CSF	5 ng/mL	Peprtech	300-03

<i>Diferenciación MΦ1</i>	RPMI completo			
	M-CSF	20 ng/mL	Peprotech	300-25

**Tabla 2. Medios de cultivo para la diferenciación de distintos tipos celulares.**

**Medios de cultivo para la activación celular**

<i>Tipo celular</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Concen- tración</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Referencia</i>
MSC	Medio de cultivo de MSC			
	IFN- $\gamma$	50 ng/mL	R&D	285-IF
	TNF- $\alpha$	10 ng/mL	R&D	210-TA
	IL1- $\beta$	10 ng/mL	Peprotech	200-01B
HUVEC	Medio de cultivo de HUVEC			
	TNF- $\alpha$	10 ng/mL	R&D	210-TA
	IL1- $\beta$	10 ng/mL	Peprotech	200-01B
Fibroblastos dérmicos	DMEM/F12			
	FBS	0 %		
	Ciprofloxacino	10 $\mu$ g/mL	Sigma- Aldrich	
	TFG- $\beta$	10 ng/mL	R&D	240-B-010
MΦ1, MΦ2 y THP1	RPMI completo			
	LPS	10 ng/mL	Invitrogen	00-4976-93
Células NK	RPMI completo			
	IL-2	20 ng/mL	R&D	202-IL-010
	IL-15	20 ng/mL	R&D	247-IL-010

**Tabla 3. Medio para la activación de distintas células**

## 2. Modificación genética de las MSC

### 2.1. Producción de partículas virales

#### 2.1.1. Transformación de bacterias y extracción de plásmidos

Para la transformación de bacterias se usó la cepa competente *E.coli* DH-5 $\alpha$ . Esta cepa ha sido modificada para aumentar la eficacia de la transformación. La inserción del plásmido de interés se llevó a cabo mediante choque térmico: 50 $\mu$ l de bacterias se incubaron con 500 ng de plásmido 20 min en hielo, seguidamente 45 segundos a 42°C y finalmente 2 min de nuevo en hielo. Tras la transformación, las bacterias se expandieron en un agitador orbital a 180 revoluciones por minuto (r.p.m) en 1 mL de medio de cultivo en suspensión conocido como LB (del inglés, *Lysogeny Broth*) sin antibiótico a 37°C. Al cabo de 1 h, se centrifuga a 3000 r.p.m durante 5 min y con el pellet se realizó una siembra en placa de LB agar suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/m por el método de la triple estría y se incubaron a 37°C toda la noche. Nuestro plásmido de interés tiene un gen de resistencia a ampicilina, de esta forma, sólo se seleccionaron las colonias que nos interesaban.

Estas colonias se picaron individualmente y se expandieron en LB suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL a 37°C durante 8 horas a 180 r.p.m. Pasado ese tiempo, el inóculo que mejor hubiera crecido se añadió a 300 mL de LB suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL a 37°C toda la noche a 180 r.p.m. La extracción del plásmido se realizó usando el kit JETSTAR Plasmid Purification Kit (Genprice) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop ND1000) y se diluyó a una concentración de 1 $\mu$ g/mL.

#### 2.1.2. Transfección de plásmidos en HEK-293T: generación de partículas lentivirales

Las partículas virales se produjeron en células HEK293T. Se sembraron 16x10<sup>6</sup> células HEK293T en una placa p150 en medio completo. Al día siguiente se cambió el medio y las HEK293T se transfectaron con distintos vectores dependiendo de si estos lentivirus eran de 2<sup>a</sup> o 3<sup>a</sup> generación (todos de Addgene).

Para la transfección de los diferentes plásmidos lentivirales se empleó el método de precipitación con fosfato cálcico. Las soluciones A y B (Tabla 4) se prepararon por separado. La solución A se fue añadiendo a la solución B despacio y se procedió a burbujear con el pipeteador automático la mezcla durante 1 min. Luego se añadió la mezcla gota a gota sobre las HEK293-T y se incubaron durante 8. Transcurrido ese

tiempo, se les cambió el medio a las HEK293-T por medio alto en glucosa sin suero y se incubaron 48 h.

A las 48 h se recoge el medio (dónde se encuentran los lentivirus) y se filtran a 0,45 µm para eliminar las células que hayan quedado en suspensión y se guarda a -80°C hasta su infección.

	2ª GENERACIÓN		3ª GENERACIÓN	
Solución A	Plásmido de interés (HIF-1α; #12254)*	75 µl	Plásmido de interés (hTERT; #85140)	75 µl
	pMD2G (#12259)	25 µl	pMD2G (#12259)	25 µl
	psPAX2 (#12260)	37 µl	pRRE (#12251)	50 µl
			pRSV-REV (#12253)	20 µl
	CaCl <sub>2</sub> 2M	460 µl	CaCl <sub>2</sub> 2M	460 µl
H <sub>2</sub> O	3,153 µl	H <sub>2</sub> O	3,120 µl	
Solución B	HBS (2x) **	3,75 µl	HBS (2X) **	3,75 µl

**Tabla 4. Medios de transfección de plásmidos de 2ª y 3ª generación.** \*El plásmido HIF-1α se sintetizó en el laboratorio, clonando el gen HIF-1α en el plásmido pWPI [216]. \*\*HEPES tampón salino: 10mM glucosa, 40mM HEPES, 10mM KCl, 270mM NaCl, 1.5mM Na<sub>2</sub>HPO, pH 7.1.

## 2.2. Transducción lentiviral de MSC

Se sembraron 1x10<sup>5</sup> células de MSC en una placa p100 y se transdujeron con los lentivirus generados en el apartado anterior; teniendo en cuenta que la multiplicidad infectiva de las MSC es de 10, es decir, necesitan 10 partículas virales por célula para una buena infección. El medio de cultivo junto con las partículas lentivirales se suplementó con el polímero catiónico polibreno a 8µg/mL (Sigma-Aldrich) que mejora la eficiencia de la infección y se incubó durante 6 horas. Transcurrido ese tiempo el medio de las células se reemplazó por medio bajo en glucosa. Una vez que incorporan el ADN plasmídico en el genoma, las células establecen la expresión constitutiva de la proteína de interés y del gen reportero. Como control de la infección se generaron partículas lentivirales usando los mismos vectores, pero sin las proteínas de interés.

	Vector	Nombre	Vector	Nombre
Control	pWPI-IRES-GFP	MSC	pLV-IRES-hygro	MSC
Gen de interés	pWPI-HIF-1α-IRES-GFP	MSC-HIF	pLV-hTERT-IRES-hygro	MSC-T

La eficiencia de la transducción de pWPI-GFP y pWPI-HIF-1α-GFP se evaluó cuantificando las células GFP<sup>+</sup> por citometría de flujo, mientras que la de pLV-hygro y pLV-hTERT-hygro se evaluó mediante un ensayo de selección con higromicina. Para la

prueba de selección con higromicina se sembraron las diferentes líneas de MSC a  $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se incubaron con 100 µg/mL de higromicina durante 48 h. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo por reducción del compuesto MTT. A su vez, las MSC-HIF fueron transducidas con el vector pLV-hTERT-hygro, estas células se denominaron MSC-T-HIF. En todos los casos, la eficiencia de la transducción fue de más de un 95%.

Los tiempos de duplicación de la población (PDT, del inglés *Population Doubling Time*) se calcularon mediante la fórmula  $PDT = (t_2 - t_1) / 3,32 \times (\log N_2 - \log N_1)$  donde N<sub>2</sub> es el número de células cosechadas y N<sub>1</sub> el número de células del inóculo [217].

### 2.2.1. Caracterización de la inmortalización celular con hTERT

Además de comprobar que el gen de la telomerasa se estaba expresando por medio de qPCR y WB se llevó a cabo dos ensayos para probar que esta proteína era funcional.

La actividad de la telomerasa se determinó utilizando un protocolo descrito por Erbert *et. al.* [218].  $1 \times 10^5$  células de MSC-T y MSC-T-HIF fueron lisadas y el lisado se incubó con el oligonucleótido TS (5'AATCCGTCGAGCAGAGTT, Sigma-Aldrich), el oligonucleótido inverso ACX (5'GCGCGCTTACCCTCTTACCCTAACC, Sigma-Aldrich) y SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a 25 °C durante 20 min. El oligonucleótido TS imita las terminaciones finales de los telómeros mientras que el ACX es un oligonucleótido complementario al TS que sirve de molde para que éste se amplifique. Los productos de la reacción se cuantificaron en un sistema de RT-qPCR en el ViiA 7. La actividad telomerasa relativa (RTA) se extrapola a partir de una curva estándar realizada con células HEK-293T.

También se realizó un ensayo de la actividad β-galactosidasa que está asociada a la senescencia. Para ello, los distintos tipos de MSC en fase 14 fueron sembrados a baja densidad y se utilizó el kit de tinción de β-galactosidasa siguiendo las indicaciones del fabricante (#9860, Cell Signaling Technology).

## 3. Aislamiento de vesículas extracelulares

### 3.1. Método de extracción: Ultracentrifugación

Las EVs se aislaron utilizando un protocolo de ultracentrifugación en serie descrito anteriormente [219]. Para obtener las EVs, las MSC se cultivaron en un medio de extracción (ME), que se preparó complementando el DMEM bajo en glucosa con un 10% de FBS depletado en EVs y antibióticos. El FBS se depletó de la mayoría de EVs mediante ultracentrifugación del FBS normal y DMEM mezclado 1:1 a 100.000×g

durante 16 hora. Después de 48 h de incubación de las MSC, los medios condicionados se recogieron y fueron centrifugados a 2.000×g durante 20 min (centrífuga de sobremesa Eppendorf 5804, rotor A-4-62), seguido de una centrifugación a 10.000×g durante 70 min (centrífuga Hitachi CP100NX, rotor Beckman Coulter 50.2 Ti). Los sobrenadantes fueron posteriormente filtrados manualmente a través de una jeringa de 0,22 µm. A continuación, las EVs se concentraron mediante dos rondas de ultracentrifugación a 110.000×g durante 120 minutos (centrífuga Hitachi CP100NX, rotor Beckman Coulter 50.2 Ti) con un paso de lavado entre las rondas. Las muestras se pasaron por un filtro Amicon™ de 100 kDa (Merck Millipore, Burlington, MA, EE.UU.) para eliminar las citoquinas añadidas y luego se filtraron por un filtro de 0,22 µm para mantener la esterilidad.

### 3.2. Caracterización de las EVs

La concentración de proteínas de las EVs se determinó con el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) para garantizar que se utilizaban cantidades iguales de proteínas para los experimentos. Las EVs se suspendieron en el tampón RIPA (1% de NP40, 0,5% de desoxicolato, 0,1% de dodecilsulfato de sodio en solución salina tamponada con Tris (TBS), (Sigma-Aldrich)) para el WB y en PBS para la caracterización y el análisis funcional.

#### 3.2.1. Cuantificación mediante nanoparticle tracking análisis

La distribución del tamaño de las EVs y la cuantificación de las vesículas se analizaron mediante NTA utilizando un sistema NanoSight NS3000 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido).

#### 3.2.2. Ensayo de la actividad acetilcolinesterasa

Se desarrolló un ensayo de acetilcolinesterasa como se ha descrito previamente, ya que esta se asocia a la presencia de EVs [220]. Se añadieron 30 µl de cada preparación de EVs en pocillos individuales de una microplaca de fondo plano de 96 pocillos. A continuación, se añadieron 1,25 mM de acetiltiocolina y 0,1 mM de 5,5' ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico, DTNB) (Sigma-Aldrich) a cada pocillo hasta un volumen final de 300 µL y se monitorizó el cambio de absorbancia a 412 nm. Los datos se representaron como actividad de la acetilcolinesterasa tras 30 minutos de incubación a 37 °C. La actividad de las EV<sub>MSC-T</sub> se fijó en 1 para facilitar la comparación.

#### 3.2.3. Microscopía electrónica e Inmunooro

La microscopía electrónica se llevó a cabo como se describe anteriormente por la unidad de microscopía del Centro de Investigación Príncipe Felipe [219]. Las EVs

fueron diluidas en PBS, cargadas en rejillas recubiertas de carbón Formwar y contrastadas con acetato de uranilo al 2%. Para la inmunodetección con partículas de oro, las EVs se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% y se dejaron reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente en las rejillas. Luego, se bloquearon con albúmina de suero bovino al 5% en PBS y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti-CD63 (Abcam; TS63; Cambridge, UK) durante 30 minutos a 37 °C. Las rejillas se incubaron entonces con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con partículas de oro coloidal de 6 nm (ab6708; Abcam). Las EVs inmunomarcadas se posfijaron con glutaraldehído al 2% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y fueron contrastadas. Finalmente, las EVs fueron examinadas con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 Spirit. Las imágenes se adquirieron con una cámara CCD Morada (Olympus Soft Image Solutions GmbH, Münster, Alemania).

## **4. Análisis de expresión génica**

### **4.1. Extracción de ARN**

Para aislar el ARN de las células, éstas se mantuvieron en hielo y se lavaron con PBS frío antes de añadir el tampón de lisis celular conocido como RLT. Se recogió del pocillo el lisado celular y se le añadió 1V de EtOH 70%. A continuación, se usó el kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) que consiste en una purificación del ARN en columna. La concentración de ARN se determinó usando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). La calidad de la extracción fue determinada usando el ratio 260/280 (indicador de contaminación por proteínas) y el ratio 260/230 (indicador de contaminación causada por componentes orgánicos o agentes caotrópicos).

### **4.2. Retrotranscripción**

Una vez aislado el ARN y cuantificado, éste puede usarse como molde para obtener el ADN complementario (ADNc) por transcripción inversa. Para ello, se utilizó el kit PrimeScript RT Reagent Kit (Takara, Kusatsu, Japan) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción se lleva a cabo en un termociclador Eppendorf partiendo de 1µg de ARN en todas las muestras con los siguientes ciclos de temperatura: 15 min a 37°, 5 seg a 85° y finalmente se lleva la reacción a 4°C. El ADNc se guardó a -20°C hasta la realización de la qPCR.

### **4.3. RT-qPCR**

Los cebadores sentido y antisentido específicos para humanos fueron diseñados mediante la herramienta informática Primer-Blast y se adquirieron a través de Condalab

(Madrid, España). La RT-qPCR se realizó con SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), cada reacción de qPCR contenía 2µl de ADNc, 0'34 µl de cada primer, 2'32 µl de H<sub>2</sub>O molecular y 5µl del Master Mix, siendo un volumen final de 10µl. La reacción se realizó en placas de 384 pocillos en un sistema de PCR Viia 7 (Applied Biosystems). Los ciclos de temperatura utilizados son de 95°C durante 10 min seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min. Los cebadores diseñados utilizados fueron:

hGAPDH	CCCCTCTGCTGATGCCCCA (F) / TGACCTTGGCCAGGGGTGCT (R)
hTERT	GTATGGCTGCGTGGTGAAC (F) / TCTGAACAAAAGCCGTGCCA (R)
hIDO	CTACCATCTGCAAATCGTG (F) / GAAGGGTCTTCAGAGGTCT (R)
hCOX2	GAATCATTACCAGGCAAA (F) / TCTGTACTGCGGGTGGAAACA (R)
hPD-L1	CCTGCAGGGCATTCCAGAAA (F) /GTCCTTGGGAACCGTGACAG (R)
hIL-6	CCAGGAGCCCAGCTATGAAC (F) / GAGCAGCCCCAGGGAGAA (R)
hHIF-1α	CACAGCCTGGATATGAA (F) / GAATTCTTGGTGTTATATATG (R)
hVCAM	AGGTGACGAATGAGGGGACCACA (F) / CCAGCCTCCAGAGGGCCACT (R)
hICAM	CTGGTCCTGCTCGGGGCTCT (F) / GGGCTGGTCACAGGAGGTGC (R)
hSELP	TTGTTCTGCCAGCAGCTGCC (F) / AGGGCCAGAGACCCGAGGAG (R)
mActin	GCCAACCGTGAAAAGATGACC (F) / GAGGCATACAGGGACAGCAC (R)
mTNF	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT (F) / GCTACGACGTGGGCTACAG (R)
mIL-1β	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG (F) / CTGGATGCTCTCATCAGGACA (R)
mIL-6	GAGTCCTTCAGAGAGATACAGAAAC (F) / TGGTCTTGGTCCTTAGCCAC (R)
mCD86	GCACGGACTTGAACAACCAG (F) / CCTTTGTAATGGGCACGGC (R)
miNOS	CGCTTGGGTCTTGTTCCTC (F) / GGTCATCTTGTATTGTTGGGCTG (R)
mCCR7	CTCTCCACCGCCTTTCCTG (F) / ACCTTCCCCTACCTTTTTATTCCC (R)
mIL-10	GGACAACATACTGCTAACCGAC (F) / CCTGGGGCATCACTTCTACC (R)
mArgI	GTGGGGAAAGCCAATGAAGAG (F) / TCAGGAGAAAGGACACAGGTTG (R)
mCD206	TGTGGAGCAGATGGAAGGTC (F) / TGTCGTAGTCAGTGGTGGTTC (R)

## 5. Análisis de expresión de proteína

### 5.1. Citometría de flujo

Para el análisis por citometría de flujo, tanto las EVs como las células se incubaron primero con una solución de bloqueo (PBS que contenía un 1% de suero normal de ratón) durante 10 minutos y luego se incubaron con anticuerpos conjugados con fluorocromo durante 30 minutos a 4 °C a las concentraciones recomendadas por los fabricantes, y se analizaron utilizando un citómetro de flujo BD FACSCANTO II equipado con el software FlowJo® (FlowJo LLC, BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

Los anticuerpos humanos utilizados fueron:

anti-CD14 (RPE, Dako; TUK4)  
anti-CD34 (APC, Dako; C7238)  
anti-CD45 (PECy5, BD Biosciences; HI-30)  
anti-CD73 (BV421, BD Biosciences; AD2)  
anti-CD90 (PE, Immunotech; F15-42-1-5)  
anti-CD105 (PE, Abcam; SN6)  
anti-CD3 (PerCP-Cy, BD Biosciences; SK7)  
anti-CD4 (BV510, BD Biosciences; L200)  
anti-CD8 (PE-Cy7, BD Biosciences; RPA-T8)  
anti-CD274 (APC, BD Biosciences; MIH1)  
anti-CD19 (APC-H7, BD Biosciences; SJ25C1)  
anti-CD56 (Alexa Fluor, BD Biosciences; B159)  
anti-CD15 (FITC, Biolegend; HI98,)  
anti-CD163 (PerCP-Cy, BD Biosciences; GHI/61)  
anti-CD80 (APC, BD Biosciences; FUN-1)  
anti-CD86 (V450, BD Biosciences; L307.4)  
anti-HLA-DR (FITC, Miltenyi Biotec; AC122)

### 5.1.1. Detección de EVs por citometría de flujo

Como las EVs tienen un tamaño inferior al rango de detección del citómetro, se analizaron utilizando un protocolo previamente descrito basado en perlas de captura [221]. Se incubaron perlas magnéticas de 10  $\mu\text{m}$  recubiertas de estreptavidina (Millipore) con 1  $\mu\text{g}$  de anticuerpos biotinilados (anti-CD81, anti-CD9 y anti-CD63, immunostep) durante 1 h a temperatura ambiente, bajo agitación suave. Las perlas se lavaron para limpiar los anticuerpos no unidos y se incubaron con 30  $\mu\text{g}$  de EVs durante toda la noche a 4 °C con una rotación suave y constante. Al día siguiente las perlas se habían unido a los EVs mediante interacción estreptavidina-biotina, estas perlas tienen un tamaño detectable por el citómetro. Las perlas fueron lavadas y posteriormente se bloquearon y tiñeron como se ha descrito anteriormente.

## 5.2. Inmunodetección

### 5.2.1. Preparación de la muestra

Las EVs o las células se lisaron en 100  $\mu\text{L}$  de tampón RIPA que contenía inhibidores de proteasas (Complete, Sigma-Aldrich) y fosfatasa (PhosSTOP, Sigma-Aldrich). La obtención de los extractos fue en todo momento en hielo para evitar la degradación proteica. Los extractos se mantuvieron en hielo durante 15 min, realizando

un agitado en vórtex cada 5 min para disgregar las muestras. Finalmente se centrifugaron a 4° a velocidad máxima durante 15 min (Eppendorf 5417 R). Se recuperaron los sobrenadantes y se separaron 10 µl para hacer la cuantificación de la proteína. El resto se conservó a -80°.

La cantidad proteica se cuantificó mediante el método colorimétrico BCA (BCA proteína assay kit (Pierce, Cultek). La cuantificación se realiza en placas de 96 pocillos. Se realizó una curva patrón añadiendo 10 µl de distintas concentraciones conocidas de BSA (seroalbúmina bovina) en RIPA. También se añadieron pocillos con 10 µl de extracto proteico de las distintas muestras. Se agregaron 190 µl de la solución de trabajo del kit sobre los 10 µl y se incubó a 37°C durante 30 min. Tras ese periodo, se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de placas. La absorbancia de las muestras se extrapoló sobre la curva patrón y se sacó la concentración de cada muestra.

### 5.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis es una técnica que separa proteínas según su tamaño molecular. En primer lugar, se mezclaron cantidades iguales de muestras proteicas con tampón de muestra Laemmli no reductor (BioRad) que carga negativamente las proteínas y se desnaturalizaron a 96 °C durante 5 minutos. Para separar las proteínas se utilizaron geles de SDS-poliacrilamida al 10% en un tampón compuesto por 27 mM de glicina, 0'1% de SDS y 50 mM de tris-HCl. Se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ (BioRad) para identificar el tamaño de las proteínas. La electroforesis se realizó a 50mA contantes.

### 5.2.3. Transferencia e inmunodetección

Las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (Immobilon-P; Millipore) previamente activadas con metanol (2 min), en un tampón de compuesto por 20% de metanol, 20 mM de tris y 150 mM de glicina. La transferencia se realizo en frío a 250mA contantes durante 3 h.

Las membranas se bloquearon con TBS que contenía un 5% (p/v) de leche en polvo no grasa con un 0,1% de Tween-20 durante 1 h. A continuación, se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C en rotación con los anticuerpos primarios correspondientes. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 min en agitación con TBS y se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios unidos a la peroxidasa HRP correspondientes durante 1 h en agitación suave. Se realizaron 3 lavados de nuevo en PBS y se reveló la membrana mediante dos kits de quimioluminiscencia: el reactivo ECL Plus (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) y para muestras con menos cantidad, el reactivo Thermo Scientific™ SuperSignal™ West

Femto Maximum Sensitivity Substrate. Las reacciones se visualizaron con un equipo Amersham Imager 600 (GE Healthcare) y se cuantificaron con el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

Los anticuerpos primarios humanos utilizados fueron:

anti-tubulina (dilución 1/4000; Sigma-Aldrich; T5168)  
 anti-hTERT (dilución 1/500; Rockland Immunochemicals; 600-401-252S)  
 anti-HIF-1 $\alpha$  (dilución 1/500; BD Biosciences; 610958)  
 anti-IDO (dilución 1/1000; Cell Signaling Technology; #12006)  
 anti-COX2 (dilución 1/1000; Santa Cruz; H-3)  
 anti-IL-6 (dilución 1/1000; Santa Cruz; H-183)  
 anti-HSP70 (dilución 1/500; Cell Signaling Technology; D69)  
 anti-CD9 (dilución 1/500; Santa Cruz; C-4)  
 anti-TSG101 (dilución 1/200; Santa Cruz; C-2)  
 anti-calnexina (dilución 1/1000; Santa Cruz, H-70)  
 anti-PD-L1 (dilución 1/500; AB Clonal; A11273)  
 anti- $\alpha$ -SMA (dilution 1/200; Dako; clone 1A4)  
 anti-COL-1 $\alpha$  (dilution 1/500; Cell Signaling; E8I9Z)

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

anti-IgG de conejo (dilución 1/4000; Dako; P0448)  
 anti-IgG de ratón (dilución 1/10.000; Sigma-Aldrich; A9044)

### 5.3. Ensayo con ELISA

Los niveles de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-10 presentes en los sobrenadantes de los cultivos se midieron mediante ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (BioLegend, San Diego, CA, US). Se añadieron 100  $\mu$ l de Solución de Captura del anticuerpo en placas de 96 pocillos el día de antes y se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó la placa 4 veces (PBS + 0'05% Tween-20) y se añadieron 200  $\mu$ l de Diluyente de Ensayo como bloqueo (PBS + 1% BSA). Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en agitación circular (500 r.p.m). Después de lavar 4 veces, se añadieron 100  $\mu$ l de los estándares de las curvas y las muestras a los pocillos correspondientes y se agitó a temperatura ambiente en agitación durante 2 h. Tras 4 lavados, se añadieron 100  $\mu$ l de la Solución de Detección del Anticuerpo a temperatura ambiente en agitación durante 1 h. Después de lavar 4 veces, se añadieron 100  $\mu$ l de la Solución Avidina-HRP a temperatura ambiente en agitación durante 30 min. Tras 5 lavados se añadieron 100  $\mu$ l de la Solución Sustrato TMB a cada pocillo y se dejó

incubando en oscuridad 30 min. Finalmente se añadieron 100  $\mu$ l de la Solución Stop y se leyó la placa a 450nm con corrección a 570nm.

#### **5.4. Ensayo de inmunodetección por esferas acoplada a citometría de flujo (CBA)**

El CBA (del inglés, *Cytometric Bead Assay*) es un método multiplex basado en citometría de flujo. Son inmunoensayos que utilizan bolitas conjugadas con anticuerpos específicos que son capaces de detectar más de una proteína en una muestra. En nuestro caso usamos CBA para detectar IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en los extractos de EVs. Se añadió 1  $\mu$ l/muestra de perlas unidas a los anticuerpos de captura (APC) en 50  $\mu$ l/muestra de medio de captura y se incubaron junto con 50  $\mu$ l del estándar de cada metabolito o 50  $\mu$ l de muestra durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 1 $\mu$ l/muestra de anticuerpos de detección (PE) en 50  $\mu$ l de medio de detección y se dejaron 2 h en temperatura ambiente. Se lavaron las mezclas y se centrifugaron 5 min a 1.200 r.p.m 3 veces. Finalmente se analizaron por citometría. Cada metabolito se une a una perla con un tamaño y una intensidad en APC diferente. La abundancia de cada metabolito se mide en función de la intensidad en PE.

### **6. Inmunocitoquímica**

La técnica de inmunofluorescencia se llevó a cabo para determinar la localización intracelular de distintas proteínas en tipos celulares diferentes.

Por un lado, analizamos la localización intracelular de p65 en MSC-T y MSC-T-HIF. Para ello, se sembraron sobre cristales  $4 \times 10^4$  células en p24 (dos pocillos por condición) en medio de MSC y al día siguiente se les añadió a uno de los duplicados medio de activación de MSC (citoquinas pro-inflamatorias). A los otros pocillos se les cambió el medio por medio fresco de MSC. Trascorridas 48 h se procedió a su fijación.

Por otro lado, analizamos la presencia de VE-Cad y PECAM-1 en las HUVEC. Para ello, se sembraron sobre cristales  $8 \times 10^4$  células en p24 (cuatro pocillos por condición) en medio EGM-2 completo y al día siguiente a tres de los pocillos se les añadió TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . De esos tres, uno fue tratado con EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> y otro con EV<sub>MSC-T-HIF</sub><sup>C</sup>. Al otro pocillo se le cambió el medio por medio fresco EGM-2 completo. Trascorridas 24 h se procedió a su fijación.

Por último, analizamos la presencia de  $\alpha$ -SMA en los fibroblastos dérmicos. Para ello, se sembraron sobre cristales  $4 \times 10^4$  células en p24 (cuatro pocillos por condición)

en medio anti-fibrótico (DMEM/F12 sin FBS y antibiótico) y al día siguiente a tres de los pocillos se les añadió medio de pro-fibrótico (DMEM/F12 con FBS y antibiótico + 10  $\mu$ l de TFG- $\beta$ ). De esos tres, uno fue tratado con EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> y otro con EV<sub>MSC-T-HIF</sub><sup>C</sup>. Al otro pocillo se les cambió por medio fresco anti-fibrótico. Trascorridas 24 h se procedió a su fijación.

Las células se lavaron con PBS frío y se fijaron solución fría de PFA al 4% durante 10 min. Seguidamente se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron y bloquearon con Solución de Bloqueo (PBS + 10% FBS + 1% Triton X-100) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizó la tinción incubando las células con los anticuerpos primarios diluidos en Solución de Bloqueo en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente los cristales se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en Solución de Bloqueo 1 h en oscuridad. Los cristales volvieron a lavarse 3 veces con PBS y fueron teñidos con DAPI (2  $\mu$ g/mL) para el marcaje de los núcleos. Finalmente, los cristales se lavaron para retirar el exceso de DAPI (3 veces con PBS) y se montaron sobre portaobjetos con las células hacia abajo usando medio de montaje FluorSave™ (Merck Millipore). La cuantificación de la localización de la fluorescencia se realizó con ImageJ (NIH). Cada punto mostrado en el gráfico corresponde a la media de 50 células.

Anticuerpos primarios:

- Anti-p65 humano de conejo (1/500, Santa Cruz, sc-372)
- Anti-VE-Cad humano de ratón (Santa Cruz, sc-9989)
- Anti-PECAM-1 humano de ratón (Santa Cruz, sc-71872)
- Anti-  $\alpha$ -SMA-Cy3 humano de ratón (Sigma-Aldrich, C6198)

Anticuerpos secundarios:

- Anti-IgG anti-conejo de cabra (1:1000; Alexa Fluor®568, Abcam)
- Anti-IgG anti-ratón de cabra (1:1000; Alexa Fluor®488, Abcam)

## 7. Ensayo de viabilidad celular

### 7.1. Ensayo de viabilidad celular MTT

El ensayo de MTT se utiliza para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, proliferación y citotoxicidad de las células. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán púrpura por parte de las células metabólicamente activas. Las células viables contienen enzimas oxidorreductoras dependientes de NAD(P)H que reducen el MTT a formazán. Las

células se les añade se lavaron con PBS y se les añadió la solución de MTT a 0,5 mg/mL durante 3 horas diluída en medio de cultivo. Los cristales intracelulares de formazán se disolvieron utilizando dimetilsulfóxido DMSO (Sigma-Aldrich). La solución coloreada resultante se cuantificó midiendo la absorbencia a 550 nm en un espectrofotómetro Halo Led 96 (Dynamica Scientific Ltd., Livingston, Reino Unido).

## 7.2. Ensayo de viabilidad celular CCK8

El ensayo CCK8 determina el número de células viables en cultivo. Para ello, se incuban las células en una solución al 10% del reactivo CCK8® (Cell Counting Kit-8) durante 4 horas. Las células vivas son capaces de bio-reducir la sal de tetrazolio soluble en el medio gracias a la presencia de un portador de electrones, esto produce un tinte naranja de formazán cuya absorbencia a 460nm es proporcional al número de células viables.

## 7.3. Ensayo de apoptosis celular Anexina V

El ensayo de Anexina V es un método común para detectar células apoptóticas. La anexina V es una proteína que tiene una alta afinidad por el fosfolípido aniónico fosfatidilserina (PS). En las células sanas normales, la PS se encuentra en la superficie interna de la membrana plasmática. Sin embargo, durante la apoptosis, la membrana plasmática sufre cambios estructurales que incluyen la translocación de la PS desde el lado interno al externo. A su vez, el yoduro de propidio (IP) es una es capaz de penetrar en las células no viables y es utilizado en citometría de flujo como marcador de viabilidad estándar. La combinación de la anexina V y el IP permite la diferenciación de: células vivas (anexina V negativo / IP negativo), células en apoptosis temprana (anexina V positivo / IP negativo) y células necróticas (anexina V positivo / IP positivo).

Las células cultivadas bajo diferentes tratamientos se levantaron del plástico con tripsina/EDTA (Gibco) y se lavaron con PBS mediante una centrifugación. Luego se resuspendieron en Tampón de Unión del kit comercial, al que se añadió 2'5 µl de Anexina-V-FITC y 5 µl de IP durante 15 min a temperatura ambiente, en oscuridad. A continuación, se midió el porcentaje de células vivas, apoptóticas y muertas mediante el citómetro de flujo.

## 8. Ensayo de captación de EVs

Para medir la captación de EVs por parte de diferentes poblaciones de células inmunes, primero se marcaron las EVs con éster succinimidílico de carboxifluorosceína (CFSE; ThermoFisher Scientific) como se ha descrito anteriormente [222]. El stock de CFSE se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante, añadiendo 18 µL de DMSO

al colorante CFSE, lo que dio como resultado un stock de 5 mM. Para teñir las EVs con el CFSE, se añadió 1  $\mu$ L del stock de CFSE a 30  $\mu$ g de EVs diluidas en 1 mL de PBS y se incubó durante 15 min a 37°C en la oscuridad en un tubo de 1 mL. Transcurrido este tiempo, las EVs se transfirieron a un tubo de ultracentrífuga con 20 mL de PBS filtrado. El colorante no incorporado se eliminó mediante un paso de ultracentrifugación. Las EVs se resuspendieron en 30  $\mu$ l de PBS filtrado y se añadieron a 100.000 PBMCs o neutrófilos sembrados en pocillos de placas p24. Se utilizó CFSE mezclado con PBS como control negativo para normalizar la cantidad de colorante no incorporado. Tras 3 horas de incubación, se detectaron las células positivas a CFSE mediante citometría de flujo. Se comparó la captación de EVs por diferentes células inmunitarias y se analizó mediante los marcadores de superficie específicos de estas células.

## 9. Ensayo de proliferación de linfocitos T

Se realizó un ensayo de proliferación de linfocitos T como se describió anteriormente [223]. En primer lugar, las PBMC se marcaron con 5 $\mu$ M de CFSE (ThermoFisher Scientific) durante 15 min a 37°C. Posteriormente se activaron con Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 (ThermoFisher Scientific) en relación 1:1 al número de PBMCs que íbamos a usar.

→ Para evaluar el potencial inmunosupresor de las MSC, el día antes de aislar las PBMCs, se sembraron 2'5x10<sup>4</sup> MSC por pocillo en placa de p24. Al día siguiente, se añadieron sobre las MSC 1x10<sup>5</sup> PBMCs (relación 4:1 respecto las MSC) teñidas y activadas en 0'5 mL de medio RPMI completo.

→ Para evaluar el potencial inmunosupresor de las EV<sub>MSC</sub> se añadieron 15  $\mu$ g de diferentes extractos de EV a 1x10<sup>5</sup> PBMCs teñidas y activadas en 0'5 mL de medio RPMI completo en placas de p24.

→ Para evaluar el potencial inmunosupresor de los macrófagos tratados con EVs, se diferenciación monocitos hacia M1 tratados o no con EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> e EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> y se usaron monocitos diferenciados hacia M2 como control positivo. Tras 5 días de diferenciación como se muestra en el apartado de cultivo celular, se activaron con LPS. Al día siguiente de activarlos, se añaden en co-cultivo con los macrófagos 1x10<sup>5</sup> PBMCs teñidas y activadas en 0'5 mL de medio RPMI completo en placas de p24.

Transcurridos 5 días de cultivo, se recogieron las PBMCs que estaban en suspensión en el medio de cultivo. Los linfocitos T CD3<sup>+</sup> constituyen la porción más significativa de las PBMCs (45-70%). Además, el uso de las perlas de activación de linfocitos T humanos CD3/CD28 Dynabeads® generan la activación y expansión

eficiente de dichos linfocitos. Por lo que, tras 5 días de activación, la mayoría del cultivo de PBMCs estaba enriquecido con linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Aun así, para garantizar que analizamos solo la población de linfocitos T, se procedió a una tinción de citometría de flujo usando el anticuerpo anti-CD3 para seleccionar esta población en concreto. Las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se identificaron mediante la tinción de antígenos de la superficie celular. Los datos de citometría se realizaron utilizando el software FlowJo (FlowJo LLC, BD, Franklin Lakes, Nueva Jersey, USA)

Se determinó la proliferación de los linfocitos T usando como método la dilución de CFSE. Este versátil colorante es permeable a la membrana, por lo que entra en el citoplasma. A continuación, el CFSE se une de forma estable a los abundantes grupos aminos presentes en las moléculas citoplasmáticas, confiriendo a las células una intensidad de fluorescencia estable que se divide por igual entre las células hijas después de cada división, con cada división el etiquetado CFSE se diluye 1/2. A partir de los datos de citometría de flujo, se calculó el índice de expansión (IE) [224]. El índice de expansión tiene en cuenta el número de división ( $N^{\circ}_D$ ) y cuántas células se han dividido en cada ciclo. Como control se usaron PBMCs no activadas, en este caso la intensidad de fluorescencia del CFSE es la máxima por evento (célula). El porcentaje de células en un ciclo determinado ( $N^{\circ}_D$ ) se divide por 2 elevado a la potencia del  $N^{\circ}_D$  para calcular el porcentaje de células originales, no divididas, de las que surgieron. Esto se denomina número de cohorte indivisa. La suma de estos valores da como resultado la cohorte indivisa total de cada cultivo. La suma de las cohortes de las divisiones representa, por tanto, el número de precursores que han sido activados y por tanto han proliferado durante los 5 días de activación.

El porcentaje de inmunosupresión de las MSC y de las  $EV_{MSC}$  se calculó normalizando los datos a una escala de 0-100%, estableciendo un 0% de inmunosupresión para el IE de las PBMCs activadas (Act.) y un 100% de inmunosupresión para las PBMCs no activadas (no Act.) mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inmunosupresión} = \frac{(EI^{Act} - EI^{Muestra})}{(EI^{Act} - EI^{no Act})} \times 100$$

El porcentaje de inmunosupresión de los macrófagos se calculó normalizando los datos a una escala de 0-100%, estableciendo un 0% de inmunosupresión para el IE de las PBMCs tratadas con MΦ1 y un 100% de inmunosupresión para las PBMCs no activadas (No Act.) utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inmunosupresión} = \frac{(EI^{M\Phi 1} - EI^{Muestra})}{(EI^{M\Phi 1} - EI^{no Act})} \times 100$$

## 10. Ensayo de adhesión celular

Para analizar la capacidad de las EVs a la hora de reducir la capacidad del endotelio activado de impulsar la adhesión de las células inmunitarias, las HUVEC se cultivaron a alta confluencia ( $1 \times 10^5$ ) por cuadruplicado en placas de p24. Al día siguiente se estimularon tres de los pocillos con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  (R&D) y 10 ng/mL de IL-1 $\beta$  (PeproTech) durante 24 h. Al mismo tiempo que la estimulación dos de estos pocillos fueron tratados con 15  $\mu$ g/mL de EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> o EV<sub>MSC-T-HIF</sub><sup>C</sup>. Al cuarto pocillo se le cambió el medio por EGM-2 fresco y se usó de control negativo. Pasadas las 24 h, se añadieron  $1 \times 10^5$  PBMCs marcadas con CFSE sobre la monocapa de HUVEC. Después de 2 horas de co-cultivo, se absorbió el medio con cuidado retirando las PBMCs no adheridas. La monocapa de HUVEC fue lavada dos veces con PBS para limpiar aquellas PBMCs que no estuvieran unidas. Finalmente, la proporción de PBMCs adheridas a las HUVEC se midió por el valor de intensidad de fluorescencia a 492<sup>EX</sup> / 517<sup>EM</sup> nm de cada pocillo utilizando un lector de placas de fluorescencia. Se le asignó al pocillo estimulado con las citoquinas y sin tratamiento de EVs el 100% de adhesión de las PBMCs. Las imágenes se adquirieron con un objetivo de 10x en el microscopio Paula Cell Imager (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) combinando el contraste de fase y la fluorescencia del canal verde.

## 11. Ensayo de citotoxicidad de células NKs

Las células NK atacan y eliminan las células aberrantes, como las infectadas por virus y las tumorales. Para analizar la capacidad de las EVs a la hora de reducir la actividad citotóxica de las células NK, se llevó a cabo un ensayo de co-cultivo de estas células y HEK-293T (células de estirpe tumoral). El día antes del aislamiento de las células NK, las células HEK-293T se sembraron en pocillos de p96 a una densidad de  $2 \times 10^3$  por cuatriplicados. Al día siguiente a tres de los pocillos se les añadió células NK a una densidad de  $2 \times 10^4$  en un ratio de 10:1 (NK:HEK-293T) en medio RPMI completo suplementado con 20 ng/mL de IL2 e IL-15. Dos de estos pocillos fueron tratados al mismo tiempo con 15  $\mu$ g/mL de EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> o EV<sub>MSC-T-HIF</sub><sup>C</sup>. Como control negativo se dejó el cuarto pocillo sin añadir células NK. Las células estuvieron una semana en cultivo y se realimentaron cada 2 días con la misma concentración de las citoquinas IL-2 e IL-15. Transcurrido ese tiempo, los pocillos fueron lavados para eliminar tanto las células NK en suspensión como el debrís celular y se procedió a un ensayo de CCK8 para ver la viabilidad de las células HEK-293T.

## 12. Análisis proteómico de las EVs

Para analizar el contenido proteico de las EVs se llevó a cabo un análisis proteómico de las  $EV_{MSC}$ ,  $EV_{MSC-T}^C$  e  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  como se había descrito anteriormente [225]. Las muestras se diluyeron en el tampón de lisis RIPA y se cuantificaron usando Qubit® Protein Assay Kit (Invitrogen). Un total de 30  $\mu$ g de las proteínas por muestra se cargaron en un gel de 12.5% de acrilamida 1D SDS-PAGE. Seguidamente, se cortó la banda con todas las proteínas y fueron digeridas con tripsina. La digestión se detuvo usando una solución del 1% de ácido trifluoroacético 5 $\mu$ L se usaron para una cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

Los datos fueron analizados con el software String. Las proteínas se ordenaron siguiendo una puntuación llamada Unused Protein Score, la cual se trata de una medida de comparación entre las proteínas obtenidas vs las proteínas de la base de datos. Sólo las proteínas con al menos un único péptido y un valor Unused de  $>1'2$  fueron consideradas para los siguientes análisis. Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional para detectar las asociaciones entre los diferentes GOs y los grupos experimentales. Esta caracterización funcional nos permitió determinar el conjunto de procesos biológicos que se encuentran sobrerrepresentados en nuestro subgrupo de proteínas. Los procesos biológicos diferencialmente expresados se recogen en un TreeMap usando la función web REVIGO que permite la comparación de resultados entre grupos y es de especial utilidad para revelar patrones funcionales.

## 13. Modelos animales

### 13.1. Especies murinas

Los ratones Balb/c machos adultos (6 semanas de edad, 22-26 g) se compraron a Charles River Laboratories Inc. (MA, USA) y se alojaron en las instalaciones del IIS La Fe en condiciones estándar. Los procedimientos con animales fueron aprobados por los comités éticos institucionales y locales de cuidado de animales de acuerdo con las directrices de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos.

### 13.2. Modelo de hipersensibilidad de tipo IV

Los ratones fueron afeitados y sensibilizados mediante la aplicación tópica abdominal de 150 $\mu$ L de oxazolona al 3% (Santa Cruz) disuelta en acetona, 5 días antes del

experimento. El día 5 después de la sensibilización, a los ratones se les generó una reacción inmunológica mediante la aplicación tópica de 20µL de 1% de oxazolona disuelta en acetona en las superficies interna y externa de la oreja izquierda. Una vez pasadas 6 horas desde la aplicación de la oxazolona, se administraron 15µg de EVs por inyección subcutánea en la parte posterior de la oreja utilizando 50µL de PBS esterilizado y filtrado como vehículo. Al grupo de control se le administró sólo con PBS. El grosor de la oreja se midió antes de la generación de la reacción inmunológica y a las 6, 24, 48 y 72 horas después con un micrómetro digital. El grado de inflamación se calculó como la diferencia de grosor entre la oreja izquierda (oreja inflamada) y la derecha (oreja control). A continuación, se sacrificaron los ratones y las muestras de las orejas se recogieron y fijaron en EtOH 70% durante una semana a 4°C. Finalmente se embebieron en parafina para su posterior corte y análisis histológico.

### **13.3. Modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6- trinitrobenceno-sulfónico**

La colitis por TNBS se indujo mediante una administración intrarrectal de 100 µl de TNBS (3,5 mg por 20 g de ratón; Sigma-Aldrich) disuelto en etanol al 40%, como se ha descrito previamente [226]. Los ratones tratados con EVs recibieron 100 µl de NaCl al 0,9% disuelto en etanol al 40%. Algunos ratones fueron tratados 6 horas después de la inducción de TNBS por vía intraperitoneal con 50 µg de EVs en 100 µl de PBS. Al grupo de control se le administró sólo con PBS. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical el día 4 después de la administración de TNBS. Se sacó el colón y se midió la longitud con una regla. Tras la medición, el tejido del colon se diseccionó en dos partes, una se congeló en nitrógeno líquido para la extracción de ARN y la otra se fijó en PFA al 4% durante toda la noche. Finalmente se embebieron en parafina para su posterior corte y análisis histológico.

## **14. Técnicas histológicas**

### **14.1. Inclusión del tejido en parafina**

Una vez se ha fijado el tejido se procede a su inclusión en parafina para poder cortarlo. Para ello las muestras de tejido se someten al siguiente protocolo:

- Etanol al 70% durante la noche en agitación (225 rpm) y a 4°C
- EtOH al 70% durante 1h en agitación
- EtOH al 96% durante 1 h (2 veces) en agitación
- EtOH al 100% durante 1 h (2 veces) en agitación
- Xilol durante 30 min (2 veces) en agitación
- El tejido se cambia a parafina “sucia” durante 1 h (estufa a 60°C)

- El tejido se cambia a parafina “limpia” y se deja toda la noche en la estufa a 60°C
- Al día siguiente se incluyen los tejidos en los “cassetes” para generar los bloques.

## 14.2. Desparafinación del tejido

Una vez tenemos los bloques, se cortan en un microtomo a 5 µm de grosor y se depositan sobre portaobjetos recubiertos de gelatina-alumbre para poder proceder a la visualización por microscopio óptico. Para realizar cualquier tinción acuosa o inmunofluorescencia los cortes han de desparafinarse. Para ello se sigue el siguiente protocolo:

- Se mantienen los cortes sobre los portaobjetos en estufa a 60°C durante 25 minutos
- Xilol durante 10 min (2 veces)
- EtOH 100% durante 10 min (2 veces)
- EtOH 96% durante 10 minutos
- EtOH 70% durante 10 minutos.
- Mantener en agua destilada hasta empezar la tinción

## 14.3. Tinción de Hematoxilina y Eosina

Una vez se desparafinó el tejido, se procedió al siguiente protocolo para llevar a cabo la tinción:

- Hematoxilina de Mayer durante 2 min. La hematoxilina no es un colorante en sentido estricto, sino que es la hemateína, su producto oxidado, la que teñirá sustancias como la cromatina del núcleo y las grandes agregaciones ribosomales del citoplasma, como las que se dan en el retículo endoplasmático rugoso.
- Lavar en agua corriente.
- Transferir a alcohol clorhídrico (1:2000 de ácido clorhídrico EtOH 70%).
- Lavar en agua corriente.
- Transferir a agua amoniacal (0'1 % de amoniaco en agua).
- Eosina al 0.2 % en H<sub>2</sub>O durante 30". La eosina, colorante ácido, se une a elementos del citoplasma y de la matriz extracelular.
- gotas de acético.
- EtOH 96% durante 30"
- EtOH 100% durante 30"
- Xilol durante 1 min (2 veces)
- Se mantiene en xilol hasta el montaje
- Tras el montaje, los portaobjetos se visualizaron con un microscopio digital Leica DMD108 (Leica Microsystems).

#### 14.4. Tinción de Rojo Sirio

Una vez se desparafinó el tejido, se procedió al siguiente protocolo para llevar a cabo la tinción:

- Preparación del Rojo Sirio. Por una parte, se mezclaron 4 g de Ácido Pícrico (Sigma-Aldrich) saturado con 90 mL de agua destilada y se agitó durante 30 min. Por otra, se pesaron 0,1 g de Direct Red 80 (Sigma-Aldrich) y se disolvieron en 10 mL de agua destilada. Mezclamos ambas disoluciones y esperamos 48 horas. Finalmente, lo filtramos en el momento de usar.
- Incubar las muestras con Rojo Sirio a temperatura ambiente durante 30 min
  - o Mezclar 4 g de Pícrico saturado en 90 mL de agua destilada y agitar durante 30 minutos
  - o Pesar 0,1g de Direct Red y disolver en 10 mL de agua
  - o Mezclar ambas disoluciones y esperar 48 horas
  - o Filtrar en el momento de usar
- Transferir a agua acética (0'5 % de ácido acético en agua) durante 5 min (2 veces)
- EtOH 100% durante 5 min (2 veces)
- Xilol durante 5 min (2 veces)
- Se mantiene en xilol hasta el montaje
- Tras el montaje, los portaobjetos se visualizaron con un microscopio digital Leica DMD108 (Leica Microsystems).

#### 14.5. Tinción de Inmunofluorescencia

Para el análisis de inmunofluorescencia, los portaobjetos se bloquearon con suero de cabra neonatal al 5% y las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 1 hora. Los portaobjetos se incubaron durante la noche en una cámara humidificada a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios:

anti-CD45 de rata (dilución 1/200; BD Biosciences)

anti-CD68 de conejo (dilución 1/200; Santa Cruz)

anti-F4/F80 de rata (dilución 1/200; Abcam)

anti-CD274 de conejo (dilución 1/200; AB Clonal A11273)

anti-CD206 de conejo (dilución 1/200; Abcam)

Al día siguiente los portaobjetos se lavaron tres veces durante 5 minutos en PBS. Luego, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG rata Alexa 555 o anti-IgG conejo Alexa 488 durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron tres veces durante 5 min en PBS. Para detectar el núcleo celular, estos se tiñeron con DAPI (0'5 µg/mL) y los portaobjetos se montaron con el reactivo FluorSave™ (Merck Mil-

lipore). Las secciones se observaron y visualizaron bajo el microscopio fluorescente Leica DM2500 (Leica Microsystems). El procesamiento final de las imágenes y la cuantificación se realizaron con el software ImageJ mediante el recuento de puntos verdes y rojos en el área fijada.

## 15. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media  $\pm$  SD o SEM, según se especifica en cada experimento. Se utilizó la prueba t de Student para las muestras pareadas en las comparaciones entre grupos. Cuando la distribución no era normal, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar las medias de más de tres grupos. Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para comparar las medias de más de dos grupos. El ANOVA de dos vías se utilizó para evaluar simultáneamente el efecto de dos factores sobre una variable de respuesta. Los análisis se realizaron con el software GraphPad Prism 8 (San diego, CA, US). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a  $p < 0.05$  con un intervalo de confianza del 95%.



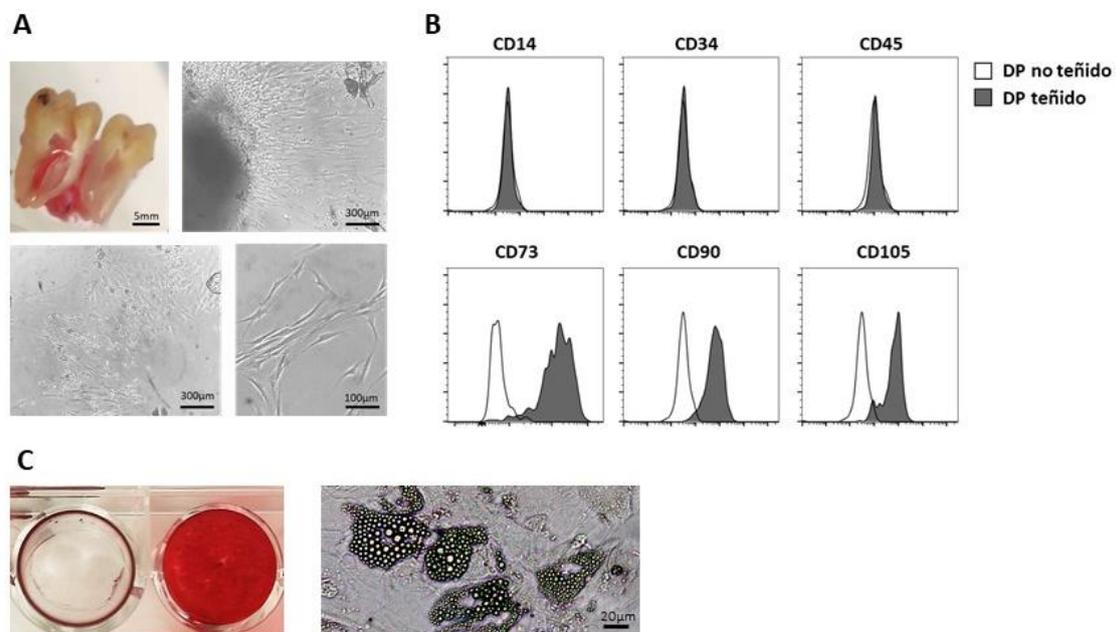
# RESULTADOS



# 1. Aislamiento de células mesenquimales estromales de pulpa dental

## 1.1. Caracterización fenotípica y potencial de diferenciación

La pulpa dental es una fuente de fácil acceso de MSC (DP-MSC) ya que constituye deshecho quirúrgico [227]. La rápida capacidad proliferativa junto con las características inmunorreguladoras de las DP-MSC han fomentado el uso de estas células en terapia celular. Las DP-MSC se obtuvieron a partir de extracciones de cordales de pacientes jóvenes (de entre 16 y 18 años) y sanos extraídos por prescripción médica. Tras el procedimiento de extracción de la pulpa dentaria, los explantes se mantuvieron en condiciones de cultivo, cambiando el medio cada dos días, el tiempo necesario para permitir que las células se deslizaran por debajo de ellos. Al microscopio las células muestran la morfología tipo fibroblástica que presentan las MSC adheridas al plástico de cultivo (Fig. 1A). Al cabo de 15-20 días las células alcanzaron la confluencia y se procedió a su caracterización y expansión. Se observó que las células eran negativas para los marcadores de superficie CD45, CD34 y CD14; mientras que eran positivas para los marcadores CD73, CD105 y CD90 (Fig. 1B). También se comprobó que las células poseían la capacidad de diferenciación hacia tejido óseo y tejido adiposo (Fig. 1C).

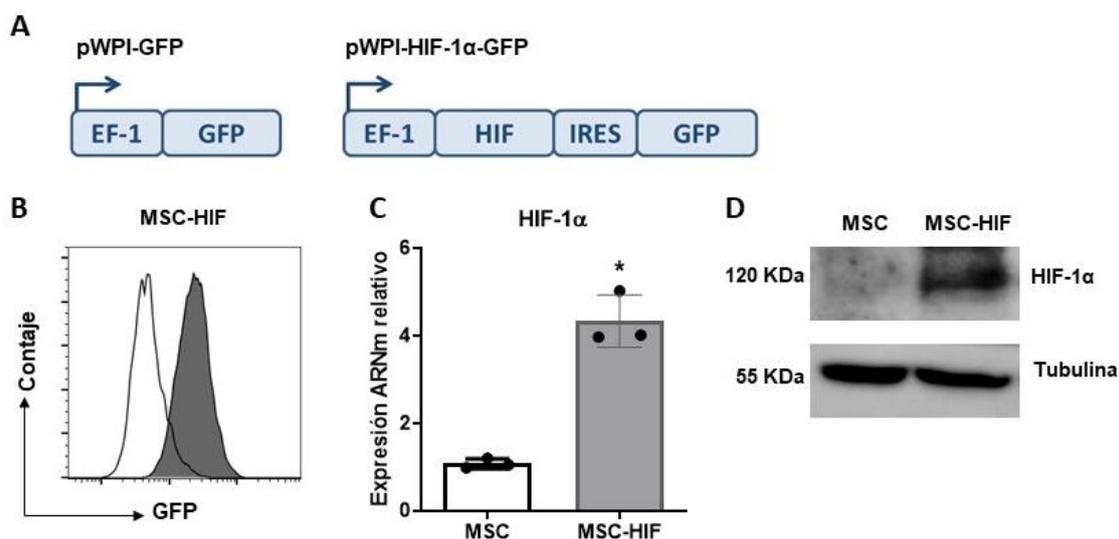


**Figura 1. Aislamiento y caracterización de MSC de pulpa dentaria.** A) Fotos del proceso de extracción de las células mesenquimales. Izq. arriba: Tercer molar partido por la mitad, en su interior se localiza la pulpa dentaria. Der. arriba: Explante a partir del cual comienzan a migrar células mesenquimales. Izq. abajo: Células mesenquimales que quedan adheridas al plástico de cultivo una vez el explante ha sido retirado. Der. abajo: Células mesenquimales estromales en fase 1, tras haberlas levantado del cultivo primario y resembrado a  $2 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. B) Panel de citometría de flujo de los marcadores que caracterizan a las células mesenquimales estromales tanto por presencia (CD73, CD90, CD105) como por ausencia (CD14, CD34, CD45). C) Fotos del proceso de diferenciación osteogénica y adipogénica.

## 2. Modificaciones genéticas y primado de las MSC

### 2.1. La sobreexpresión del factor HIF-1 $\alpha$ aumenta el potencial inmunosupresor de las MSC silvestres

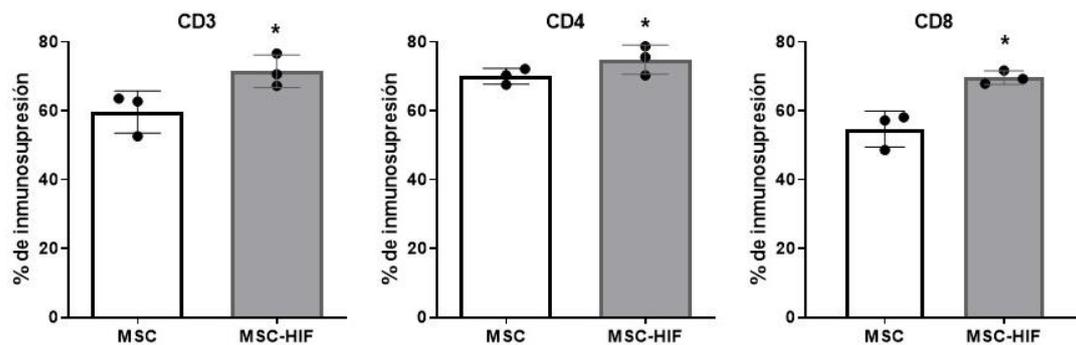
Como se ha comentado en la introducción, la hipoxia juega un papel fundamental a la hora de potenciar el efecto inmunoregulatorio y regenerativo de las MSC. Tras el aislamiento y caracterización de las células de pulpa dentaria, el siguiente paso fue modificarlas genéticamente para que sobreexpresaran el factor HIF-1 $\alpha$ . Para ello, las MSC fueron transducidas con el vector lentiviral pWPI-HIF-GFP (MSC-HIF). Como control de la infección, las MSC fueron infectadas con el vector lentiviral pWPI-GFP y serán nombradas a partir de ahora como MSC (Fig. 2A). El porcentaje de transducción se comprobó mediante citometría de flujo: alrededor del 95% de las células cultivadas fueron positivas para GFP (Fig. 2B). Los niveles de ARNm de HIF-1 $\alpha$  se incrementan  $4,34 \pm 0,59$  veces (Fig. 2C) con respecto a las MSC silvestres. Además, los cultivos de MSC-HIF expresan la proteína HIF-1 $\alpha$  en normoxia (Fig. 2D).



**Figura 2. Transducción de las MSC con el factor HIF-1 $\alpha$ .** A) Representación esquemática de los vectores lentivirales pWPI-GFP y pWPI-HIF-1 $\alpha$ -GFP. B) Histograma del análisis por citometría de flujo de las células GFP<sup>+</sup>. C) Niveles de expresión del ARNm de HIF-1 $\alpha$  relativo a las MSC silvestres. Se representa la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. D) Inmunodetección representativa de los niveles de proteína HIF-1 $\alpha$  en MSC y MSC-HIF. \**p* < 0.05

Una vez comprobado que la transducción había sido efectiva, quisimos analizar cómo afectaba la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  al potencial inmunoregulatorio de las MSC. Para ello hicimos un ensayo de proliferación de células T en co-cultivo con MSC y MSC-HIF en una proporción 4:1 (CD3<sup>+</sup>:MSC). Se observó que las células que sobreexpresaban HIF-1 $\alpha$  tenían un potencial inmunosupresor mayor que las MSC silvestres, frenando la proliferación de células T activadas ( $71,5 \pm 4,7\%$  vs  $59,6 \pm 6,1\%$ ),

tanto cooperadoras (CD4<sup>+</sup>) (74,9±4,2% v 70±2,2%) como citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) (69,6±1,9% vs 54,6±5.2%) (Figura 3).



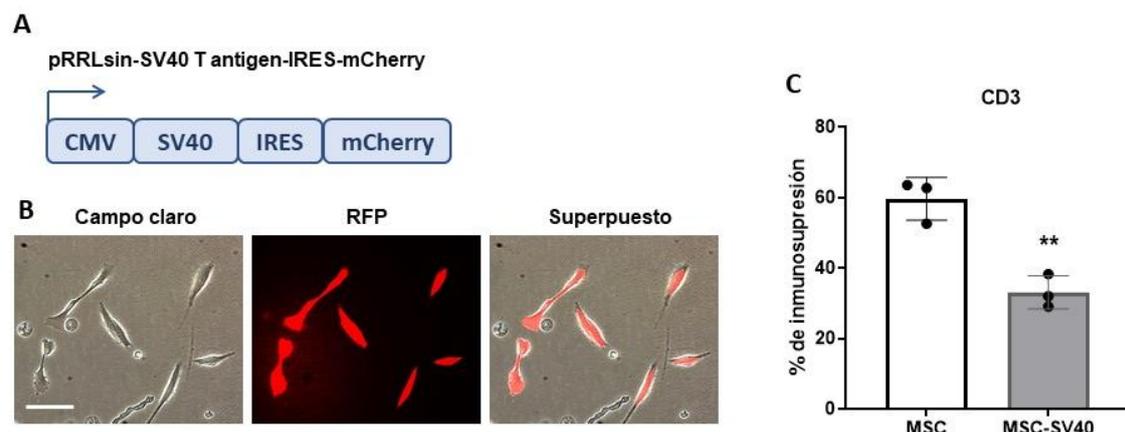
**Figura 3.** La sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  aumenta la capacidad de la MSC para inhibir la activación de las células T. Las células de sangre periférica enriquecidas con células T se tiñeron con CFSE y se activaron con anticuerpos monoclonales anti-CD3/anti-CD28 en presencia o ausencia de MSC (blanco) o de MSC-HIF (gris). Tras 5 días, se determinó la proliferación de los subconjuntos de células T mediante citometría de flujo. Se representa la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Las células T se clasificaron según las características de dispersión frontal/lateral y la expresión de CD3, CD4 y CD8. La significancia estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. \**p* < 0.05

## 2.2. Inmortalización de las MSC

Para conseguir un cultivo de células no senescentes y evitar así la variabilidad entre biopsias, las MSC se inmortalizaron usando dos estrategias diferentes, mediante la sobreexpresión del antígeno T del virus SV40 (SV40 LT) o la sobreexpresión del gen de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (hTERT).

### 2.2.1. La inmortalización de las MSC con SV40 disminuye su potencial inmunosupresor

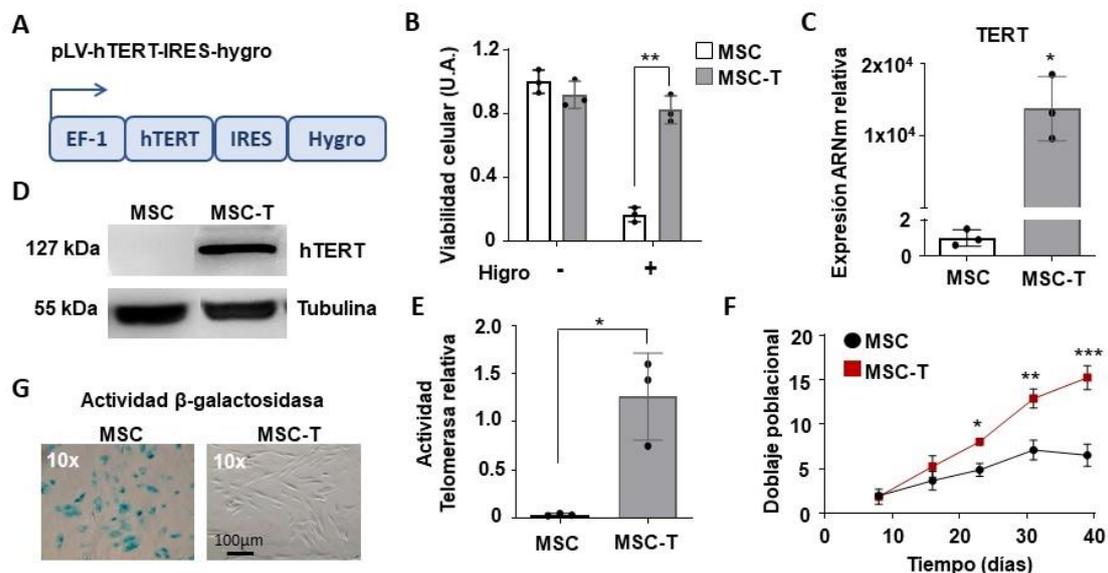
Las MSC fueron transducidas con el vector lentiviral pRRLsin-SV40 T antigen-IRES-mCherry (Fig. 4A). Se comprobó por microscopía de fluorescencia que la tasa de infección era de alrededor del 95% (Fig. 4B). A pesar de que la sobreexpresión de SV40 LT aumentó la proliferación y la vida en cultivo de las MSC, las propiedades inmunosupresoras de las MSC se vieron alteradas (Fig. 4C), por lo que decidimos descartar esta estrategia de inmortalización.



**Figura 4. La sobreexpresión de SV40 LT reduce la capacidad de la MSC para inhibir la activación de las células T.** A) Representación esquemática del vector lentiviral pRRLsin-SV40 T antigen-IRES-mCherry. B) Imágenes de microscopía de fluorescencia. Barra de escala: 50µm. C) Porcentaje de inmunosupresión de MSC (blanco) y MSC-SV40 (gris) sobre un cultivo de células de sangre periférica enriquecidas con células T y activadas con anticuerpos monoclonales anti-CD3/anti-CD28. Se representa la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. \*\**p* < 0.01

## 2.2.2. La inmortalización con hTERT retrasa la entrada en senescencia de las MSC y aumenta su tiempo de vida in vitro

Se probó a continuación a inmortalizar cultivos primarios de MSC mediante la sobreexpresión de la enzima telomerasa humana (nombradas a partir de ahora MSC-T) utilizando el vector lentiviral pLV-hTERT-IRES-hygro (Fig. 5A). La integración del transgén proporcionó resistencia a la higromicina de todo el cultivo (Fig. 5B), garantizando un 95-99% de transducción. El aumento de la expresión del enzima se comprobó tanto a nivel de expresión de ARNm como de proteína (Fig. 5C-D). Además, se llevó a cabo un ensayo de actividad de la telomerasa para corroborar que el enzima no sólo se expresaba, sino que también era funcional (Fig. 5E). En consecuencia, los cultivos de MSC-T superaron el estancamiento proliferativo y fueron capaces de mantener la división celular mucho tiempo después de que las MSC silvestres alcanzaran la senescencia replicativa (Fig. 5F-G).

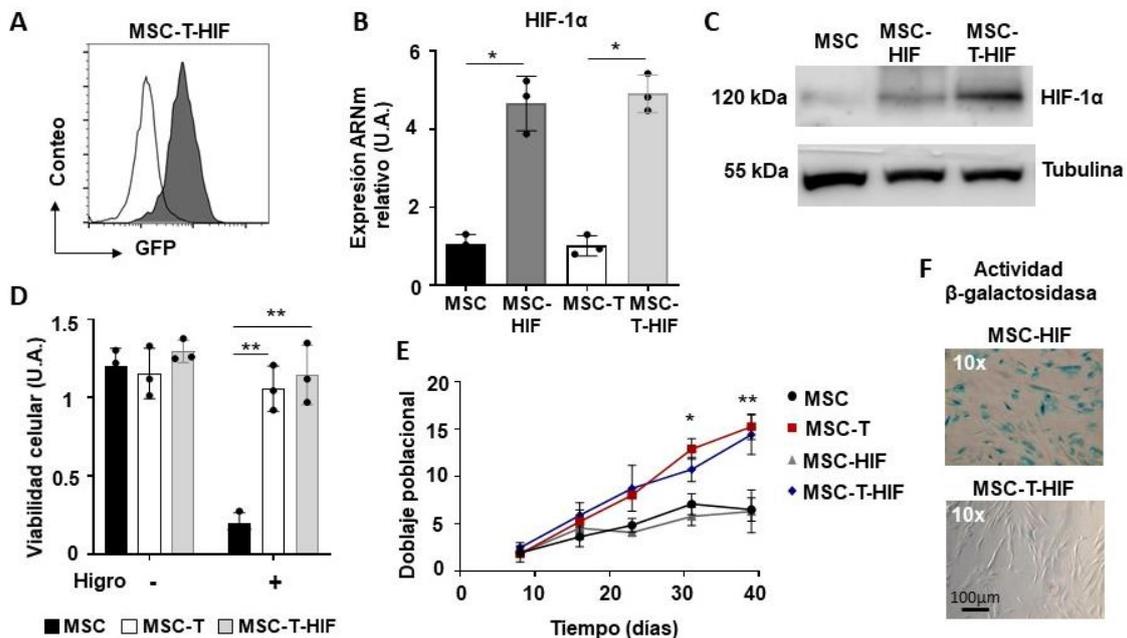


**Figura 5. La sobreexpresión de hTERT aumenta el tiempo en cultivo de las MSC.** A) Representación esquemática del vector lentiviral pLV-hTERT-IRES-hygro. B) Cuantificación de MSC (blanco) y MSC-T (gris) vivas detectadas mediante el ensayo MTT tras ser tratadas o no con higromicina durante 48 h. Los valores se representan con relación a la condición de MSC no tratadas. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de 3 experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. C) Niveles de expresión del gen hTERT cuantificados por RT-qPCR en MSC (blanco) y MSC-T (gris). Los niveles de expresión del gen diana en cada muestra se normalizaron respecto a la expresión de GAPDH. Los valores se representan con relación a los niveles de las MSC. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de 3 experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. D) Inmunodetección representativa de la proteína hTERT; se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. E) Actividad telomerasa relativa medida mediante el protocolo de amplificación cuantitativa de repeticiones teloméricas en tiempo real (RQ-TRAP) en  $1 \times 10^6$  de MSC (blanco) y MSC-T (gris). Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de 3 experimentos independientes. La significancia estadística se

calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. F) Ensayo de proliferación. Curva de crecimiento de MSC (negro) y MSC-T (rojo); representada por la duplicación poblacional en diferentes puntos de tiempo. Cada punto representa la media  $\pm$  S.D. de 3 experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. G) Imágenes representativas de la detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia en MSC (izquierda) y MSC-T (derecha) en pase 14. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

### 2.3. La inmortalización con hTERT no afecta a las características que definen a las MSC ni a su potencial inmunosupresor

Tras comprobar que gracias a la transducción con hTERT habíamos generado una línea inmortalizada de MSC estable en el tiempo, que no envejecía con los pases en cultivo, quisimos ver que esta modificación junto con la sobreexpresión del factor HIF-1 $\alpha$  no afectaba a las características que definen a las MSC ni tampoco a su potencial inmunosupresor. Transducimos con el vector hTERT las MSC-HIF generadas previamente (nombradas como MSC-T-HIF) y comprobamos que la transducción de ninguno de los dos vectores contrarrestaba los efectos del otro. Las células seguían siendo positivas para GFP (Fig. 6A) y mantenían la sobreexpresión tanto a nivel de ARNm como de proteína del factor HIF-1 $\alpha$  (Fig. 6B-C). Por otra parte, conservaban la resistencia a la higromicina (Fig. 6D) y mostraban características similares a las MSC-T en cuanto a crecimiento celular y senescencia replicativa (Fig. 6E-F).

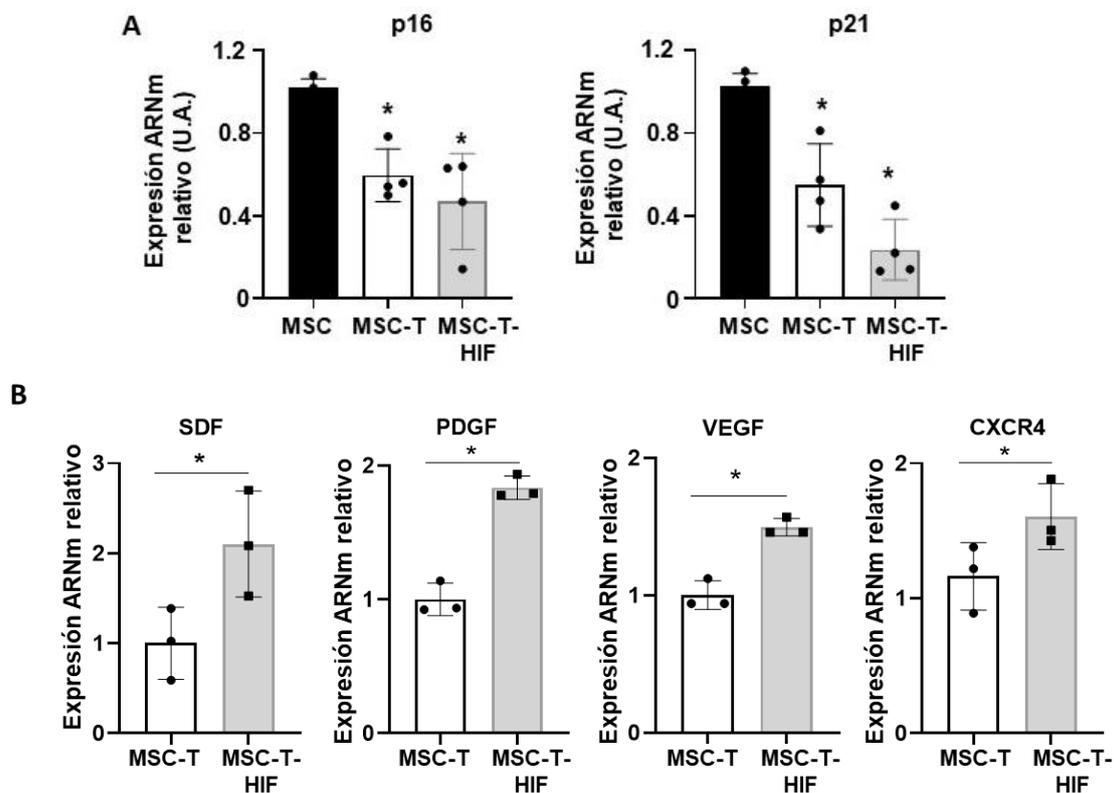


**Figura 6. La doble transducción mantiene las características de ambos vectores.** A) Histograma del análisis por citometría de flujo de las células GFP<sup>+</sup>. B) Niveles de expresión del ARNm de HIF-1 $\alpha$  relativo a las MSC silvestres. Se representa la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante un análisis de varianza (ANOVA). C) Inmunodetección representativa de los niveles de proteína HIF-1 $\alpha$  en MSC, MSC-HIF y MSC-T-HIF. D) Cuantificación de MSC (blanco), MSC-T (gris claro) y MSC-T-HIF (gris oscuro) vivas detectadas por el ensayo MTT tras ser tratadas o no con higromicina durante 48 h. Los valores se representan con relación a la condición de MSC silvestres. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de 3 experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante un ANOVA. E) Ensayo de proliferación. Curva de crecimiento de MSC (negro), MSC-T (rojo), MSC-HIF (gris) y MSC-T-HIF (azul); representada por la duplicación poblacional en diferentes puntos de tiempo. Cada punto representa la media  $\pm$  S.D. de 3 experimentos independientes. La significancia

estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. G) Imágenes representativas de la detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia en MSC-HIF (arriba) y MSC-T-HIF (abajo) en fase 14. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.

Además de demostrar el aumento de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, se quiso comprobar otra característica fenotípica propia de las células senescentes, la expresión de inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CDKi, en inglés) como son p16 y p21. Estas moléculas son capaces de activar procesos de senescencia [228]. Tanto p16 como p21 se veían aumentados en el caso de MSC senescentes (en fase 10) en comparación con las MSC-T y las MSC-T-HIF, cuyos niveles se veían disminuidos a más de la mitad (Fig. 7A).

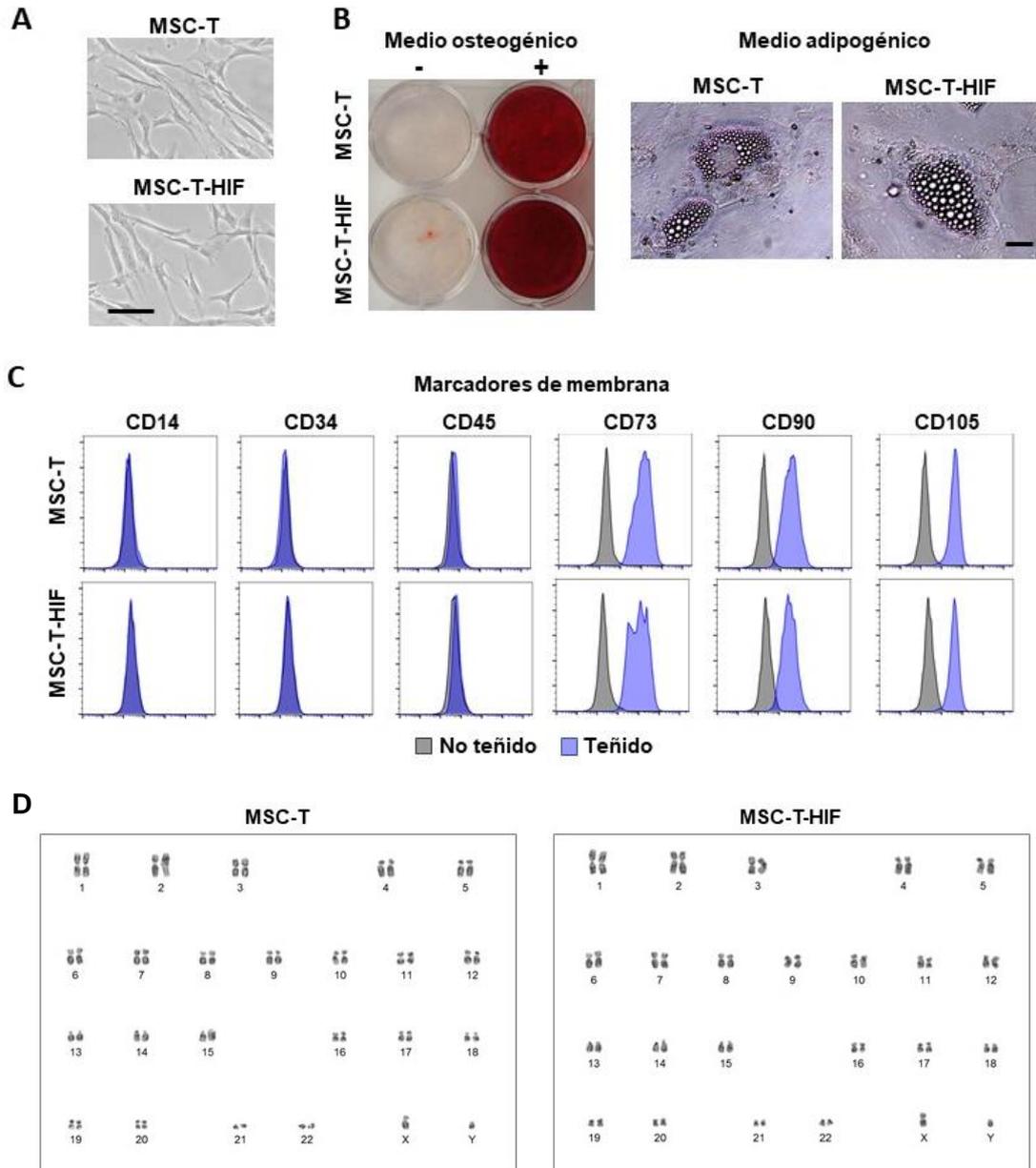
También, se corroboró que el factor HIF- $\alpha$  sobreexpresado fuera funcional, pues en estas células se veía aumentada la expresión de genes de respuesta a hipoxia como son SDF, PDGF, VEGF y CXCR4 en situación de normoxia (Fig. 7B).



**Figura 7. La doble transducción mantiene las características fenotípicas de ambos vectores.** A) Niveles de expresión del ARNm de p16 y p21 relativo a las MSC silvestres en fase 10 en las MSC-T y en las MSC-T-HIF. Se representa la media  $\pm$  S.D. de cuatro experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante un ANOVA. B) Niveles de expresión del ARNm de SDF, PDGF, VEGF y CXCR4 relativo a las MSC-T en las MSC-T-HIF. Se representa la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. \**p* < 0,05.

Tras las modificaciones genéticas confirmamos que tanto las MSC-T como las MSC-T-HIF, mantenían las características que definen a las células mesenquimales estromales. Ambas líneas celulares mostraron: adherencia al plástico en condiciones normales de cultivo con morfología fibroblástica (Fig. 8A); capacidad de diferenciación

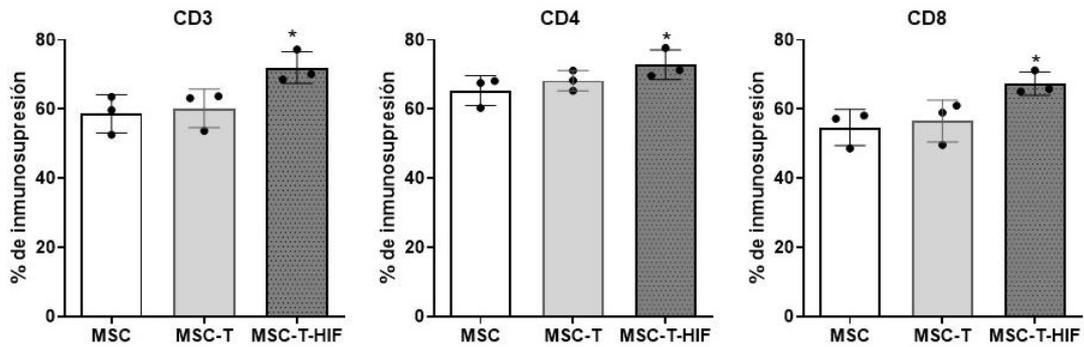
a osteoblastos y adipocitos bajo condiciones estándares de diferenciación *in vitro* (Fig. 8B) y expresión de los antígenos específicos de superficie CD105, CD73 y CD90, y ausencia de CD45, CD34 ni CD14 (Fig. 8C). Además, el análisis del cariotipo por bandas G de MSC-T y MSC-T-HIF cultivadas a pase elevado no reveló ninguna alteración cromosómica macroscópica en comparación con cariotipos normales de células humanas (Fig. 8D).



**Figura 8. Caracterización de las MSC-T y MSC-T-HIF.** A) Fotografías al microscopio de MSC-T y MSC-T-HIF en cultivo. Barra de escala: 100µm B) Fotos del proceso de diferenciación osteogénica y adipogénica. Barra de escala: 20µm C) Panel de citometría de flujo de los marcadores que caracterizan a las células mesenquimales estromales tanto por presencia (CD73, CD90, CD105) como por ausencia (CD14, CD34, CD45). D) Cariotipo de las células usando tinción de Giemsa a pase 45.

La inmortalización tampoco afectó a la capacidad inmunosupresora de las MSC. La sobreexpresión del factor HIF-1 $\alpha$  también aumentó la capacidad inmunosupresora

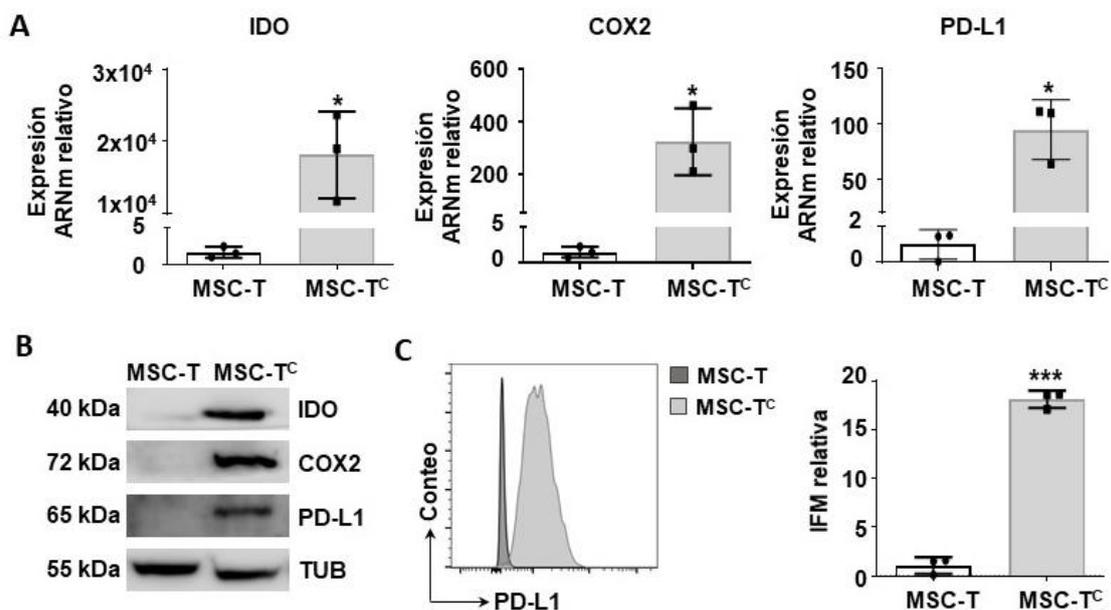
sobre linfocitos T de las MSC immortalizadas, ( $72 \pm 4,3\%$  vs  $60,2 \pm 5,4\%$ ), tanto las células  $CD4^+$  ( $72,9\% \pm 4,2$  vs  $68,2 \pm 2,9\%$ ), como las  $CD8^+$  ( $67,4 \pm 3,3\%$  vs  $56,5 \pm 5,1\%$ ) (Fig. 9).



**Figura 9. La immortalización con hTERT no afecta a la capacidad inmunosupresora de las MSC.** Las células de sangre periférica enriquecidas con células T se tiñeron con CFSE y se activaron con anticuerpos monoclonales anti-CD3/anti-CD28 en presencia o ausencia de MSC (blanco), MSC-T (gris claro) o de MSC-T-HIF (gris oscuro). Tras 5 días, se determinó la proliferación de los subconjuntos de células T mediante citometría de flujo. Se representa la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante un ANOVA. \* $p < 0.05$ .

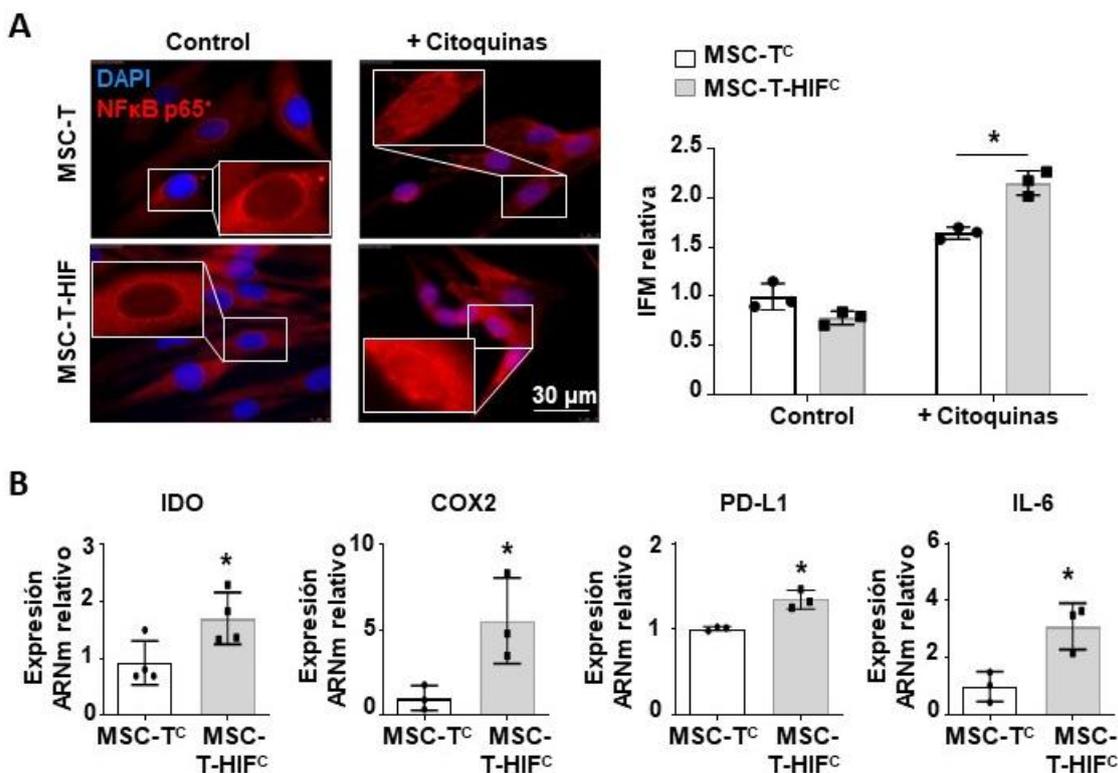
## 2.4. La activación de la vía $NF-\kappa\beta$ mediada por $TNF-\alpha$ , $IL-1\beta$ y $IFN-\gamma$ y aumenta la actividad inmunoreguladora de las MSC

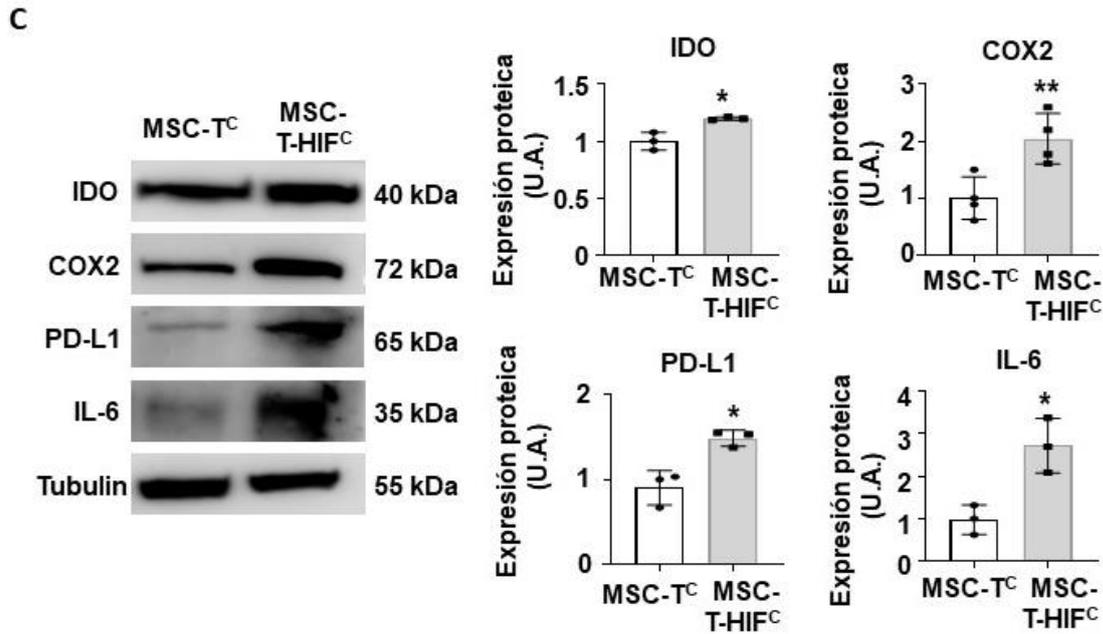
Las MSC en condiciones basales tienen una capacidad inmunosupresora limitada y requieren de la estimulación con moléculas proinflamatorias. Basándonos en trabajos anteriores, se desarrolló un medio de acondicionamiento compuesto por  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$  e  $IL-1-\beta$  que imita un entorno proinflamatorio. Como se muestra en la Figura 10, las MSC-T activadas con citoquinas (nombradas como MSC-T<sup>C</sup>) sobreexpresaron varios genes relacionados con la inmunosupresión, como IDO, COX2 y PD-L1 (Fig. 10A), que se corroboró mediante un ensayo de inmunodetección (Fig. 10B) y citometría de flujo (Fig. 10C).



**Figura 10. El medio de condicionamiento potencia la capacidad inmunomoduladora de las MSC.** Cuantificación de moléculas inmunosupresoras liberadas por las MSC-T acondicionadas (MSC-T<sup>C</sup>) o no con citoquinas proinflamatorias durante 48 h. A) Niveles de expresión de los genes indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO), ciclooxigenasa 2 (COX2) y PD-L1 medidos por RT-qPCR. La expresión del gen diana se normalizó con respecto a la expresión de GAPDH y es relativa a los niveles de MSC-T, fijados arbitrariamente en 1. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de 3 experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. B) Inmunodetección representativos de la expresión de las proteínas IDO, COX2 y PD-L1; la  $\alpha$ -tubulina se utilizó como control de carga. C) Expresión de la proteína PD-L1 medida por citometría de flujo utilizando la intensidad de fluorescencia media (IFM) en MSC (blanco) y MSC-T (gris). Los valores se representan en relación con la media geométrica de MSC-T. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. \**p* < 0,05, \*\*\**p* < 0,001.

La vía NF- $\kappa$ B es un regulador clave de la capacidad inmunosupresora de las MSC. Está comprobado que la activación de NF- $\kappa$ B en las MSC es esencial para estimular su capacidad inmunomoduladora [223]. Como anteriormente demostramos que las MSC que sobreexpresan HIF-1 $\alpha$  tienen una mayor capacidad inmunosupresora, quisimos analizar el comportamiento de esta ruta en las MSC-T-HIF. Para ello, medimos la actividad de la vía NF- $\kappa$ B tanto de las MSC-T como de las MSC-T-HIF tras el acondicionamiento con el cóctel de citoquinas, midiendo la translocación nuclear de p65 y los niveles de expresión de IL-6 y otras moléculas inmunosupresoras. Observamos que la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  desencadenó una mayor translocación nuclear de p65 tras exponer las MSC al cóctel de acondicionamiento (Fig. 11A). Además, las MSC-T-HIF condicionadas (nombradas como MSC-T-HIF<sup>C</sup>) expresaron mayores niveles de IL-6 y otras moléculas inmunosupresoras, como IDO, COX2 y PD-L1 (Fig. 11B-C).





**Figura 11.** La sobreexpresión de HIF refuerza la señalización a través de la vía NF- $\kappa$ B y, en consecuencia, la expresión de moléculas inmunosupresoras. A) Inmunolocalización de p65 en MSC-T, MSC-T-HIF, MSC-T<sup>c</sup> y MSC-T-HIF<sup>c</sup> (superíndice C: acondicionamiento con citoquinas). Rojo: p65, azul: DAPI. Barra de escala: 30  $\mu$ m. La media de la intensidad de la fluorescencia se midió por núcleo y los valores se normalizaron con respecto a los de las células MSC-T (cada punto representa la media de 50 núcleos). Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba de comparaciones múltiples de Sidak para la estadística. B) Niveles de expresión de IL-6, IDO, COX2 y PD-L1 cuantificados por RT-qPCR en MSC-T<sup>c</sup> y MSC-T-HIF<sup>c</sup>. El nivel de expresión del gen diana en cada muestra se normalizó con respecto a la expresión de GAPDH. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. C) Inmunodetección representativas de las proteínas IL-6, IDO, COX2 y PD-L1. Los niveles de expresión se cuantificaron por densitometría en relación con MSC-T<sup>c</sup>. La  $\alpha$ -tubulina se utilizó como control de carga. Las barras representan la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

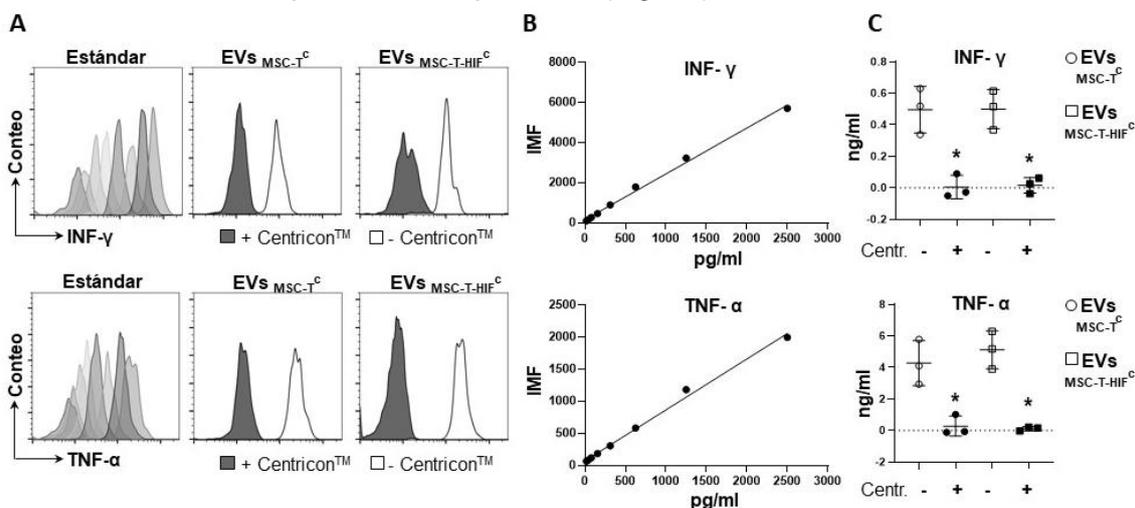
### 3. Aislamiento y caracterización de las EVs

En los últimos años el interés en el uso de EVs derivadas de MSC como agente terapéutico está aumentando respecto al trasplante de estas células, ya que cuenta con ventajas en la manufacturación y en su utilización como futuro fármaco. El hecho de contar con una línea inmortalizada es clave para poder garantizar una buena estandarización a la hora de generar el producto farmacológico. A pesar de ello, siguen existiendo varios retos para que las EVs derivadas de las MSC sean clínicamente útiles. Muchos trabajos en el campo están tratando de aumentar el rendimiento en el aislamiento de EVs mediante la ingeniería genética de las MSC y la modificación del entorno extracelular. Nuestra estrategia ha consistido en generar una línea de MSC inmortalizada y que se encuentre en un estado similar al cual se enfrentaría en una situación inflamatoria (hipoxia y ambiente proinflamatorio) para potenciar su estado activado y regenerador.

### 3.1. Caracterización fenotípica y ultraestructural

Las EVs fueron aisladas por centrifugación y filtración secuencial a partir de medio de cultivo derivado de MSC-T y MSC-T-HIF activadas con un cóctel de citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) durante 48h. También se aislaron EVs de MSC-T sin acondicionar con citoquinas como control.

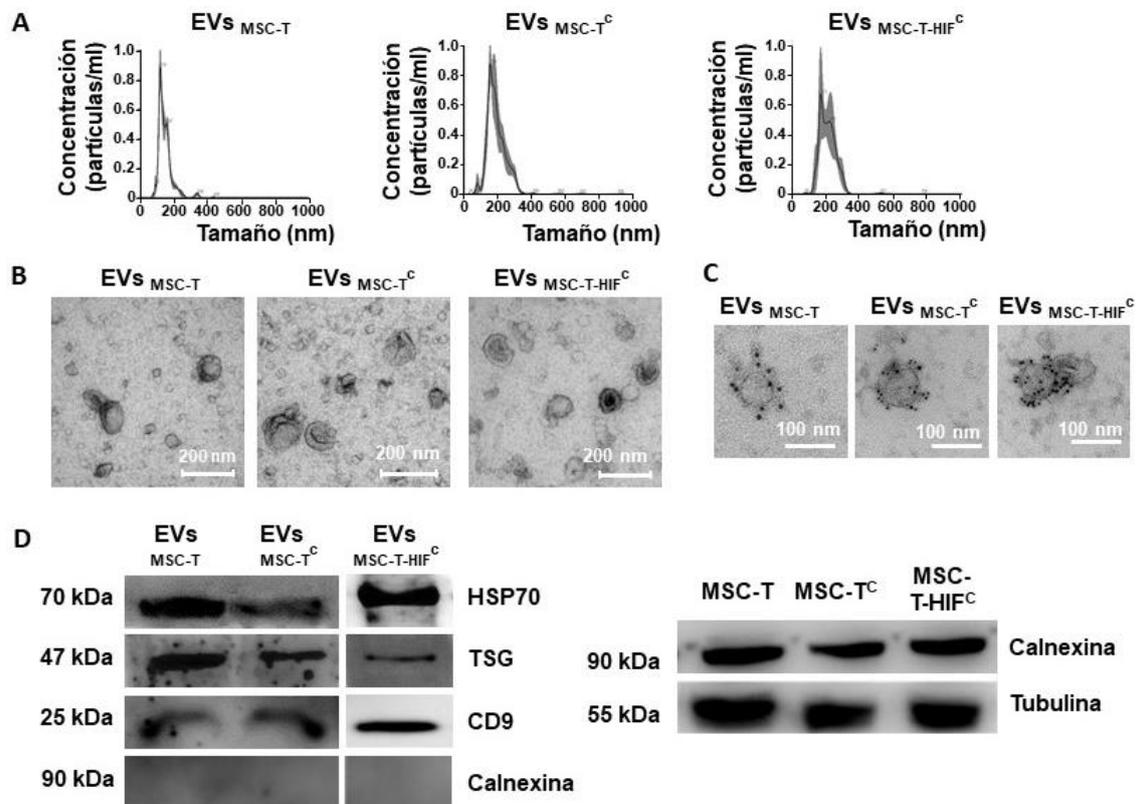
Observamos por citometría de flujo que tras las ultracentrifugaciones arrastraban las citoquinas que habíamos añadido al medio junto con los EVs, por lo que se añadió un paso de filtración con Centricon™ de 100kDa para eliminar las citoquinas y que no interfirieran en nuestros experimentos. Se comprobó que tras el uso del Centricon™ la concentración de citoquinas era despreciable (Fig. 12).



**Figura 12. Exclusión de las citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  de las muestras de EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> y EV<sub>MSC-T-HIF</sub><sup>C</sup>.** A) Histogramas representativos de los datos del CBA (matriz de cuentas por citometría) de los estándares y de las muestras de EVs medidas antes y después de pasarlas por el Centricon™ de 100kDa. B) Curva patrón de intensidad media de fluorescencia (IMF) a distintas concentraciones del estándar de citoquina. C) Cantidad de citoquina (ng/ml) en las muestras de EVs antes y después del Centricon™ tras la extrapolación respecto a la curva. ○ EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> antes del centricon; ● EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> después del centricon; □ EV<sub>MSC-T-HIF</sub><sup>C</sup> antes del centricon; ■ EV<sub>MSC-T-HIF</sub><sup>C</sup> después del centricon. Se utilizó la prueba *t* (de Student) pareada para evaluar la significancia estadística. \* *p* < 0,05

Para la caracterización de las EVs se llevaron a cabo tres métodos siguiendo la recomendación de las ISEV [65]. En primer lugar, se observó que las características que definen a las EVs no se vieran afectadas ni por la activación de las MSC con las citoquinas, ni por la sobreexpresión del factor HIF-1 $\alpha$ . La distribución de diámetros confirmada por el análisis de seguimiento de partículas (NTA) fue principalmente de 150-200nm (Fig. 13A). El análisis de TEM de las EVs reveló una morfología en forma de copa típicamente observada con el protocolo de ultracentrifugación y fue consistente con el diámetro de NTA observado (Fig. 13B). Las EVs también mostraron un marcaje inmunológico positivo del marcador canónico de EVs CD63 (Fig. 13C). Los marcadores de tetraspaninas asociados a las EVs se evaluaron mediante inmunodetección (Fig.

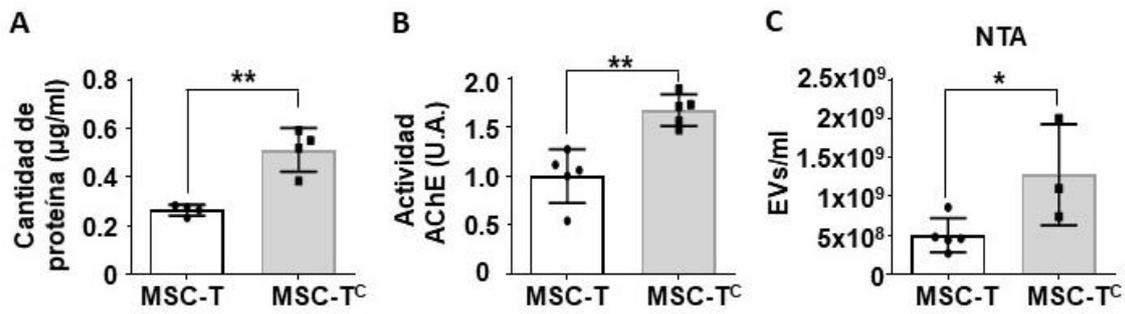
13D). Las EVs aisladas expresaban Hsp70, TSG101 y CD9 y eran negativas para la proteína del retículo endoplásmico Calnexina.



**Figura 13. Caracterización de las EVs derivadas de MSC-T, MSC-T<sup>c</sup> y MSC-T-HIF<sup>c</sup>.** A) Histogramas representativos de las EVs analizadas por NTA. B) Imágenes representativas de microscopía electrónica de EVs. Barra de escala: 200 nm. C) Inmuno oro del marcador de EVs CD63 visto por TEM. Barra de escala: 100 nm. D) Inmunodetección representativa de las proteínas Hsp70, TSG101 y CD9 en las EVs. La ausencia de Calnexina demuestra que se trata de una preparación pura de EVs. Las células se utilizaron como controles positivos a la Calnexina. La  $\alpha$ -tubulina se utilizó como control de carga.

### 3.2. El medio acondicionado con citoquinas aumenta la liberación de EVs por parte de las MSC

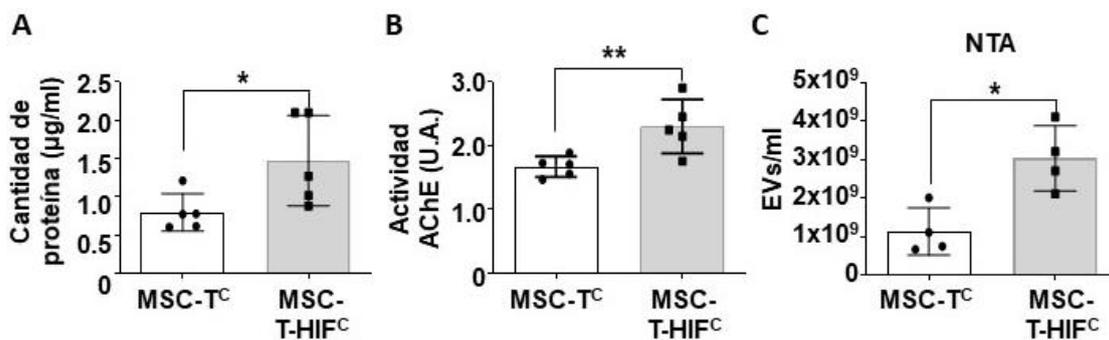
Cuando analizamos la cantidad de EVs liberadas por las MSC en distintas condiciones de cultivo, observamos que, en comparación con las MSC no acondicionadas, las MSC sometidas a la activación con las citoquinas (MSC-T<sup>c</sup>) liberaban una cantidad significativamente mayor de EVs cuantificada por: **1)** la cantidad de proteínas totales medida mediante el ensayo con ácido bicinónico (BCA) ( $0,26 \pm 0,02$  vs  $0,51 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ ) (Fig. 14A); **2)** la actividad acetilcolinesterasa, una enzima presente en la membrana de los EVs [229] ( $1 \pm 0,2$  vs  $1,6 \pm 0,1$  U.A.) (Fig. 14B); y **3)** la cantidad de partículas/mL medida mediante la técnica de NTA ( $5 \times 10^8 \pm 2,1 \times 10^7$  vs  $1,2 \times 10^9 \pm 6,4 \times 10^8$  EVs/mL) (Fig. 14C).



**Figura 14. Cuantificación de la abundancia de EVs liberadas por las MSC-T condicionadas (MSC-T<sup>c</sup>) o no (MSC-T) con citoquinas proinflamatorias durante 48 h.** A) Concentración de proteínas de EVs extraídas de 100 mL de medio de cultivo de  $1 \times 10^7$  células que fueron resuspendidas en 100 µL de PBS. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de cuatro experimentos independientes. Se utilizó la prueba *t* (de Student) pareada para evaluar la significancia estadística. B) Cuantificación de la actividad acetilcolinesterasa en las EVs. Los valores se representan en relación con el valor de EV<sub>MSC-T</sub>. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba *t* (de Student) pareada para evaluar la significancia estadística. C) Cantidad de EVs por mililitro de sobrenadante del mismo número de MSC-T y MSC-T<sup>c</sup> medido por análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba *t* (de Student) no pareada para evaluar la significancia estadística. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

### 3.3. La sobreexpresión del factor HIF-1 $\alpha$ aumenta la liberación de EVs por parte de las MSC activadas con citoquinas

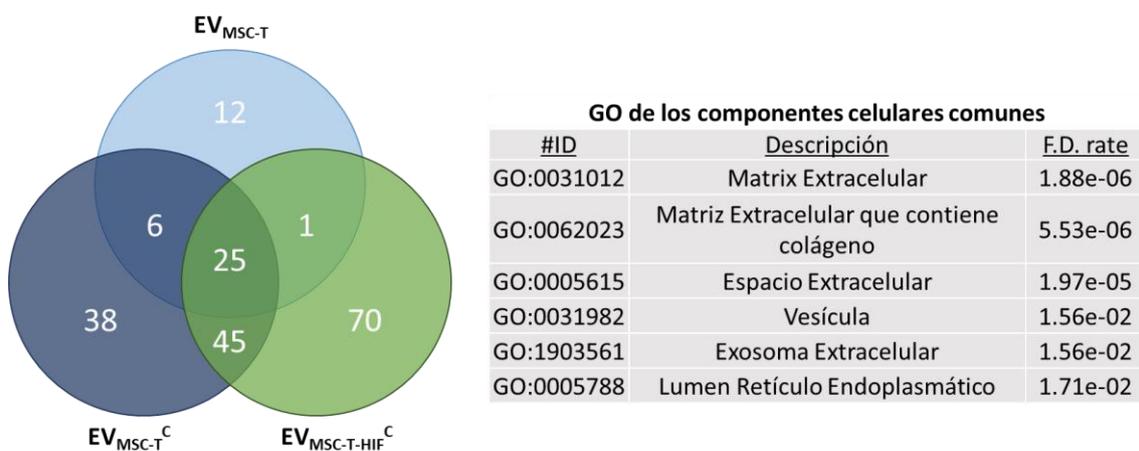
Sorprendentemente, cuando analizamos las EVs liberadas por parte de las MSC que sobreexpresaban el factor HIF-1 $\alpha$  y estaban sometidas al acondicionamiento por citoquinas (MSC-T-HIF<sup>c</sup>), observamos que éstas secretaban mayores cantidades de EVs que las MSC-T<sup>c</sup> tanto por BCA ( $0,79 \pm 0,2$  vs  $1,4 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ ) (Fig. 15A), por actividad acetilcolinesterasa ( $1,6 \pm 0,16$  vs  $2,3 \pm 0,4$  U.A.) (Fig. 15B), como por NTA ( $1,2 \times 10^9 \pm 6,4 \times 10^8$  vs  $3 \times 10^9 \pm 8,4 \times 10^8$  EVs/mL) (Fig. 15C).



**Figura 15. Cuantificación de la abundancia de EVs liberadas por las MSC-T y MSC-T-HIF<sup>c</sup> condicionadas con citoquinas proinflamatorias durante 48 h.** A) Concentración de proteínas de EVs extraídas de 100 mL de medio de cultivo de  $1 \times 10^7$  células que fueron resuspendidas en 100 µL de PBS. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de seis experimentos independientes. Se utilizó la prueba *t* (de Student) pareada para evaluar la significancia estadística. B) Cuantificación de la actividad acetilcolinesterasa en EV<sub>MSC-T<sup>c</sup></sub> y EV<sub>MSC-T-HIF<sup>c</sup></sub>. Los valores se representan en relación con el valor de EV<sub>MSC-T<sup>c</sup></sub>. El gráfico representa la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba *t* (de Student) pareada para la estadística. C) Cantidad de EVs por mililitro en el sobrenadante del mismo número de MSC-T<sup>c</sup> y MSC-T-HIF<sup>c</sup> medida por NTA. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba *t* (de Student) no pareada para evaluar la significancia estadística. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

### 3.4. El medio acondicionado con citoquinas y la sobreexpresión del factor HIF-1 $\alpha$ aumenta el contenido inmunosupresor de las EVs

Para caracterizar funcionalmente el contenido proteico de las EV<sub>MSC</sub> tras la activación con las citoquinas y la sobreexpresión del factor HIF-1 $\alpha$ , utilizamos LC-MS/MS. Los contaminantes proteicos del medio de cultivo celular derivados del FBS se eliminaron del análisis. Aunque se utilizó una cantidad equivalente de proteínas totales (30  $\mu$ g), se observaron distinto número de proteínas según la condición. Se identificaron: 44 proteínas en EV<sub>MSC-T</sub>, 114 en EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> y 141 en EV<sub>MSC-T-HIF</sub><sup>C</sup>. Por una parte, observamos que la condición de estimulación con citoquinas aumentó más del doble el contenido proteico en las EVs (44 vs 114). Por otra parte, la sobreexpresión del factor HIF-1 $\alpha$  también aumentó alrededor de un tercio más el contenido proteico en dichas EVs (114 vs 141). A partir de estas proteínas mapeamos los componentes celulares y procesos biológicos más representativos a través del análisis del *Gene Ontology* (GO; Ontología genética). El GO proporciona una definición específica de las funciones de las proteínas analizadas. Cuando analizamos los GO de las 25 proteínas comunes a las tres muestras, se observó que los componentes celulares están relacionados con la liberación de vesículas y la matriz extracelular (Fig. 16).



**Figura 16.** Diagrama de Venn de las proteínas detectadas en EV<sub>MSC-T</sub>, EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> y las EV<sub>MSC-T-HIF</sub><sup>C</sup> y GO de las proteínas comunes a todas ellas. En el diagrama de Venn podemos observar que hay 25 proteínas comunes en las 3 muestras y 45 comunes a aquellas que derivan de MSC acondicionadas con citoquinas. Se muestran los GO analizados a partir de las 25 proteínas comunes a las tres extracciones de EVs. F.D rate= false discovery rate.

También fueron analizados los procesos biológicos derivados de las 45 proteínas comunes entre las EVs secretadas por las MSC sometidas a un acondicionamiento inflamatorio con citoquinas. Se observó que el acondicionamiento aumentaba la regulación de muchos procesos, entre los que se destaca la respuesta al estrés, los

procesos inmunes y la reparación de heridas. También se detecta un aumento de la regulación de la exocitosis, corroborando los resultados obtenidos por el NTA y la AChE.

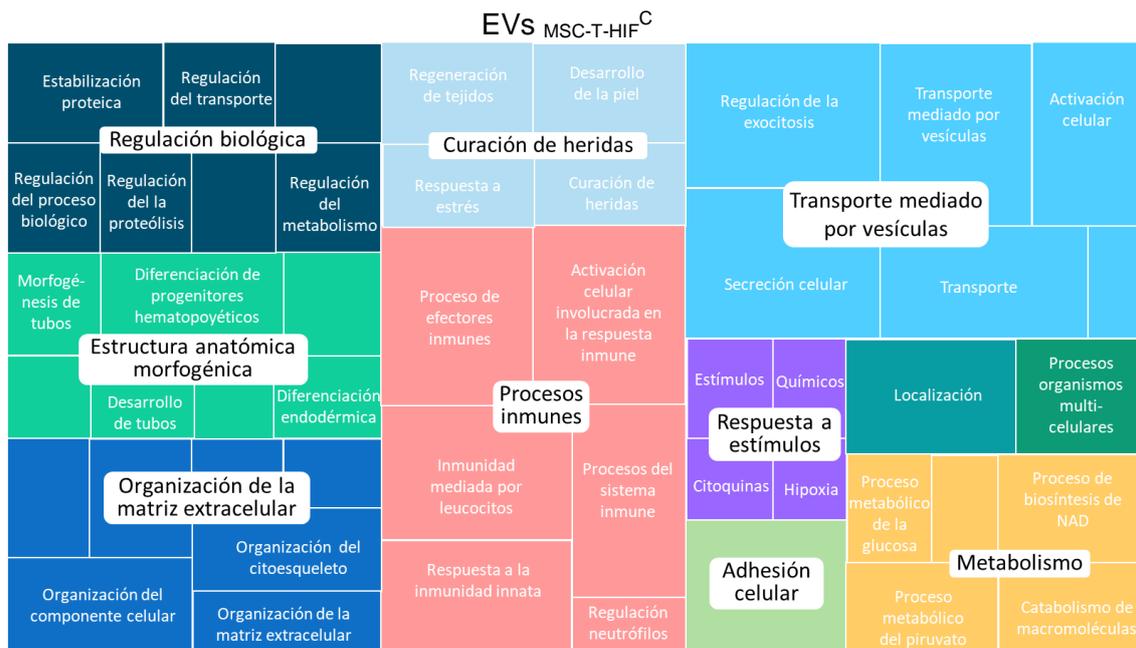
**GO de los procesos biológicos de EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> y EV<sub>MSC-T-HIF</sub><sup>C</sup>**

#ID	Descripción	F.D. rate	#ID	Descripción	F.D. rate
GO:2000145	Regulación de la movilidad celular	1.09e-05	GO:0006950	Respuesta al estrés	1.8e-04
GO:0022603	Regulation morfogénesis	1.68e-05	GO:0002252	Procesos inmuno-efectores	2.6e-04
GO:0030334	Regulación de la migración celular	1.68e-05	GO:0030162	Regulación de la proteólisis	2.6e-04
GO:0052547	Regulación de la actividad peptidasa	7.17e-05	GO:0042060	Reparación de heridas	4.0e-04
GO:0051336	Regulación de la actividad hidroxilasa	7.38e-05	GO:0045055	Regulación de la exocitosis	6.2e-04

**Figura 17. GO de los procesos biológicos compartidos entre las EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> y las EV<sub>MSC-T-HIF</sub><sup>C</sup>.** Se muestran los 10 GO más representativos analizados a partir de las 45 proteínas comunes a las extracciones de EVs aisladas de MSC acondicionadas. F.D. rate = false discovery rate.

Los procesos biológicos más significativos identificados en cada una de las tres condiciones se visualizaron en un diagrama Treemap utilizando REVIGO (Fig. 18).



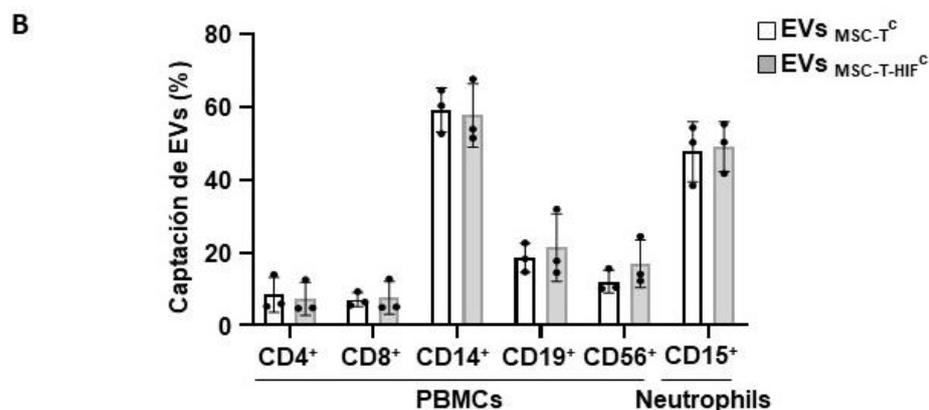
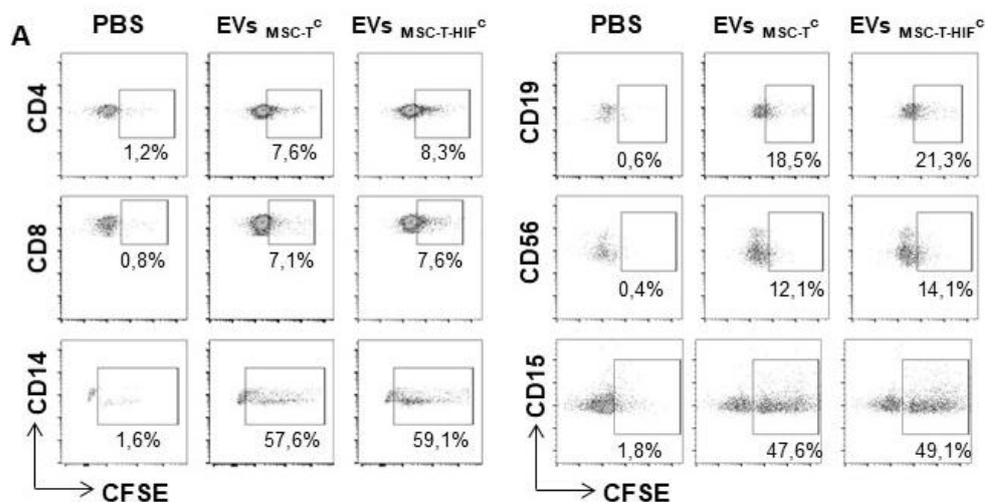


**Figura 18. Diagramas Treemap de los procesos biológicos de las EV<sub>MSC-T</sub>, las EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> y las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub>. Los diagramas se han llevado a cabo usando REVIGO después del análisis proteómico.**

Las tres muestras de EVs contenían una carga proteica implicada en 7 procesos biológicos comunes: organización de la matriz extracelular, transporte mediado por vesículas, estructura anatómica morfogénica, adhesión celular, curación de heridas, regulación biológica y procesos inmunológicos. Todos estos procesos están relacionados con la actividad paracrina, regeneradora e inmunosupresora de las MSC. Cuando las MSC son activadas con el acondicionamiento de citoquinas, tanto en las EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> como en las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub>, observamos que aparecen dos grupos nuevos: la respuesta a estímulos y el metabolismo celular. Esto tiene sentido, ya que el acondicionamiento con citoquinas supone un estímulo diferente para las MSC que provoca su activación y como consecuencia incrementa su metabolismo energético. Además, observamos como el grupo de procesos inmunológicos crece el doble gracias a la activación con citoquinas y se cuadruplica en la condición de EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub>. Este resultado muestra que, por una parte, la activación de las MSC hace que las EVs estén cargadas con un mayor número de proteínas involucradas en los procesos inmunológicos y que éstas se incrementan todavía más gracias a la sobreexpresión del factor HIF-1 $\alpha$  por parte de las MSC. Este resultado era esperable ya que se ha visto que en respuesta a la hipoxia y a la estabilización del factor HIF-1 $\alpha$ , las MSC producen un mayor nivel de citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-10), disminuyen las citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF- $\alpha$ ) y poseen una mayor supresión de las PBMCs [230], [231].

### 3.5. Las EVs son captadas por distintas poblaciones celulares del sistema inmune

Para investigar si las células del sistema inmunitario podían captar las EVs derivadas de MSC y por tanto ejercer su efecto en ellas, se llevó a cabo un experimento de captación. Para ello, se tiñeron cantidades iguales de EVs (tanto de  $EV_{MSC-T^C}$  como de  $EV_{MSC-T-HIF^C}$ ) con CFSE (del inglés, *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) y se midió la captación de vesículas añadiéndolas a diferentes subtipos de leucocitos. La internalización de las EVs se cuantificó mediante citometría de flujo con marcadores específicos para células T ( $CD4^+/CD8^+$ ), monocitos ( $CD14^+$ ), células B ( $CD19^+$ ), células asesinas naturales (NK, del inglés *Natural Killer*) ( $CD56^+$ ) y neutrófilos ( $CD15^+$ ). Nuestros resultados mostraron que cada población de células inmunitarias puede capturar las EVs de MSC pero con diferentes preferencias, lo que sugiere un mecanismo de comunicación activo basado vesículas entre las MSC y el sistema inmunitario (Fig. 19A). No observamos diferencias en la captación de vesículas aisladas de  $MSC-T^C$  o  $MSC-T-HIF^C$ . Como se muestra en la figura 19, los monocitos y los neutrófilos mostraron una mayor capacidad a la hora de captar las EVs (alrededor del 60%-50% respectivamente).



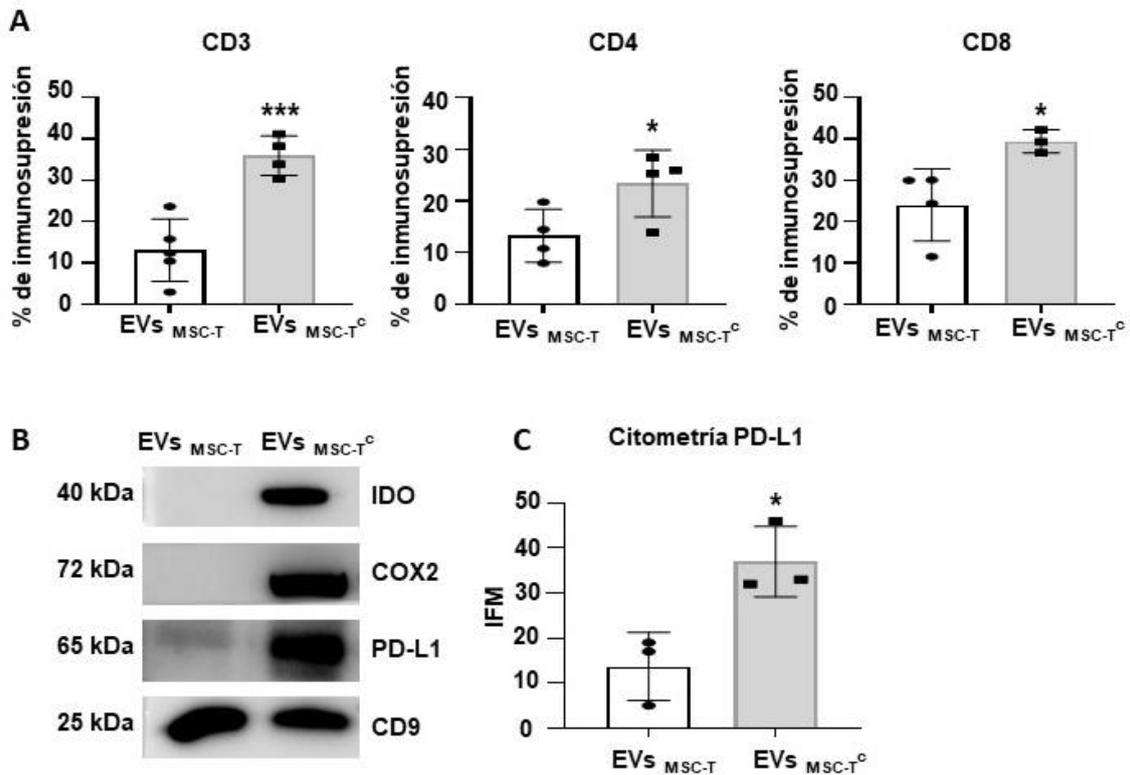
**Figura 19. Captación de las EVs por parte de distintos subtipos leucocitarios.** Las PBMC y los neutrófilos se incubaron con EVs teñidas con CFSE durante 3h a 37°C y la internalización de las EVs se midió por citometría de flujo. Como control negativo, se marcó el PBS con CFSE y se añadió a las células inmunitarias en paralelo. Los tipos de células se analizaron mediante marcadores de superficie específicos para células T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), células B (CD19<sup>+</sup>), monocitos (CD14<sup>+</sup>), células NK (CD56<sup>+</sup>) y neutrófilos (CD15<sup>+</sup>). A) Los gráficos de puntos muestran el porcentaje de captación de EVs-CFSE por parte de los distintos tipos celulares. B) La internalización de las EVs se midió por el aumento de la intensidad de la fluorescencia y se representó como el porcentaje de captación de EVs por cada población celular. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes.

## 4. Potencial inmunosupresor y resolutor de la inflamación de las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> *in vitro*

Tras el aislamiento y caracterización de las EVs y comprobar su internalización por parte de las células del sistema inmune, quisimos analizar qué efecto tenían en algunas de estas células a nivel inmunoregulatorio. También nos interesaba saber si el hecho de activar a las MSC y hacer que sobreexpresaran el factor HIF-1 $\alpha$  incrementaba las propiedades terapéuticas de las EVs que liberaban.

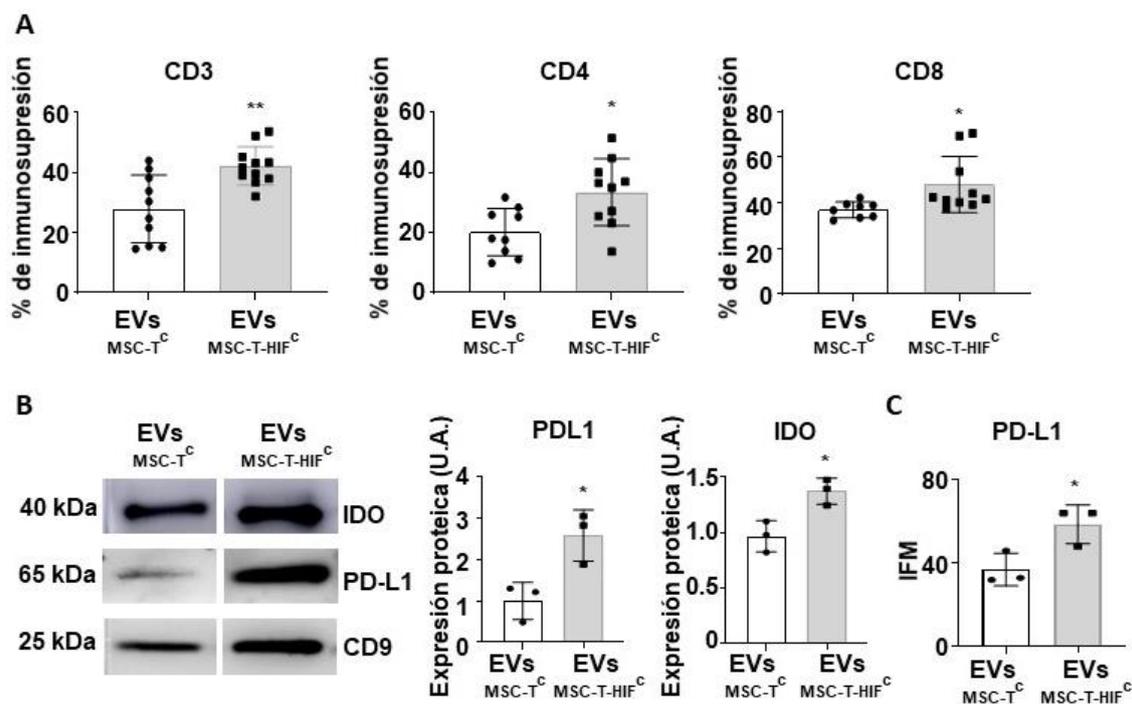
### 4.1. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> disminuyen más eficazmente la proliferación de linfocitos T activados respecto a las EV<sub>MSC-T</sub>

En primer lugar, como habíamos observado que las MSC-T acondicionadas con las citoquinas tenían una mayor expresión de moléculas inmunomoduladoras y liberaban una mayor cantidad de EVs comparadas con las MSC-T sin activar, se evaluó la capacidad inmunosupresora de sus vesículas. Observamos que las EVs derivadas de MSC-T<sup>C</sup> (EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub>) regulaban la proliferación de células T de forma más eficaz que las EV<sub>MSC-T</sub>, tanto en células CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup> (Fig. 20A). Para comprender mejor el mecanismo que subyace a este fenómeno, medimos los niveles de diferentes moléculas inmunosupresoras y descubrimos que las EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> estaban enriquecidas paraIDO, COX2 y PD-L1 en comparación con las EV<sub>MSC-T</sub> (Fig. 20B). Mientras queIDO y COX2 ejercen sus efectos supresores como factores intermedios de una cadena de reacciones, la vía de señalización PD-L1/PD-1 se inicia cuando ambas moléculas entran en contacto en la sinapsis inmunológica [232]. En este sentido, observamos que PD-L1 no sólo se incrementaba en la carga útil de las EVs cuando las células parentales eran activadas por moléculas proinflamatorias, si no que su presencia en la membrana de las EVs también aumentaba significativamente, preparándolas para interactuar con PD-1 en las células diana, (Fig. 20C), lo que sugiere un papel relevante de esta vía de señalización en la inmunosupresión observada.



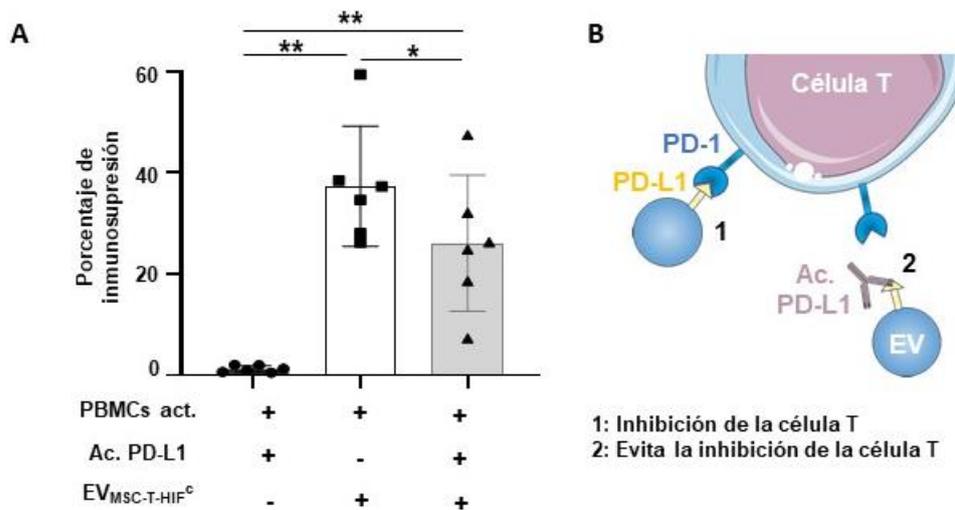
**Figura 20. El acondicionamiento da lugar a un aumento de la capacidad inmunomoduladora de las EV<sub>MSC-T</sub>.** A) Las PBMCs se tiñeron con CFSE y se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de EV<sub>MSC-T</sub> o de EVs derivadas de MSC-T<sup>C</sup> (EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub>). Después de 5 días, se tiñeron las células con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 y se determinó la proliferación de los subconjuntos de células T mediante la medición por citometría de flujo de la dilución de CFSE. La supresión (porcentaje) se calculó a partir del índice de expansión. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de cuatro experimentos independientes. Se utilizó la prueba *t* (de Student) no pareada para evaluar la significancia estadística. B) Inmuno-detección representativa de los niveles de expresión de las proteínas IDO, COX2 y PD-L1. Se utilizó CD9 como control de carga. C) Nivel de expresión de la proteína PD-L1 medido por citometría de flujo utilizando el valor medio geométrico de IFM de EV<sub>MSC-T</sub> y EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> teñidos con anti-PD-L1. Los valores se representan en relación con el valor medio geométrico de las EV<sub>MSC-T</sub>. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba *t* (de Student) pareada para evaluar la significancia estadística. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Una vez comprobado que la activación con citoquinas incrementaba el potencial inmunosupresor de las EVs, quisimos medir si tal y como sucedía con las células, el hecho de sobreexpresar el factor HIF- $\alpha$  en las MSC mejoraba la capacidad inmunosupresora de las EVs (EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub>) en un ensayo de proliferación de células T. Como se muestra en la Figura 21A, las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> tenían una mayor capacidad de supresión de la proliferación de células T que las EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub>, afectando tanto a las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Para conocer mejor los mecanismos que desencadenan las características inmunosupresoras de las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub>, analizamos los niveles de IDO y PDL-1 mediante inmuno-detección y descubrimos que los niveles eran mayores en las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> que en las EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> (Fig. 21B). La mayor presencia de PDL-1 en la superficie de las EVs fue corroborada por citometría de flujo (Fig. 21C). En cuanto a los niveles de expresión de COX-2 por parte de las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> en comparación con las EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub>, no hubo variación (no mostrado).



**Figura 21. Las EVs derivadas de MSC-T-HIF<sup>c</sup> (EV<sub>MSC-T-HIF<sup>c</sup></sub>) muestran mayores propiedades inmunosupresoras.** A) Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se tiñeron con CFSE y se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de EV<sub>MSC-T<sup>c</sup></sub> o EV<sub>MSC-T-HIF<sup>c</sup></sub>. Después de 5 días, las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 y se determinó la proliferación de los subconjuntos de células T mediante citometría de flujo de la dilución de CFSE. La supresión (porcentaje) se calculó a partir del índice de expansión. El gráfico representa la media  $\pm$  S.D. de siete experimentos independientes. Se utilizó la prueba *t* (de Student) no pareada para evaluar la significancia estadística. B) Inmunodetección representativa de las proteínas IDO y PD-L1 en EV<sub>MSC-T<sup>c</sup></sub> y EV<sub>MSC-T-HIF<sup>c</sup></sub>. Los niveles de expresión se cuantificaron por densitometría en relación con EV<sub>MSC-T<sup>c</sup></sub>. Se utilizó CD9 como control de carga. El gráfico representa la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba *t* (de Student) pareada para evaluar la significancia estadística. C) Nivel de expresión de la proteína PD-L1 medida por citometría de flujo utilizando la intensidad de fluorescencia media de EV<sub>MSC-T<sup>c</sup></sub> y EV<sub>MSC-T-HIF<sup>c</sup></sub>. Los valores se representan en relación con el valor medio geométrico de EV<sub>MSC-T<sup>c</sup></sub>. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba *t* (de Student) pareada para evaluar la significancia estadística. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Tras observar un aumento significativo de PD-L1 en la superficie de las EVs, quisimos ver qué sucede a nivel funcional mediante la inhibición de la unión PD-1/PD-L1 añadiendo un anticuerpo anti-PD-L1. La unión de PD-1 y PD-L1 se trata de un punto de control que actúa como señal inhibitoria de la proliferación y secreción de citoquinas de las células T [232]. Se observó que al añadir el anticuerpo al ensayo de proliferación de células T, la inmunosupresión que ejercían las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>c</sup></sub> sobre las PBMCs activadas, se veía parcialmente bloqueada ( $37,5 \pm 4,8\%$  vs  $26,1 \pm 5,4\%$ ) (Fig. 22A). El anticuerpo no mostró efecto en la activación de las PBMCs. Pensamos que el anticuerpo, se une al ligando PD-L1 evitando así su interacción con el receptor PD-1 en las células T, impidiendo la inhibición que genera esta señal celular (Fig. 22B).



**Figura 22. Bloquear PD-L1 inhibe parcialmente la inmunosupresión mediada por las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub>.** A) Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se tiñeron con CFSE y se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> y en presencia o ausencia de anticuerpo anti-PD-L1. Después de 5 días, las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD3 y se determinó la proliferación de células T mediante citometría de flujo de la dilución de CFSE. La supresión (porcentaje) se calculó a partir del índice de expansión. El gráfico representa la media ± S.D. de seis experimentos independientes. Se utilizó la prueba *t* (de Student) pareada para evaluar la significancia estadística. B) Representación gráfica del proceso de bloqueo por parte del anticuerpo en la interacción PD-1/PD-L1. \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01.

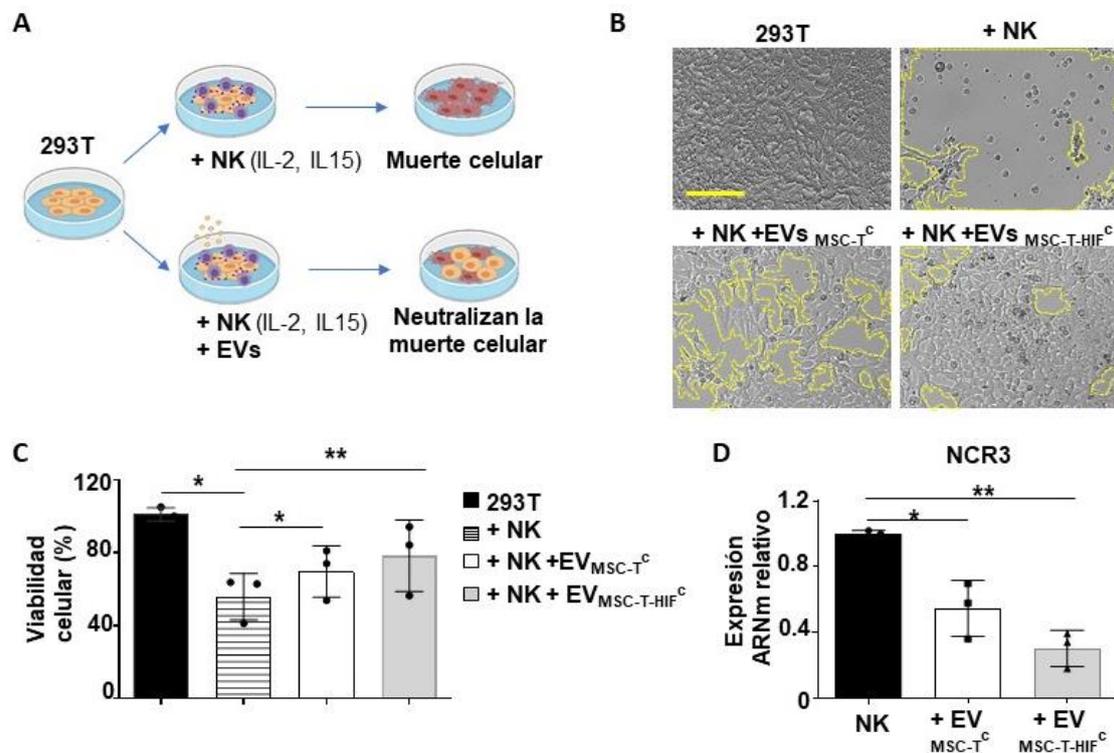
#### 4.2. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> minimizan más significativamente la actividad citotóxica de las células NK que las EV<sub>MSC-T</sub>

Las células NK, que vinculan la inmunidad innata y la adaptativa, también han demostrado desempeñar un papel importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes [233].

Para observar cómo afectan las EVs en la población de células NK, se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad. Para ello se co-cultivaron células NK, activadas con IL-2 e IL-15 y células HEK-293T en una relación (10:1) con o sin tratamiento de EVs (Fig. 23A) y se analizó la viabilidad celular una semana después. Tras 7 días en cultivo se observó mediante microscopía de campo claro como las células NK activadas, destruían a las HEK-293T, dejando los pocillos con muy baja confluencia. El tratamiento con EVs redujo la muerte de las HEK-293T, aumentando su confluencia, con mayor efectividad en el caso de las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> frente a las EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> (Fig. 23B). Gracias a un ensayo de viabilidad CCK8 pudimos cuantificar el porcentaje de viabilidad de las HEK-293T. Las NK redujeron un 55% el número de HEK-293T. El tratamiento con EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> mejoró la viabilidad de las HEK-293T en presencia de NKs un 14%, mientras que el tratamiento con EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> la aumentó un 22,4% (Fig. 23C).

El receptor NCR3 desempeña un papel importante en la respuesta de las células NK, principalmente activando la citotoxicidad y la secreción de citoquinas [234]. Por ello quisimos evaluar su expresión en células NK activadas con la citoquina IL-2 e IL-15 y

tratadas con las EVs. Las  $EV_{MSC-T}^C$  redujeron la expresión de este gene significativamente, mientras que el tratamiento con  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  lo redujo todavía más (Fig. 23D).

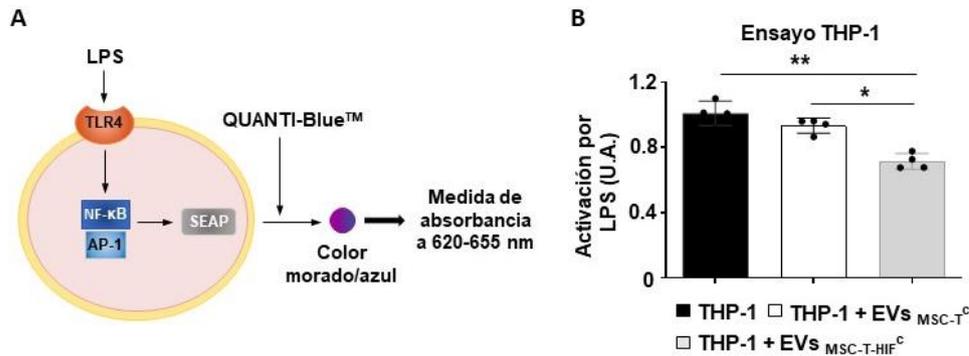


**Figura 23. Los  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  minimizan la actividad citotóxica mediada por las células NK.** A) Representación gráfica del experimento de citotoxicidad mediada por las células NK. B) Fotos de microscopía en campo claro del co-cultivo de HEK-293T y células NK, con o sin tratamiento de EVs tras una semana. Las líneas amarillas discontinuas marcan las áreas sin HEK-293T. Barra de escala: 200 nm. C) Viabilidad celular mediada por un ensayo de CCK8 del cultivo de HEK-293T tras una semana de co-cultivo con células NK, con o sin tratamiento de EVs. D) Niveles de expresión de NCR3 cuantificados por RT-qPCR en células NK, tratadas o no con EVs. El nivel de expresión del gen diana en cada muestra se normalizó con respecto a la expresión de GAPDH. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01.

### 4.3. Las $EV_{MSC-T-HIF}^C$ reducen la activación de las células THP-1 mediada por el LPS

Las células THP-1 son una línea celular que ha sido ampliamente usada como modelo de monocitos humanos. Al igual que sucede con los monocitos, cuando las THP-1 son estimuladas por endotoxinas como el lipopolisacárido (LPS) se diferencian hacia un fenotipo proinflamatorio de monocito. En este ensayo se usó una línea conocida como THP1-XBlue™, que expresan de forma estable un gen reportero, la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP), inducible por los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 (Fig. 24A). Las THP-1 se sembraron en presencia de LPS con o sin tratamiento de EVs. Tanto los  $EV_{MSC-T}^C$  como los  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  fueron capaces de disminuir la

activación de los monocitos mediada por la unión del LPS al receptor TLR4, siendo más pronunciado el efecto en las  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  (Fig. 24B).



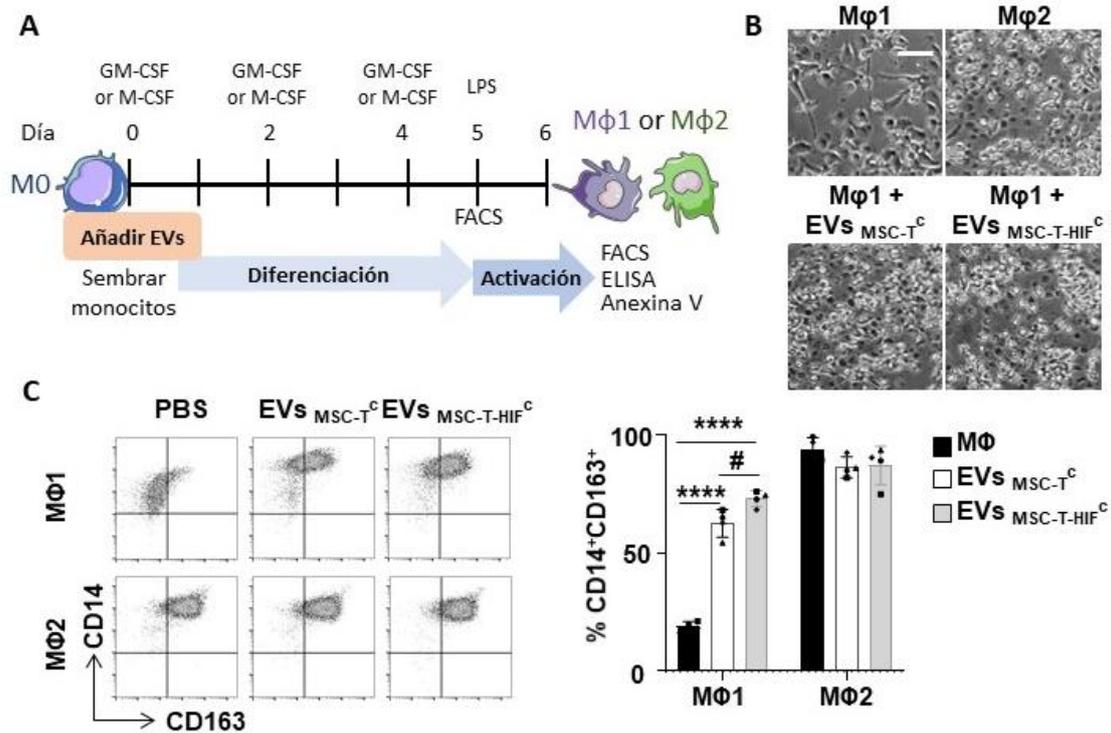
**Figura 24.** Los  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  disminuyen la activación mediada por LPS en una línea de monocitos humana. A) Representación gráfica de las vías de señalización inducidas en la activación mediada por LPS en las THP1-XBlue™. B) Las células se incubaron con 10ng/ml de LPS con o sin tratamiento de EVs. Tras 24 horas de incubación se evaluó la estimulación del TLR4 midiendo los niveles de SEAP en el sobrenadante mediante QUANTI-Blue™. Los valores de absorbancia se normalizaron con respecto a los valores de las THP-1 activadas con el LPS. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de cuatro experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba *t* (de Student) pareada. \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01.

#### 4.4. Las $EV_{MSC-T-HIF}^C$ repolarizan los macrófagos M1 hacia un fenotipo M2 de forma más eficiente que las $EV_{MSC-T}^C$

A la luz de los resultados anteriores, quisimos analizar el efecto de las EVs derivadas de las MSC en monocitos humanos aislados de sangre periférica y que no se tratara de una línea celular como lo eran las THP-1, para obtener resultados más representativos de la realidad.

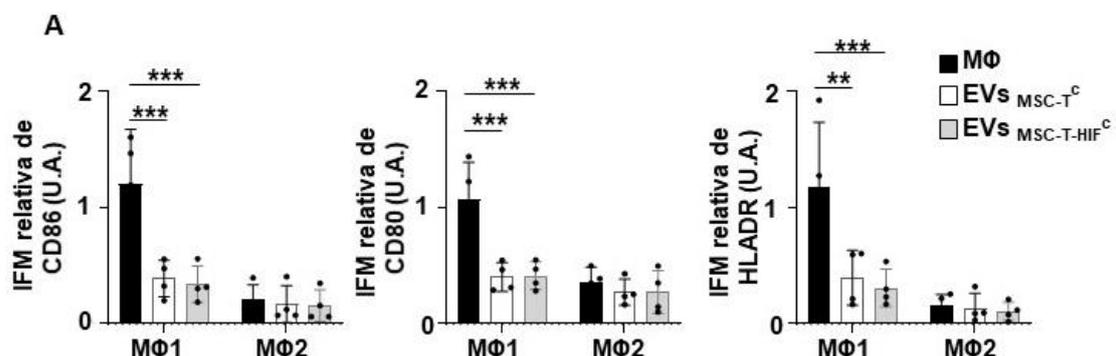
##### 4.4.1. Caracterización fenotípica y funcional de los monocitos diferenciados hacia $M\phi 1$ tratados con EVs

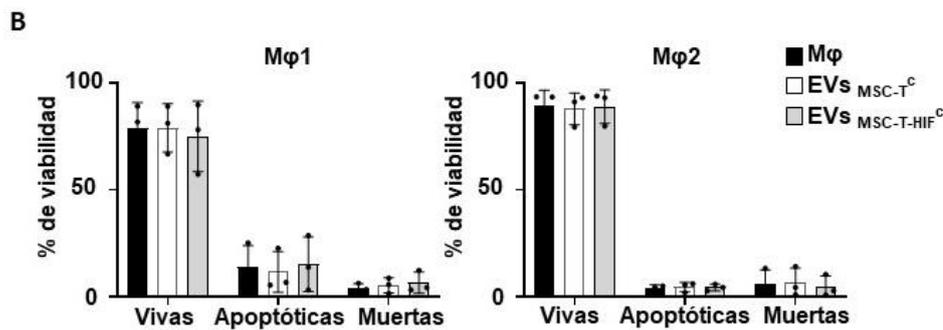
El papel inmunomodulador de las MSC en la polarización de los macrófagos M2 es bien conocido [235], por lo que desarrollamos un ensayo para estudiar el efecto de las EVs en la diferenciación de monocitos a macrófagos M1 o M2 (Fig. 25A). A día 5 de diferenciación y antes de la activación de los macrófagos con LPS, observamos que los macrófagos M1 diferenciados en presencia de EVs, se parecían morfológicamente más a los  $M\phi 2$  que a los  $M\phi 1$  (Fig. 25B). A continuación, analizamos por citometría de flujo el porcentaje de población  $CD14^+CD163^+$ , un fenotipo clásico de  $M\phi 2$ , y se observó que los EVs derivados de MSC fueron capaces de aumentar significativamente el porcentaje de células  $CD14^+CD163^+$  respecto a la condición  $M\phi 1$  ( $19,1 \pm 1,8\%$ ) (Fig. 25C). Además, las  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  mostraron una capacidad de repolarización significativamente mayor que las  $EV_{MSC-T}^C$  ( $72,7 \pm 3,2\%$  vs  $62,4 \pm 4,8\%$ ). Cuando se añadieron las EVs en monocitos diferenciados hacia  $M\phi 2$  no observamos ningún cambio en el porcentaje de células  $CD14^+CD163^+$ .



**Figura 25. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> repolarizan los macrófagos M1 hacia el fenotipo M2.** A) Esquema del diseño experimental in vitro. B) Imágenes de microscopía de campo claro de los macrófagos tras cinco días de diferenciación. Barra de escala: 50µm. C) Tras 5 días de diferenciación, se evaluó el porcentaje de células CD14 y CD163 positivas mediante citometría de flujo. Se muestran gráficos de puntos representativos. El gráfico representa la media  $\pm$  S.D. de cuatro experimentos independientes. Se utilizó un ANOVA de dos vías para el análisis estadístico. #p < 0,05, \*\*\*\*p < 0,0001.

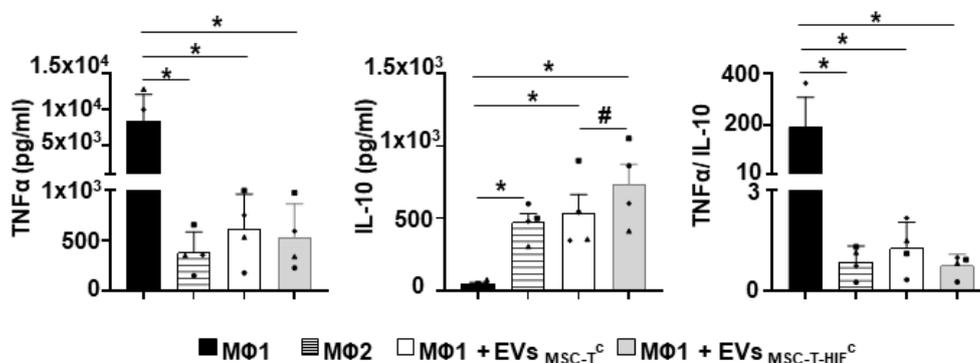
A la vista de estos datos, quisimos analizar los diferentes receptores de superficie celular que se regulan en Mφ1 en respuesta a la estimulación de LPS. En este caso, el tratamiento con EVs redujo la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, y la expresión del HLA-DR, asemejándose a los valores observados en Mφ2 (Fig. 26A). Igual que sucedía con el marcador de Mφ2 (CD163) en la figura anterior, cuando se añadieron las EVs en monocitos diferenciados hacia Mφ2 no observamos ningún cambio en el patrón de marcadores de expresión de Mφ1, mostrando que las EVs afectaron principalmente a la diferenciación hacia Mφ1. Además, analizamos el efecto de las EVs derivadas de MSC sobre la supervivencia de los macrófagos, y observamos que ni las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> ni las EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> afectan a la viabilidad de los macrófagos (Fig. 26B).





**Figura 26. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> repolarizan los macrófagos M1 hacia el fenotipo M2 disminuyendo las moléculas co-estimuladoras.** A) Tras la activación con LPS, se evaluó la intensidad de fluorescencia media (IFM) de la expresión de CD86, CD80 y HLA-DR mediante citometría de flujo. La expresión MFI relativa se calculó dividiendo todos los datos individuales por la expresión media en Mφ1. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de cuatro experimentos independientes. Se utilizó un ANOVA de dos vías para el análisis estadístico. B) Las EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> y EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> no afectan a la viabilidad de los macrófagos en diferenciación. Cuantificación de las células positivas a la anexina V-FITC y al I.P. Los gráficos muestran los macrófagos viables, apoptóticos y muertos tras la diferenciación M1/M2 en presencia o no de EVs. \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001

Viendo que a nivel de marcadores de superficie los monocitos tratados con EVs repolarizaban la diferenciación de Mφ1 hacia Mφ2, se quiso analizar si las citoquinas pro y antiinflamatorias típicas liberadas por los macrófagos también se habían alterado (Fig. 27). La administración de EVs de MSC a los monocitos durante su diferenciación hacia Mφ1 disminuyó significativamente su capacidad de producir la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , al mismo tiempo que aumentó significativamente la secreción de la citoquina antiinflamatoria IL-10, tras la activación de LPS. Además, la IL-10 liberada por los macrófagos diferenciados en presencia de EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> fue significativamente mayor que en presencia del tratamiento con EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub>. Por lo tanto, la relación TNF- $\alpha$ /IL-10 fue significativamente menor en los cultivos M1 diferenciados en presencia de EVs, lo que demuestra una mayor capacidad de repolarización de los macrófagos M1 hacia el fenotipo M2, como se demuestra no sólo en la expresión de los marcadores de superficie, sino también funcionalmente.

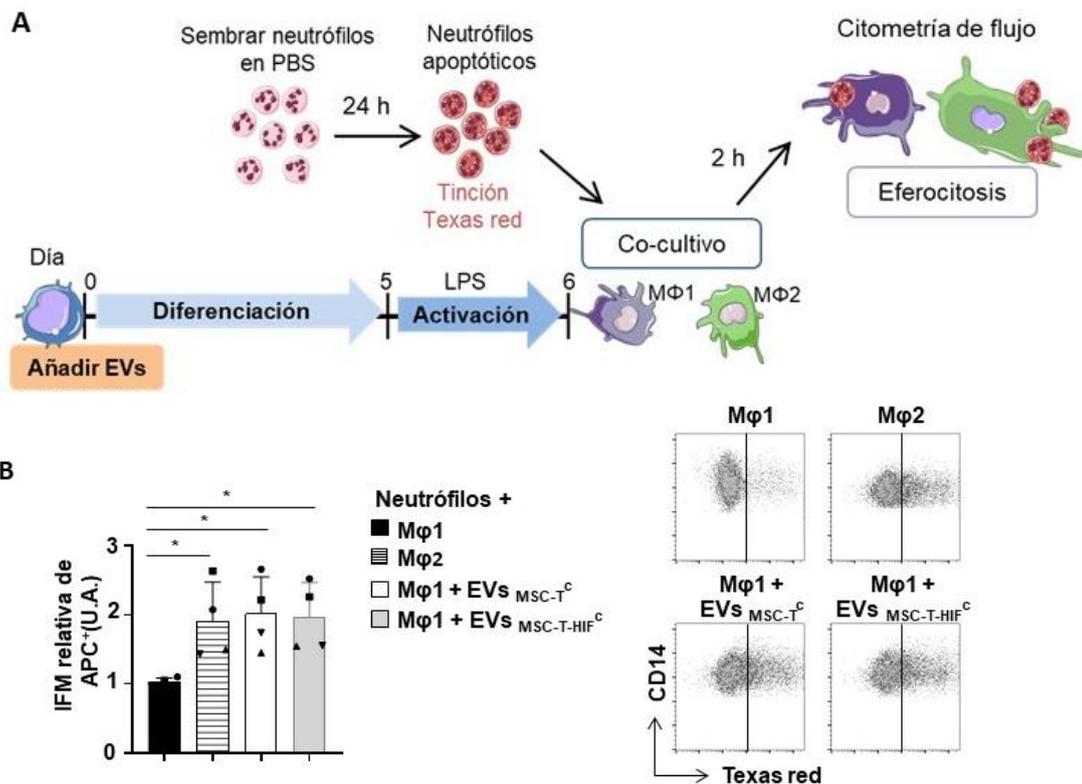


**Figura 27. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> repolarizan los macrófagos M1 hacia el fenotipo M2 funcionalmente.** La producción de TNF- $\alpha$  e interleuquina IL-10 por parte de los macrófagos se determinó mediante ELISA tras la estimulación con LPS. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de cuatro experimentos independientes. Se utilizó un ANOVA de una vía con corrección de Geisser-Greenhouse para el análisis estadístico. \* o p < 0,05.

Dado que las EVs derivadas de MSC fueron capaces de redirigir el fenotipo de los macrófagos M1 hacia los M2, quisimos confirmar estos resultados analizando la interacción de los macrófagos con otras poblaciones celulares inmunitarias. Para ello, desarrollamos dos ensayos funcionales *in vitro*, la eferocitosis de neutrófilos y la inmunosupresión de PBMCs.

#### 4.4.2. Las EVs<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> aumentan la eferocitosis de los neutrófilos por parte de los macrófagos

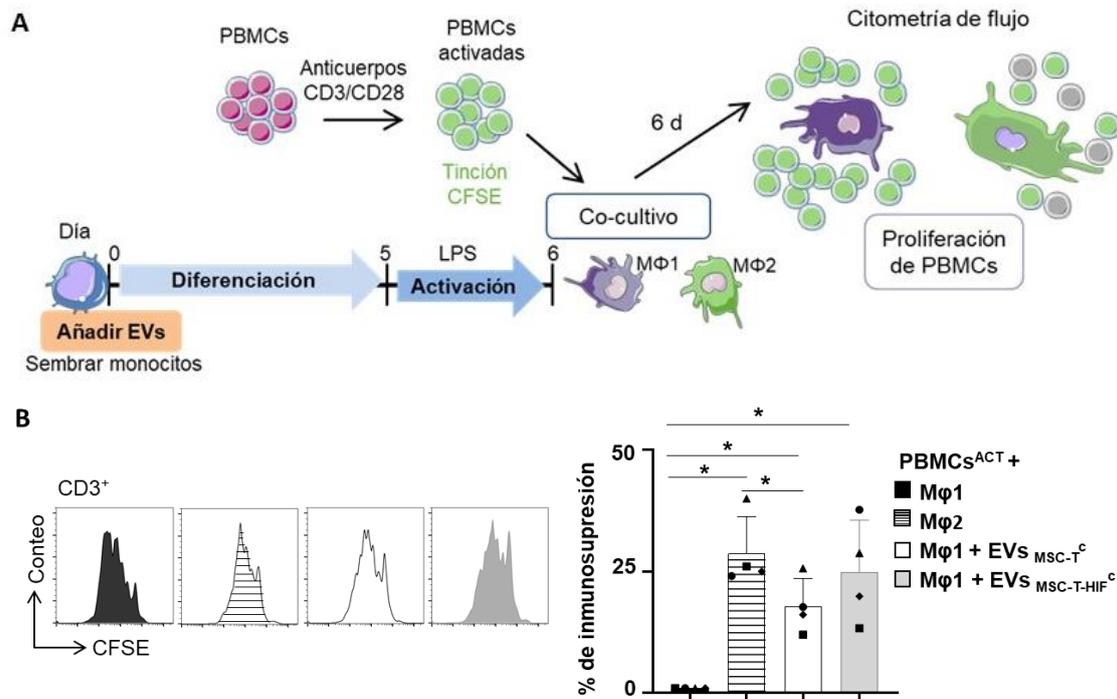
La resolución de la inflamación es un proceso activo que no sólo detiene la señalización proinflamatoria, sino que también elimina los neutrófilos polimorfonucleares apoptóticos en el lugar del tejido lesionado [236]; este proceso se denomina eferocitosis. Se ha demostrado que los macrófagos activados M2 tienen una mayor capacidad eferocítica en comparación con los macrófagos activados M1 [237]. Testamos el efecto que tenían las EVs aisladas de MSC en el proceso de eferocitosis (Fig. 28A). La capacidad de los M $\phi$ 1 para eliminar neutrófilos apoptóticos aumentó significativamente cuando se diferenciaron en presencia de EVs, alcanzando la capacidad fagocítica de los macrófagos M2 (Fig. 28B).



**Figura 28. Capacidad eferocítica de los macrófagos tratados con EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub>.** A) Esquema del diseño experimental *in vitro*. B) La internalización de neutrófilos apoptóticos se midió mediante el aumento en el canal APC y se representó como IFM por cada condición. La IFM relativa se calculó dividiendo todos los datos individuales por la expresión media en M $\phi$ 1. El gráfico representa la media  $\pm$  S.D. de cuatro experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una vía con corrección de Geisser-Greenhouse. Se muestran gráficos de puntos representativo. \* $p < 0.05$ .

#### 4.4.3. Las EVs $MSC-T-HIF^C$ aumentan la inmunosupresión de los macrófagos sobre células T

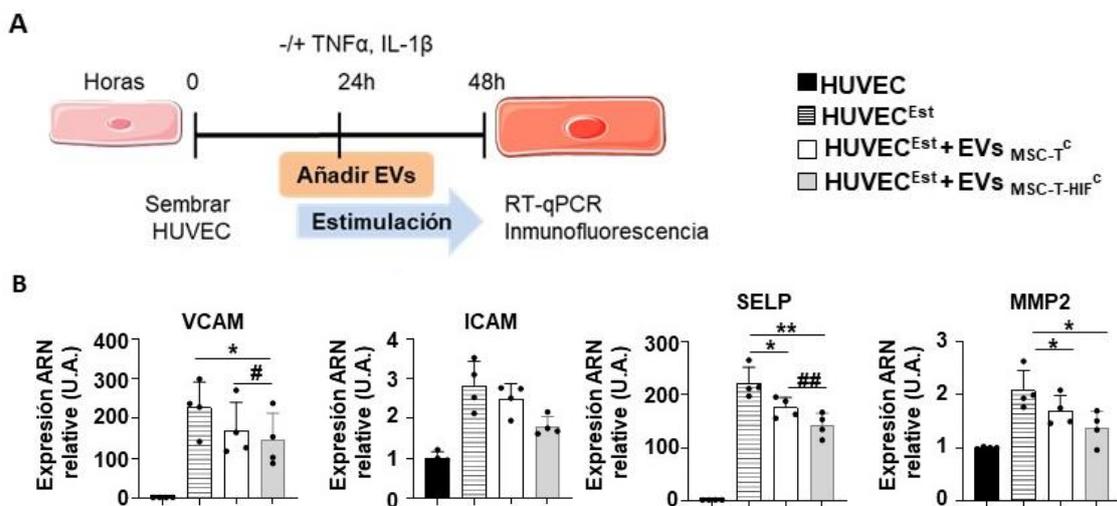
Se sabe que cuando la activación de  $M\phi 1$  disminuye y los macrófagos adoptan un fenotipo regulador/supresor, la homeostasis se restablece en parte mediante la supresión de la proliferación de células T [238]. Desarrollamos un ensayo de proliferación de células T en co-cultivo con macrófagos diferenciados a M1 o M2 (Fig. 29A). Nuestros resultados mostraron que  $M\phi 2$  indujo una drástica disminución en la proliferación de células T en comparación con  $M\phi 1$  (Fig. 29B). El tratamiento con EVs en monocitos diferenciados hacia  $M\phi 1$ , redujo significativamente su capacidad de inducir la proliferación de células T. Además, mientras que los  $M\phi 1$  diferenciados en presencia de  $EV_{MSC-T}^C$  mostraron una diferencia significativa respecto a la capacidad inmunosupresora de  $M\phi 2$ , los diferenciados en presencia de  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  mostraron una capacidad inmunosupresora como si fueran macrófagos tipo M2 (Fig. 29B).



**Figura 29. Capacidad inmunoreguladora de los macrófagos tratados con  $EV_{MSC-T-HIF}^C$ .** A) Esquema del diseño experimental *in vitro*. B) Se desarrolló un ensayo de proliferación de células T. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se tiñeron con CFSE y se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 antes del co-cultivo con macrófagos diferenciados a M1 tratados o no con EVs y M $\phi 2$ . Después de 5 días, las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD3 y se determinó la proliferación de células T mediante la medición por citometría de flujo como dilución CFSE. La supresión (porcentaje) se calculó a partir del índice de expansión. El gráfico representa la media  $\pm$  S.D. de cuatro experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una vía con corrección de Geisser-Greenhouse. Cada forma de símbolo (●, ■, ▲, ◆) representa un experimento diferente emparejado. \* $p < 0.05$ .

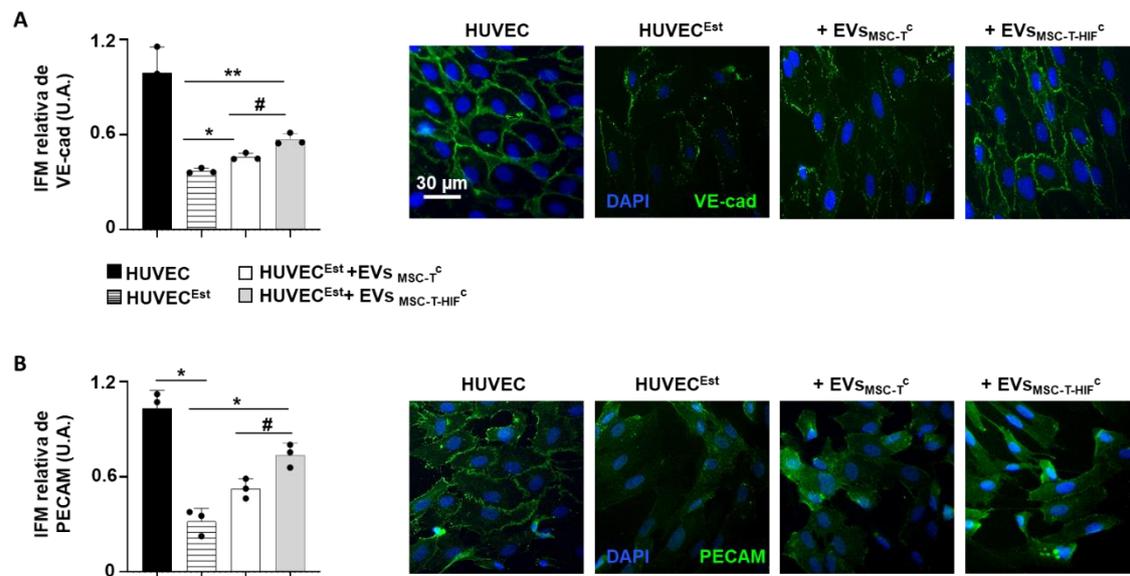
#### 4.5. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> reducen la inflamación y la adhesión de las PBMC al endotelio activado

Las células endoteliales son los principales participantes y reguladores de las reacciones inflamatorias. La adhesión de los leucocitos circulantes al endotelio vascular es el paso fundamental para su extravasación durante la inflamación [239]. Quisimos evaluar cómo las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> afectan al proceso de adhesión y extravasación en el endotelio activado. Las HUVEC fueron estimuladas con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  para simular un entorno inflamatorio y tratadas o no con EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> y EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> (Fig. 30A). Después de 24 horas, se analizó el patrón de expresión de los genes relacionados con la inflamación endotelial, como las selectinas (SELP), las integrinas (VCAM, ICAM) y la metaloproteasa (MMP2) mediante RT-qPCR. La expresión de estos genes se redujo con la adición de EVs derivadas de MSC. Además, se observó que las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> redujeron significativamente la expresión de VCAM y SELP en comparación con las EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub>. Es importante destacar que hubo una reducción notable, aunque no significativa, de la expresión de ICAM y MMP2 entre EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> y EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> (Fig. 30B).



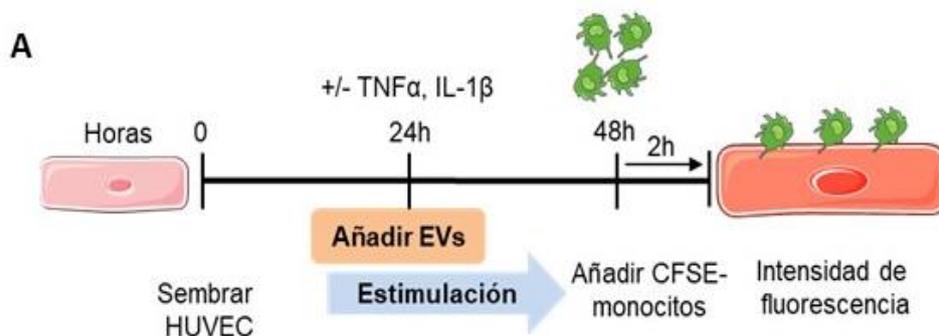
**Figura 30. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> reducen la respuesta inflamatoria del endotelio activado.** (A) Esquema del diseño experimental *in vitro*. (B) Niveles de expresión de VCAM, ICAM, SELP y MMP2 cuantificados por RT-qPCR en HUVEC estimuladas con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (HUVEC<sup>Est</sup>). Las HUVEC<sup>Est</sup> fueron tratadas con EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> y EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub>. Las HUVEC no estimuladas se utilizaron como control. El nivel de expresión del gen diana en cada muestra se normalizó con respecto a la expresión de GAPDH. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de cuatro experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía con corrección de Geisser-Greenhouse. \* o # p < 0.05, \*\* o ## p < 0.05

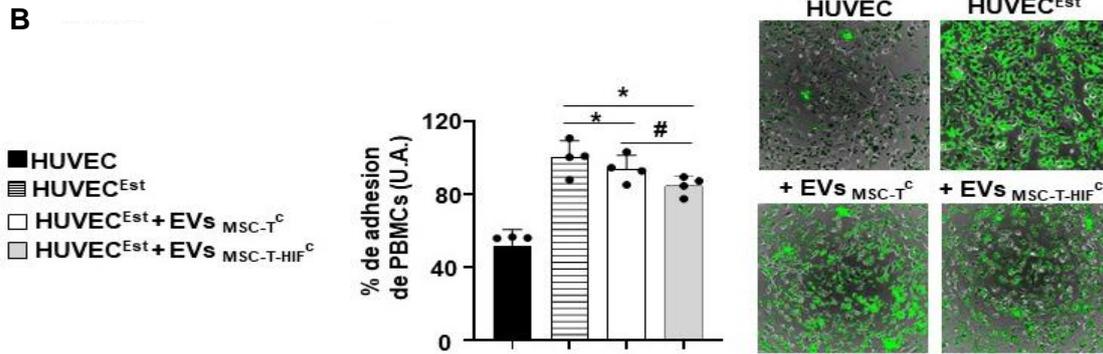
Seguidamente, llevamos a cabo una tinción de inmunofluorescencia contra VE-cad y PECAM para analizar las uniones de adherencia entre las células endoteliales. En concordancia con estudios previamente publicados, el estímulo inflamatorio redujo la cohesión y la organización de estas uniones intercelulares. Sin embargo, en un entorno inflamatorio, las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> fueron capaces de restaurar parcialmente la distribución de VE-cad (Fig. 31A) y PECAM (Fig. 31B) en las HUVEC mejor que las EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub>.



**Figura 31. Las EV<sub>MSC-T-HIF</sub><sup>C</sup> aumentan la adhesión intercelular de las células endoteliales.** Inmunofluorescencia de A) VE-cadherina (VE-cad, verde), B) PECAM (verde) y del núcleo (azul) para mostrar la distribución de estas moléculas en la membrana celular. El gráfico de barras muestra la cuantificación de la IFM en verde. La IFM relativa se calculó dividiendo todos los datos individuales por la expresión media en HUVEC no estimuladas. El gráfico representa la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía con corrección de Geisser-Greenhouse. \* o #  $p < 0.05$ .

Después de obtener estos datos, decidimos realizar un ensayo de adhesión de células inmunes sobre el endotelio generado por las HUVEC. Las PBMCs se tiñeron con CFSE y se añadieron a una monocapa de células HUVEC durante dos horas (Fig. 32A). La condición inflamatoria se consideró como un 100% de adhesión. Observamos una adhesión residual de las PBMCs al endotelio no estimulado, aproximadamente la mitad de las PBMCs no se adhirieron en esta condición ( $51,96 \pm 5,8\%$ ) (Fig. 32B). Observamos que, en condiciones inflamatorias, las EVs fueron capaces de reducir significativamente la adhesión de las PBMCs. En consonancia con los resultados obtenidos para la expresión de moléculas y uniones de adhesión, la reducción de la adhesión de las PBMCs fue significativamente mayor en las EV<sub>MSC-T-HIF</sub><sup>C</sup> en comparación con las EV<sub>MSC-T</sub><sup>C</sup> ( $20,1 \pm 2,3\%$  vs  $9,9 \pm 3,7\%$ ) (Fig. 32B).

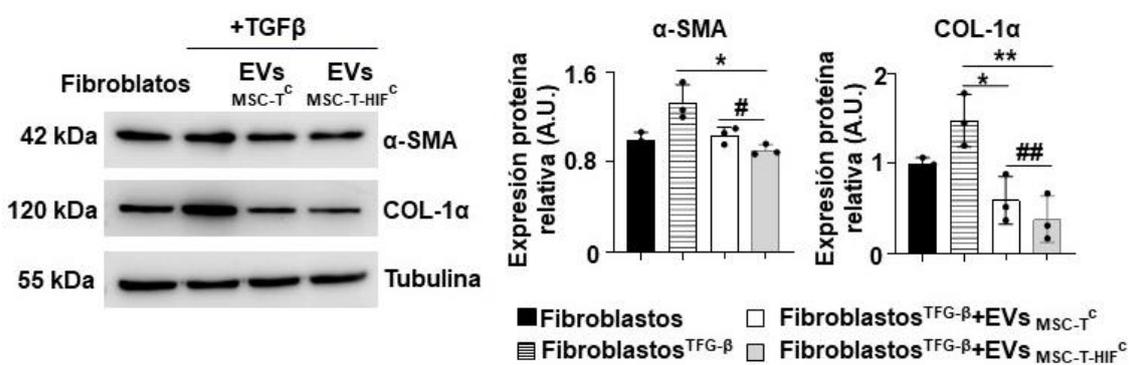




**Figura 32.** Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> reducen la adhesión de las PBMCs al endotelio activado. A) Esquema del diseño experimental in vitro. B) Imágenes de microscopía de PBMC teñidas de verde adheridas a HUVECs no estimuladas y HUVEC<sup>Est</sup> durante 2h, tratadas con EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> o EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub>. El porcentaje de adhesión de PBMCs se calculó considerando la condición estimulada como el 100% de la adhesión. El gráfico representa la media  $\pm$  S.D. de cuatro experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía con corrección de Geisser-Greenhouse. \* o #p < 0,05.

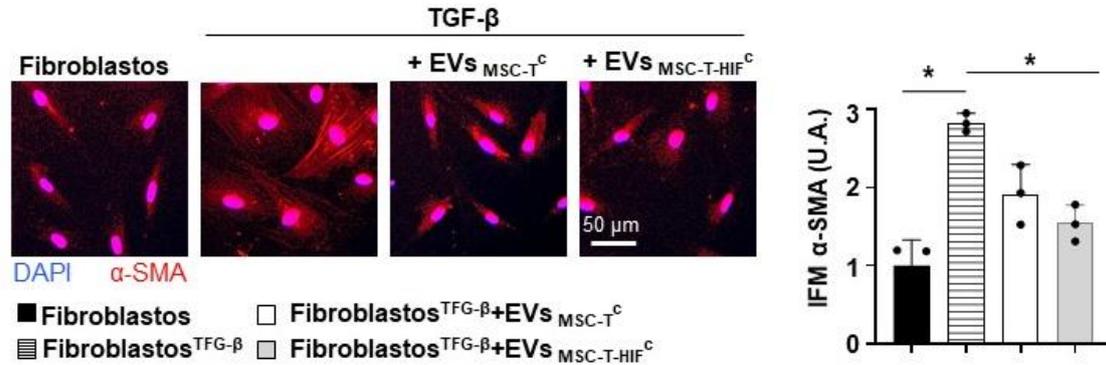
#### 4.6. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> reducen la fibrosis mediada por TFG- $\beta$ en cultivos de fibroblastos

La fibrosis es causada por un proceso inflamatorio crónico inducido por una variedad de estímulos, incluyendo reacciones autoinmunes, y se atribuye a la deposición excesiva de componentes de la matriz extracelular (CME), incluyendo el colágeno [240]. Para analizar cómo afecta la adición de EVs derivadas de MSC al proceso de fibrosis en un contexto inflamatorio, activamos fibroblastos con TGF- $\beta$  y los tratamos con EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> o EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> durante 24h. Se cuantificaron los niveles de  $\alpha$ -SMA y COL-1 $\alpha$  (proteínas relacionadas con la fibrosis) mediante inmunodetección y se encontró que el TFG- $\beta$  aumentaba los niveles de estas proteínas, mientras que las EVs derivadas de MSC eran capaces de reducirlos (Fig. 33). Además, las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> mostraron una capacidad anti-fibrótica significativamente mayor que las EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> reduciendo tanto la expresión de  $\alpha$ -SMA como de COL-1 $\alpha$ .



**Figura 33.** Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> reducen la fibrosis causada por el TGF- $\beta$ . Inmunodetección representativos de las proteínas  $\alpha$ -SMA y COL-1 $\alpha$  en fibroblastos dérmicos no estimulados y estimulados por TGF- $\beta$ , tratados con EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub> o EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub>. Los niveles de expresión se cuantificaron por densitometría en relación con el fibroblasto no estimulado. La tubulina se utilizó como control de carga. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía con corrección de Geisser-Greenhouse. \* o #p < 0,05, \*\* o #p < 0,01

Estos resultados se confirmaron mediante el análisis de  $\alpha$ -SMA utilizando un ensayo de inmunofluorescencia (Fig. 34). Nuevamente, pudimos observar cómo TGF- $\beta$  aumentaba la tinción de  $\alpha$ -SMA, mientras que las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> reducía la presencia de estos filamentos con un potencial significativamente mayor que las EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub>.



**Figura 34. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> reducen la fibrosis causada por el TGF- $\beta$ .** Se evaluó la inmunofluorescencia de  $\alpha$ -SMA (rojo) y del núcleo (azul). El gráfico de barras muestra la cuantificación de la IFM roja. La IFM relativa se calculó dividiendo todos los datos individuales por la expresión media en el fibroblasto no estimulado. El gráfico representa la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía con corrección de Geisser-Greenhouse. \* $p < 0,05$ .

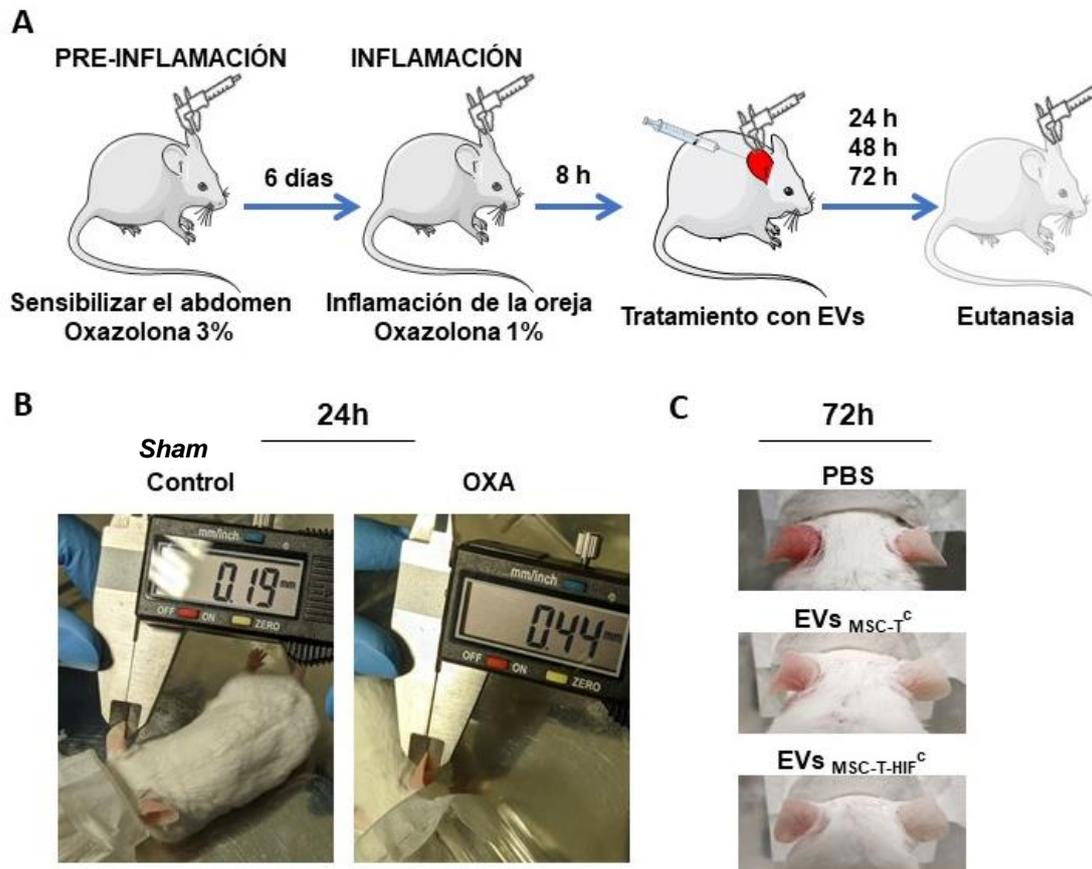
## 5. Potencial inmunosupresor de las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> *in vivo*

Los ensayos *in vitro* utilizados en la investigación inmunológica son útiles para estudiar el papel de los tratamientos sobre cada tipo celular; sin embargo, las reacciones inmunitarias *in vivo* son procesos multicelulares coordinados y requieren modelos animales para desentrañar su complejidad. Por ello, probamos la capacidad inmunosupresora de las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> en dos modelos de ratón que reproducen dos patologías relacionadas con la autoinmunidad y la inflamación: la hipersensibilidad retardada y la colitis ulcerosa.

### 5.1. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> reducen la inflamación en un modelo de hipersensibilidad retardada de tipo IV

El modelo experimental de hipersensibilidad retardada (DTH, del inglés *Delay Type Hypersensitivity*), se trata de un enfoque adecuado para evaluar la respuesta inmune mediada por las células T y los monocitos/macrófagos [241]. El DTH se induce mediante la aplicación tópica de oxazolona en la oreja de animales previamente sensibilizados. El tratamiento, en nuestro caso las EVs, se administra localmente a las 8 horas de la inducción de la inflamación. La respuesta inflamatoria inicial se caracteriza por la hinchazón de la oreja a las 24-48 horas, debido al rápido reclutamiento de macrófagos y neutrófilos. A las 72 horas el animal se sacrifica y la oreja se fija y se conserva en parafina para poder llevar a cabo la histología del tejido (Fig. 35A). La

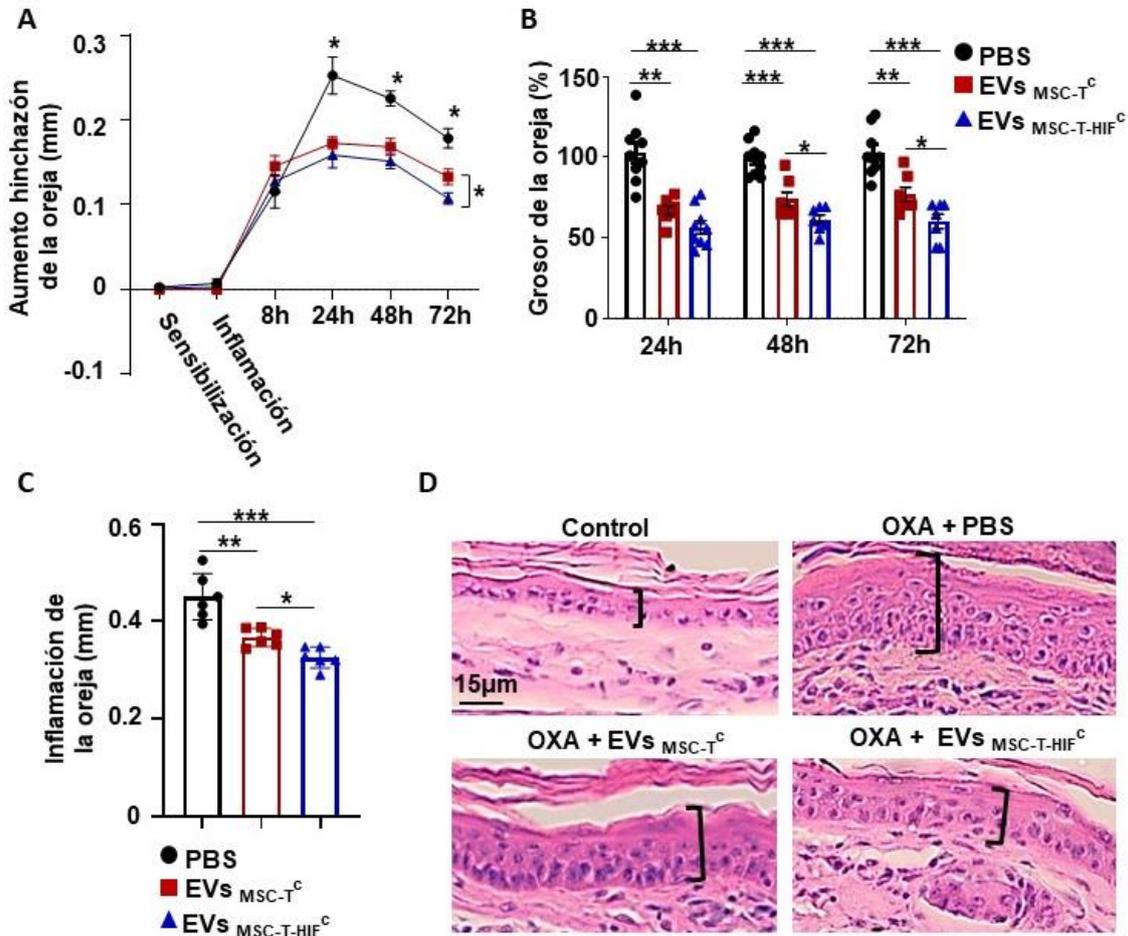
capacidad inmunorreguladora de las EVs se evaluó en un primer momento haciendo medidas diarias del grosor de la oreja utilizando un calibrador digital. Los animales *sham* (simulación) son aquellos a los que se les realiza el procedimiento, pero no llevan el agente que genera el modelo, en este caso la oxazolona y sirven como control. Como se muestra en la figura 35B, estos animales tienen un grosor de oreja normal, mientras que en los tratados con oxazolona aumenta dicho grosor.



**Figura 35. Modelo DTH.** A) Esquema del diseño experimental *in vivo*. B) Imágenes que ilustran el procedimiento utilizado para medir la hinchazón de las orejas utilizando un calibrador digital en un ratón control (izq.) y en ratones tratados con oxazolona (der.). C) Imágenes representativas de las orejas de los ratones tratados con oxazolona 72h después de la inyección subcutánea de PBS,  $EV_{MSC-T^C}$  y  $EV_{MSC-T-HIF^C}$ .

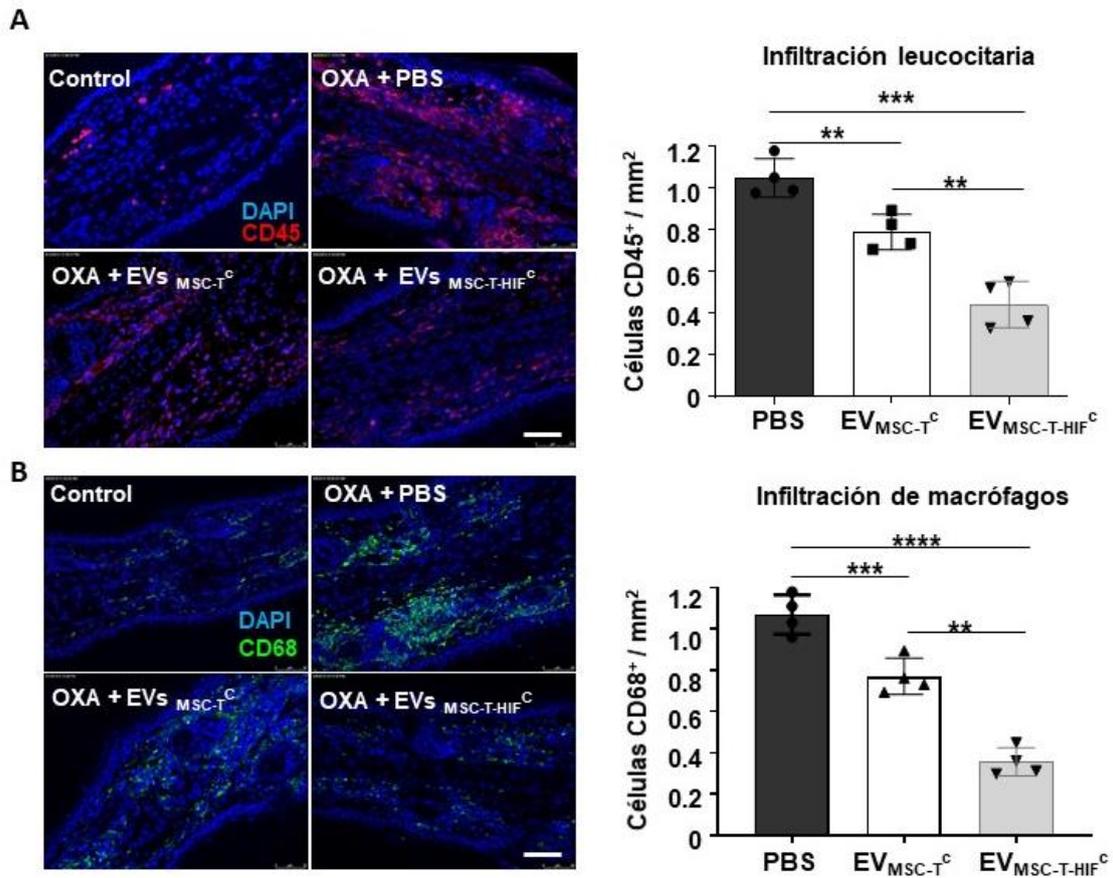
Utilizando este modelo, observamos que las EVs eran significativamente más eficaces que el control (solución salina tamponada con fosfato, PBS) para reducir la inflamación de la oreja, durante todo el proceso inflamatorio. Además, observamos que, a las 72 horas, la eficacia a la hora de reducir la hinchazón era significativamente mayor en  $EV_{MSC-T-HIF^C}$  que las  $EV_{MSC-T^C}$  (Fig. 36A). Como se muestra en la Figura 36B, las  $EV_{MSC-T-HIF^C}$  redujeron el grosor de la oreja en un  $38,64 \pm 2,88\%$  comparado con el control (PBS) 48h después de la inflamación y en un  $40,76 \pm 7,18\%$  a las 72 h. Además de la hinchazón, el DTH se asocia con hiperplasia epidérmica e infiltración de células inmunitarias. El análisis histológico de las preparaciones de oreja mostró que el tratamiento con  $EV_{MSC-}$

$T_{\text{HIF}}^{\text{C}}$  redujeron la hiperplasia y la infiltración celular de forma sustancial en comparación con el tratamiento de  $\text{EV}_{\text{MSC-T}}^{\text{C}}$  y PBS (Fig. 36C-D).



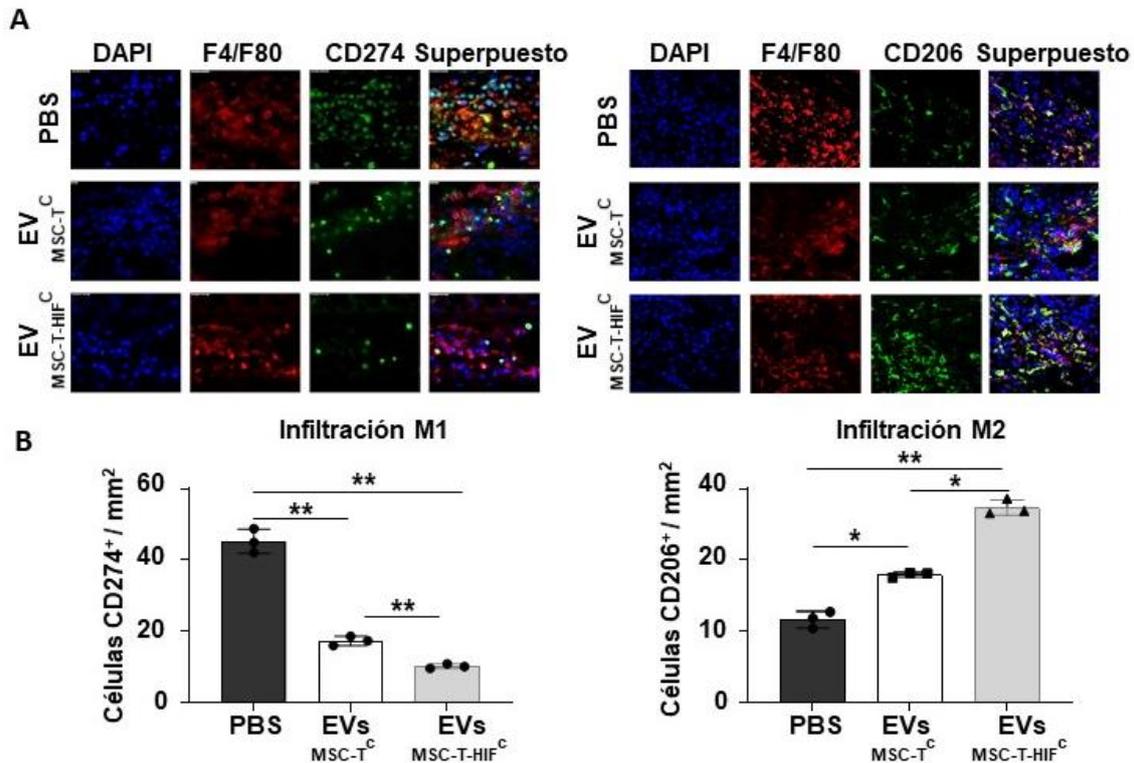
**Figura 36. Las  $\text{EV}_{\text{MSC-T-HIF}}^{\text{C}}$  muestran potencial inmunorregulador en un modelo de ratón de hipersensibilidad retardada.** Los ratones BALB/c fueron sensibilizados mediante oxazolona al 3% en la piel abdominal en el día -5 y la oreja izquierda fue inflamada con oxazolona al 1% a día 0. Los ratones fueron inyectados con los siguientes tratamientos: PBS (círculo negro),  $\text{EV}_{\text{MSC-T}}^{\text{C}}$  (triángulo rojo) o  $\text{EV}_{\text{MSC-T-HIF}}^{\text{C}}$  (cuadrado azul) 8 h después de la inflamación. La oreja derecha no inflamada se utilizó como control. A) Aumento del grosor de la oreja (en mm) en diferentes tiempos. Los datos se presentan como la media  $\pm$  S.E.M. de siete ratones en cada grupo. Se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para evaluar la significancia estadística. B) Grosor de la oreja medido en diferentes tiempos. Los datos reflejan la reducción del grosor causada por cada tratamiento en relación con los ratones control (PBS). El gráfico representa la media  $\pm$  S.E.M de siete ratones de cada grupo. Se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para evaluar la significancia estadística. C) Medición de la hinchazón de la oreja en secciones histológicas. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M del grosor de seis animales. Se utilizó ANOVA para evaluar la significancia estadística. D) Secciones histológicas representativas teñidas con H&E de las orejas a las 72 horas. El aumento del epitelio se indica entre paréntesis. Barra de escala: 15  $\mu\text{m}$ . \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

La infiltración celular se caracterizó además mediante la cuantificación de la infiltración de células  $\text{CD45}^+$  y células  $\text{CD68}^+$  en los cortes de las orejas inflamadas (Fig. 37A-B), mostrando que tanto la infiltración de leucocitos como de macrófagos se reducía drásticamente en los ratones tratados con una única dosis de EVs.



**Figura 37.** Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>c</sup></sub> reducen la infiltración leucocitaria y la presencia de macrófagos en un modelo de ratón de hipersensibilidad retardada (DTH). Inmunodetección de células CD45<sup>+</sup> (A) y CD68<sup>+</sup> (B) en las orejas a las 72 h. Barra de escala: 100  $\mu$ m. Cuantificación de células CD45<sup>+</sup> y CD68<sup>+</sup> por mm<sup>2</sup>. Los datos son relativos a la condición PBS. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.D. de cuatro ratones. Se utilizó ANOVA para evaluar la significancia estadística. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

La reacción inflamatoria DTH está impulsada por la interacción entre células T y monocitos, siendo la polarización de los monocitos un regulador relevante [242]. Por lo tanto, analizamos la presencia de macrófagos M1 (proinflamatorios) y M2 (immunomoduladores) en los cortes de oreja inflamada (Fig. 38A-B). Se observó que, en el punto de tiempo de 72 h, las orejas de los ratones no tratados con EVs mostraban un alto infiltrado M1 mientras que la presencia de macrófagos M2 era escasa. Por otro lado, los ratones trasplantados con EV<sub>MSC-T<sup>c</sup></sub> mostraban un menor infiltrado M1 y una mayor presencia de células M2 en las orejas. Además, cuando se inyectaban EV<sub>MSC-T-HIF<sup>c</sup></sub>, se exagera la polarización de los macrófagos hacia un perfil inmunosupresor.



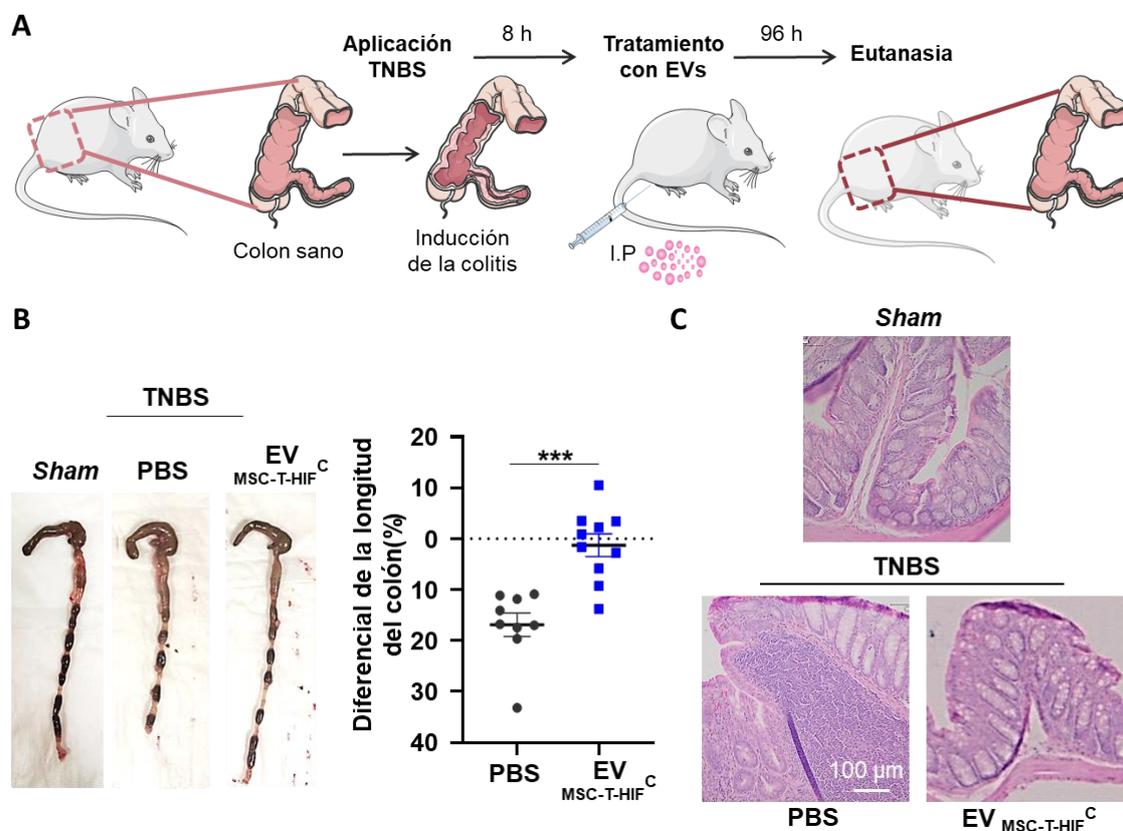
**Figura 38.** Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> aumentan la polarización de macrófagos M2 (inmunomoduladores) en un modelo de ratón de hipersensibilidad retardada (DTH). Inmunodetección de F4/F80 (marcador de macrófagos; rojo) y (A) células CD274<sup>+</sup> (macrófago proinflamatorio (M1); verde) y (B) células CD206<sup>+</sup> (macrófago M2; verde) en las orejas a las 72 h. Barra de escala: 100µm. Cuantificación de células doblemente positivas por mm<sup>2</sup>. Los datos son relativos a la condición PBS. Los gráficos representan la media ± S.D. de cuatro ratones. Se utilizó la prueba ANOVA para evaluar la significancia estadística. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

## 5.2. Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> previenen el acortamiento del colón, la inflamación y la fibrosis en un modelo de colitis aguda

Tanto los experimentos *in vitro*, como el modelo *in vivo* mostraron un mayor beneficio de las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> como agente terapéutico. Hemos demostrado que las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> son más eficaces que las EV<sub>MSC-T-C</sub> a la hora de 1) disminuir la proliferación de las células T, 2) repolarizar los macrófagos hacia un fenotipo M2 y reducir la activación del endotelio y la fibrosis *in vitro* y 3) reducir la inflamación en un modelo hipersensibilidad retardada. Por ello las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> fueron las candidatas para evaluar su efecto terapéutico en un modelo de enfermedad inflamatoria más complejo que el DTH.

El modelo de colitis ulcerosa inducido por TNBS, se basa en el supuesto que en las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) se produce un aumento de la permeabilidad de la mucosa, facilitando el contacto de la lámina propia con antígenos de la luz intestinal. Para evaluar la eficacia de los EVs como tratamiento para las EII, se inyectaron por vía intraperitoneal a ratones Balb/c, 50µg de EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> 8h después de

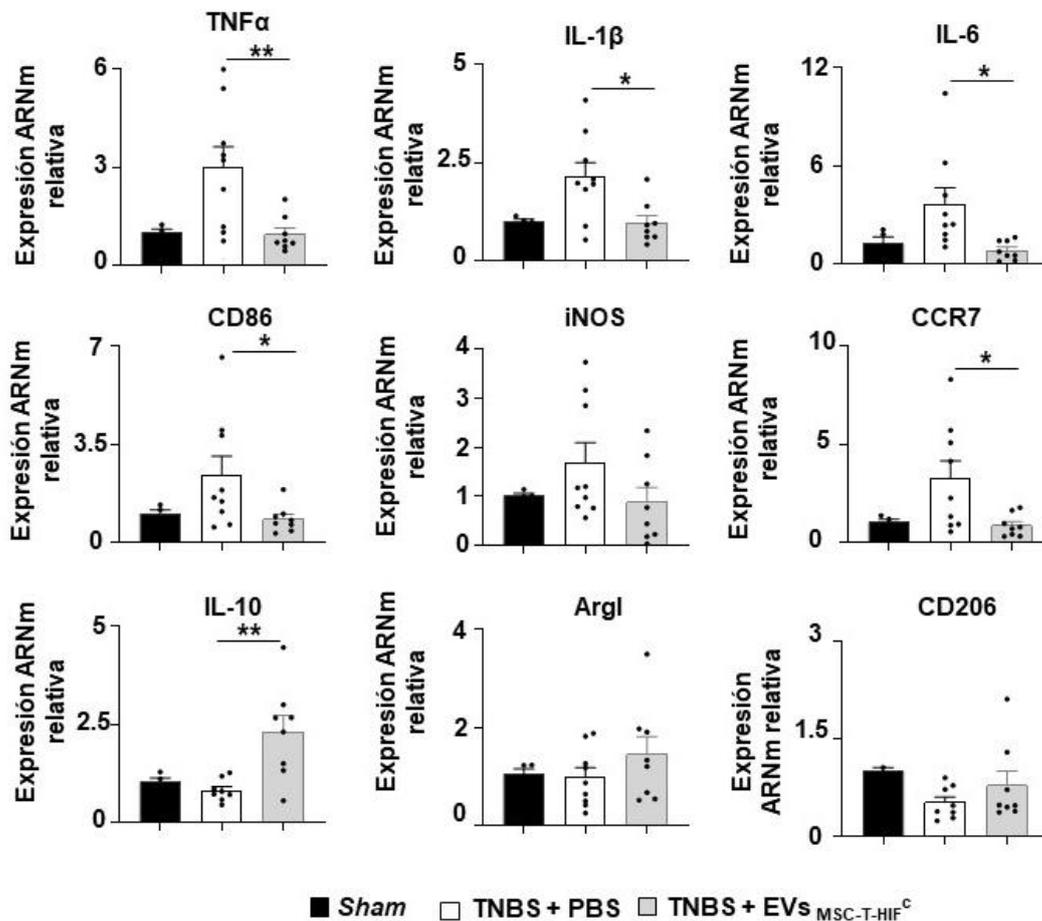
inducir la colitis mediante la administración del TNBS (Fig 39A). Lo que observamos es que el TNBS redujo de forma observable la longitud del colon en comparación con los grupos *Sham* (Fig. 39B). Sin embargo, la administración de  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  recuperó significativamente esta alteración. Los segmentos de colon de los ratones de cada grupo se tiñeron con H&E para observar las alteraciones patológicas. Se observó un daño severo de la mucosa en el grupo TNBS tratado con PBS, caracterizado por la disminución del número de glándulas intestinales, la distorsión de las criptas y la profusa infiltración de células inflamatorias. Sin embargo, los grupos tratados con  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  mostraron una protección de la arquitectura del tejido con un daño histopatológico significativamente menor (Fig. 39C).



**Figura 39. Las  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  atenúan el patrón de la enfermedad en ratones con colitis inducida por TNBS.** A) Imágenes macroscópicas de los tejidos colónicos en el día 5 después de la inducción de colitis por TNBS. Porcentaje de longitud diferencial del colon en comparación con el grupo *sham* (línea de puntos horizontal). Los datos se presentan como la media  $\pm$  S.E.M de nueve ratones en cada grupo. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba *t* (de Student) no pareada. B) Tinción de H&E de secciones histológicas representativas de colonos de ratones en el grupo *sham* y en los grupos PBS y EVs previamente tratados con TNBS. Barra de escala, 100 $\mu$ m.

A continuación, se analizó la expresión de citoquinas inflamatorias y marcadores de macrófagos en el tejido del colon mediante RT-qPCR para encontrar los mecanismos responsables del alivio de los síntomas por las EVs derivadas de MSC. Como se muestra en la Figura 40, los niveles de expresión del ARNm de las citoquinas

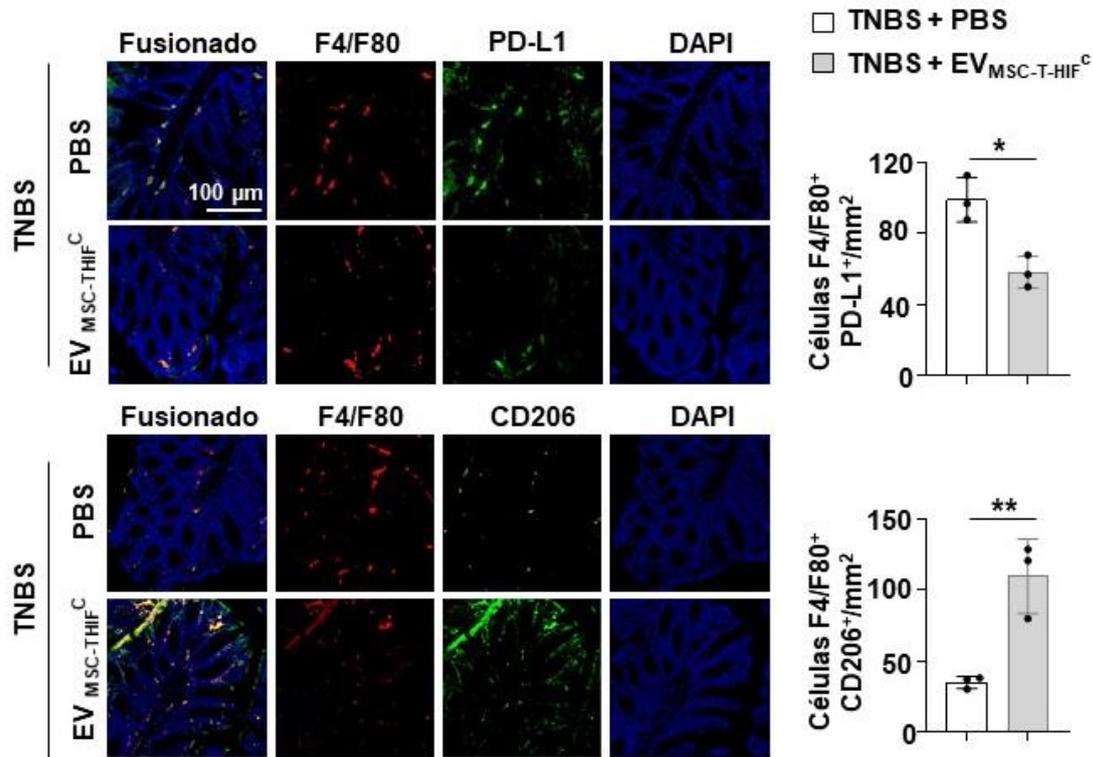
proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) y de los genes asociados a los macrófagos M1 (CD86, iNOS y CCR7) en el grupo tratado con EVs fueron significativamente menores que en el grupo PBS. Mientras que los niveles de expresión del ARNm de la citoquina antiinflamatoria IL-10 aumentaron significativamente en los animales del grupo tratado con EV en comparación con los ratones del PBS. Los resultados de la expresión de los genes asociados a los macrófagos M2 (Arg1 y CD206) mostraron una tendencia, aunque no significativa, de aumento en el grupo tratado con EV en comparación con el grupo PBS. Estos datos revelan que las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> podrían aliviar la respuesta inflamatoria regulando la expresión de citoquinas en la colitis inducida por TNBS.



**Figura 40.** Las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> modifican el patrón de citoquinas propio de la colitis ulcerosa atenúan el patrón de la enfermedad en ratones con colitis inducida por TNBS. Niveles de expresión de ARNm TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CD86, iNOS, CCR7, IL-10, CD206 y Arg1 cuantificados por RT-qPCR en los cólores de los ratones en el grupo sham y en los grupos PBS y EVs previamente tratados con TNBS. El grupo sham se utilizó como control. El nivel de expresión del gen diana en cada muestra se normalizó con respecto a la expresión de  $\beta$ -actina. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.E.M. de nueve experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba *t* (de Student) no pareada. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.

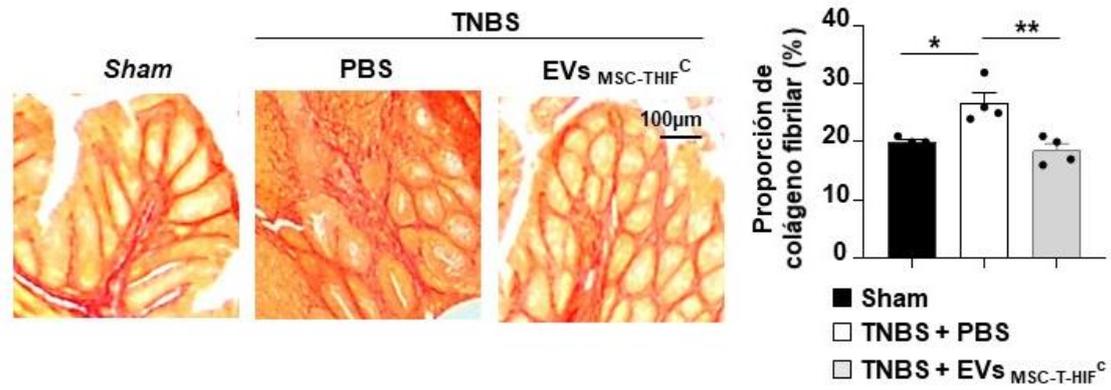
Para corroborar los resultados anteriores, estudiamos el efecto de las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> sobre el fenotipo de los macrófagos infiltrados. Realizamos tinciones de inmunofluorescencia en el colon y observamos que el grupo PBS mostraba una elevada

presencia de macrófagos M1 proinflamatorios ( $F4/F80^+$ - $PD-L1^+$ ) en comparación con los M2 inmunomoduladores ( $F4/F80^+$ - $CD206^+$ ). Sin embargo, los ratones tratados con  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  mostraron un infiltrado M1 significativamente menor y una mayor presencia de células M2 (Fig. 41).



**Figura 41. Las  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  reducen la infiltración de la proporción de macrófagos M1/M2.** Inmunodetección de F4/F80 (marcador de macrófago; rojo) y células PD-L1 (macrófago proinflamatorio (M1); verde) o CD206 (macrófago M2; verde) en el colon 5 días después de la colitis inducida por TNBS. Barra de escala: 100 $\mu$ m. Cuantificación de células doblemente positivas por  $mm^2$ . Se analizaron diez secciones de 0.14  $mm^2$  por ratón. Los gráficos representan la media  $\pm$  S.E.M. de tres ratones. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba *t* (de Student) no pareada. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Para investigar más a fondo los mecanismos subyacentes a la recuperación de la colitis tras el tratamiento con  $EV_{MSC-T-HIF}^C$ , se analizó la fibrosis intestinal mediante una tinción con rojo Sirius para analizar las fibras de colágeno del tejido. La fibrosis intestinal se produce en el contexto de una inflamación que conduce a un daño tisular y a una reconstrucción tisular alterada con una deposición excesiva de matriz extracelular [240]. Nuestros resultados mostraron un aumento significativo del porcentaje de colágeno en el colon del grupo TNBS tratado con PBS en comparación con el *sham* ( $26'8 \pm 2'3$  vs  $20 \pm 0,8$ ). Sin embargo, las  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  redujeron significativamente las fibras de colágeno del colon en comparación con los ratones tratados con PBS ( $18'5 \pm 3'5$  vs  $26'8 \pm 2'3$ ) (Fig. 42), lo que sugiere que el tratamiento con  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  es capaz también de reducir la fibrosis intestinal en los ratones con colitis ulcerosa.



**Figura 42. Las  $EV_{MSC-T-HIF^C}$  reducen la proporción de colágeno fibrilar.** Se utilizó la tinción Rojo Sirio para detectar las fibras de colágeno en el colon. Barra de escala:  $100\mu m$ . Los gráficos representan la media  $\pm$  S.E.M. de cuatro ratones. Se utilizó la prueba  $t$  (de Student) no pareada para evaluar la significancia estadística. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .



# DISCUSIÓN



## 1. MSC como fuente de EVs

La pulpa dental es una fuente eficiente y de fácil disponibilidad de MSC. Sin embargo, no es una de las fuentes más utilizadas para la obtención de MSC, comparada con otras fuentes como la médula ósea (47'6%), el tejido adiposo (18'6%) o el cordón umbilical (20%), su uso apenas representa un 3'5% en los ensayos clínicos [243]. A pesar de eso, las DP-MSC no sólo muestran grandes características inmunoregulatoras como otras fuentes de MSC, sino que tienen una capacidad proliferativa muy elevada que las convierte en una fuente perfecta para el aislamiento de EVs [244]. Otra cuestión muy importante es la edad de las células del donante. Las células obtenidas de donantes más jóvenes son menos susceptibles a los daños y cambios oxidativos, envejecen considerablemente más despacio en el cultivo y tienen una mayor tasa de proliferación [245], [246]. Las DP-MSC obtenidas en el laboratorio son de donantes sanos y jóvenes, de entre 16-18 años, que se someten a la extracción de los cordales cuando no hay suficiente espacio para que crezcan en la parte posterior de la boca, puesto que pueden causar dolor, infección e incluso apiñamiento dental y problemas en la mordida.

A pesar de que las EVs derivadas de las MSC cultivadas en condiciones estándar tienen propiedades inmunosupresoras [86], [98]; su potencia es limitada, por lo que la dosis efectiva de EVs necesaria es muy alta, lo que hace que el desarrollo de una terapia sea un reto. Por ejemplo, Kordelas et al. trataron a un paciente con enfermedad de injerto contra huésped utilizando una dosis de EVs equivalente a la secreción de ~300 millones de MSC [98]. En este estudio, los síntomas clínicos de la EICH mejoraron significativamente poco después del inicio de la terapia, pero no se observó una remisión total o a medio plazo. Se ha demostrado que tanto la modificación de la célula parental como su estimulación desempeñan un papel importante en el aislamiento de las vesículas extracelulares [247]. Los estímulos que las MSC reciben del entorno pueden modular la carga y la liberación de EVs, potenciando sus propiedades inmunoregulatoras y regenerativas [248].

Por un lado, la hipoxia es una característica fisiológica de los nichos inmunológicos [155]. Los cambios en las MSC impulsados por el factor transcripcional HIF-1 $\alpha$  modulan la inmunidad innata y adaptativa controlando la proliferación, diferenciación y función de diferentes células inmunitarias [249]. Cada vez más grupos observan que el preconditionamiento con hipoxia es capaz de potenciar las propiedades inmunosupresoras de las MSC, así como las de sus EVs [250], [251]. Sin embargo, el mantenimiento *in vitro* de las células en condiciones bajas de oxígeno es difícil y la exposición a un entorno normóxico revierte rápidamente las características ganadas.

Anteriormente, trabajos publicados por mi grupo de investigación demostraron que la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  aumentaba la capacidad inmunosupresora de las MSC [174] y que esta modificación genética era capaz de potenciar el potencial angiogénico de las EV<sub>MSC-HIF</sub> [175]. En este trabajo, hemos querido continuar con esta línea y evaluar si la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  junto con el acondicionamiento de las MSC con factores proinflamatorios podría también mejorar las propiedades inmunomoduladoras de las EVs secretadas. Nuestros resultados son corroborados por el artículo de Contreras-López et al. donde muestran que el silenciamiento de HIF1- $\alpha$  en MSC disminuye su potencial inmunosupresor sobre la población de células Th1 y Th17 y limita su capacidad para generar células T reguladoras [249]. Nuestros resultados también demuestran cómo la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  aumenta la secreción de EVs por parte de las MSC. Trabajos anteriores realizados por nuestro laboratorio también mostraron como la estabilización del factor HIF-1 $\alpha$  tanto por condiciones de hipoxia como por modificación genética aumentaba la liberación de EVs por parte de las células parentales [175], [186].

Por otro lado, los cultivos de MSC *in vitro* no muestran las mismas propiedades que cuando están en estado inflamatorio [252]. En este sentido, hemos utilizado un cóctel de citoquinas proinflamatorias que comprendía la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  para aumentar la potencia de las EVs secretadas por las MSC y lograr un tratamiento eficaz. Este cóctel se basó en datos publicados anteriormente con el objetivo de activar las MSC [69], [145]. Entre las citoquinas proinflamatorias, el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y el IFN- $\gamma$  son las moléculas más importantes relacionadas con la activación inmunosupresora de las MSC, y cada una de ellas impulsa diferentes elementos. El TNF- $\alpha$  activa la vía NF- $\kappa$ B, que desempeña un papel central en la regulación de la inmunosupresión de las MSC [223]. La IL-1 $\beta$  regula la migración y las moléculas de la superficie de las MSC encargadas de llegar al sitio de lesión mediante la señalización a través de la vía NF- $\kappa$ B [253]. También aumenta la secreción de otros factores tróficos como el G-CSF a través de un receptor de IL-1 tipo 1 (IL-1R1) [254]. Por último, el IFN- $\gamma$  desencadena la expresión de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que es responsable de suprimir la activación y la proliferación de múltiples células inmunitarias mediante el agotamiento del triptófano y la producción de quineurina [255].

En resumen, hemos demostrado que un acondicionamiento adecuado de las MSC prepara a las células para liberar factores que podrían responder mejor al arduo entorno presente en el lugar de la lesión, caracterizado por una fuerte inflamación y un bajo suministro de oxígeno.

Por último, las MSC no se dividen de forma ilimitada y pierden características terapéuticas tras periodos prolongados de cultivo. Por lo tanto, es extremadamente difícil diseñar y estandarizar adecuadamente cualquier terapia basada en las EVs secretadas por las MSC. En consecuencia, optamos por modificar genéticamente las células secretoras de EVs mediante la sobreexpresión de hTERT para superar esta limitación, ya que las líneas celulares inmortalizadas serán probablemente esenciales para facilitar los futuros procesos de fabricación. La inmortalización con hTERT es una modificación bien descrita de las MSC para eludir la senescencia y favorecer un mayor tiempo de cultivo sin alterar las características terapéuticas [256], [257], [258]. De hecho, en nuestro trabajo, hemos observado que las hTERT-MSc tenían un mayor tiempo de vida en cultivo sin perder las características fenotípicas de las MSC: ni en su capacidad de diferenciación, ni en su capacidad a la hora de secretar EVs inmunosupresoras. Anteriormente, Chen et al. inmortalizaron hESC-MSc sobreexpresando c-myc para obtener una fuente consistente de EVs [259]. Sin embargo, el uso de un oncogén altera significativamente las características biológicas de las células [260] y, aunque los autores demostraron que la capacidad terapéutica de las EVs se mantenía y no se detectaba la presencia de la proteína c-myc, esta estrategia plantea problemas de seguridad. En este sentido, nosotros observamos como la inmortalización con el oncogen SV40 hacia que las células perdieran sus capacidades inmunosupresoras y aumentarían excesivamente su tasa replicativa. Por el contrario, nuestros datos sustentados por los de otros investigadores, indican que el uso de hTERT es más seguro, ya que no modifica profundamente el comportamiento de las MSC e incluso mejora algunas características relevantes de las mismas [261], [262], [263].

## 2. Uso de EVs en terapias inmunosupresoras

Las células estromales mesenquimales (MSC) son un subconjunto de células multipotentes similares a las adultas que se han postulado como las candidatas óptimas para la terapia celular debido a sus características inmunomoduladoras y regenerativas. Debido a la falta de resultados inequívocamente positivos obtenidos en los numerosos ensayos clínicos realizados hasta la fecha [56], los investigadores han vuelto al laboratorio para diseñar estrategias terapéuticas más eficientes basadas en las MSC. En este sentido, las EVs secretadas por las células estromales podrían ser una buena alternativa como terapia de nueva generación [264].

Además, la terapia con EVs tiene ventajas significativas sobre la terapia celular convencional, ya que pueden formularse como un producto "listo para usar" [265]. El uso de EVs también cuenta con beneficios en términos de seguridad, fabricación y

logística. Por ejemplo, debido a su pequeño tamaño, las EVs pueden esterilizarse por filtración. En consecuencia, los estándares de las salas limpias no tendrían que ser tan elevados como los necesarios para la producción de medicamentos de terapia avanzada a la hora de esterilizar el producto final [266]. Al mismo tiempo, las EVs son mucho más fáciles de manejar que las células. Las condiciones de congelación, descongelación y almacenamiento son menos críticas para la integridad de las EVs que para las células, lo que debería facilitar su manipulación en centros sanitarios y hospitales [267]. Además, las EVs son más seguras que las células vivas en los pacientes. Las vesículas no tienen ADN nuclear y son elementos no replicativos, lo que disipa las preocupaciones de transformación maligna tras la infusión [126], [127].

La modificación genética de las MSC se ha utilizado anteriormente como herramienta para investigar el comportamiento biológico y los posibles mecanismos terapéuticos, pero nunca se pretendió utilizarla para la terapia en humanos debido a las preocupaciones de seguridad [268]. Sin embargo, el uso de EVs como productos finales supera esta limitación. Debido al mínimo riesgo de transferencia de transgenes tras el trasplante, es posible manipular las células secretoras de EVs tanto genéticamente como mediante factores de señalización para potenciar las características terapéuticas de los productos obtenidos. Esto podría anunciar una nueva era en la terapia celular. En este sentido, no hemos podido garantizar que los transgenes utilizados para modificar genéticamente las MSC (HIF-1 $\alpha$  y TERT) puedan transportarse dentro de las EVs, lo que supone una limitación que habrá que solventar en futuros ensayos.

A pesar de las ventajas ofrecidas por las terapias basadas en EVs, su desarrollo se ve frenado por obstáculos como la heterogeneidad inherente y la complejidad biológica o tecnológica, que dificultan el hallazgo de la sustancia terapéuticamente activa (es decir, el componente activo) y su modo de acción definido (MoA). El modo de acción de las terapias basadas en EV derivadas de células expandidas *in vitro* puede verse influido por diversos factores: la diversidad de las MSC y de sus condiciones de cultivo; los distintos métodos de producción y separación de las EVs; la falta de estandarización del producto entre lotes; y la limitada reproducibilidad de los ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*. Además, garantizar la eficacia y seguridad de las EVs para su uso en clínica, requiere de la determinación de su identidad y pureza, lo que supone muchas veces la tarea más complicada en el desarrollo de la terapia. Para ello, la ISEV inició en 2014 la estandarización de las técnicas de aislamiento y caracterización de las EVs. Las directrices de la ISEV fueron actualizadas en 2018 por 382 investigadores [65]. Entre ellas encontramos: 1) establecer el tamaño y rendimiento, 2) garantizar la morfología y la presencia de una bicapa, 3) confirmar la presencia de marcadores

específicos, diferenciándolas de los restos celulares, 4) eliminar cuidadosamente los contaminantes y 5) evitar el mal uso de la nomenclatura cuando no haya una identificación clara de la subpoblación. Para mejorar aún más el rigor y la reproducibilidad, en 2017 se creó la plataforma EV-TRACK, una base de conocimientos colectivos que permite a los autores depositar sus protocolos de aislamiento y caracterización antes de su publicación, así como recibir recomendaciones sobre posibles deficiencias del diseño experimental [269]. Sin embargo, aún se necesitan más estudios y guías de trabajo para evitar que suceda lo mismo que pasó con el uso de MSC en los ensayos clínicos. Si efectivamente el “proceso” es el producto, entonces los criterios mínimos de aceptación del uso de MSC-EVs deben abarcar tanto las células productoras como las vesículas derivadas de ellas [266].

Este trabajo cuenta con varias limitaciones a la hora de producir y validar las EVs como producto terapéutico que es importante destacar e intentar solventar en próximos proyectos. Por una parte, para facilitar la aprobación de las EVs en clínica, es esencial definir las condiciones de cultivo de las MSC, que deben estar en consonancia con las normas GMP [270]. Además, las tecnologías de purificación y aislamiento también pueden alterar sustancialmente la composición del producto final. El aislamiento de EVs por ultracentrifugación, resulta en una elevada heterogeneidad entre lotes ya que arrastra muchas veces proteínas presentes en el medio, lo representa un problema a la hora de definir el producto y por tanto en la aprobación relativa a la seguridad. Métodos de aislamiento por exclusión de tamaño podrían generar un producto más reproducible, capaz de pasar los controles de seguridad y eficacia necesarios para la aprobación reglamentaria en ensayos clínicos. Por otro lado, para cumplir con las normas GMP, los componentes xenogénicos como el FBS deben eliminarse al menos durante la fase de producción de EVs [271]. En primer lugar, por posible contaminación con patógenos animales (por ejemplo: virus específicos, micoplasma, priones) al no poder excluirse por completo y, en segundo lugar, por posibles reacciones inmunitarias a las proteínas del suero bovino por parte de los pacientes. En este trabajo hemos usado FBS depletado de EVs durante la fase de producción, por lo que en el futuro deberemos validar los resultados utilizando un medio comercial libre de suero animal y a poder ser sin antibióticos para poder trasladar nuestra terapia a la clínica.

En los últimos años se ha demostrado que las vesículas extracelulares (EVs) liberadas por las MSC son capaces de reproducir los efectos beneficiosos de las células de las que proceden [272], [273]. Las EVs son partículas con membrana que juegan un papel clave en la comunicación célula-célula [274]. Las EVs pueden llegar a los tejidos dañados e interactuar con las células circundantes transmitiendo todo tipo de moléculas

como quimioquinas, citoquinas, factores de crecimiento, receptores de membrana, lípidos y miARNs [275]. La transferencia de todo este contenido protegido dentro de las EVs puede cambiar el destino y las propiedades de las células diana, siendo ésta su principal función fisiológica [276].

En consecuencia, en este trabajo, hemos demostrado una interacción activa entre las MSC-EVs y distintas células del sistema inmune como primer paso en la respuesta inmunosupresora de las EVs. Otros grupos ya han demostrado una captación por parte de las células del sistema inmune con otras fuentes de EVs [277], [278]. Al igual que estos grupos, nosotros también hemos observado una elevada captación por parte de los macrófagos y una notable pero no tan grande captación por parte de los linfocitos B, ambos tipos celulares actúan como células presentadoras de antígenos y como tal, su capacidad fagocítica es muy elevada [279]. En contraste con los resultados obtenidos por Rutman et al. hemos visto una captación muy elevada de EVs por parte de los neutrófilos, esto nos parece lógico porque los monocitos y los neutrófilos son células fagocíticas por excelencia [280].

### **3. Potencial inmunosupresor de las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> *in vitro***

En el presente estudio, confirmamos los informes anteriores [86], [281], [282] de que las EVs derivadas de MSC pueden reproducir las características inmunosupresoras de las células parentales y modular la proliferación de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. También hemos observado que las EVs derivadas de MSC están cargadas de diversas moléculas con capacidad inmunomoduladora, como IDO y PD-L1.

Además, hemos demostrado que, mediante la simulación de una condición inflamatoria en las MSC, conseguimos que las EVs liberadas presenten propiedades inmunomoduladoras mejoradas. En este sentido, hemos observado que las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> desempeñan una potente respuesta inmunorreguladora y antiinflamatoria mediante los siguientes procedimientos *in vitro*: I) induciendo una mayor inmunosupresión en las poblaciones de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, II) expresando mayores niveles de los factores inmunomoduladores como IDO y PDL1, III) reduciendo la actividad citotóxica de las células NK; IV) repolarizando la diferenciación de los macrófagos M1 hacia los macrófagos tipo M2, fenotípica y funcionalmente; V) reduciendo la adhesión de las PBMC al endotelio estimulado y restaurando parcialmente la arquitectura del endotelio no inflamado, al disminuir el reclutamiento masivo de células inmunes a los tejidos; VI) previniendo de la fibrosis excesiva causada por una resolución alterada de la inflamación.

Hemos demostrado que la estimulación de las MSC parentales aumentaba la carga de moléculas inmunosupresoras en las EVs y además aumentaba casi 3 veces la capacidad de inmunosupresión de las EVs sobre la proliferación de linfocitos T activados, afectando tanto a las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Estos resultados están en consonancia con un informe de Kim et al., que demostró que las EVs derivadas de MSC y estimuladas con IFN- $\gamma$  ejercían efectos inmunosupresores en un modelo murino de EICH [283]. Nuestros resultados indican que la estimulación de las MSC es probablemente esencial para potenciar sus efectos inmunomoduladores. La inhibición de la proliferación de células T por parte de las MSC está mediada principalmente por la regulación al alza de la (IDO) [284], muchos autores han encontrado elevadas concentraciones de la molécula IDO dentro de las MSC-EVs [150],[88]. En nuestro trabajo, observamos como gracias a la estimulación de las MSC mediante el cóctel de citoquinas y a la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$ , la concentración de IDO en las EVs se ve incrementada significativamente. En cuanto a la molécula PD-L1, existen numerosos estudios en inmunoterapia del cáncer los cuales manifiestan que los EVs derivados de las células tumorales expresan en la membrana moléculas de PD-L1 para frenar la inmunidad el entorno. Su unión al receptor PD-1 (punto de control inmunitario) en la superficie de las células T efectoras transduce una señalización negativa en su actividad [285], [286]. Por otra parte, aunque se sabe poco sobre el papel del eje PD-1/PD-L1 en la polarización de los macrófagos, también hay varios trabajos en inmunoterapia del cáncer que sugieren que la unión de PD-L1 a PD-1 promueve la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M2 [287], [87], [288]. En este trabajo se ha manifestado por citometría de flujo la presencia fuertemente aumentada de PD-L1 en las membranas de las EVs derivadas de MSC estimuladas con citoquinas y que sobreexpresaban HIF-1 $\alpha$ , cuya unión al PD-1 tanto de células T como de macrófagos podría ser responsable en parte de la inmunosupresión vista en los diferentes ensayos *in vitro*.

Di Trapani *et al.*, observaron que las MSC-EV estimuladas con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  reducían la proliferación de las células NK con mayor eficacia que las MSC-EV control [248]. En este trabajo, nosotros también hemos podido comprobar una mayor inmunosupresión ejercida por parte de las EVs estimuladas que por las EVs control. En este caso, las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> reducían la citotoxicidad mediada por las NK y reducían genes relacionados con su activación como el NCR3 [234].

Existen varias formas activadas de macrófagos, pero en términos generales, hay dos grupos principales. Los macrófagos M1 que estimulan la inflamación y los macrófagos M2 que disminuyen la inflamación y estimulan la reparación de los tejidos. Otros autores han establecido previamente cómo las EVs derivadas de MSC

precondicionadas tienen una mayor capacidad de alterar el fenotipo M1/M2 [148], [289]. En este sentido, nuestra contribución ha sido demostrar que el cambio M1/M2 puede tener lugar durante el proceso de diferenciación de los monocitos en macrófagos. En Ti et al. y Lo Sicco et al., se añadieron las EVs a THP1 diferenciados y a macrófagos diferenciados, respectivamente. Sin embargo, en nuestro trabajo, las EVs se añadieron en el día 0 de la diferenciación de los monocitos y fueron capaces de repolarizar la diferenciación de M $\phi$ 1 hacia M $\phi$ 2. Creemos que esto es relevante ya que los monocitos circulantes migran a las zonas lesionadas y, como progenitores de M $\phi$ , representan el primer eslabón para la intervención.

Muchos autores han analizado el condicionamiento hipóxico para potenciar el efecto angiogénico de las EVs aisladas de MSC [157], [175], [160]. Pero se ha estudiado menos el efecto de las EVs aisladas de MSC en hipoxia sobre la adhesión e integridad endotelial en condiciones inflamatorias. Merino et al. han demostrado recientemente los efectos regenerativos de partículas de membrana generadas a partir de MSC de tejido adiposo sobre las células endoteliales [290] y Lopatina et al. han demostrado que las EVs liberadas por las MSC de tejido adiposo y estimuladas con PDGF *in vitro* mejoran la adhesión de las PBMC al endotelio [291]. En este sentido, hemos demostrado que las integrinas y las moléculas de adhesión, como VECAM, ICAM y E-selectina, se reducen más cuando el endotelio estimulado se trata con EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> que con EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub>, lo que da lugar a una menor adhesión de las PBMC al endotelio activado. Además, la EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> también regulan a la baja la expresión de la MMP-2, una enzima proteolítica que desempeña un papel importante en la extravasación de células inmunitarias, degradando las uniones entre el endotelio y la matriz extracelular [292]. Además, las EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> aumentan la expresión de las uniones adherentes y uniones de adhesión como VE-Cad y PECAM, lo que complicaría la extravasación de células inmunes a través de las células endoteliales activadas, restaurando su arquitectura fisiológica.

La señalización del TGF- $\beta$  es responsable de impulsar la fibrosis en muchos trastornos, como las enfermedades inmunológicas, incluida la enfermedad inflamatoria intestinal [122]. Otras investigaciones informaron previamente de que la administración de EVs aisladas de MSC en hipoxia podría reducir notablemente la expresión de colágeno-1 y  $\alpha$ -SMA, preservando la inflamación de las vías respiratorias y la fibrosis [293]. En el presente estudio, hemos demostrado que los fibroblastos estimulados por TGF- $\beta$  tratados con EV<sub>MSC-T-HIF<sup>C</sup></sub> disminuyen la expresión de colágeno-1 y  $\alpha$ -SMA de forma más significativa que los EV<sub>MSC-T<sup>C</sup></sub>, apuntando a los efectos beneficiosos de la modificación genética de HIF-1 $\alpha$  para el uso de EVs en la mejora de la fibrosis.

#### 4. Potencial inmunosupresor de las $EV_{MSC-T-HIF}^C$ *in vivo*

El incremento del potencial terapéutico por parte de las  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  se ha visto respaldado por las siguientes observaciones *in vivo*: I) reduciendo la inflamación y la infiltración de leucocitos e induciendo la polarización de  $M\phi 2$  en un modelo de ratón de hipersensibilidad retardada; II) promoviendo la curación de la colitis en un modelo de ratón de la enfermedad de Crohn, preservando la longitud del colon y la arquitectura de la mucosa intestinal y alterando la proporción de infiltración  $M\phi 1/M\phi 2$ .

El término hipersensibilidad se refiere a una respuesta inmunitaria adaptativa inapropiada o exagerada que provoca daños en los tejidos. Existen cuatro tipos principales de reacciones de hipersensibilidad. La hipersensibilidad de tipo IV o hipersensibilidad retardada (DTH), recibe ese nombre ya que la reacción tarda varios días en ser evidente. El DTH se ha utilizado ampliamente en ratones como modelo para el estudio de fármacos antiinflamatorios [294]. Es el único tipo de hipersensibilidad mediada por células y no por anticuerpos como sucede en el resto [295]. Los linfocitos CD4 Th1 efectoras son los principales responsables en desencadenar el proceso inflamatorio, aunque también participan macrófagos, linfocitos CD8 y células NK. La histopatología de las lesiones DTH varía según la naturaleza del antígeno, el tipo de células efectoras y la localización anatómica. En algunas enfermedades autoinmunes, las células Th1 reconocen específicamente los autoantígenos para causar daños en los tejidos, ya sea por citotoxicidad directa o por respuestas inflamatorias mediadas por macrófagos activados. En la diabetes de tipo 1, las células Th1 median la destrucción de las células B de los islotes pancreáticos; en la esclerosis múltiple, las células Th1 reaccionan contra las proteínas básicas de la mielina; mientras que en la artritis reumatoide las células Th1 son activadas contra proteínas de las articulaciones. El modelo DTH puede usarse como modelo básico para representar la etiología de este tipo de enfermedades autoinmunes y testar fármacos potenciales [296].

Nosotros elegimos el modelo murino de DTH para probar el efecto de las  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  porque se trata de un enfoque útil y a corto plazo para evaluar las respuestas inmunitarias mediadas por células asociadas principalmente a la reactividad Th1. En nuestro caso la hipersensibilidad la inducimos mediante la aplicación tópica de oxazolona en la oreja de animales que habían sido previamente sensibilizados con aplicaciones tópicas de oxazolona en la piel del abdomen [297]. El trabajo de Contreras-López et al. citado anteriormente, también corrobora los datos obtenidos en el modelo *in vivo*. En este trabajo, confirman mediante el modelo DTH el papel crítico de HIF-1 $\alpha$  en el efecto inmunosupresor de MSC, mostrando que el silenciamiento de HIF1- $\alpha$  afecta

la capacidad de las MSC para reducir la inflamación e inhibir la generación de células T proinflamatorias *in vivo* [249].

La enfermedad de Crohn es un tipo de enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Se trata de una enfermedad inflamatoria crónica recidivante que está mediada inmunológicamente. Se conocen dos mecanismos fundamentales asociados a su patogénesis: la transición mesenquimal-epitelial y el aumento del infiltrado inflamatorio, que termina con una elevada liberación de citoquinas inflamatorias y la remodelación de la matriz extracelular [298]. Como se ha mencionado anteriormente, la terapia con MSC se ha postulado como un candidato potencial para las enfermedades inflamatorias inmunomediadas, como la enfermedad de Crohn [299]. De hecho, sólo una terapia avanzada con MSC (Darvadstrocel) está aprobada en la UE y es para el tratamiento de fístulas perianales complejas en la enfermedad de Crohn [300]. Actualmente, varios estudios experimentales y ensayos clínicos están investigando el potencial de la administración de EVs derivadas de MSC para mejorar la patología de la enfermedad de Crohn [301]. Nuestros resultados demuestran que las  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  pueden interactuar con las células inmunitarias, el endotelio y los fibroblastos modificando su condición proinflamatoria hacia un fenotipo que resuelva la inflamación y promueva la curación de los tejidos. A la luz de lo anterior, las  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  podrían convertirse en un nuevo candidato terapéutico para el tratamiento de trastornos autoinmunes como la enfermedad de Crohn.

La colitis inducida por TNBS es un modelo animal experimental que recapitula la patogénesis de la enfermedad de Crohn humana. La administración de TNBS provoca una importante respuesta inmunitaria inducida por la IL-12 liberada por las células Th1 [302]. Las células Th1 también producen IFN- $\gamma$ , que impulsa a los monocitos reclutados hacia el fenotipo M $\phi$ 1, lo que da lugar a un aumento de citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y la IL-6 [303]. Hemos observado que la inyección de TNBS regula al alza la expresión de estas citoquinas. Sin embargo, los ratones tratados con  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  mostraron tanto una reducción de las citoquinas proinflamatorias como un aumento de la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10. La IL-10 actúa regulando las respuestas proinflamatorias excesivas al inhibir la capacidad de las células presentadoras de antígeno de presentar los antígenos a las células T y es producida en gran medida por los macrófagos M2 [304]. En este sentido, planteamos la hipótesis de que el efecto curativo de las  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  en la colitis se produce en parte al dirigirse a los monocitos circulantes y modificar su fenotipo hacia M $\phi$ 2. El tratamiento con  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  reduce la expresión de marcadores M $\phi$ 1 (iNOS, CD86 y CCR7) y aumenta la expresión de marcadores M $\phi$ 2 (Arg1 y CD206) en el intestino. Confirmamos esta

hipótesis con el estudio de inmunofluorescencia que muestra que el tratamiento con  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  reduce la proporción  $M\phi 1/M\phi 2$  de los macrófagos infiltrados.

La inflamación intestinal suele conducir a la fibrosis intestinal que puede observarse en el modelo de colitis inducida por TNBS. Esta fibrosis también es una condición fisiopatológica observada en la enfermedad de Crohn [305]. Se sabe que un exceso de actividad de los macrófagos M2 puede contribuir a la fibrosis intestinal [306]. En este sentido, hemos demostrado que el tratamiento con  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  no sólo no favorece el aumento de la fibrosis intestinal, sino que es capaz de reducir el exceso de fibrosis generado por la administración de TNBS.

Resumiendo, en este trabajo hemos demostrado que las  $EV_{MSC-T-HIF}^C$  pueden interactuar con diferentes células responsables de la situación inflamatoria como los linfocitos T, las células NK, los macrófagos M1 y el endotelio y los fibroblastos en estado activado, proporcionando una potencial terapia "libre de células" para el tratamiento de enfermedades inmunológicas e inflamatorias.

A pesar de que estos dos modelos de enfermedad son inducidos por un agente irritante que aumenta la inflamación tisular, no representan al completo los síntomas observados en las patologías humanas que simulan. En próximos ensayos sería interesante buscar otros modelos más representativos de enfermedades inflamatorias inmunomediadas. Sin embargo, estos modelos sencillos de analizar y capaces de recapitular algunas de las características fisiopatológicas de las IMID han aportado una gran evidencia de que las EVs derivadas de MSC modificadas genéticamente y cultivadas en condiciones como las que se dan en un estado inflamatorio son capaces de crear un microambiente local favorable para el proceso de curación del tejido.

Así, nuestro trabajo abre la puerta a futuros estudios para evaluar si los protocolos de modificación genética utilizados anteriormente para comprender mejor la biología de la terapia celular pueden ahora replantearse como estudios traslacionales y utilizarse como peldaños para nuevas estrategias terapéuticas.

Aunque serán necesarios más estudios preclínicos y clínicos para investigar los mecanismos que subyacen a la aparentemente excelente capacidad terapéutica mostrada por las  $EV_{MSC-T-HIF}^C$ , creemos que nuestra estrategia es muy prometedora para su aplicación práctica.



# CONCLUSIONES



- La sobreexpresión del factor inducible por hipoxia HIF-1 $\alpha$  aumenta el potencial inmunosupresor de las MSC
- La inmortalización de las MSC ha garantizado una fuente de EVs de larga vida *in vitro*. Gracias a esto, se han reducido los costes y el tiempo en el aislamiento de las EVs y se ha aumentado la reproducibilidad de los experimentos.
- El acondicionamiento de las células ha generado una respuesta positiva en el potencial inmunosupresor de las EVs derivadas de MSC, aumentando su número y modificando su contenido hacia un fenotipo más inmunosupresor.
- Las EV<sub>MSCHIF<sup>C</sup></sub> han demostrado poseer un potencial regenerativo e inmunosupresor mayor que las EVs derivadas de MSC no potenciadas *in vitro*:
  - Reduciendo la proliferación de células T
  - Disminuyendo la actividad citotóxica de las células NK
  - Aumentando la repolarización de M $\Phi$ 1 hacia M $\Phi$ 2
  - Preservando la arquitectura endotelial
  - Moderando la adhesión de las PBMC al endotelio activado
  - Evitando la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos
- Las EV<sub>MSCHIF<sup>C</sup></sub> han demostrado poseer un potencial regenerativo e inmunosupresor en modelos animales de patologías humanas como son la hipersensibilidad de tipo IV o la colitis inducida por TNBS.
- Estas EVs pueden proporcionar una herramienta nueva y segura para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y otras enfermedades inflamatorias.



# BIBLIOGRAFÍA



- [1] D. D. Chaplin, "Overview of the immune response," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 2 SUPPL. 2, 2010.
- [2] L. Koenderman, W. Buurman, and M. R. Daha, "The innate immune response," *Immunology Letters*, vol. 162, no. 2. 2014.
- [3] F. A. Bonilla and H. C. Oettgen, "Adaptive immunity," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 2 SUPPL. 2, 2010.
- [4] D. Boraschi, "How Innate and Adaptive Immunity Work," in *Nanoparticles and the Immune System: Safety and Effects*, 2013.
- [5] M. R. Shurin, "Immune-mediated diseases: From theory to therapy," in *IDrugs*, 2007, vol. 10, no. 11.
- [6] Abul K. Abbas, *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, Sixth Edition*, vol. 110, no. 9. 2017.
- [7] A. Davidson and B. Diamond, "Advances in Immunology: Autoimmune diseases," *N. Engl. J. Med.*, vol. 345, no. 5, 2001.
- [8] H. El-Gabalawy, L. C. Guenther, and C. N. Bernstein, "Epidemiology of immune-mediated inflammatory diseases: Incidence, prevalence, natural history, and comorbidities," *Journal of Rheumatology*, vol. 37, no. SUPPL. 85. 2010.
- [9] L. Puig *et al.*, "Prevalence of ten Immune-mediated inflammatory diseases (IMID) in Spain," *Rev. Esp. Salud Publica*, vol. 93, 2019.
- [10] A. J. Friedenstein, K. V Petrakova, A. I. Kurolesova, and G. P. Frolova, "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.," *Transplantation*, vol. 6, no. 2, 1968.
- [11] A. I. Caplan, "Mesenchymal stem cells," *J. Orthop. Res.*, vol. 9, no. 5, Sep. 1991.
- [12] M. F. Pittenger *et al.*, "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.," *Science*, vol. 284, no. 5411, pp. 143–7, Apr. 1999.
- [13] P. Bianco, P. G. Robey, and P. J. Simmons, "Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays," *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 4. 2008.
- [14] E. M. Horwitz *et al.*, "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement," *Cytotherapy*, vol. 7, no. 5, 2005.
- [15] M. Krampera, J. Galipeau, Y. Shi, K. Tarte, and L. Sensebe, "Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells-The international society for cellular therapy (ISCT) working proposal," *Cytotherapy*, vol. 15, no. 9, 2013.
- [16] P. A. Zuk *et al.*, "Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies," in *Tissue Engineering*, 2001, vol. 7, no. 2.
- [17] S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahimi, P. G. Robey, and S. Shi, "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000.
- [18] M. A. Haniffa *et al.*, "Adult Human Fibroblasts Are Potent Immunoregulatory Cells and Functionally Equivalent to Mesenchymal Stem Cells," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 3, 2007.
- [19] E. A. Jones *et al.*, "Enumeration and Phenotypic Characterization of Synovial Fluid Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells in Inflammatory and Degenerative Arthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 50, no. 3, 2004.

- [20] Y. Sakaguchi, I. Sekiya, K. Yagishita, and T. Muneta, "Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source," *Arthritis Rheum.*, vol. 52, no. 8, 2005.
- [21] H.-S. Wang *et al.*, "Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord," *Stem Cells*, vol. 22, no. 7, 2004.
- [22] C. M. Raynaud *et al.*, "Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation," *Stem Cells Int.*, 2012.
- [23] M. Crisan *et al.*, "A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs," *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 3, 2008.
- [24] A. I. Caplan, "All MSCs Are Pericytes?," *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 3, 2008.
- [25] D. O. Traktuev *et al.*, "Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells," *Circ. Res.*, vol. 104, no. 12, 2009.
- [26] E. Jones and D. McGonagle, "Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo," *Rheumatology*, vol. 47, no. 2, 2008.
- [27] M. Honczarenko, Y. Le, M. Swierkowski, I. Ghiran, A. M. Glodek, and L. E. Silberstein, "Human Bone Marrow Stromal Cells Express a Distinct Set of Biologically Functional Chemokine Receptors," *Stem Cells*, vol. 24, no. 4, 2006.
- [28] M. Pevsner-Fischer, S. Levin, and D. Zipori, "The Origins of Mesenchymal Stromal Cell Heterogeneity," *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 7, no. 3, 2011.
- [29] C. M. Kolf, E. Cho, and R. S. Tuan, "Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 9, no. 1, 2007.
- [30] A. I. Caplan and S. P. Bruder, "Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 7, no. 6, 2001.
- [31] L. Chen, E. E. Tredget, P. Y. G. Wu, Y. Wu, and Y. Wu, "Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing," *PLoS One*, vol. 3, no. 4, 2008.
- [32] S. Aggarwal and M. F. Pittenger, "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses," *Blood*, vol. 105, no. 4, 2005.
- [33] A. Uccelli, L. Moretta, and V. Pistoia, "Mesenchymal stem cells in health and disease," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 9, 2008.
- [34] S. S. Iyer and M. Rojas, "Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: Novel concept for future therapies," *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 8, no. 5, 2008.
- [35] R. Yañez, M. L. Lamana, J. García-Castro, I. Colmenero, M. Ramírez, and J. A. Bueren, "Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Have In Vivo Immunosuppressive Properties Applicable for the Control of the Graft-Versus-Host Disease," *Stem Cells*, vol. 24, no. 11, 2006.
- [36] Z. Selmani *et al.*, "Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4 + CD25 high FOXP3 + Regulatory T Cells," *Stem Cells*, vol. 26, no. 1, 2008.

- [37] A. Corcione *et al.*, "Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions," *Blood*, vol. 107, no. 1, 2006.
- [38] R. Ramasamy, H. Fazekasova, E. W. F. Lam, I. Soeiro, G. Lombardi, and F. Dazzi, "Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle," *Transplantation*, vol. 83, no. 1, 2007.
- [39] M. H. Abumaree *et al.*, "Human Placental Mesenchymal Stem Cells (pMSCs) Play a Role as Immune Suppressive Cells by Shifting Macrophage Differentiation from Inflammatory M1 to Anti-inflammatory M2 Macrophages," *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 9, no. 5, pp. 620–641, Oct. 2013.
- [40] G. M. Spaggiari, A. Capobianco, S. Becchetti, M. C. Mingari, and L. Moretta, "Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: Evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation," *Blood*, vol. 107, no. 4, pp. 1484–1490, Feb. 2006.
- [41] A. I. Caplan, "Why are MSCs therapeutic? New data: New insight," *Journal of Pathology*, vol. 217, no. 2. 2009.
- [42] A. I. Caplan and D. Correa, "The MSC: An injury drugstore," *Cell Stem Cell*, vol. 9, no. 1. 2011.
- [43] J. Panés *et al.*, "Long-term Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy (Cx601) for Complex Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease," *Gastroenterology*, vol. 154, no. 5, Apr. 2018.
- [44] B. Soria-Juan *et al.*, "Cost-effective, safe, and personalized cell therapy for critical limb ischemia in type 2 diabetes mellitus," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. JUN, 2019.
- [45] J. Viola, B. Lal, and O. Grad, "The emergence of tissue engineering as a research field," *Natl. Sci. Found. Arlington, VA*, 2003.
- [46] R. S. Mahla, "Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics," *International Journal of Cell Biology*, vol. 2016. 2016.
- [47] J. A. Thomson, "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts," *Science (80-. )*, vol. 282, no. 5391, 1998.
- [48] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors," *Cell*, vol. 126, no. 4, 2006.
- [49] L. Mlsna, "Stem Cell Based Treatments and Novel Considerations for Conscience Clause Legislation," *Indiana Health Law Rev.*, vol. 8, no. 2, 2011.
- [50] H. M. Lazarus, S. E. Haynesworth, S. L. Gerson, N. S. Rosenthal, and A. I. Caplan, "Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): Implications for therapeutic use," *Bone Marrow Transplant.*, vol. 16, no. 4, 1995.
- [51] G. Siegel, R. Schäfer, and F. Dazzi, "The Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells," *Transplantation*, vol. 87, no. 9S, May 2009.
- [52] F. Morandi *et al.*, "Immunogenicity of Human Mesenchymal Stem Cells in HLA-Class I-Restricted T-Cell Responses Against Viral or Tumor-Associated Antigens," *Stem Cells*, vol. 26, no. 5, 2008.
- [53] X. P. Huang *et al.*, "Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces

- immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair," *Circulation*, vol. 122, no. 23, 2010.
- [54] T. Squillaro, G. Peluso, and U. Galderisi, "Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update," *Cell Transplantation*, vol. 25, no. 5. 2016.
- [55] F. Gao *et al.*, "Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects," *Cell Death and Disease*, vol. 7, no. 1. 2016.
- [56] J. Galipeau and L. Sensébé, "Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities.," *Cell Stem Cell*, vol. 22, no. 6, pp. 824–833, Jun. 2018.
- [57] P. J. Martin *et al.*, "Prochymal Improves Response Rates In Patients With Steroid-Refractory Acute Graft Versus Host Disease (SR-GVHD) Involving The Liver And Gut: Results Of A Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Phase III Trial In GVHD," *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 16, no. 2, 2010.
- [58] N. Guimarães-Camboa *et al.*, "Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo," *Cell Stem Cell*, vol. 20, no. 3, 2017.
- [59] A. I. Caplan and J. E. Dennis, "Mesenchymal stem cells as trophic mediators," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 98, no. 5. 2006.
- [60] D. Kong *et al.*, "Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries," *Circulation*, vol. 110, no. 14, 2004.
- [61] M. Gnecci *et al.*, "Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells [2]," *Nature Medicine*, vol. 11, no. 4. 2005.
- [62] H. Yagi *et al.*, "Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing," *Cell Transplantation*, vol. 19, no. 6–7. 2010.
- [63] G. Ren *et al.*, "Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide," *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 2, 2008.
- [64] C. Théry, L. Zitvogel, and S. Amigorena, "Exosomes: Composition, biogenesis and function," *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 8. European Association for Cardio-Thoracic Surgery, pp. 569–579, 2002.
- [65] C. Théry *et al.*, "Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines," *J. Extracell. Vesicles*, vol. 7, no. 1, p. 1535750, Dec. 2018.
- [66] G. Van Niel, G. D'Angelo, and G. Raposo, "Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 19, no. 4. 2018.
- [67] A. Lakkaraju and E. Rodriguez-Boulan, "Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity," *Trends in Cell Biology*, vol. 18, no. 5. 2008.
- [68] T. Wollert and J. H. Hurley, "Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes," *Nature*, vol. 464, no. 7290, 2010.
- [69] Joo, Suh, Lee, Bang, and Lee, "Current Knowledge and Future Perspectives on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Agent," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 3, p. 727, Jan. 2020.
- [70] S. R. Baglio, D. M. Pegtel, and N. Baldini, "Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy," *Front. Physiol.*, vol. 3 SEP, 2012.

- [71] H. Cai, K. Reinisch, and S. Ferro-Novick, "Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle," *Developmental Cell*, vol. 12, no. 5. 2007.
- [72] R. Szatanek, J. Baran, M. Siedlar, and M. Baj-Krzyworzeka, "Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (review)," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 36, no. 1. 2015.
- [73] J. Lötvall *et al.*, "Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles," *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 3, no. 1. 2014.
- [74] A. R. Brisson, S. Tan, R. Linares, C. Gounou, and N. Arraud, "Extracellular vesicles from activated platelets: a semiquantitative cryo-electron microscopy and immuno-gold labeling study," *Platelets*, vol. 28, no. 3, 2017.
- [75] B. T. Pan and R. M. Johnstone, "Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor," *Cell*, vol. 33, no. 3, 1983.
- [76] R. M. Johnstone, "The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins.," *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, vol. 70, no. 3–4. 1992.
- [77] G. Raposo *et al.*, "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles," *J. Exp. Med.*, vol. 183, no. 3, 1996.
- [78] B. György *et al.*, "Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 68, no. 16. 2011.
- [79] I. Parolini *et al.*, "Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 49, 2009.
- [80] D. Feng *et al.*, "Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis," *Traffic*, vol. 11, no. 5, 2010.
- [81] H. Costa Verdera, J. J. Gitz-Francois, R. M. Schiffelers, and P. Vader, "Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis," *J. Control. Release*, vol. 266, 2017.
- [82] C. Pizzirani *et al.*, "Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1 $\beta$ -loaded microvesicles from human dendritic cells," *Blood*, vol. 109, no. 9, May 2007.
- [83] M. Shimoda and R. Khokha, "Proteolytic factors in exosomes," *Proteomics*, vol. 13, no. 10–11. 2013.
- [84] C. Subra *et al.*, "Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins," *J. Lipid Res.*, vol. 51, no. 8, 2010.
- [85] A. V. Vlassov, S. Magdaleno, R. Setterquist, and R. Conrad, "Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials," *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1820, no. 7. 2012.
- [86] D. G. Phinney and M. F. Pittenger, "Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy," *Stem Cells*, vol. 35, no. 4, pp. 851–858, Apr. 2017.
- [87] A. Mokarizadeh, N. Delirezh, A. Morshedi, G. Mosayebi, A. A. Farshid, and K. Mardani,

- “Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: Potent organelles for induction of tolerogenic signaling,” *Immunol. Lett.*, vol. 147, no. 1–2, 2012.
- [88] A. Del Fattore *et al.*, “Immunoregulatory effects of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles on T lymphocytes,” *Cell Transplant.*, vol. 24, no. 12, 2015.
- [89] J. Stephen, E. L. Bravo, D. Colligan, A. R. Fraser, J. Petrik, and J. D. M. Campbell, “Mesenchymal stromal cells as multifunctional cellular therapeutics – a potential role for extracellular vesicles,” *Transfusion and Apheresis Science*, vol. 55, no. 1. 2016.
- [90] T. Matsushita, “Regulatory and effector B cells: Friends or foes?,” *Journal of Dermatological Science*, vol. 93, no. 1. 2019.
- [91] A. Adamo *et al.*, “Extracellular vesicles mediate mesenchymal stromal cell-dependent regulation of B cell PI3K-Akt signaling pathway and actin cytoskeleton,” *Front. Immunol.*, vol. 10, no. MAR, 2019.
- [92] M. Budoni, A. Fierabracci, R. Luciano, S. Petrini, V. Di Ciommo, and M. Muraca, “The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles,” *Cell Transplant.*, vol. 22, no. 2, 2013.
- [93] S. Cosenza *et al.*, “Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis,” *Theranostics*, vol. 8, no. 5, 2018.
- [94] C. Balbi *et al.*, “First characterization of human amniotic fluid stem cell extracellular vesicles as a powerful paracrine tool endowed with regenerative potential,” *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 6, no. 5, 2017.
- [95] Y. Fan, F. Herr, A. Vernochet, B. Mennesson, E. Oberlin, and A. Durrbach, “Human Fetal Liver Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Impair Natural Killer Cell Function,” *Stem Cells Dev.*, vol. 28, no. 1, 2019.
- [96] L. Bai *et al.*, “Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes on Experimental Autoimmune Uveitis,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, 2017.
- [97] X. Zou *et al.*, “NK cell regulatory property is involved in the protective role of MSC-derived extracellular vesicles in renal ischemic reperfusion injury,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 27, no. 11, 2016.
- [98] L. Kordelas *et al.*, “MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease,” *Leukemia*, vol. 28, no. 4, pp. 970–973, Apr. 2014.
- [99] J. Sun *et al.*, “HIF-1 $\alpha$  overexpression in mesenchymal stem cell-derived exosomes mediates cardioprotection in myocardial infarction by enhanced angiogenesis,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 11, no. 1, 2020.
- [100] K. Hyvärinen *et al.*, “Mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles enhance the anti-inflammatory phenotype of regulatory macrophages by downregulating the production of interleukin (IL)-23 and IL-22,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. APR, 2018.
- [101] G. R. Willis *et al.*, “Mesenchymal stromal cell exosomes ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia and restore lung function through macrophage immunomodulation,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 197, no. 1, 2018.
- [102] B. Shen *et al.*, “CCR2 Positive Exosome Released by Mesenchymal Stem Cells Suppresses Macrophage Functions and Alleviates Ischemia/Reperfusion-Induced Renal Injury,” *Stem Cells Int.*, vol. 2016, 2016.

- [103] M. Collin and V. Bigley, "Human dendritic cell subsets: an update," *Immunology*, vol. 154, no. 1. 2018.
- [104] E. Favaro *et al.*, "Human mesenchymal stem cell-derived microvesicles modulate T cell response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in patients with type 1 diabetes," *Diabetologia*, vol. 57, no. 8, 2014.
- [105] T. Shigemoto-Kuroda *et al.*, "MSC-derived Extracellular Vesicles Attenuate Immune Responses in Two Autoimmune Murine Models: Type 1 Diabetes and Uveoretinitis," *Stem Cell Reports*, vol. 8, no. 5, 2017.
- [106] M. Nawaz *et al.*, "Extracellular Vesicles and Matrix Remodeling Enzymes: The Emerging Roles in Extracellular Matrix Remodeling, Progression of Diseases and Tissue Repair," *Cells*, vol. 7, no. 10, 2018.
- [107] A. Hoeben, B. Landuyt, M. S. Highley, H. Wildiers, A. T. Van Oosterom, and E. A. De Bruijn, "Vascular endothelial growth factor and angiogenesis," *Pharmacological Reviews*, vol. 56, no. 4. 2004.
- [108] S. Ren *et al.*, "Microvesicles from human adipose stem cells promote wound healing by optimizing cellular functions via AKT and ERK signaling pathways," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 10, no. 1, 2019.
- [109] A. Shabbir, A. Cox, L. Rodriguez-Menocal, M. Salgado, and E. Van Badiavas, "Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis in Vitro," *Stem Cells Dev.*, vol. 24, no. 14, 2015.
- [110] J. Ding, X. Wang, B. Chen, J. Zhang, and J. Xu, "Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stimulated by Deferoxamine Accelerate Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis," *Biomed Res. Int.*, vol. 2019, 2019.
- [111] X. Teng, L. Chen, W. Chen, J. Yang, Z. Yang, and Z. Shen, "Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve the microenvironment of infarcted myocardium contributing to angiogenesis and anti-inflammation," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 37, no. 6, 2015.
- [112] P. Gangadaran *et al.*, "Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells activates VEGF receptors and accelerates recovery of hindlimb ischemia," *J. Control. Release*, vol. 264, 2017.
- [113] M. P. De Miguel *et al.*, "Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications," *Curr. Mol. Med.*, vol. 12, no. 5, 2012.
- [114] J. S. Pober and W. C. Sessa, "Evolving functions of endothelial cells in inflammation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 10. 2007.
- [115] C. Zihni, C. Mills, K. Matter, and M. S. Balda, "Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 17, no. 9. 2016.
- [116] E. Dejana, F. Orsenigo, and M. G. Lampugnani, "The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability," *J. Cell Sci.*, vol. 121, no. 13, 2008.
- [117] D. R. Potter *et al.*, "Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate pulmonary vascular permeability and lung injury induced by hemorrhagic shock and trauma," *J. Trauma Acute Care Surg.*, vol. 84, no. 2, 2018.
- [118] J. D. Silva *et al.*, "Mesenchymal stromal cell extracellular vesicles rescue mitochondrial

- dysfunction and improve barrier integrity in clinically relevant models of ARDS," *Eur. Respir. J.*, vol. 58, no. 1, 2021.
- [119] S. L. Friedman, D. Sheppard, J. S. Duffield, and S. Violette, "Therapy for fibrotic diseases: Nearing the starting line," *Science Translational Medicine*, vol. 5, no. 167. 2013.
- [120] A. Slany, A. Bileck, D. Kreutz, R. L. Mayer, B. Muqaku, and C. Gerner, "Contribution of human fibroblasts and endothelial cells to the hallmarks of inflammation as determined by proteome profiling," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 15, no. 6, 2016.
- [121] N. C. Henderson, F. Rieder, and T. A. Wynn, "Fibrosis: from mechanisms to medicines," *Nature*, vol. 587, no. 7835. 2020.
- [122] S. M. Yun, S. H. Kim, and E. H. Kim, "The molecular mechanism of transforming growth factor- $\beta$  signaling for intestinal fibrosis: A mini-review," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 10, no. FEB. 2019.
- [123] S. Fang *et al.*, "Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal MicroRNAs Suppress Myofibroblast Differentiation by Inhibiting the Transforming Growth Factor- $\beta$ /SMAD2 Pathway During Wound Healing," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 5, no. 10, 2016.
- [124] L. Wang *et al.*, "Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, 2017.
- [125] Y. Huang and L. Yang, "Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in therapy against fibrotic diseases," *Stem Cell Research and Therapy*, vol. 12, no. 1. 2021.
- [126] T. Lener *et al.*, "Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – an ISEV position paper," *J. Extracell. Vesicles*, vol. 4, no. 1, p. 30087, Jan. 2015.
- [127] B. Giebel, L. Kordelas, and V. Börger, "Clinical potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles," *Stem Cell Investig.*, vol. 4, no. 10, pp. 84–84, Oct. 2017.
- [128] X. Li, S. Wang, R. Zhu, H. Li, Q. Han, and R. C. Zhao, "Lung tumor exosomes induce a pro-inflammatory phenotype in mesenchymal stem cells via NF $\kappa$ B-TLR signaling pathway," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 9, no. 1, 2016.
- [129] J. Tolar *et al.*, "Sarcoma Derived from Cultured Mesenchymal Stem Cells," *Stem Cells*, vol. 25, no. 2, 2007.
- [130] H. Choi and D. S. Lee, "Illuminating the physiology of extracellular vesicles," *Stem Cell Research and Therapy*, vol. 7, no. 1. 2016.
- [131] D. Sun *et al.*, "A novel nanoparticle drug delivery system: The anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes," *Mol. Ther.*, vol. 18, no. 9, 2010.
- [132] E. Klyushnenkova *et al.*, "T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: Immunogenicity, tolerance, and suppression," *J. Biomed. Sci.*, vol. 12, no. 1, 2005.
- [133] S. D. Li and L. Huang, "Nanoparticles evading the reticuloendothelial system: Role of the supported bilayer," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1788, no. 10, 2009.
- [134] I. Vishnubhatla, R. Corteling, L. Stevanato, C. Hicks, and J. Sinden, "The development of stem cell-derived exosomes as a cell-free regenerative medicine," *Journal of Circulating*

- Biomarkers*, vol. 3. 2014.
- [135] R. W. Y. Yeo *et al.*, "Mesenchymal stem cell: An efficient mass producer of exosomes for drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, no. 3. 2013.
- [136] A. R. Lara, E. Galindo, O. T. Ramírez, and L. A. Palomares, "Living with heterogeneities in bioreactors: Understanding the effects of environmental gradients on cells," *Molecular Biotechnology*, vol. 34, no. 3. 2006.
- [137] G. V. Shelke, C. Lässer, Y. S. Ghosh, and J. Lötvall, "Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum," *J. Extracell. Vesicles*, vol. 3, no. 1, 2014.
- [138] F. Royo, C. Théry, J. M. Falcón-Pérez, R. Nieuwland, and K. W. Witwer, "Methods for Separation and Characterization of Extracellular Vesicles: Results of a Worldwide Survey Performed by the ISEV Rigor and Standardization Subcommittee," *Cells*, vol. 9, no. 9, 2020.
- [139] J. Z. Nordin *et al.*, "Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 11, no. 4, 2015.
- [140] E. A. Mol, M. J. Goumans, P. A. Doevendans, J. P. G. Sluijter, and P. Vader, "Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 13, no. 6, 2017.
- [141] M. Monguió-Tortajada, C. Gálvez-Montón, A. Bayes-Genis, S. Roura, and F. E. Borràs, "Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography," *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019.
- [142] Y. Wang, X. Chen, W. Cao, and Y. Shi, "Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications," *Nature Immunology*, vol. 15, no. 11. 2014.
- [143] M. Najar *et al.*, "Insights into inflammatory priming of mesenchymal stromal cells: functional biological impacts," *Inflammation Research*, vol. 67, no. 6. 2018.
- [144] Y. Shi, J. Su, A. I. Roberts, P. Shou, A. B. Rabson, and G. Ren, "How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses," *Trends in Immunology*, vol. 33, no. 3. 2012.
- [145] N. D. C. Noronha Nc *et al.*, "Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies," *Stem Cell Research and Therapy*, vol. 10, no. 1. BioMed Central Ltd., p. 131, May-2019.
- [146] J. Galipeau *et al.*, "International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials," *Cytotherapy*, vol. 18, no. 2, 2015.
- [147] M. R. Showalter *et al.*, "Primed mesenchymal stem cells package exosomes with metabolites associated with immunomodulation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 512, no. 4, 2019.
- [148] D. Ti *et al.*, "LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b," *J. Transl. Med.*, vol. 13, no. 1, 2015.
- [149] Y. Song *et al.*, "Exosomal miR-146a Contributes to the Enhanced Therapeutic Efficacy of

- Interleukin-1 $\beta$ -Primed Mesenchymal Stem Cells Against Sepsis," *Stem Cells*, vol. 35, no. 5, 2017.
- [150] Q. Zhang *et al.*, "Exosomes originating from MSCs stimulated with TGF- $\beta$  and IFN- $\gamma$  promote Treg differentiation," *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 9, 2018.
- [151] M. T. Harting *et al.*, "Inflammation-Stimulated Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Inflammation," *Stem Cells*, vol. 36, no. 1, 2018.
- [152] R. Domenis *et al.*, "Pro inflammatory stimuli enhance the immunosuppressive functions of adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, 2018.
- [153] I. Berniakovich and M. Giorgio, "Low oxygen tension maintains multipotency, whereas normoxia increases differentiation of mouse bone marrow stromal cells," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 1, 2013.
- [154] R. J. Ruthenborg, J. J. Ban, A. Wazir, N. Takeda, and J. W. Kim, "Regulation of wound healing and fibrosis by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1," *Molecules and Cells*, vol. 37, no. 9, 2014.
- [155] C. T. Taylor and S. P. Colgan, "Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches," *Nature Reviews Immunology*, vol. 17, no. 12, 2017.
- [156] N. Haque, M. T. Rahman, N. H. Abu Kasim, and A. M. Alabsi, "Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy," *The Scientific World Journal*, vol. 2013, 2013.
- [157] H. C. Zhang *et al.*, "Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells stimulated by hypoxia promote angiogenesis both in vitro and in vivo," *Stem Cells Dev.*, vol. 21, no. 18, 2012.
- [158] C. Salomon *et al.*, "Exosomal Signaling during Hypoxia Mediates Microvascular Endothelial Cell Migration and Vasculogenesis," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, 2013.
- [159] Y. Han, J. Ren, Y. Bai, X. Pei, and Y. Han, "Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 109, 2019.
- [160] C. Xue *et al.*, "Exosomes Derived from Hypoxia-Treated Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis Through the PKA Signaling Pathway," *Stem Cells Dev.*, vol. 27, no. 7, 2018.
- [161] J. Zhu *et al.*, "Myocardial reparative functions of exosomes from mesenchymal stem cells are enhanced by hypoxia treatment of the cells via transferring microRNA-210 in an nSMase2-dependent way," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 46, no. 8, 2018.
- [162] L. Li, S. Jin, and Y. Zhang, "Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of mesenchymal stem cells on endotoxin-induced acute lung injury in mice through secretion of exosome," *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 8, no. 3, 2015.
- [163] G. H. Cui *et al.*, "Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dysfunction and regulating inflammatory responses in APP/PS1 mice," *FASEB J.*, vol. 32, no. 2, 2018.
- [164] J. Ma *et al.*, "Exosomes Derived from Akt-Modified Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve Cardiac Regeneration and Promote Angiogenesis via Activating Platelet-Derived Growth Factor D," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 6, no. 1, 2017.

- [165] K. Kang *et al.*, "Exosomes Secreted from CXCR4 Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Promote Cardioprotection via Akt Signaling Pathway following Myocardial Infarction," *Stem Cells Int.*, vol. 2015, 2015.
- [166] J. G. He, Q. L. Xie, B. B. Li, L. Zhou, and D. Yan, "Exosomes Derived fromIDO1-Overexpressing Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Immunotolerance of Cardiac Allografts," *Cell Transplant.*, vol. 27, no. 11, 2018.
- [167] X. H. Gong, H. Liu, S. J. Wang, S. W. Liang, and G. G. Wang, "Exosomes derived from SDF1-overexpressing mesenchymal stem cells inhibit ischemic myocardial cell apoptosis and promote cardiac endothelial microvascular regeneration in mice with myocardial infarction," *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 8, 2019.
- [168] B. Yu *et al.*, "Exosomes secreted from GATA-4 overexpressing mesenchymal stem cells serve as a reservoir of anti-apoptotic microRNAs for cardioprotection," *Int. J. Cardiol.*, vol. 182, no. C, 2015.
- [169] Q. Zhang, Q. Yan, H. Yang, and W. Wei, "Oxygen sensing and adaptability won the 2019 Nobel Prize in Physiology or medicine," *Genes and Diseases*, vol. 6, no. 4. 2019.
- [170] G. L. Wang and G. L. Semenza, "General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia," *Genetics*, vol. 90, pp. 4304–4308, 1993.
- [171] C. C. Tsai *et al.*, "Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST," *Blood*, vol. 117, no. 2, 2011.
- [172] M. Roemeling-Van Rhijn *et al.*, "Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells," *Front. Immunol.*, vol. 4, no. JUL, 2013.
- [173] I. Cerrada *et al.*, "Hypoxia-inducible factor 1 alpha contributes to cardiac healing in mesenchymal stem cells-mediated cardiac repair," *Stem Cells Dev.*, vol. 22, no. 3, 2013.
- [174] V. G. Martinez *et al.*, "Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha improves immunomodulation by dental mesenchymal stem cells," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 8, no. 1, p. 208, Dec. 2017.
- [175] H. Gonzalez-King, N. A. García, I. Ontoria-Oviedo, M. Ciria, J. A. Montero, and P. Sepúlveda, "Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes," *Stem Cells*, 2017.
- [176] H. Li *et al.*, "Exosomes secreted from mutant-HIF-1 $\alpha$ -modified bone-marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate early steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbit," *Cell Biol. Int.*, Sep. 2017.
- [177] W. Wagner *et al.*, "Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process," *PLoS One*, vol. 3, no. 5, 2008.
- [178] V. Turinetto, E. Vitale, and C. Giachino, "Senescence in human mesenchymal stem cells: Functional changes and implications in stem cell-based therapy," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 7. 2016.
- [179] R. C. Lai, R. W. Y. Yeo, J. Padmanabhan, A. Choo, D. P. V. De Kleijn, and S. K. Lim, "Isolation and characterization of exosome from human embryonic stem cell-derived c-myc-immortalized mesenchymal stem cells," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1416, 2016.

- [180] J. D. Podlevsky and J. J. L. Chen, "It all comes together at the ends: Telomerase structure, function, and biogenesis," *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 730, no. 1–2, 2012.
- [181] B. Wang *et al.*, "Mesenchymal stem cells deliver exogenous MicroRNA-let7c via exosomes to attenuate renal fibrosis," *Mol. Ther.*, vol. 24, no. 7, 2016.
- [182] G. Lou *et al.*, "MiR-122 modification enhances the therapeutic efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against liver fibrosis," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 21, no. 11, 2017.
- [183] L. Chen *et al.*, "BMSCs-derived miR-223-containing exosomes contribute to liver protection in experimental autoimmune hepatitis," *Mol. Immunol.*, vol. 93, 2018.
- [184] S. C. Tao, T. Yuan, Y. L. Zhang, W. J. Yin, S. C. Guo, and C. Q. Zhang, "Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model," *Theranostics*, vol. 7, no. 1, 2017.
- [185] S.-C. Tao, S.-C. Guo, M. Li, Q.-F. Ke, Y.-P. Guo, and C.-Q. Zhang, "Chitosan Wound Dressings Incorporating Exosomes Derived from MicroRNA-126-Overexpressing Synovium Mesenchymal Stem Cells Provide Sustained Release of Exosomes and Heal Full-Thickness Skin Defects in a Diabetic Rat Model," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 6, no. 3, 2017.
- [186] A. Dorransoro *et al.*, "Extracellular Vesicles Secreted by Hypoxic AC10 Cardiomyocytes Modulate Fibroblast Cell Motility," *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 5, p. 152, Oct. 2018.
- [187] S. Zhang, S. J. Chuah, R. C. Lai, J. H. P. Hui, S. K. Lim, and W. S. Toh, "MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity," *Biomaterials*, vol. 156, 2018.
- [188] J. Zhao *et al.*, "Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization," *Cardiovasc. Res.*, vol. 115, no. 7, 2019.
- [189] M. Gómez-Ferrer *et al.*, "Hif-1 $\alpha$  and pro-inflammatory signaling improves the immunomodulatory activity of MSC-derived extracellular vesicles," *Int. J. Mol. Sci.*, 2021.
- [190] M. Shahir *et al.*, "Effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on the induction of mouse tolerogenic dendritic cells," *J. Cell. Physiol.*, vol. 235, no. 10, 2020.
- [191] A. C. Vigorito *et al.*, "Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD," *Blood*, vol. 114, no. 3, 2009.
- [192] A. Nassar, K. F. Tabbara, and M. Aljurf, "Ocular manifestations of graft-versus-host disease," *Saudi J. Ophthalmol.*, vol. 27, no. 3, 2013.
- [193] J. Weng *et al.*, "Mesenchymal stromal cells treatment attenuates dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease," *Mol. Ther.*, vol. 20, no. 12, 2012.
- [194] A. Katsarou *et al.*, "Type 1 diabetes mellitus," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 3, 2017.
- [195] S. Nojehdehi, S. Soudi, A. Hesampour, S. Rasouli, M. Soleimani, and S. M. Hashemi, "Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on experimental type-1 autoimmune diabetes," *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 11, 2018.
- [196] E. Mahdipour, Z. Salmasi, and N. Sabeti, "Potential of stem cell-derived exosomes to

- regenerate  $\beta$  islets through Pdx-1 dependent mechanism in a rat model of type 1 diabetes," *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 11, 2019.
- [197] G. Hajishengallis, "Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 15, no. 1. 2015.
- [198] X. Y. Xu *et al.*, "Exosomes derived from P2X7 receptor gene-modified cells rescue inflammation-compromised periodontal ligament stem cells from dysfunction," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 9, no. 11, 2020.
- [199] Y. Zheng *et al.*, "Exosomal microRNA-155-5p from PDLSCs regulated Th17/Treg balance by targeting sirtuin-1 in chronic periodontitis," *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 11, 2019.
- [200] P. Duchnowski, T. Hryniewiecki, M. Kusmierczyk, and P. Szymanski, "Red cell distribution width as a predictor of multiple organ dysfunction syndrome in patients undergoing heart valve surgery," *Biol. Open*, vol. 7, no. 10, 2018.
- [201] J. D. Fine, "Inherited epidermolysis bullosa," *Orphanet Journal of Rare Diseases*, vol. 5, no. 1. 2010.
- [202] J. D. McBride, L. Rodriguez-Menocal, A. Candanedo, W. Guzman, M. Garcia-Contreras, and E. V. Badiavas, "Dual mechanism of type VII collagen transfer by bone marrow mesenchymal stem cell extracellular vesicles to recessive dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts," *Biochimie*, vol. 155, 2018.
- [203] S. Kuriyama, H. Hayashi, Y. Jingami, N. Kuramoto, J. Akita, and M. Matsumoto, "Efficacy of inverted internal limiting membrane flap technique for the treatment of macular hole in high myopia," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 156, no. 1, 2013.
- [204] X. Zhang, J. Liu, B. Yu, F. Ma, X. Ren, and X. Li, "Effects of mesenchymal stem cells and their exosomes on the healing of large and refractory macular holes," *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 256, no. 11, 2018.
- [205] T. R. Doepfner, M. Bähr, B. Giebel, and D. M. Hermann, "Immunological and non-immunological effects of stem cell-derived extracellular vesicles on the ischaemic brain," *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, vol. 11. 2018.
- [206] G. H. Cui *et al.*, "RVG-modified exosomes derived from mesenchymal stem cells rescue memory deficits by regulating inflammatory responses in a mouse model of Alzheimer's disease," *Immun. Ageing*, vol. 16, no. 1, 2019.
- [207] G. A. Roth *et al.*, "Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013," *Circulation*, vol. 132, no. 17. 2015.
- [208] L. Shao *et al.*, "MiRNA-Sequence Indicates That Mesenchymal Stem Cells and Exosomes Have Similar Mechanism to Enhance Cardiac Repair," *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, 2017.
- [209] Y. Peng, J. L. Zhao, Z. Y. Peng, W. F. Xu, and G. L. Yu, "Exosomal miR-25-3p from mesenchymal stem cells alleviates myocardial infarction by targeting pro-apoptotic proteins and EZH2," *Cell Death Dis.*, vol. 11, no. 5, 2020.
- [210] X. Li, M. Geng, Y. Peng, L. Meng, and S. Lu, "Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19," *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 10, no. 2. 2020.
- [211] C. Huang *et al.*, "Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China," *Lancet*, vol. 395, no. 10223, 2020.
- [212] A. Tsuchiya *et al.*, "Therapeutic potential of mesenchymal stem cells and their exosomes

- in severe novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases," *Inflammation and Regeneration*, vol. 40, no. 1, 2020.
- [213] V. Sengupta, S. Sengupta, A. Lazo, P. Woods, A. Nolan, and N. Bremer, "Exosomes Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells as Treatment for Severe COVID-19," *Stem Cells Dev.*, vol. 29, no. 12, 2020.
- [214] I. Cárcamo-Orive *et al.*, "ERK2 protein regulates the proliferation of human mesenchymal stem cells without affecting their mobilization and differentiation potential," *Exp. Cell Res.*, vol. 314, no. 8, 2008.
- [215] D. Castellano *et al.*, "Electrospun poly(hydroxybutyrate) scaffolds promote engraftment of human skin equivalents via macrophage M2 polarization and angiogenesis," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 12, no. 2, 2018.
- [216] I. Cerrada *et al.*, "Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha Contributes to Cardiac Healing in Mesenchymal Stem Cells-Mediated Cardiac Repair," *Stem Cells Dev.*, vol. 22, no. 3, pp. 501–511, 2013.
- [217] C. Gandia *et al.*, "Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction," *Stem Cells*, vol. 26, no. 3, pp. 638–645, Mar. 2008.
- [218] B. S. Herbert, A. E. Hochreiter, W. E. Wright, and J. W. Shay, "Nonradioactive detection of telomerase activity using the telomeric repeat amplification protocol," *Nat. Protoc.*, 2006.
- [219] C. Théry, S. Amigorena, G. Raposo, and A. Clayton, "Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids," *Curr. Protoc. Cell Biol.*, vol. 30, no. 1, 2006.
- [220] A. Savina, M. Vidal, and M. I. Colombo, "The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11," *J. Cell Sci.*, vol. 115, no. 12, 2002.
- [221] A. Morales-Kastresana and J. C. Jones, "Flow cytometric analysis of extracellular vesicles," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1545, Humana Press Inc., 2017, pp. 215–225.
- [222] L. Czernek, A. Chworos, and M. Duechler, "The Uptake of Extracellular Vesicles is Affected by the Differentiation Status of Myeloid Cells," *Scand. J. Immunol.*, vol. 82, no. 6, 2015.
- [223] A. Dorransoro *et al.*, "Human mesenchymal stromal cells modulate T-cell responses through TNF- $\alpha$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B," *Eur. J. Immunol.*, vol. 44, no. 2, Feb. 2014.
- [224] A. B. Lyons, "Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution," *J. Immunol. Methods*, 2000.
- [225] N. A. Garcia, I. Ontoria-Oviedo, H. González-King, A. Diez-Juan, and P. Sepúlveda, "Glucose Starvation in Cardiomyocytes Enhances Exosome Secretion and Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells," *PLoS One*, vol. 10, no. 9, p. e0138849, Sep. 2015.
- [226] J. Cosín-Roger, D. Ortiz-Masiá, S. Calatayud, C. Hernández, J. V. Esplugues, and M. D. Barrachina, "The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD," *Mucosal Immunol.*, vol. 9, no. 4, 2016.
- [227] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, and K. Bieback, "Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue," *Stem Cells*, vol. 24, no. 5, pp. 1294–1301, May 2006.

- [228] F. Rodier *et al.*, "Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion," *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 8, 2009.
- [229] R. Cantin, J. Diou, D. Bélanger, A. M. Tremblay, and C. Gilbert, "Discrimination between exosomes and HIV-1: Purification of both vesicles from cell-free supernatants," *J. Immunol. Methods*, vol. 338, no. 1–2, 2008.
- [230] Y. W. Lan *et al.*, "Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 6, no. 1, 2015.
- [231] C. M. Jiang *et al.*, "Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of human gingiva-derived mesenchymal stem cells," *J. Dent. Res.*, vol. 94, no. 1, 2015.
- [232] T. Okazaki and T. Honjo, "The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance," *Trends in Immunology*, vol. 27, no. 4. Elsevier, pp. 195–201, Apr-2006.
- [233] M. Liu, S. Liang, and C. Zhang, "NK Cells in Autoimmune Diseases: Protective or Pathogenic?," *Frontiers in Immunology*, vol. 12. 2021.
- [234] A. D. Barrow, C. J. Martin, and M. Colonna, "The natural cytotoxicity receptors in health and disease," *Frontiers in Immunology*, vol. 10, no. MAY. 2019.
- [235] Q. Z. Zhang *et al.*, "Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of M2 macrophages and enhance cutaneous wound healing," *Stem Cells*, vol. 28, no. 10, 2010.
- [236] S. Arandjelovic and K. S. Ravichandran, "Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis," *Nature Immunology*. 2015.
- [237] A. L. Alessandri, L. P. Sousa, C. D. Lucas, A. G. Rossi, V. Pinho, and M. M. Teixeira, "Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development," *Pharmacology and Therapeutics*. 2013.
- [238] P. J. Murray and T. A. Wynn, "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets," *Nature Reviews Immunology*, vol. 11, no. 11. 2011.
- [239] D. Vestweber, "How leukocytes cross the vascular endothelium," *Nature Reviews Immunology*, vol. 15, no. 11. 2015.
- [240] I. C. Lawrance *et al.*, "Cellular and molecular mediators of intestinal fibrosis," *Journal of Crohn's and Colitis*, vol. 11, no. 12. 2017.
- [241] I. C. Allen, "Delayed-Type Hypersensitivity Models in Mice," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1031, 2013, pp. 101–107.
- [242] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati, "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization," *Trends in Immunology*, vol. 25, no. 12. 2004.
- [243] A. Leyendecker, C. C. G. Pinheiro, M. T. Amano, and D. F. Bueno, "The use of human mesenchymal stem cells as therapeutic agents for the in vivo treatment of immune-related diseases: A systematic review," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. SEP, 2018.
- [244] L. Pierdomenico *et al.*, "Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp," *Transplantation*, 2005.
- [245] W. Wagner *et al.*, "Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells," *PLoS One*, vol. 4, no. 6, 2009.

- [246] A. Stolzing, E. Jones, D. McGonagle, and A. Scutt, "Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 129, no. 3, 2008.
- [247] K. S. Park, E. Bandeira, G. V. Shelke, C. Lässer, and J. Lötval, "Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles," *Stem Cell Research and Therapy*, vol. 10, no. 1. 2019.
- [248] M. Di Trapani *et al.*, "Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions," *Sci. Rep.*, vol. 6, 2016.
- [249] R. Contreras-Lopez *et al.*, "HIF1 $\alpha$ -dependent metabolic reprogramming governs mesenchymal stem/stromal cell immunoregulatory functions," *FASEB J.*, vol. 34, no. 6, 2020.
- [250] N. Bister, C. Pistono, B. Huremagic, J. Jolkonen, R. Giugno, and T. Malm, "Hypoxia and extracellular vesicles: A review on methods, vesicular cargo and functions," *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 10, no. 1. 2020.
- [251] C. Gorgun *et al.*, "Dissecting the effects of preconditioning with inflammatory cytokines and hypoxia on the angiogenic potential of mesenchymal stromal cell (MSC)-derived soluble proteins and extracellular vesicles (EVs)," *Biomaterials*, vol. 269, 2021.
- [252] M. Krampera, "Mesenchymal stromal cell licensing: A multistep process," *Leukemia*, vol. 25, no. 9. 2011.
- [253] R. Carrero *et al.*, "IL1 $\beta$  induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF- $\kappa$ B.," *Stem cell Rev. reports*, vol. 8, no. 3, pp. 905–16, Sep. 2012.
- [254] E. Redondo-Castro *et al.*, "Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 8, no. 1, p. 79, Dec. 2017.
- [255] O. DelaRosa *et al.*, "Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells.," *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, no. 10, pp. 2795–806, Oct. 2009.
- [256] S. James *et al.*, "Multiparameter Analysis of Human Bone Marrow Stromal Cells Identifies Distinct Immunomodulatory and Differentiation-Competent Subtypes.," *Stem cell reports*, vol. 4, no. 6, pp. 1004–15, Jun. 2015.
- [257] H.-J. Lee, J.-H. Choi, J. Jung, J. K. Kim, S. S. Lee, and G. J. Kim, "Changes in PTTG1 by human TERT gene expression modulate the self-renewal of placenta-derived mesenchymal stem cells," *Cell Tissue Res.*, vol. 357, no. 1, pp. 145–157, Jul. 2014.
- [258] H. Saeed, W. Qiu, C. Li, A. Flyvbjerg, B. M. Abdallah, and M. Kassem, "Telomerase activity promotes osteoblast differentiation by modulating IGF-signaling pathway," *Biogerontology*, vol. 16, no. 6, pp. 733–745, Dec. 2015.
- [259] T. S. Chen *et al.*, "Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs," *J. Transl. Med.*, vol. 9, no. 1, p. 47, Apr. 2011.
- [260] S. Melnik *et al.*, "Impact of c-MYC expression on proliferation, differentiation, and risk of neoplastic transformation of human mesenchymal stromal cells," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 10, no. 1, p. 73, Dec. 2019.

- [261] B. M. Abdallah *et al.*, "Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite of extensive proliferation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 326, no. 3, pp. 527–538, Jan. 2005.
- [262] K. Gao *et al.*, "Immortalization of Mesenchymal Stem Cells From Bone Marrow of Rhesus Monkey by Transfection With Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene," *Transplant. Proc.*, vol. 40, no. 2, pp. 634–637, Mar. 2008.
- [263] J. F. Bentzon *et al.*, "Tissue distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 330, no. 3, pp. 633–640, May 2005.
- [264] V. Agrahari, V. Agrahari, P. A. Burnouf, C. H. Chew, and T. Burnouf, "Extracellular Microvesicles as New Industrial Therapeutic Frontiers," *Trends in Biotechnology*, vol. 37, no. 7. 2019.
- [265] A. Tieu *et al.*, "An Analysis of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles for Preclinical Use," *ACS Nano*, vol. 14, no. 8, 2020.
- [266] M. Gimona, K. Pachler, S. Laner-Plamberger, K. Schallmoser, and E. Rohde, "Manufacturing of human extracellular vesicle-based therapeutics for clinical use," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 6, 2017.
- [267] M. Maumus, P. Rozier, J. Boulestreau, C. Jorgensen, and D. Noël, "Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Opportunities and Challenges for Clinical Translation," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8. 2020.
- [268] D. K. W. Ocansey *et al.*, "Improved therapeutics of modified mesenchymal stem cells: an update," *Journal of translational medicine*, vol. 18, no. 1. p. 42, 2020.
- [269] J. Van Deun *et al.*, "EV-TRACK: Transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research," *Nature Methods*, vol. 14, no. 3. 2017.
- [270] B. Crivelli *et al.*, "Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: From active principle to next generation drug delivery system," *Journal of Controlled Release*, vol. 262. 2017.
- [271] K. Pachler *et al.*, "A Good Manufacturing Practice–grade standard protocol for exclusively human mesenchymal stromal cell–derived extracellular vesicles," *Cytotherapy*, vol. 19, no. 4, 2017.
- [272] S. Dabrowska, A. Andrzejewska, M. Janowski, and B. Lukomska, "Immunomodulatory and Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles: Therapeutic Outlook for Inflammatory and Degenerative Diseases," *Frontiers in Immunology*, vol. 11. 2021.
- [273] W. Chen *et al.*, "Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome," *Immunol. Res.*, vol. 64, no. 4, pp. 831–840, Aug. 2016.
- [274] G. Raposo and W. Stoorvogel, "Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends," *Journal of Cell Biology*, vol. 200, no. 4. 2013.
- [275] S. L. N. Maas, X. O. Breakefield, and A. M. Weaver, "Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles," *Trends in Cell Biology*, vol. 27, no. 3. 2017.
- [276] I. Prada and J. Meldolesi, "Binding and fusion of extracellular vesicles to the plasma membrane of their cell targets," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 8, 2016.

- [277] A. K. Rutman, S. Negi, M. Gasparrini, C. P. Hasilo, J. Tchervenkov, and S. Paraskevas, "Immune Response to Extracellular Vesicles from Human Islets of Langerhans in Patients with Type 1 Diabetes," *Endocrinology*, vol. 159, no. 11, 2018.
- [278] E. Eitan *et al.*, "Age-Related Changes in Plasma Extracellular Vesicle Characteristics and Internalization by Leukocytes," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, 2017.
- [279] C. A. Janeway and R. Medzhitov, "Innate immune recognition," *Annual Review of Immunology*, vol. 20, 2002.
- [280] M. T. Silva and M. Correia-Neves, "Neutrophils and macrophages: The main partners of phagocyte cell systems," *Front. Immunol.*, vol. 3, no. JUL, 2012.
- [281] B. Zhang, Y. Yin, R. C. Lai, S. S. Tan, A. B. H. Choo, and S. K. Lim, "Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes," *Stem Cells Dev.*, vol. 23, no. 11, 2014.
- [282] R. Blazquez *et al.*, "Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells," *Front. Immunol.*, vol. 5, no. NOV, 2014.
- [283] D. S. Kim *et al.*, "Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- $\gamma$ ," *EBioMedicine*, vol. 28, pp. 261–273, Feb. 2018.
- [284] R. Chinnadurai *et al.*, "Mesenchymal stromal cells derived from Crohn's patients deploy indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune suppression, independent of autophagy," *Mol. Ther.*, vol. 23, no. 7, 2015.
- [285] G. Chen *et al.*, "Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response," *Nature*, vol. 560, no. 7718, 2018.
- [286] S. M. Morrissey and J. Yan, "Exosomal PD-L1: Roles in Tumor Progression and Immunotherapy," *Trends in Cancer*, vol. 6, no. 7, 2020.
- [287] S. R. Gordon *et al.*, "PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity," *Nature*, vol. 545, no. 7655, 2017.
- [288] Y. Yuan *et al.*, "Endoplasmic reticulum stress promotes the release of exosomal PD-L1 from head and neck cancer cells and facilitates M2 macrophage polarization," *Cell Commun. Signal.*, vol. 20, no. 1, p. 12, Dec. 2022.
- [289] C. Lo Sicco *et al.*, "Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as mediators of anti-inflammatory effects: Endorsement of macrophage polarization," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 6, no. 3, 2017.
- [290] A. Merino *et al.*, "Membrane Particles Derived From Adipose Tissue Mesenchymal Stromal Cells Improve Endothelial Cell Barrier Integrity," *Front. Immunol.*, vol. 12, 2021.
- [291] T. Lopatina *et al.*, "PDGF enhances the protective effect of adipose stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute hindlimb ischemia," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, 2018.
- [292] M. Abbasi-Kangevari, S. H. Ghamari, F. Safaeinejad, S. Bahrami, and H. Niknejad, "Potential therapeutic features of human amniotic mesenchymal stem cells in multiple sclerosis: Immunomodulation, inflammation suppression, angiogenesis promotion, oxidative stress inhibition, neurogenesis induction, MMPs regulation, and remyelination stimulation," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. FEB, 2019.
- [293] L. Dong *et al.*, "Hypoxic hUCMSC-derived extracellular vesicles attenuate allergic airway inflammation and airway remodeling in chronic asthma mice," *Stem Cell Res. Ther.*, vol.

- 12, no. 1, 2021.
- [294] B. Särnstrand, A. H. Jansson, G. Matuseviciene, A. Scheynius, S. Pierrou, and H. Bergstrand, "N,N'-diacetyl-L-cystine - The disulfide dimer of N-acetylcysteine - Is a potent modulator of contact sensitivity/delayed type hypersensitivity reactions in rodents," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 288, no. 3, 1999.
- [295] J. S. Marshall, R. Warrington, W. Watson, and H. L. Kim, "An introduction to immunology and immunopathology," *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, vol. 14. 2018.
- [296] N. R. Rose, "Pathogenic mechanisms in autoimmune diseases," *Clin. Immunol. Immunopathol.*, vol. 53, no. 2, 1989.
- [297] Y. Luo and M. E. Dorf, "Delayed-Type Hypersensitivity," in *Current Protocols in Immunology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [298] J. Panés and J. Rimola, "Perianal fistulizing Crohn's disease: Pathogenesis, diagnosis and therapy," *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 14, no. 11. 2017.
- [299] M. Duijvestein, G. R. van den Brink, and D. W. Hommes, "Stem cells as potential novel therapeutic strategy for inflammatory bowel disease," *Journal of Crohn's and Colitis*, vol. 2, no. 2. 2008.
- [300] L. J. Scott, "Darvadstrocel: A Review in Treatment-Refractory Complex Perianal Fistulas in Crohn's Disease," *BioDrugs*, vol. 32, no. 6, 2018.
- [301] A. C. Sebbagh *et al.*, "Regenerative medicine for digestive fistulae therapy: benefits, challenges and promises of stem/stromal cells and emergent perspectives via their extracellular vesicles," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Jun. 2021.
- [302] E. Antoniou *et al.*, "The TNBS-induced colitis animal model: An overview," *Annals of Medicine and Surgery*, vol. 11. 2016.
- [303] E. Muraille, O. Leo, and M. Moser, "Th1/Th2 paradigm extended: Macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism?," *Frontiers in Immunology*, vol. 5, no. NOV. 2014.
- [304] S. K. Mittal and P. A. Roche, "Suppression of antigen presentation by IL-10," *Current Opinion in Immunology*, vol. 34. 2015.
- [305] E. Loeuillard *et al.*, "2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colitis with fibrosis and modulation of TGF- $\beta$ 1 signaling," *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 48, 2014.
- [306] T. A. Wynn, "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis," *Journal of Pathology*, vol. 214, no. 2. pp. 199–210, Jan-2008.