



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de
Investigación
Sanitaria La Fe

Las vesículas extracelulares derivadas de células mesenquimales estromales de pulpa dental como producto terapéutico frente a la respuesta inmune que se desencadena tras el infarto agudo de miocardio

Elena Amaro Pallezo

Directora de Tesis: Pilar Sepúlveda Sanchis

Tutora UPV: María Belén Picó Sirvent

Enero, 2024

*“Vive como si fueras a morir mañana.
Aprende como si fueras a vivir para siempre”*

Mahatma Gandhi

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Pilar Sepúlveda, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en el laboratorio de Regeneración y Trasplante Cardíaco, que siempre lo consideraré mi casa. Gracias por la confianza depositada en mí y por la orientación recibida, esencial en esta etapa tan importante de aprendizaje. Gracias por permitirme trabajar con libertad, fomentando mi capacidad crítica y haciéndome crecer como profesional. Es uno de los aprendizajes más importantes que me llevo.

Agradecer también a la post-doc del grupo, Imelda Ontoria, por permitirme trabajar a su lado, por ayudarme en mil cosas (entre ellas a buscar reactivos), por apoyarme y confiar en mí profesionalmente. Gracias por los momentos de desahogo, de cotilleos y de risas. Ha sido bonito poder compartir estos años y aprender de ti.

Gracias a todas y cada una de las personas que forman parte de la familia RETRACAR. A Rosa, por ser tan generosa, por ayudarme siempre que lo he necesitado, que han sido muchas veces, y por hacerlo siempre con una sonrisa. Has sido una parte fundamental de esta tesis y eres una parte fundamental del día a día en el laboratorio. A Marilù, por dar ese toque de locura al laboratorio y por haber inventado el sillón psicológico del laboratorio, que seguramente acabará usándolo mucha gente.

A las personas que ya no están pero que siguen siendo RETRACAR. A Akaitz Dorronsoro, que me enseñó tanto y me guio en los primeros años. A Amparo, mi médico particular, la madre del laboratorio. Gracias por preocuparte por mí y por todo el cariño y la alegría que desprendes. Has dejado un hueco grande en el laboratorio, pero me alegra que estés disfrutando la vida como tú sabes hacerlo. A mi Marini, qué bonito ha sido conocerte y que formes parte de mi vida. Eres y contagias alegría y buena energía.

A mi FAMILIA RETRACAR, tanto los que seguís como los que ya no. Hace siete años llegué a Valencia prácticamente sola y vosotros os habéis convertido en mi familia. Repetiría todos los momentos, tantos los buenos como los malos, porque la tesis me ha dado lo más importante, a vosotros. Es tan bonito trabajar rodeada de amigos, sabiendo que remamos todos a una y que todos queremos lo mejor para el resto. Sin duda es lo que más voy a echar de menos, las risas, las confidencias y el apoyo en el lugar de trabajo. Qué decir de cada uno de vosotros... Marc, mi guía de TFM, hemos compartido muchos momentos de frustración y de fiesta. Eres divertido, pero no solo eso, eres inteligente y estoy segura de que puedes con todo lo que te venga y de que te va a salir genial todo. Mi Marti I, eres especial, gracias por todo lo que me has ayudado (y me sigues ayudando), gracias por los consejos, por las charlas, por las risas y por todo lo que me has enseñado. Los monocitos nos unieron mucho más y, menos mal, porque me llevo una amiga maravillosa. A mi Rafiki, lo que ha llovido desde que me decías "eso ya te lo he explicado, lo deberías saber" cuando realmente no me lo habías explicado, madre mía, cuanto camino hemos recorrido y los caminos que nos quedan por recorrer, aunque sea cojos. Eres comprensivo, eres divertido y tienes la mayor paciencia del mundo. Me hace muy feliz poder tenerte como amigo y compañero de futbolines. Aquí

es necesaria una mención especial que, aunque no forme parte de RETRACAR para mí es como si formase, a Noe, nos quedan mil planes por delante, gracias por convertirte en una gran amiga, el resto te lo digo en tu boda. Me quedan mis otros dos componentes del trio calavera. Nacho, la persona con la que más tiempo he pasado a lo largo de la tesis. Qué difícil ha sido aguantarte en algunos momentos (igual que tú a mi) y que feliz me hace tenerte como amigo. Gracias por los miles de viajes en coche, por las charlas y por el apoyo. Estoy segura de que nos quedan por delante muchos viajes, festivales, cenas y dianas en el Colonial. A mi Marti II, qué decirte a ti, eres un pilar fundamental en mi vida, de las personas más especiales que tengo a mi alrededor. Quien nos iba a decir que un regaliz nos uniría como lo ha hecho. Te quiero y siempre voy a estar ahí igual que sé que tú vas a estar ahí para mí. No hay mejor heredera de mi sitio que tú.

Por último, me gustaría agradecer a las personas que me aguantan día a día. A mis padres, gracias por ayudarme a crecer y nunca frenarme, por alentarme a estudiar fuera y apoyarme en todas mis decisiones. Sin vosotros y vuestro apoyo nada de esto hubiese sido posible. Gracias por escucharme hablar del laboratorio e interesaros por ello, aun cuando no tenías ni idea de qué os estaba hablando. Gracias por sentirnos orgullosos de mí, creedme que vuestro orgullo no es mayor que el que yo siento por vosotros. Y finalmente a Guille, llegaste ya casi al final de la tesis, pero te ha tocado aguantar la parte más dura. Gracias por apoyarme y entenderme, por quererme incluso aunque esté insoportable. Este camino ha sido mucho más fácil contigo a mi lado, la vida, en general, es más bonita contigo a mi lado. Y lo que nos queda...Os quiero.

Agradecimientos	5
Abreviaturas	13
Resumen	15
Summary	16
Resum	17
INTRODUCCIÓN	
1. Infarto agudo de miocardio	21
1.1. Definición	21
1.1.1. Síntomas del IAM	21
1.1.2. Cambios electrocardiográficos	21
1.1.3. Biomarcadores de daño cardíaco	22
1.2. Epidemiología	22
1.3. Clasificación clínica	22
1.4. Tratamiento general del IAM	23
1.4.1. Estrategias terapéuticas en el STEMI	24
1.4.2. Estrategias terapéuticas en el NSTEMI	25
1.4.3. Terapias antitrombóticas	25
1.5. Papel de la inflamación en el IAM	25
1.5.1. Fase proinflamatoria.....	27
1.5.2. Fase pro-resolutiva o antiinflamatoria	30
1.5.3. Los macrófagos en el IAM	32
1.5.4. Los neutrófilos en el IAM	35
1.5.5. Los fibroblastos cardíacos en el IAM.....	36
1.5.6. Tratamientos frente la inflamación en el IAM.....	37
2. Terapia celular: células mesenquimales estromales	38
2.1. MSC: origen, definición, fuentes	39
2.2. Propiedades terapéuticas MSC	40
2.2.1. Propiedades tróficas de las MSC	40
2.2.2. Propiedades inmunomoduladoras de las MSC	41
2.3. MSC en IAM	42
3. Vesículas extracelulares (EVs)	44

3.1. Definición y biogénesis	44
3.2. Composición	48
3.3. Métodos de aislamiento y caracterización de las EVs	50
3.3.1. Aislamiento de las EVs.....	50
3.3.2. Caracterización de las EVs	51
3.4. Efectos terapéuticos de las EVs derivadas de MSC	52
3.4.1. Efecto inmunomodulador de las EVs.....	52
3.4.2. Efecto regenerativo	55
3.5. Efecto terapéutico de las MSC-EVs en IAM	56
3.6. Las MSC-EVs como producto biológico terapéutico: ventajas y retos	57
3.6.1. Ventajas de las terapias basadas en MSC-EVs	57
3.6.2. Retos de las terapias basadas en MSC-EVs.....	62

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis	65
2. Objetivos	65

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Declaraciones éticas	69
2. Cultivos celulares	69
2.1. Cultivos primarios	69
2.1.1. MSC inmortalizadas mediante la sobreexpresión de hTERT	69
2.1.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	69
2.1.3. Aislamiento y diferenciación de monocitos	70
2.1.4. Aislamiento y cultivo de neutrófilos	70
2.1.5. Cultivo de fibroblastos cardíacos humanos.....	72
3. Aislamiento de vesículas extracelulares	72
3.1. Ultracentrifugaciones seriadas (UC)	72
3.2. Filtración de flujo tangencial-cromatografía de exclusión por tamaño (TFF-SEC)	73
4. Caracterización de EVs	73
4.1. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).....	73
4.2. Microscopía electrónica de transmisión	73

4.3. Análisis por dispersión dinámica de luz (DLS)	73
4.4. Caracterización mediante reflectancia total atenuada - Infrarrojo por transformada de Fourier (ATR-FTIR)	74
4.5. Imágenes de fluorescencia e interferometría de una sola partícula con ExoView®.....	74
5. Análisis proteómico de las EVs.....	75
6. Análisis lipidómico de las EVs	76
7. Secuenciación de miRNAs presentes en las EVs	76
8. Análisis de expresión génica.....	77
8.1. Extracción de ARN	77
8.2. Retrotranscripción de ARN	77
8.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT- qPCR).....	77
9. Análisis de expresión proteica	79
9.1. Western Blot.....	79
9.1.1. Extracción de proteína	79
9.1.2. Cuantificación de proteínas mediante ensayo de BCA.....	79
9.1.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida	80
9.1.4. Transferencia a membrana de PVDF.....	81
9.1.5. Inmunodetección	81
9.2. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA).....	82
9.3. Ensayo MPO.....	83
10. Análisis de marcadores de monocitos por citometría de flujo	84
11. Ensayo funcional de eferocitosis	84
12. Ensayo de apoptosis con Anexina V y ioduro de propidio (PI).....	85
13. Ensayo de proliferación de linfocitos T	85
14. Ensayo de estrés oxidativo in vitro con DCFH-DA	86
15. Modelo experimental de infarto agudo de miocardio in vivo	87
15.1. Animales.....	87

15.2. Procedimiento de infarto agudo de miocardio y administración de EVs	87
15.3. Ecocardiografía en ratas.....	88
15.4. Sacrificio de los animales.....	88
15.4.1. Fijación por perfusión	88
15.4.2. Criopreservación de tejido.....	89
15.5. Técnicas histológicas	89
15.5.1. Inclusión en parafina y corte de los corazones	89
15.5.2. Desparafinación del tejido	90
15.5.3. Tinción de Tricrómico de Masson	90
15.5.4. Inmunofluorescencia en tejido	91
15.5.5. Medida del tamaño de infarto	92
15.6. Homogeneizado de tejido	92
15.7. Array de citocinas	92
16. Análisis estadístico	93

RESULTADOS

1. Mejora del rendimiento en la extracción de MSC-EVs	97
2. Las EVs obtenidas de tres biopsias distintas de MSC presentan características y cargos similares.	101
2.1. Los procesos biológicos en los que está implicado el cargo proteico de las EVs son iguales independientemente de la biopsia	104
2.2. El contenido lipídico de las EVs no varía entre las distintas biopsias de MSC	107
2.3. Los miRNAs cargados en las EVs son similares entre las biopsias y participan en procesos de inmunoregulación	108
3. Las MSC-EVs inducen la polarización <i>in vitro</i> de los macrófagos M1 hacia un fenotipo pro-resolutivo similar al de los M2.....	110
3.1. El tratamiento con EVs modifica los marcadores de membrana presentes en los macrófagos M1	110
3.2. Las EVs aumentan la capacidad de eferocitosis de los macrófagos	114

4. Las EVs modulan la expresión génica y el estrés oxidativo de los neutrófilos en presencia y ausencia de estímulos inflamatorios	116
5. Las EVs reducen la proliferación de PBMCs activadas.....	118
6. Las EVs modifican la expresión de genes implicados en el depósito de matriz extracelular en fibroblastos cardiacos humanos (HCF)	119
7. Potencial inmunomodulador de las EVs en un modelo <i>in vivo</i> de infarto agudo de miocardio (IAM)	121
7.1. Las EVs amortiguan el deterioro de la función cardíaca tras el IAM	123
7.2. El tejido cicatricial que se genera tras el IAM es menor tras el tratamiento con EVs	124
7.3. Las EVs reducen la expresión génica y proteica de marcadores de macrófagos M1 en la zona infartada a los 7 días tras el IAM.....	125
7.4. El tratamiento con EVs reduce el número de macrófagos M1 infiltrados en la zona de infarto.	127
7.5. La zona infartada de ratas tratadas con EVs tienen un perfil de citocinas diferente a la de ratas tratadas con PBS	132
7.6. Las EVs reducen la infiltración y la activación de los neutrófilos tras el IAM	134
7.7. El tratamiento con EVs de DP-MSC no afecta a la angiogénesis tras el IAM.....	136
DISCUSIÓN	
1. Las EVs derivadas de MSC como producto biológico	141
2. Capacidad inmunosupresora de las EVs de DP-MSC <i>in vitro</i>	144
3. Potencial terapéutico de las EVs de DP-MSC en un modelo <i>in vivo</i> de IAM	147
CONCLUSIONES	
BIBLIOGRAFÍA	

Abreviaturas

RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
miRNA	micro ácido ribonucleico
LPS	Lipopolisacárido
NK	Células Natural Killer
MSC	Célula mesenquimal estromal (<i>Mesenchymal stem cell</i>)
MVBs	Cuerpos multivesiculares (<i>Multivesicular bodies</i>)
ILVs	Vesículas intraluminales (<i>Intraluminal vesicles</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehido
SDS	Dodecilsulfato sódico
HBSS	Solución tampón de sales Hanks
FA	Fracción de acortamiento
CPA	Cambio porcentual de área
GO	Ontología génica (<i>Gene ontology</i>)
kDa	kilo Dalton
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
Treg	Linfocito T regulador
WB	Western Blot
CCL-	Ligando de quimiocina CC
CXCL-	Ligando de quimiocina C-X-C
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EVs	Vesículas extracelulares
sEVs	Vesículas extracelulares de pequeño tamaño
FBS	Suero bovino fetal
IL-	Interleucina
PI	Ioduro de propidio
FITC	Isocianato de fluoresceína
APC	Aloficocianina
PE	Ficoeritrina
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
HCF	Factor de crecimiento de hepatocitos
IAM	Infarto agudo de miocardio
STEMI	Infarto de miocardio con elevación del segmento ST
NSTEMI	Infarto de miocardio sin elevación del segmento ST
TNF	Factor de necrosis tumoral
TLR	Receptor de tipo Toll
HLA	Antígeno leucocitario humano
HSP	Proteína de choque térmico

DCFH-DA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
MFI	Intensidad media de fluorescencia
ECG	Electrocardiograma
cTnT	Troponina T cardíaca
cTnI	Troponina I cardíaca
CK	Creatina quinasa
ICP	Intervención coronaria percutánea
CABG	Cirugía de bypass coronario
tPA	Activador tisular de plasminógeno
IRI	Lesión por isquemia-reperfusión
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daños
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
SPMs	Mediadores lipídicos pro-resolutivos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
NET	Trampas extracelulares de neutrófilos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
MPO	Mieloperoxidasa
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
ECM	Matriz extracelular
MVs	Microvesículas
ISEV	Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares
ESCRT	Complejos de clasificación endosómica necesarios para el transporte
TFF	Filtración de flujo tangencial
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
UC	Ultracentrifugación
IM	Infarto de miocardio
UPLC	Cromatografía líquida
MS	Espectrometría de masas
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
SD	Desviación estándar
TBS	Tampón salino Tris
ATR-FTIR	Reflectancia total atenuada-espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
DLS	Dispersión dinámica de luz
FDR	Fold Discovery Rate o tasa de descubrimiento falso
MFI	Intensidad media de fluorescencia
HCF	Fibroblastos cardíacos humanos

Resumen

El infarto agudo de miocardio (IAM) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. A lo largo de los últimos años se ha visto que la respuesta inflamatoria que ocurre tras desencadenarse el IAM es muy importante en el desarrollo clínico de esta patología. Si se produce una respuesta inflamatoria exacerbada aumenta el riesgo de remodelado cardiaco adverso y fallo cardiaco, pero el hecho de que no se desencadene la respuesta inflamatoria también tiene consecuencias negativas. Debido a la importancia de la respuesta inflamatoria en el IAM, recientemente se han intentado desarrollar terapias dirigidas frente componentes celulares o moleculares que participan en esta respuesta. Dentro de estas terapias, la terapia celular con células mesenquimales estromales (MSC) se ha postulado como un buen candidato. Las MSC se caracterizan fundamentalmente por su capacidad inmunomoduladora, lo que ha conducido a su empleo como agentes terapéuticos en diferentes enfermedades que cursan con procesos inflamatorios. Sin embargo, a lo largo de los últimos años, numerosos estudios han mostrado que el efecto terapéutico de las MSC está mediado fundamentalmente por las vesículas extracelulares (EVs) que liberan. Estas EVs recapitulan los efectos terapéuticos de las células de origen, por lo que también presentan efectos inmunomoduladores. El empleo de las EVs de MSC como agentes terapéuticos presenta ventajas respecto al uso de las MSC como, por ejemplo, una mayor bioseguridad. No obstante, el uso clínico de las EVs todavía tiene que hacer frente a retos como la obtención de grandes cantidades de EVs que constituyan un producto clínico estable y homogéneo.

En este trabajo se ha querido evaluar, por un lado, si las EVs obtenidas de diferentes biopsias de la misma fuente tisular de MSC pueden constituir un producto biológico homogéneo que presente las mismas características y funcionalidad. Por otro lado, se ha evaluado si estas EVs se pueden emplear como agente terapéutico frente a la respuesta inflamatoria que se desencadena tras el IAM. Para ello se ha estudiado el efecto inmunomodulador de las EVs sobre células del sistema inmune, fundamentalmente macrófagos, *in vitro* y en un modelo *in vivo* de IAM en ratas. Los resultados mostraron que las EVs favorecen la diferenciación de los macrófagos M1 proinflamatorios hacia un fenotipo similar al M2, aumentando la expresión de marcadores M2 y reduciendo la secreción de citocinas proinflamatorias. Además, las EVs promovieron la activación de neutrófilos *in vitro* y la reducción de su estrés oxidativo. La administración de EVs en ratas sometidas a IAM amortiguó la caída de la función cardiaca y limitó la extensión de la zona infartada a los 7 y 21 días postinfarto. Las EVs también redujeron el número de macrófagos y neutrófilos proinflamatorios dentro de la zona infartada, favoreciendo la resolución de la inflamación.

En conclusión, las EVs empleadas en este trabajo han demostrado ser un producto biológico estable con independencia de la biopsia de la que proceden, y han demostrado ser capaces de ejercer respuestas pro-resolutivas eficaces en un modelo de isquemia miocárdica, lo que las convierte en potenciales agentes terapéuticos para tratar la inflamación en el IAM.

Summary

Acute myocardial infarction (AMI) is one of the main causes of morbidity and mortality in developed countries. Over the last few years, it has been shown that the inflammatory response that occurs after AMI is triggered is very important in the clinical development of this pathology. If an exacerbated inflammatory response occurs, the risk of adverse cardiac remodeling and heart failure increases, but failure to trigger the inflammatory response also has negative consequences. Because of the importance of the inflammatory response in AMI, recent attempts have been made to develop therapies that target cellular or molecular components involved in this response. Within these therapies, cell therapy with mesenchymal stromal cells (MSC) has been postulated as a good candidate. MSC are mainly characterized by their immunomodulatory capacity, which has led to their use as therapeutic agents in different diseases involving inflammatory processes. However, in recent years, numerous studies have shown that the therapeutic effect of MSCs is mainly mediated by the extracellular vesicles (EVs) they release. These EVs recapitulate the therapeutic effects of the cells of origin and therefore also have immunomodulatory effects. The use of MSC-EVs as therapeutic agents has advantages over the use of MSC, such as increased biosafety. However, the clinical use of EVs still faces challenges such as obtaining large quantities of EVs that constitute a stable and homogeneous clinical product.

The aim of this study was to evaluate, on the one hand, whether EVs obtained from different biopsies of the same MSC tissue source can constitute a homogeneous biological product with the same characteristics and functionality. On the other hand, we have evaluated whether these EVs can be used as a therapeutic agent against the inflammatory response triggered after AMI. To this end, the immunomodulatory effect of EVs on immune system cells, mainly macrophages, was studied *in vitro* and in an *in vivo* model of AMI in rats. The results showed that EVs favored the differentiation of proinflammatory M1 macrophages towards an M2-like phenotype, increasing the expression of M2 markers and reducing the secretion of proinflammatory cytokines. In addition, EVs promoted the activation of neutrophils *in vitro* and the reduction of their oxidative stress. The administration of EVs in rats subjected to AMI blunted the decline in cardiac function and limited the extent of the infarct zone at 7- and 21-days post-infarction. EVs also reduced the number of proinflammatory macrophages and neutrophils within the infarct zone, favoring the resolution of inflammation.

In conclusion, the EVs used in this work have been shown to be a stable biological product regardless of the biopsy from which they are derived, and have been shown to be able to exert effective pro-resolving responses in a model of myocardial ischemia, making them potential therapeutic agents to treat inflammation in AMI.

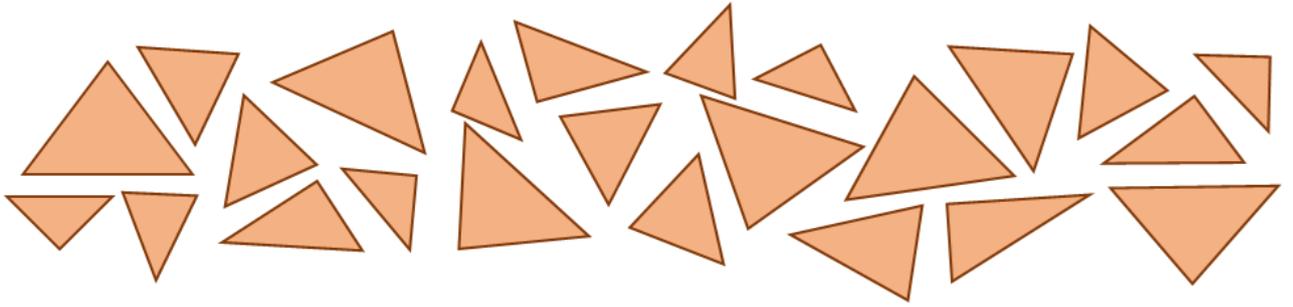
Resum

L'infart agut de miocardi (IAM) és una de les principals causes de morbiditat i mortalitat als països desenvolupats. Al llarg dels darrers anys s'ha vist que la resposta inflamatòria que passa després de desencadenar-se l'IAM és molt important en el desenvolupament clínic d'aquesta patologia. Si es produeix una resposta inflamatòria exacerbada augmenta el risc de remodelat cardíac advers i fallada cardíaca, però el fet que no es desencadeni la resposta inflamatòria també té conseqüències negatives. A causa de la importància de la resposta inflamatòria a l'IAM, recentment s'han intentat desenvolupar teràpies dirigides davant de components cel·lulars o moleculars que participen en aquesta resposta. Dins aquestes teràpies, la teràpia cel·lular amb cèl·lules mesenquimals estromals (MSC) s'ha postulat com un bon candidat. Les MSC es caracteritzen fonamentalment per la seva capacitat immunomoduladora, cosa que ha conduït a la seva ocupació com a agents terapèutics en diferents malalties que cursen amb processos inflamatoris. Tot i això, al llarg dels últims anys, nombrosos estudis han mostrat que l'efecte terapèutic de les MSC està intervingut fonamentalment per les vesícules extracel·lulars (EVs) que alliberen. Aquestes EVs recapitulen els efectes terapèutics de les cèl·lules d'origen, per la qual cosa també presenten efectes immunomoduladors. L'ús de les EVs de MSC com a agents terapèutics presenta avantatges respecte a l'ús de les MSC com, per exemple, una bioseguretat més gran. Tot i això, l'ús clínic de les EVs encara ha de fer front a reptes com l'obtenció de grans quantitats d'EVs que constitueixin un producte clínic estable i homogeni.

En aquest treball s'ha volgut avaluar, d'una banda, si les EV obtingudes de diferents biòpsies de la mateixa font tissular de MSC poden constituir un producte biològic homogeni que presenti les mateixes característiques i funcionalitat. D'altra banda, s'ha avaluat si aquestes EVs es poden fer servir com a agent terapèutic davant de la resposta inflamatòria que es desencadena després de l'IAM. Per això s'ha estudiat l'efecte immunomodulador de les EV sobre cèl·lules del sistema immune, fonamentalment macròfags, *in vitro* i en un model *in vivo* d'IAM en rates. Els resultats van mostrar que les EVs afavoreixen la diferenciació dels macròfags M1 proinflamatoris cap a un fenotip similar al M2, augmentant l'expressió de marcadors M2 i reduint la secreció de citocines proinflamatòries. A més, les EV van promoure l'activació de neutròfils *in vitro* i la reducció del seu estrès oxidatiu. L'administració d'EVs en rates sotmeses a IAM va esmorteir la caiguda de la funció cardíaca i va limitar l'extensió de la zona infartada als 7 i 21 dies postinfart. Les EVs també van reduir el nombre de macròfags i neutròfils proinflamatoris dins de la zona infartada, afavorint la resolució de la inflamació.

En conclusió, les EVs emprades en aquest treball han demostrat ser un producte biològic estable amb independència de la biòpsia de què procedeixen, i han demostrat ser capaços d'exercir respostes pro-resolutives eficaces en un model d'isquèmia miocàrdica, cosa que les converteix en agents terapèutics potencials per tractar la inflamació a l'IAM.

INTRODUCCIÓN



1. Infarto agudo de miocardio

1.1. Definición

El infarto agudo de miocardio (IAM) se define como un síndrome clínico en el que se da una combinación de síntomas concretos, cambios electrocardiográficos y liberación de biomarcadores de daño cardíaco [1]. La primera descripción del infarto agudo en humanos fue la de Herrick en 1912, quien observó seis casos diferentes y estableció que esta patología se caracterizaba por una serie de síntomas clínicos y cambios en el electrocardiograma de los individuos [2]. A lo largo de los años, a medida que el IAM adquiría mayor importancia e interés global, se fue perfilando su definición, siendo en el año 2000 cuando la Comisión Técnica Internacional estableció una definición consensuada de esta patología, que se ha ido ajustando a lo largo de los años [3]. De acuerdo a la Definición Universal del Infarto de Miocardio (UDMI, de sus siglas en inglés) de 2018, la descripción en términos patológicos del IAM es la muerte de las células miocárdicas debido a una isquemia prolongada [4]–[6] que se desencadena como resultado de un desequilibrio entre la oferta y la demanda de oxígeno.

1.1.1. Síntomas del IAM

La isquemia miocárdica desencadena diferentes síntomas entre los que se incluyen dolor torácico, que se puede extender hacia las extremidades superiores, la mandíbula o incluso generar molestias epigástricas durante el esfuerzo o en reposo. Además de esto, los pacientes con IAM también pueden sufrir disnea, fatiga, sudoración, náuseas o latidos cardíacos anormales [7]. Generalmente estas molestias son difusas, no localizadas ni afectadas por el movimiento, sin embargo, no son específicas de la isquemia miocárdica, sino que también se pueden dar en otro tipo de patologías como afecciones gastrointestinales, neurológicas o pulmonares [5]. Además, hay que tener en cuenta que un elevado porcentaje de pacientes no experimentan estos síntomas, fundamentalmente el dolor torácico, dando lugar a lo que se conoce como infarto de miocardio silencioso.

1.1.2. Cambios electrocardiográficos

El electrocardiograma (ECG) es una herramienta esencial para la evaluación diagnóstica de pacientes con sospecha de IAM. Se debe realizar entre los 5-10 primeros minutos tras la llegada del paciente, ya que reduce el tiempo de diagnóstico y de tratamiento, favoreciendo un mejor resultado clínico [5]. La isquemia miocárdica aguda se asocia con cambios dinámicos en la forma de la onda del ECG, fundamentalmente en el segmento ST, aunque también se pueden dar variaciones en el segmento QRS. Todo este estudio permite diferenciar entre los distintos tipos de infarto [8] e incluso permite también determinar el grado de reperfusión que presenta un paciente en función de las variaciones en las ondas electrocardiográficas.

1.1.3. Biomarcadores de daño cardíaco

La necrosis que se produce tras el daño isquémico en el miocardio provoca la liberación de proteínas estructurales y otras macromoléculas intracelulares hacia el exterior como consecuencia de la rotura de las membranas celulares. Estas moléculas acaban liberándose al torrente sanguíneo, actuando como biomarcadores de daño cardíaco. Entre estos biomarcadores se incluyen la troponina cardíaca I y T (cTnI y cTnT), la creatina quinasa (CK de sus siglas en inglés), la mioglobina, o la lactato deshidrogenasa, entre otros [9]. De entre todos los biomarcadores de IM, la troponina cardíaca es el biomarcador de elección debido a su mayor sensibilidad, especificidad y valor pronóstico. Las troponinas raramente se elevan en afecciones no cardíacas y sólo se elevan ligeramente en otras afecciones cardíacas como la taquicardia, la insuficiencia cardíaca y afecciones inflamatorias como la miocarditis. Los niveles de troponina comienzan a elevarse entre 4 y 6 horas después del inicio de los síntomas y alcanzan su valor máximo a las 18-24 horas, pudiendo permanecer elevados entre 7 y 10 días después del IAM [8]. Actualmente se recomienda medir los valores de cTn empleando ensayos de alta sensibilidad para poder hacer un diagnóstico mucho más preciso [5], [10], [11].

Como alternativa a la cTn, aunque menos específica por su presencia en otros órganos, está la isoforma MB de la creatina quinasa (CK-MB). Este biomarcador también aumenta entre las 4 y las 8 horas tras el inicio de los síntomas, alcanzando su máximo a las 24 horas y volviendo a la normalidad a las 48-72 horas.

Por otro lado, aunque tienen importancia histórica, la CK total, la lactato deshidrogenasa y la mioglobina ya no se utilizan para el diagnóstico del IM porque tienen una baja especificidad para la lesión cardíaca. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el uso combinado de varios biomarcadores puede ser útil para la exclusión precoz del IAM [5].

1.2. Epidemiología

El IAM es la manifestación más grave de la enfermedad de las arterias coronarias y es responsable de más de un tercio de las muertes anuales en los países desarrollados. Actualmente, la mejora en los tratamientos y los cambios en el estilo de vida de la población han favorecido la reducción de la mortalidad por enfermedad coronaria a lo largo de las últimas décadas. Sin embargo, el IAM sigue teniendo una huella sustancial en la salud y en la economía mundial, ya que afecta a más de 7 millones de personas en todo el mundo cada año [12].

1.3. Clasificación clínica

El infarto de miocardio se ha clasificado tradicionalmente en dos grandes grupos en función de la presencia o ausencia de elevación del segmento ST en el ECG. Los infartos que presentan elevación del segmento ST (STEMI, de sus siglas en inglés) se caracterizan por un bloqueo completo de la arteria coronaria. Por el contrario, los infartos que no muestran elevación del segmento ST en el ECG (NSTEMI) se caracterizan

porque el bloqueo de la arteria coronaria es parcial. Esto tiene diferentes implicaciones en cuanto a la severidad y al tratamiento que se les da a los pacientes. El STEMI se considera generalmente más grave que el NSTEMI debido a que la oclusión completa de la arteria suele afectar a un área mayor de músculo cardíaco, induciendo mayor muerte. El tratamiento también suele ser diferente, en los casos de STEMI, se opta por la reperfusión del tejido cardíaco mediante técnicas como la intervención coronaria percutánea (ICP), mientras que en el NSTEMI se suelen emplear tratamientos farmacológicos que permitan reducir la oclusión coronaria [13]–[15]. En el siguiente apartado se explicará en más detalle los tratamientos que se emplean en los distintos casos de IAM.

Además de esta clasificación, el IAM se puede clasificar también en cinco tipos distintos en función de su etiología y sus características clínicas y patológicas [5], [16].

- Infarto de tipo 1: es un tipo de infarto debido a aterosclerosis coronaria que generalmente se desencadena por la ruptura de la placa aterosclerótica, que produce la oclusión total o parcial de la arteria coronaria [17].
- Infarto de tipo 2: se incluyen los infartos que se desencadenan por un desajuste entre el suministro y la demanda de oxígeno, que no es resultado de una aterosclerosis aguda. Pacientes con una enfermedad arterial coronaria (EAC) estable pueden desencadenar un IAM de tipo 2 como consecuencia de un factor estresante que provoque un flujo sanguíneo insuficiente al miocardio. Las tasas de mortalidad a corto y largo plazo de los pacientes con IAM de tipo 2 son generalmente más altas que las de los pacientes con IAM tipo 1, debido principalmente a una mayor prevalencia de comorbilidades [18], [19].
- Infarto de tipo 3: este tipo de infarto es el que se produce en pacientes que sufren muerte cardíaca, que presentan síntomas de isquemia miocárdica acompañados de cambios isquémicos en el ECG o fibrilación ventricular, pero mueren antes de que se puedan identificar aumentos en los biomarcadores cardíacos.
- Infarto de tipo 4: este tipo de infarto se subdivide en dos grupos, por un lado, se incluyen aquellos infartos relacionados con una intervención coronaria percutánea (tipo 4A) y, por otro lado, los infartos con trombosis de un stent coronario (tipo 4B)
- Infarto de tipo 5: son aquellos relacionados con un injerto de derivación de arteria coronaria (CABG).

1.4. Tratamiento general del IAM

La primera aproximación terapéutica que se realiza en los pacientes con IAM es intentar disminuir el dolor torácico mediante la administración de oxígeno o fármacos como la nitroglicerina [8]. Simultáneamente, es de vital importancia identificar si el IAM es de tipo STEMI o NSTEMI, ya que la aproximación terapéutica que se lleva a cabo es distinta en cada caso [16].

1.4.1. Estrategias terapéuticas en el STEMI

En el STEMI el principal objetivo terapéutico es la reperfusión de la zona miocárdica isquémica para intentar limitar el tamaño del infarto [20]. De acuerdo a las guías clínicas, la reperfusión se tiene que realizar con la mayor rapidez y eficacia posibles, ya que se ha demostrado que una reperfusión rápida se relaciona con un tamaño de infarto menor y con una menor mortalidad [21]. Existen diferentes estrategias de reperfusión y en cada caso concreto la estrategia debe elegirse teniendo en cuenta qué tratamiento tiene más probabilidades de restablecer completamente el flujo arterial en el menor tiempo posible. Las principales estrategias de reperfusión son la Intervención Coronaria Percutánea (ICP), la fibrinólisis y la cirugía de baipás coronario (CABG de sus siglas en inglés).

Intervención coronaria percutánea (ICP)

La ICP es la aproximación terapéutica de elección siempre y cuando se realice antes de los 90-120 minutos tras el primer contacto clínico del paciente, ya que se ha observado que esta técnica reduce la mortalidad y la probabilidad de re-infarto respecto a la fibrinólisis [16], [20]. Dentro de la ICP, las dos técnicas que se emplean mayoritariamente son la angioplastia con balón y la colocación de stents. Entre ellas, la colocación de stents ha demostrado mejores resultados con una menor tasa de infarto de miocardio posterior que la angioplastia con balón. Además, dentro de los stents, se han desarrollado nuevos dispositivos capaces de liberar fármacos, que han dado mejores resultados que los stents de metal, por lo que actualmente, dentro de la ICP lo que más está recomendado en pacientes con STEMI es la implantación de stents liberadores de fármacos [20].

Fibrinólisis

En general la fibrinólisis no es el tratamiento de primera elección si se puede realizar una ICP, ya que la capacidad de reperfusión de estos tratamientos no es tan alta. No obstante, en algunas ocasiones no se puede realizar la ICP y es necesario aplicar tratamientos fibrinolíticos o incluso se puede llevar a cabo las dos aproximaciones terapéuticas en el mismo paciente. La fibrinólisis únicamente debe administrarse en los casos de STEMI, ya que está contraindicado en NSTEMI, porque los riesgos superan los beneficios.

Los agentes trombolíticos empleados en la fibrinólisis promueven la conversión del plasminógeno endógeno en plasmina, que lisa la fibrina y disuelve los coágulos, favoreciendo la reperfusión de la zona isquémica [22]. Entre los agentes de reperfusión farmacológicos disponibles se incluyen la estreptoquinasa, el activador tisular del plasminógeno (tPA) y sus formas recombinantes (alteplasa, reteplasa y tenecteplasa), siendo el tPA y sus formas recombinantes más efectivos para restaurar la perfusión y reducir la mortalidad que la estreptoquinasa [20].

Cirugía de baipás coronario (CABG)

Consiste en la derivación vascular uniendo artificialmente la zona coronaria isquémica que se localiza tras una obstrucción con la arteria aorta para conseguir

reperfundir la zona dañada. Actualmente la ICP ha reemplazado a la CABG, aunque esta técnica sigue siendo importante en pacientes que no responden adecuadamente a la ICP. Además, la CABG también se puede emplear en pacientes con NSTEMI estable si las guías clínicas lo aconsejan [20], [23].

1.4.2. Estrategias terapéuticas en el NSTEMI

Estos pacientes se caracterizan porque tienen una perfusión residual en la zona isquémica, por lo que la urgencia de revascularización no es tan alta como en el STEMI. No obstante, a la hora de determinar la aproximación terapéutica de los pacientes con NSTEMI es necesario establecer el riesgo de cada paciente a sufrir eventos adversos debido a la isquemia recurrente. En los pacientes con riesgo alto y NSTEMI inestable se realiza una ICP urgente, igual que en los pacientes con STEMI. Por el contrario, a los pacientes con riesgo bajo se les aplican estrategias de isquemia guiada [16].

1.4.3. Terapias antitrombóticas

La trombosis juega un papel importante en la mayor parte de los IAM, por lo que las terapias dirigidas a reducirla tienen bastante importancia como aproximación terapéutica. Dentro de las terapias antitrombóticas se incluyen los agentes antiplaquetarios como la aspirina o los inhibidores P2Y₁₂, los agentes anticoagulantes como la heparina, el bivalirudin o el fondaparinux, y la terapia combinada con ambos tipos de agentes. Dependiendo de si se trata de un STEMI o NSTEMI, las pautas farmacológicas y el tipo de medicamento será uno u otro, pero en general las terapias antitrombóticas se aplican en ambos tipos de infarto [8], [16], [20].

1.5. Papel de la inflamación en el IAM

El inicio de la isquemia miocárdica en el contexto del IAM induce la muerte celular de cardiomiocitos y otras células cardíacas en la zona afectada. Esto desencadena una respuesta proinflamatoria inicial que tiene como finalidad eliminar los restos necróticos presentes en la zona isquémica. El miocardio necrótico se convierte en una región de debilidad mecánica que requiere la generación de cicatrices para prevenir la rotura miocárdica y limitar el deterioro funcional. Este remodelado adaptativo es necesario para prevenir la mortalidad precoz tras un IAM. Sin embargo, un remodelado ventricular excesivo y progresivo, tanto en el lugar del infarto como en el miocardio remoto, altera el tamaño y la función ventriculares, dando lugar al síndrome clínico de fallo cardíaco [24].

Es en este proceso donde la inflamación juega un papel esencial, ya que su ausencia promueve resultados clínicos adversos debido a que no se puede formar una cicatriz adecuada, existiendo un mayor riesgo de rotura cardíaca y, por tanto, mayor mortalidad. Sin embargo, la persistencia de la respuesta inflamatoria conduce también a resultados nocivos, ya que promueve el remodelado cardíaco adverso favoreciendo un mayor riesgo de fallo cardíaco.

La reparación cardíaca tras un IAM consta de varias fases: una fase inflamatoria temprana que tiene lugar las primeras 72 horas tras el IAM; una fase reparadora y

proliferativa, que tiene lugar entre los días 4-10 tras el IAM y en la que se desencadenan respuestas antiinflamatorias o pro-resolutivas; y finalmente, una fase de maduración [25]. En la fase inicial inflamatoria la muerte de las células cardíacas como consecuencia de la isquemia induce la infiltración de numerosas células del sistema inmune que se van a encargar de eliminar las células necróticas. En esta fase se producen cambios que afectan al grosor de la pared ventricular, lo que aumenta aún más la respuesta inflamatoria.

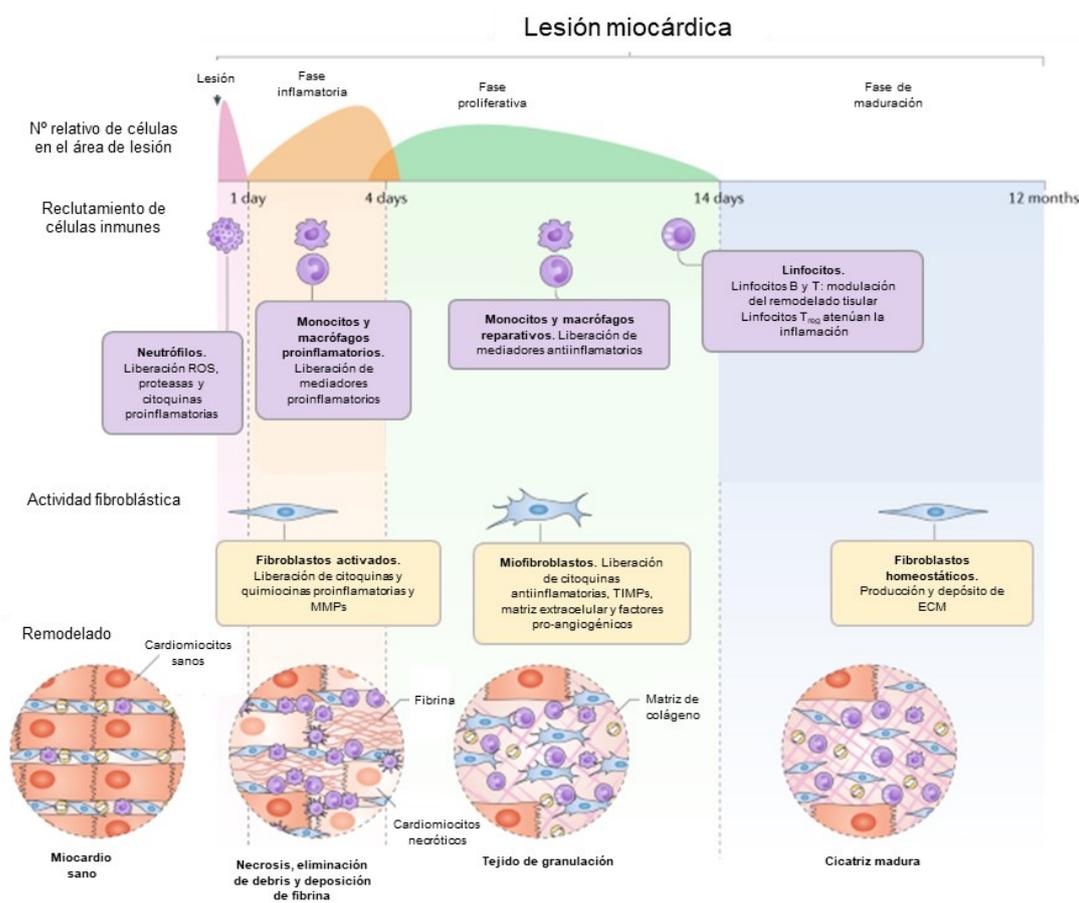


Figura 1. La reparación cardíaca tras el IAM se divide en una primera fase inflamatoria, seguida de una fase proliferativa que finalmente da lugar a una fase de maduración. Tanto las células del sistema inmune (neutrófilos, monocitos, macrófagos y linfocitos) como los fibroblastos actúan de manera diferente en cada una de las fases. Adaptada de Forte, E., Furtado, M. B., & Rosenthal, N. 2018. Nature Reviews Cardiology.

Tras esta respuesta inflamatoria inicial se desencadena una fase reparadora antiinflamatoria o pro-resolutiva que induce la reparación de la zona isquémica afectada, la formación de cicatriz y la neovascularización [26]. La transición entre estas dos fases está finamente regulada mediante interacciones complejas entre múltiples componentes del propio corazón (incluyendo cardiomiocitos, células endoteliales, fibroblastos y el intersticio) y componentes de la respuesta inmune (incluyendo neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos). Las alteraciones tanto del equilibrio como de la transición entre las fases proinflamatoria y antiinflamatoria pueden contribuir al remodelado adverso y aumentar el riesgo de fallo cardíaco. Por lo tanto, es necesario alcanzar un equilibrio fisiológico adecuado entre estas dos fases para una reparación óptima. Una fase inflamatoria desproporcionadamente prolongada, de magnitud

excesiva o insuficientemente suprimida puede provocar un daño tisular sostenido, promoviendo una defectuosa formación de cicatrices y una mayor pérdida celular y disfunción contráctil. Esto finalmente puede conducir a la expansión del infarto y a un remodelado cardíaco adverso [27], [28].

El tránsito adecuado de la actividad inflamatoria a la antiinflamatoria del sistema inmunitario es crucial durante la cicatrización miocárdica. La inhibición de la inflamación parece ser perjudicial para la función miocárdica e incluso puede conducir a la rotura del miocardio. Por el contrario, la resolución adecuada de la inflamación, definida como la degradación de los productos inflamatorios que conduce al cese de la inflamación y al restablecimiento de la homeostasis, es esencial para prevenir la cronificación del proceso inflamatorio. Los objetivos clave de la resolución de la inflamación en el IAM son la limitación de la infiltración del tejido miocárdico con células polimorfonucleares, la disminución de la permeabilidad vascular y la eliminación adecuada de las células destruidas y los componentes de la matriz extracelular. Comprender el papel que desempeñan las células inmunitarias en la resolución de la inflamación permitirá elaborar planteamientos diagnósticos y terapéuticos adecuados para mejorar los resultados del IAM [25].

En el contexto actual del IAM, sobre todo en los casos de STEMI, la aproximación terapéutica de elección es la reperfusión de la zona isquémica mediante ICP. Esta aproximación ha permitido reducir la mortalidad de los pacientes, sin embargo, la reperfusión de la zona isquémica también induce lo que se denomina lesión por isquemia/reperfusión (IRI, de sus siglas en inglés), que suele producirse entre 6 y 24 horas después de la reperfusión [29], [30]. La IRI puede contribuir hasta en un 50% al tamaño final del IAM, aumentando la probabilidad de que se produzca un remodelado adverso del ventrículo izquierdo, lo que a su vez incrementa el riesgo a sufrir fallo cardíaco. La IRI aumenta de forma exacerbada la muerte de los cardiomiocitos en la zona reperfundida y, por tanto, desencadena una respuesta inflamatoria inicial mayor, que si no se controla puede contribuir al remodelado cardíaco adverso y favorecer el riesgo a tener un fallo cardíaco [26], [31].

La patogenia de la insuficiencia cardíaca tras un IM está estrechamente relacionada con la reparación y el remodelado del corazón infartado. El término "remodelado ventricular postinfarto" describe una constelación de cambios celulares, moleculares y proteómicos tanto en el miocardio infartado como en el no infartado que, en última instancia, dan lugar a dilatación ventricular, hipertrofia de los segmentos viables y disfunción miocárdica progresiva. La gravedad del remodelado adverso postinfarto depende del tamaño del infarto, pero también se ve afectada por las características cualitativas de la reparación cardíaca y por el perfil de alteraciones celulares y moleculares en el miocardio viable [32].

1.5.1. Fase proinflamatoria

Tras el IAM, la isquemia induce la lesión y la muerte de diferentes células miocárdicas (cardiomiocitos, células endoteliales, fibroblastos), así como una mayor permeabilidad

del endotelio que permite la infiltración de células inmunes en la zona isquémica [31], [33]–[35]. Las células necróticas y la matriz extracelular dañada comienzan a liberar sustancias que actúan como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, de sus siglas en inglés), que son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, de sus siglas en inglés) presentes en las células del sistema inmune. El reconocimiento de los DAMPs por parte de las células inmunitarias activa el inicio de una respuesta proinflamatoria estéril en la que se ponen en marcha varios procesos como la activación de la cascada del complemento, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la liberación de mediadores proinflamatorios como citocinas y quimiocinas [36], [37]. La presencia de estos mediadores proinflamatorios induce un mayor reclutamiento de células inmunes aumentando aún más la respuesta inflamatoria para conseguir eliminar todas las células apoptóticas, así como los restos celulares necróticos y la matriz extracelular dañada [26].

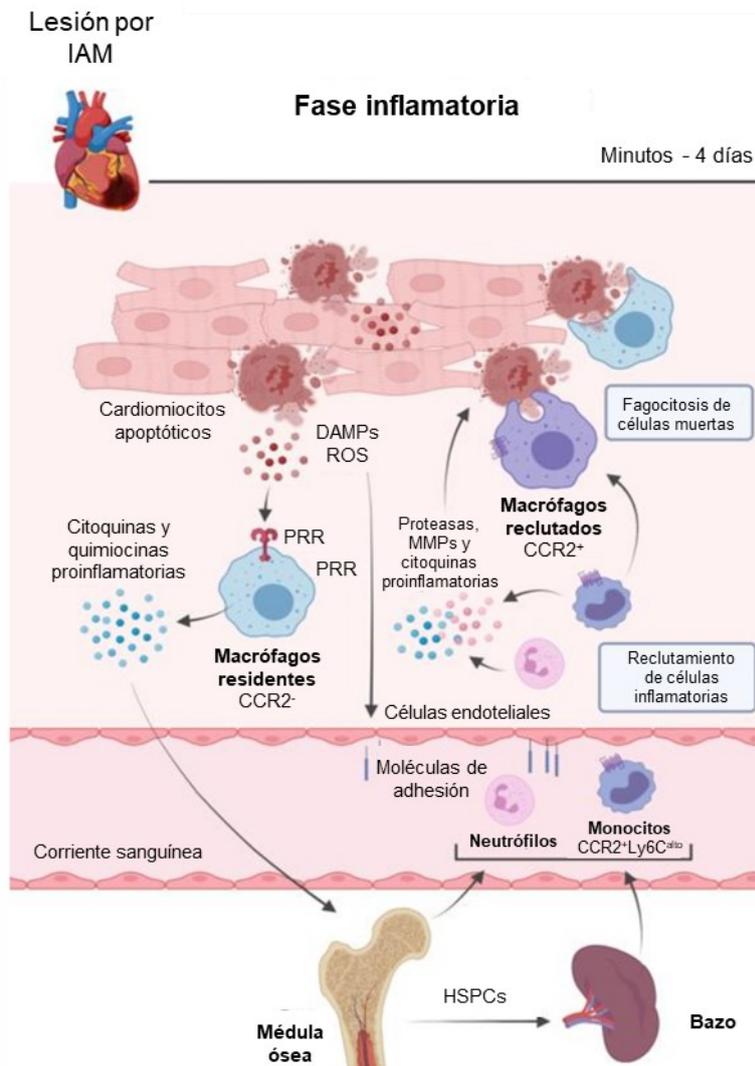


Figura 2. Fase proinflamatoria tras el IAM. La muerte celular libera señales que activan el reclutamiento de células del sistema inmune, las cuales liberan citocinas y otras señales proinflamatorias. Se produce un aumento de la permeabilidad endotelial para favorecer el reclutamiento de células inmunes. Adaptada de Viola, M., de Jager, S. C., & Sluijter, J. P. 2021. International Journal of Molecular Sciences.

Dentro de los DAMPs que activan la respuesta inmune se incluyen moléculas como la anfoterina (HBMG1, de sus siglas en inglés), la interleucina (IL)-1 α , proteínas de choque térmico, o el ADN mitocondrial, entre otros [35], [38]. Estos DAMPs activan los PRRs, principalmente receptores de tipo Toll (TLR, de sus siglas en inglés), receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos (NLRs) y el receptor para compuestos de glicosilación avanzada (RAGE) [36]. La unión de los DAMPs a los PRRs, presentes tanto en células del sistema inmune como en células endoteliales y cardiomiocitos, induce la activación de las vías de señalización de las proteinquinas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), que promueven la síntesis de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión celular. El reclutamiento posterior de leucocitos amplifica aún más la respuesta inflamatoria, aumenta la producción de DAMPs y promueve tanto la eferocitosis de las células apoptóticas como la digestión de los tejidos a través de la liberación de proteasas y oxidasas [27]. La eferocitosis eficiente de los cardiomiocitos apoptóticos es especialmente importante para la transición a la fase de resolución de la inflamación y la cicatrización. Este proceso está mediado principalmente por macrófagos que expresan la tirosina quinasa reproductora del epitelio mieloide (MERTK) [39].

Citocinas y quimiocinas en el IAM

Poco tiempo después del IAM, tanto las células residentes cardíacas como las células inflamatorias circulantes secretan citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF α , IL-6 e IL-18, que son propagadores clave de la respuesta inflamatoria [40], [41]. Una de las principales características de las citocinas es su pleiotropía funcional y su redundancia, que consiste en que una única citocina es capaz de exhibir una amplia gama de efectos biológicos en distintos tipos de células y varias citocinas pueden ejercer acciones similares y superpuestas en el mismo tipo de células [42]. Estos efectos multifuncionales, superpuestos y, a menudo, contradictorios de las citocinas han dificultado la comprensión de su papel funcional en el IAM.

Dentro de las citocinas, las quimiocinas, que son citocinas quimioatrayentes, también desempeñan un papel importante en el IAM. Las quimiocinas se encargan de atraer leucocitos a la zona dañada y son capaces de provocar distintas respuestas en células del sistema inmune relacionadas con procesos de activación, desgranulación y apoptosis de los leucocitos. De esta forma, las quimiocinas contribuyen a aumentar la respuesta inflamatoria que se desencadena en el miocardio tras el proceso isquémico. Dentro de las quimiocinas se pueden diferenciar los subtipos CC, CXC y CX3C, cada uno de los cuales ejerce una mayor capacidad quimioatrayente sobre diferentes tipos de células inmunitarias [43].

A pesar de que hay estudios preclínicos que sugieren que las citocinas y las quimiocinas sirven para agravar la lesión isquémica y el remodelado cardíaco, también hay varios estudios que han demostrado que las citocinas y quimiocinas son capaces de inducir respuestas cardioprotectoras y efectos celulares pleiotrópicos en las células residentes del miocardio y del sistema inmunitario. Estos estudios indican que las

citocinas y quimiocinas proinflamatorias inducen efectos en el corazón infartado que no se pueden catalogar simplemente como "buenos" o "malos", sino que son complejos y variables, ya que dependen de factores como el contexto temporal, la composición celular prevaleciente en el microambiente y otras respuestas no inflamatorias como el crecimiento, la apoptosis, el estrés oxidativo o la función mitocondrial [27]. Esto muestra el gran desafío que supone abordar los diferentes componentes de la respuesta inflamatoria en el IAM.

Es importante tener en cuenta que la inflamación es un evento necesario para la reparación tisular efectiva y, por lo tanto, la supresión de la activación inflamatoria que no es excesiva o está desregulada puede inducir efectos deletéreos sobre el remodelado cardíaco después del IAM [44], [45].

La supresión inadecuada o la duración prolongada de la respuesta proinflamatoria que se produce tras el IAM pueden tener graves consecuencias patológicas, entre las que se incluyen: la muerte de cardiomiocitos, el deterioro de la función sistólica, la dilatación del ventrículo como consecuencia de la extensa degradación de la matriz, el compromiso de la integridad de la pared ventricular, la rotura cardíaca o la fibrosis [46], [47].

1.5.2. Fase pro-resolutiva o antiinflamatoria

La fase antiinflamatoria o pro-resolutiva regenerativa comienza a aproximadamente a los 4 días tras el IAM. Esta fase se caracteriza por la supresión, resolución y contención de la respuesta proinflamatoria inicial, mediante la activación de vías inhibitoras endógenas que suprimen la inflamación e inducen cambios en las funciones de los leucocitos infiltrantes dentro de la zona del IAM [26].

La transición de la fase inflamatoria a la fase pro-resolutiva o reparativa tras el IAM se desencadena por un conjunto de cambios en el microambiente cardíaco, en los que están estrechamente implicados los distintos tipos celulares del sistema inmune infiltrados en la zona dañada. Para que se produzca una cicatrización óptima se tienen que activar mecanismos que inducen la resolución del infiltrado inflamatorio y la transición al depósito de tejido fibroso. Estos mecanismos implican la eliminación del infiltrado de neutrófilos y de los restos de la matriz, la inhibición de la síntesis de citocinas y quimioquinas, la eliminación de la matriz provisional de fibrina y finalmente la activación de los fibroblastos y la deposición de colágeno. Aunque muy pocos estudios se han ocupado del proceso de resolución de la inflamación en la cicatrización tras el IAM, comprender estos conceptos es esencial para poder desarrollar estrategias dirigidas a la reparación cardíaca [35].

Es probable que todos los tipos celulares implicados en la reparación cardíaca participen en la represión y resolución de la reacción inflamatoria que se produce tras el IAM, sin embargo, aún se desconocen los efectores celulares clave que impulsan la inhibición de la inflamación [48]. No obstante, se ha observado que poblaciones como las de los neutrófilos o los monocitos y macrófagos tienen una gran importancia en estos procesos.

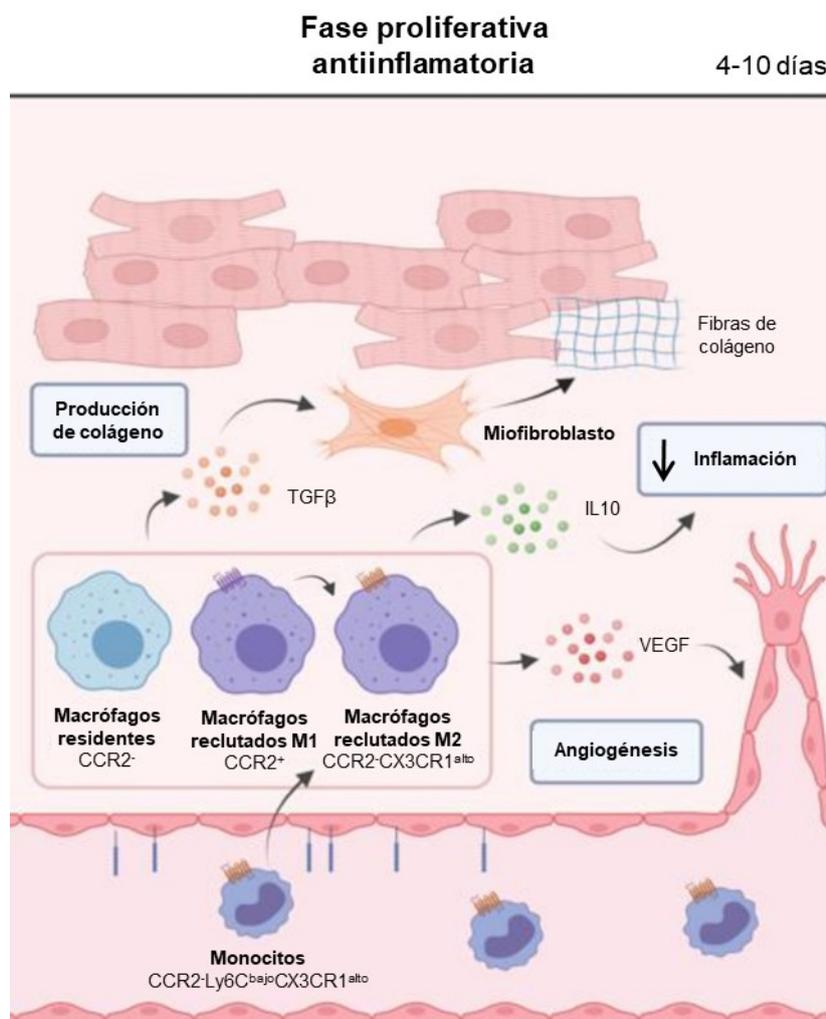


Figura 3. Fase proliferativa antiinflamatoria del IAM. Se desencadena aproximadamente entre el cuarto y décimo días tras el IAM. En esta fase se produce un cambio hacia un ambiente antiinflamatorio en el que los macrófagos pasan a tener un fenotipo M2 pro-resolutivo. Los fibroblastos comienzan a generar el tejido de granulación y se activa la formación de vasos sanguíneos. Adaptada de Viola, M., de Jager, S. C., & Sluijter, J. P. 2021. International Journal of Molecular Sciences.

Los neutrófilos son células con un tiempo de vida muy corto y, aunque su supervivencia se puede prolongar por la presencia de DAMPs, hipoxia o citocinas pro-inflamatorias, lo normal es que rápidamente, a partir del cuarto día tras el IAM, entren en apoptosis o necrosis y mueran [49]. Los neutrófilos apoptóticos inducen la resolución de la inflamación mediante diferentes mecanismos, por un lado, liberando mediadores pro-resolutivos, como los mediadores lipídicos pro-resolutivos (SPMs, de sus siglas en inglés) o la anexina A1, que impiden el infiltrado de nuevos neutrófilos en la zona afectada e inducen la expresión de señales por parte de los neutrófilos que promueven la fagocitosis de los mismos por los macrófagos. La fagocitosis de los neutrófilos apoptóticos induce a su vez la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo pro-resolutivo o M2. Estos macrófagos secretan citocinas antiinflamatorias y pro-fibróticas, así como factores pro-angiogénicos que suprimen la inflamación y promueven la reparación tisular [27], [50], [51]. Se ha observado que la depleción de los macrófagos produce efectos adversos en el tamaño del infarto, en el remodelado ventricular y en la formación de trombos, sin embargo, la restauración de los macrófagos atenúa estos

efectos [52]. Cabe destacar que, en el IAM, los macrófagos no pueden clasificarse simplemente como M1 o M2, sino que presentan una amplia gama de fenotipos matizados, que se explicarán con más detalle en el siguiente apartado. La modulación farmacológica de la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo pro-resolutivo o antiinflamatorio podría constituir una estrategia terapéutica para mejorar la fase reparativa tras el IAM [26].

Además de los neutrófilos y los macrófagos, hay otros tipos celulares del sistema inmune que contribuyen en la fase reparativa, como son las células dendríticas o los linfocitos T reguladores (Treg). Se ha observado también que las células dendríticas tienen un papel importante en la reparación y el remodelado cardíaco, ya que su depleción promueve la extensión de la fase proinflamatoria al aumentar la infiltración de macrófagos proinflamatorios y sostener la producción de citocinas proinflamatorias [26], [53]. Los Treg también tienen efectos protectores en el IAM, ya que son capaces de inhibir el reclutamiento de células inflamatorias y la secreción de citocinas proinflamatorias [54], así como de promover la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo pro-resolutivo [55] y de prevenir la apoptosis de los cardiomiocitos [56], entre otras cosas.

1.5.3. Los macrófagos en el IAM

En condiciones normales dentro del miocardio los macrófagos constituyen entre el 6% y el 8% de las células que no son cardiomiocitos. Estos macrófagos cardíacos desempeñan un papel en el desarrollo cardíaco, la inmunovigilancia y pueden contribuir a importantes funciones cardíacas especializadas, como la conducción del impulso eléctrico [24], [57], [58]. Se ha observado que los macrófagos son especialmente abundantes en el sistema de conducción del corazón, donde forman uniones comunicantes con los cardiomiocitos a través de conexina 43 [57]. En general, se encargan del mantenimiento de la homeostasis en el miocardio sano, cambiando su abundancia y fenotipo en respuesta a lesiones o enfermedades tisulares [59].

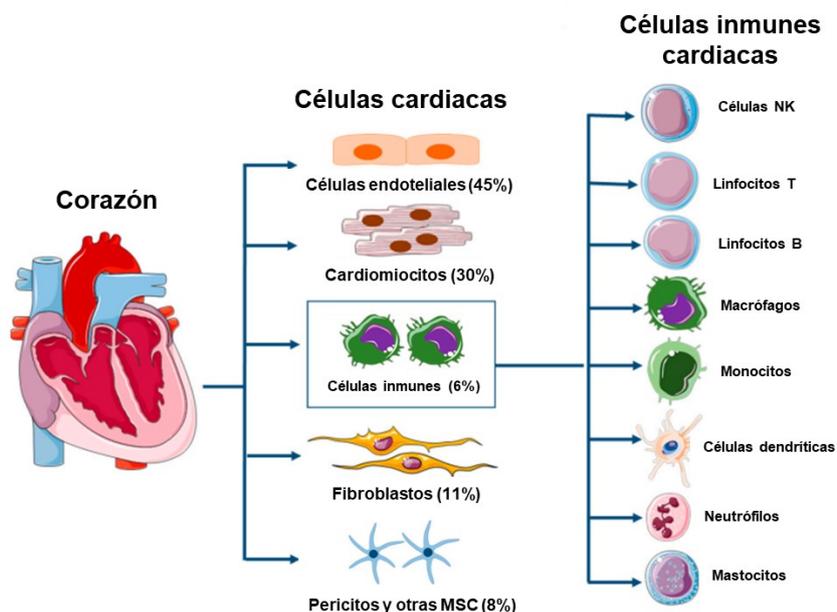


Figura 4. Composición celular del corazón. El 6% del corazón está constituido por células inmunes, dentro de las cuales se incluyen células NK, macrófagos, linfocitos o células dendríticas. Adaptada de Lafuse, W. P., Wozniak, D. J., & Rajaram, M. V. 2020. Cells.

Mediante estudios de perfiles transcripcionales a partir de muestras de tejido cardíaco se han podido identificar subconjuntos distintos de macrófagos cardíacos humanos que se diferencian en su origen, localización y función inflamatoria [60]. Los macrófagos residentes cardíacos provienen de un linaje embrionario distinto al de los macrófagos derivados de monocitos circulantes y mantienen una población autoproliferativa en la edad adulta, que es independiente del reclutamiento de macrófagos derivados de monocitos y que se va reduciendo con la edad [61], [62].

El estudio detallado de los macrófagos cardíacos mostró que en condiciones sanas hay al menos cuatro subconjuntos, que se diferencian por sus marcadores. Todos los macrófagos son $CD45^+F4/80^+CD11b^+CD64^+MERTK^+$, pero difieren en la expresión del MHC de clase II, el receptor de quimiocinas CC-2 (CCR2) y el antígeno linfocitario 6C (Ly6C). Los macrófagos residentes mayoritarios son aquellos que no expresan CCR2 ($CCR2^-$) y dentro de ellos se identifican dos grupos $MHC-II^{bajo}CCR2^-$ y $MHC-II^{alto}CCR2^-$ [62], [63]. Los macrófagos $CCR2^+$, aunque pueden ser residentes en condiciones normales, suelen ser una población muy pequeña, que aumenta notablemente en condiciones patológicas. La cuarta población de macrófagos es la $Ly6C^+$, que es la menos abundante de todas [57].

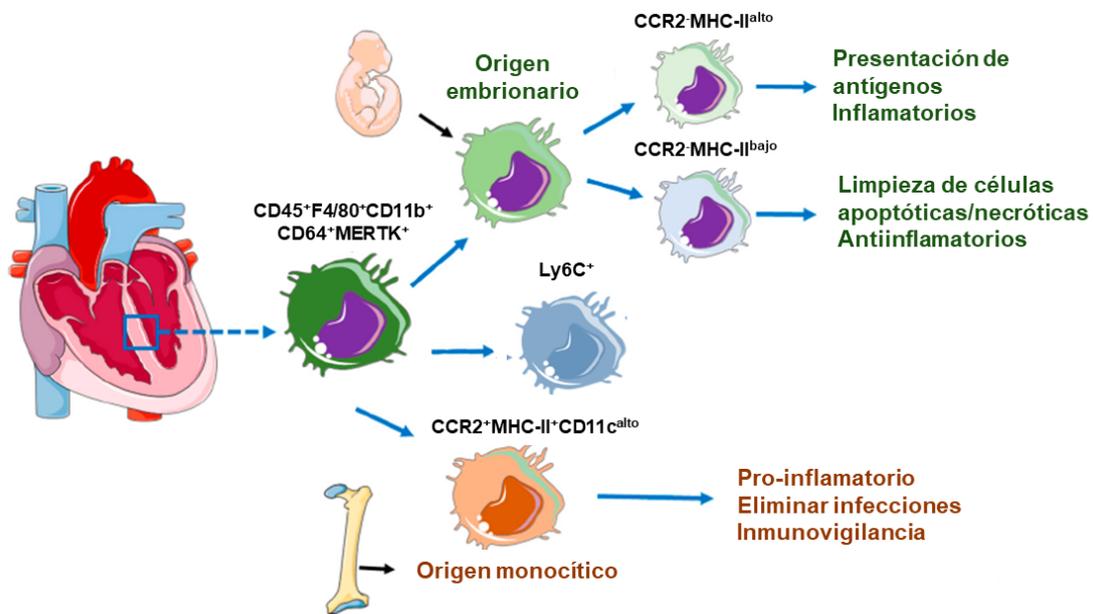


Figura 5. Poblaciones de macrófagos en el corazón. Las poblaciones de origen embrionario no expresan en su mayoría CCR2, mientras que la población que sí que expresa este marcador suele ser de origen monocítico. Cada una de las poblaciones cumple una función diferente. Adaptada de Lafuse, W. P., Wozniak, D. J., & Rajaram, M. V. 2020. Cells.

En condiciones sanas, los macrófagos residentes en el corazón ($MHC-II^{bajo}CCR2^-$ y $MHC-II^{alto}CCR2^-$) presentan un perfil similar al de los macrófagos M2 [64], aunque también expresan algunas citocinas proinflamatorias como $IL1\beta$, por lo que estos macrófagos residentes cardíacos no se ajustan exactamente a la clasificación general

de macrófagos M1/M2 [65]. En el caso de los corazones humanos los macrófagos proinflamatorios se caracterizan por ser CD14⁺CD16⁻, mientras que los pro-resolutivos son CD14⁺CD16⁺ [24].

En condiciones patológicas, se produce un incremento de la población de macrófagos MHC-II^{alto}CCR2⁺, que deriva de monocitos circulantes. Aunque esta población generalmente se recluta durante los procesos inflamatorios cardiacos, acaba sustituyendo a los macrófagos cardiacos embrionarios a medida que sus propiedades proliferativas disminuyen con la edad. [46], [62]. Sin embargo, a diferencia de los macrófagos residentes, los macrófagos que se generan a partir de monocitos circulantes no proliferan en el corazón. Estos monocitos se caracterizan por ser Ly-6C^{alto} y, a diferencia de los monocitos Ly-6C^{bajo}, son mucho más invasivos, inducen una monocitosis excesiva y se diferencian en macrófagos. Se ha visto que estos monocitos inflamatorios dependen de CCR2, CCR5 y CX3CR1 para infiltrarse en las zonas de lesión.

En el IAM, minutos después de que ocurra el daño isquémico, se produce la degranulación de los mastocitos residentes [66], la producción de citocinas y quimiocinas inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF y CCL2) por parte de los macrófagos residentes y los cardiomiocitos [67], [68], y la activación de las células endoteliales. Todo esto conduce al reclutamiento de monocitos CCR2⁺Ly-6C^{alto} procedentes primero de la circulación y después del bazo, que se infiltran en la zona infartada mediante interacciones entre el ligando MCP-1 y el receptor CCR2 [44], [69]. Aproximadamente al tercer día tras el IAM el infiltrado de monocitos alcanza su máximo y se diferencian a macrófagos [70]. Las poblaciones de macrófagos en la zona infartada alcanzan su máximo entre los días 5 y 7 tras el IAM. En este momento, los macrófagos proinflamatorios de tipo M1 dominan la población celular de la zona infartada y se encargan de secretar citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y MMP, potenciando la respuesta proinflamatoria y facilitando la descomposición del colágeno y la matriz extracelular. Estos macrófagos proinflamatorios desempeñan un papel esencial en la preparación del tejido infartado para su reparación mediante la eliminación de células inmunitarias apoptóticas, restos celulares y componentes de la matriz [65]. La fase proinflamatoria disminuye gradualmente dando paso a la fase reparativa, momento en el cual se produce una transición fenotípica de monocitos y macrófagos proinflamatorios (monocitos Ly-6C^{alto} y macrófagos M1) hacia fenotipos pro-resolutivos (monocitos Ly-6C^{bajo} y macrófagos M2). Estos monocitos y macrófagos anti-inflamatorios secretan factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) para promover la proliferación de fibroblastos que generen una cicatriz y promover la revascularización [46]. Los macrófagos M2, tanto humanos como murinos, se caracterizan por tener niveles altos de expresión de CX3CR1 [71].

En definitiva, tras el IAM se producen dos olas de infiltrado de monocitos, la primera a los pocos minutos del IAM, donde se infiltran monocitos Ly-6C^{alto} y la segunda a los 4-5 días tras el IAM donde se infiltran monocitos Ly-6C^{bajo} que se diferencian a M2.

En la zona remota del miocardio, la que está alejada de la zona de infarto, también se produce una expansión similar a la que ocurre en la zona infartada, aumentando primero los monocitos y macrófagos proinflamatorios y, posteriormente, los antiinflamatorios, aunque estas variaciones se producen días más tarde que en la zona de infarto [24].

Algunos estudios han correlacionado la monocitosis con malos resultados tras el IAM, por lo que se estableció la hipótesis de que la infiltración excesiva de monocitos es perjudicial. Sin embargo, el tratamiento con liposomas cargados con clodronato, un compuesto que depleta los monocitos circulantes, ya sea durante la fase proinflamatoria temprana o la fase proliferativa posterior, conduce alteraciones en la reparación del infarto [70]. Esto sugiere que la presencia de monocitos y macrófagos es esencial en el proceso de curación del infarto.

1.5.4. Los neutrófilos en el IAM

A diferencia de los macrófagos, no existe una población definida de neutrófilos que esté presente en el corazón sano y tenga funciones homeostáticas, debido principalmente, al corto tiempo de vida que suelen tener estas células. No obstante, en condiciones patológicas, en concreto cuando se desencadena un IAM, se produce una fuerte granulopoyesis e infiltración de los neutrófilos en el corazón. En condiciones normales, la señalización de CXCL12-CXCR4 evita la salida de neutrófilos de la médula ósea, sin embargo, después del IAM esta señalización se interrumpe [72] y se activa la señalización entre CXCL1/2-CXCR2, que impulsa su movilización hacia la sangre periférica [73]–[75] y su infiltración en el miocardio isquémico [76]. Los DAMPs y los mediadores inflamatorios liberados por las células residentes son reconocidos por los receptores de los neutrófilos [77], que comienzan a fagocitar los restos celulares y de matriz dañada generados por la isquemia. Al mismo tiempo, los neutrófilos comienzan a secretar ROS, enzimas proteolíticas (como MPO o MMPs) y mediadores inflamatorios que aumentan la inflamación y pueden causar muerte en los cardiomiocitos [78].

Los neutrófilos finalmente entran en apoptosis y son eliminados por los macrófagos en un proceso conocido como eferocitosis [79]. Este proceso estimula la producción de mediadores antiinflamatorios y pro-resolutivos como TGF-1, IL10, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [80] o SPMs [81], que inician el proceso de resolución de la inflamación [82], [83]. Si los neutrófilos no se eliminan a tiempo del sitio del infarto se puede desencadenar un proceso inflamatorio no resolutivo que puede dar lugar a un remodelado cardíaco adverso [84]. No obstante, se ha visto que, aunque los neutrófilos contribuyen a la patogénesis del IAM, también son esenciales en el proceso de curación y resolución de la inflamación, ya que su depleción genera un empeoramiento de la función cardíaca y aumento de la fibrosis [85], [86].

En concreto, a lo largo del IAM se han descrito dos fenotipos distintos de neutrófilos, que se pueden clasificar como neutrófilos N1 (Ly6G⁺CD206⁻) y neutrófilos N2 (Ly6G⁺CD206⁺) [87]. Los neutrófilos N1 presentan un perfil proinflamatorio con una alta expresión de marcadores proinflamatorios como CCL3, IL1 β , IL12 α y TNF α . Por su

parte, los neutrófilos N2 expresan altos niveles de moléculas antiinflamatorias como CD206 o IL10. En general, los neutrófilos N1 siempre son predominantes (>80 % del total de neutrófilos), aunque el porcentaje de neutrófilos N2 aumenta progresivamente después del IAM, pasando de un 2,4% en el día 1 tras el IAM al 18,1% en el día 7 [88].

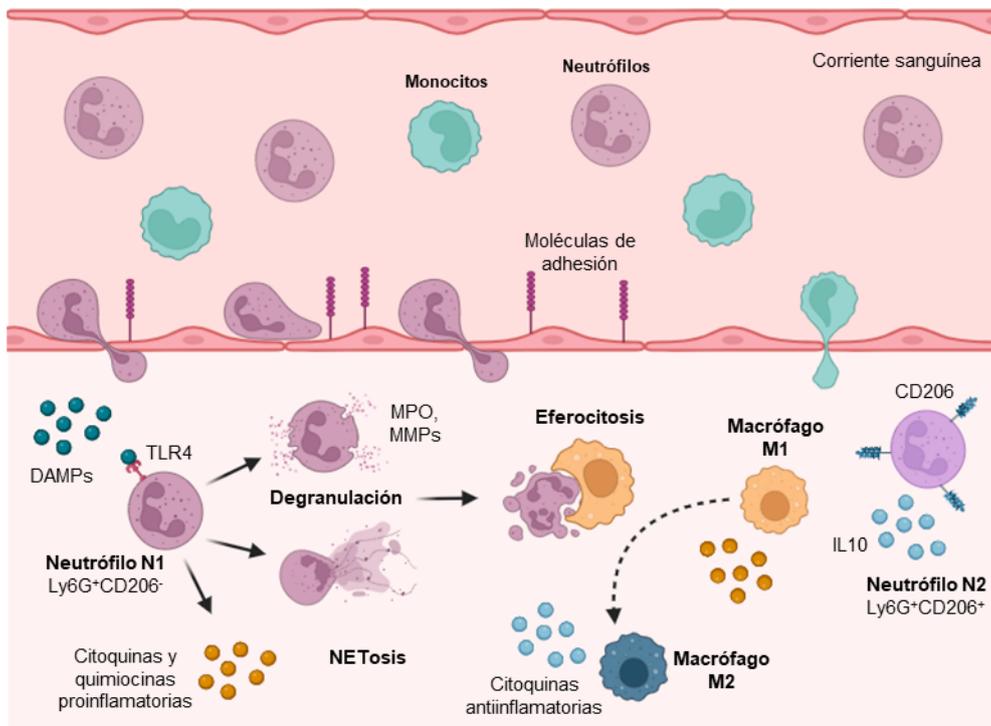


Figura 6. Los neutrófilos en el IAM. Inicialmente los neutrófilos presentan un fenotipo N1 proinflamatorio que tras su degranulación y NETosis entran en apoptosis. La eferocitosis de los neutrófilos apoptóticos por parte de macrófagos M1 induce su polarización hacia macrófagos M2. Además, hay un subtipo de neutrófilos N2 en el IAM que expresan CD206 y liberan citocinas antiinflamatorias. Imagen creada con BioRender.

1.5.5. Los fibroblastos cardíacos en el IAM

Los fibroblastos son las principales células encargadas de la formación de la cicatriz tras el IAM. El fenotipo de los fibroblastos cambia a lo largo de las distintas fases que se producen después del IAM (Figura 7). En un corazón sano, los fibroblastos cardíacos interactúan con el entorno extracelular para mantener la homeostasis y contribuyen a la transducción de potenciales eléctricos mediante su interacción con los cardiomiocitos a través de conexinas [89], [90]. Cuando se desencadena el IAM, los fibroblastos durante la fase inflamatoria pasan a tener inmediatamente a un fenotipo antimigratorio, antiproliferativo e inflamatorio, produciendo citocinas proinflamatorias y MMPs [91]. De esta forma, los fibroblastos contribuyen a eliminar la matriz extracelular (ECM de sus siglas en inglés) dañada. Durante la fase proliferativa del IAM, los fibroblastos se polarizan hacia un fenotipo anti-inflamatorio y proangiogénico. En esta fase aumenta la expresión de α -SMA y TGF β 1 [92]–[94], contribuyendo a la síntesis de componentes de la ECM [35] y la expresión de VEGF, favoreciendo la angiogénesis en la zona isquémica [95]. Por último, en la fase de maduración del IAM, los fibroblastos pasan a tener un fenotipo antiangiogénico y profibrótico, siendo su principal función el depósito de ECM para constituir la cicatriz. Estos fibroblastos se caracterizan por un aumento en la

síntesis de colágeno, fundamentalmente colágeno I y III [96], así como en la expresión de fibronectina 1 (FN1) y α -SMA [97]. A partir del séptimo día tras el IAM, los fibroblastos comienzan a desactivarse y vuelven a sus funciones homeostáticas.

Los resultados clínicos tras el IAM dependen de la cantidad y la calidad de la cicatriz formada, por lo tanto, es necesario un equilibrio en el depósito y el entrecruzamiento de la ECM para minimizar la expansión del infarto y mantener al mismo tiempo una tensión óptima [89].

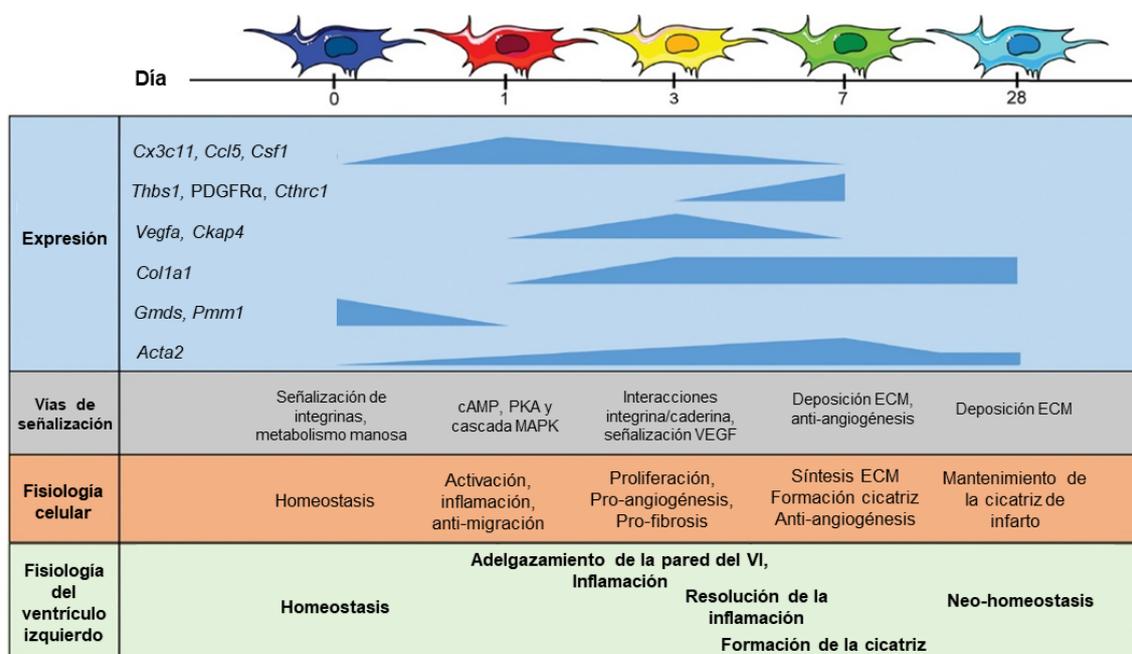


Figura 7. Evolución de los fibroblastos a lo largo del IAM. Modificaciones en su expresión génica, señalización y procesos fisiológicos en los que participan a lo largo de los días tras el IAM. Adaptada de Daseke II, M. J. et al. 2020. Matrix biology.

1.5.6. Tratamientos frente la inflamación en el IAM

El papel fundamental de la inflamación en todos los aspectos de la respuesta fisiológica ante el IAM sugiere que el tratamiento de señales inflamatorias concretas puede ser prometedor para reducir la mortalidad y prevenir la insuficiencia cardíaca en pacientes que sobreviven a un IAM. El diseño de estas estrategias terapéuticas debe tener en cuenta importantes consideraciones temporales y espaciales, ya que los procesos inflamatorios tienen diferentes funciones y consecuencias en las distintas fases tras el IAM. No obstante, es probable que exista una ventana de oportunidad terapéutica para atacar de forma segura y eficaz señales inflamatorias específicas. Sin embargo, en la actualidad todavía no hay desarrollada completamente ninguna estrategia terapéutica dirigida frente al proceso inflamatorio en el IAM [32], [98].

Los primeros intentos de inhibir la inflamación se centraron principalmente en el uso de estrategias antiinflamatorias amplias, como el uso de glucocorticoides, antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs de sus siglas en inglés) y estrategias inmunomoduladoras con ciclofosfamida, metotrexato o ciclosporinas. Todas estas estrategias solían tener consecuencias adversas, por lo que fracasaron [32], [99]. Estos

fracasos junto con los avances en la comprensión de la respuesta inflamatoria condujeron al desarrollo de dianas inflamatorias específicas en el IAM. Dentro de estas dianas se incluyen el complemento, la proteína C reactiva, integrinas y selectinas concretas, quimiocinas y citocinas. Entre todas ellas, las dianas terapéuticas que mayor interés han suscitado son las citocinas IL1 β , IL6 y TNF α .

La Anakinra es una forma recombinante del antagonista del receptor de IL1 que se une a él, pero no activa una respuesta de señalización, por lo que funciona como un inhibidor competitivo de IL1 α /IL1 β . Por otro lado, los anticuerpos anti-IL1 β (como canakinumab) inhiben selectivamente las respuestas mediadas por esta citocina. En la mayoría de los estudios experimentales de IAM, la inhibición del IL1 con Anakinra o anticuerpos anti-IL-1 β mostró efectos protectores, reduciendo el tamaño del infarto y previniendo el remodelado adverso [100], [101]. Debido a los buenos resultados preclínicos se inició un ensayo clínico, “Estudio de resultados de trombosis antiinflamatoria de canakinumab (CANTOS)” para estudiar el efecto de canakinumab en pacientes con enfermedad cardiovascular obteniendo resultados modestos [102]. Por otro lado, estudios piloto han demostrado que Anakinra se puede administrar de manera segura en pacientes con STEMI y puede atenuar la el remodelado adverso, al tiempo que protege del desarrollo de insuficiencia cardíaca posterior al IAM [103], [104].

Se ha estudiado también el efecto de Tozilizumab, un anticuerpo antagonista de IL6 en pacientes con NSTEMI, observando que reduce la respuesta inflamatoria y la liberación de cTnT tras una ICP en estos pacientes [105], [106]. Otra de las citocinas sobre las que se ha intentado actuar en el IAM es TNF α , administrando Etanercept, un antagonista de esta citocina, en pacientes que acababan de sufrir un infarto. Los resultados de este ensayo clínico mostraron que la terapia frente a TNF α no inducía mejoras significativas en los pacientes con IAM, por lo que no estaba indicada [107].

En general, el desarrollo de terapias frente a la inflamación en el IAM no ha demostrado efectos terapéuticos significativos, debido probablemente a la complejidad de la respuesta inflamatoria en el infarto. Sin embargo, pese a los resultados modestos que se han obtenido hasta ahora, existen evidencias de que la terapia frente a la inflamación puede ser muy prometedora, por lo que es necesario seguir investigando en este campo. Teniendo esto en cuenta, se sigue intentado desarrollar nuevas terapias frente al IAM, que lo traten desde diferentes aproximaciones, entre ellas la inflamación. Dentro de estas terapias destaca la terapia celular como posible candidato para tratar el IAM.

2. Terapia celular: células mesenquimales estromales

Una de las aproximaciones actuales para el tratamiento del IAM es la terapia celular. Dentro de la terapia celular existen distintos tipos de células que han demostrado efectos terapéuticos en diferentes estudios. Uno de esos tipos celulares son las células mesenquimales estromales (MSC de sus siglas en inglés).

2.1. MSC: origen, definición, fuentes

Las MSC son células multipotentes descritas por primera vez por Friedenstein en la década de los 60 [108], que se pueden aislar a partir de diferentes tejidos y expandir *in vitro* de forma eficiente. Friedenstein las describió inicialmente como fibroblastos-unidad de formación de colonias (CFU-F de sus siglas en inglés) y no fue hasta 1991 cuando Caplan acuñó el término célula madre mesenquimal (MSC, de mesenchymal stem cell) [109]. En 1999 Pittenger *et al.* demostraron el potencial de estas células para diferenciarse a distintos tejidos como adipocitos, osteoblastos y condrocitos *in vitro*, lo que potenció aún más la investigación con estas células [110]. La nomenclatura de estas células como células madre mesenquimales fue debatida durante mucho tiempo hasta que en 2005 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso que estas células debían denominarse células mesenquimales estromales (MSC, de mesenchymal stromal cell), en vez de células madre mesenquimales, debido a la falta de pruebas concluyentes acerca de su capacidad “stem” [111]. En 2006, la ISCT estableció las cuatro características fundamentales de las MSC [112]: (1) presentar capacidad de auto-renovación [113]; (2) ser capaces de adherirse a superficies plásticas en condiciones de cultivo estándar; (3) ser capaces de diferenciarse *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condroblastos en condiciones estándar de diferenciación; (4) más del 95% de la población de MSC debe expresar en su superficie los antígenos CD105, CD73 y CD90 y no expresar ningún antígeno hematopoyético (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 y HLA-II) [114], [115].

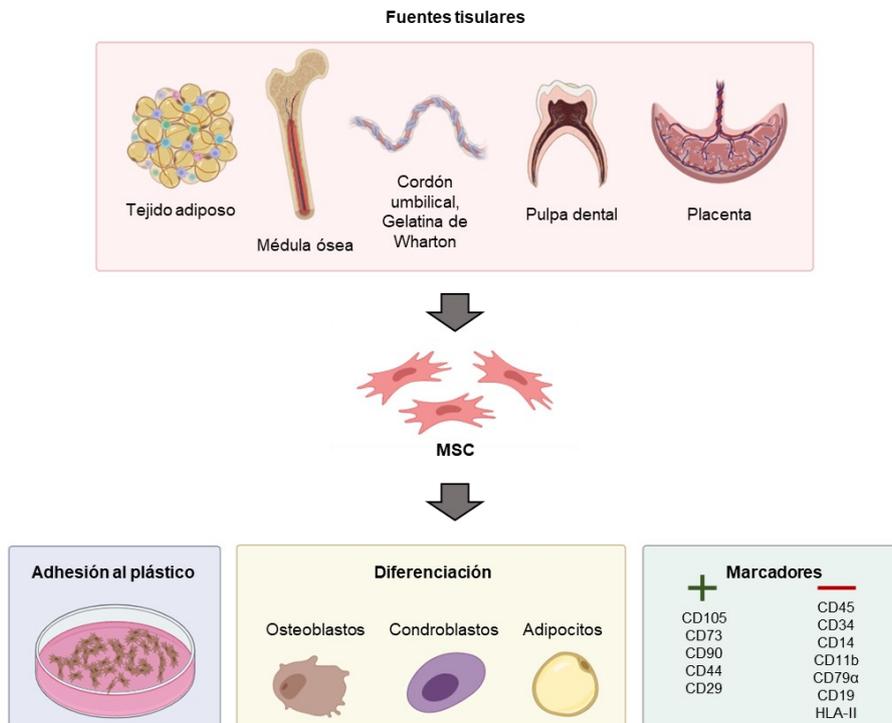


Figura 8. Fuentes tisulares y características de las MSC. Las MSC se pueden aislar a partir de diferentes tejidos (tejido adiposo, médula ósea, cordón umbilical, pulpa dental o placenta, entre otros). Las características principales de las MSC según la ISCT son: adhesión al plástico, diferenciación a osteoblastos, condroblastos y adipocitos y ser positivas o negativas para ciertos marcadores. Imagen creada con BioRender.

Aunque inicialmente las MSC se descubrieron en médula ósea, estas células se han aislado y caracterizado a partir de diferentes tipos de tejido, entre los que se incluyen la pulpa dentaria [116], el tejido adiposo [117], el líquido sinovial [118], la placenta [119], [120] o el cordón umbilical [121], entre otros. Diferentes estudios realizados en la primera década de los 2000 [122]–[124] mostraron que las células perivasculares y las MSC compartían marcadores como CD146 o PDGFR y los pericitos aislados y cultivados presentaban características similares a las MSC. Esto llevó a la teoría de que la mayoría de las MSC podían provenir de precursores perivasculares [122], [124]. Las MSC tienen una gran capacidad de responder rápidamente a las lesiones en diferentes tejidos, lo cual podría explicarse por la amplia distribución de los precursores perivasculares a lo largo del organismo [125]. No obstante, todas las MSC no se comportan de la misma forma, se ha observado que dependiendo de la fuente tisular de la que se obtienen, las MSC pueden presentar diferencias en cuanto a sus características biológicas [126], [127]. Esta heterogeneidad se refleja a través de la capacidad de proliferación o diferenciación de las MSC e incluso en los mecanismos paracrinicos de las mismas. Las hipótesis indican que esta heterogeneidad se debe a la influencia del microambiente específico de cada nicho de origen de las MSC, que presenta señales químicas y mecánicas diferentes que influyen sobre las características finales de las MSC [128], [129]. Además, se ha observado que las MSC en cultivo conservan estas características derivadas de su microambiente de origen [128].

2.2. Propiedades terapéuticas MSC

En el auge de la terapia celular, las MSC se postularon como fuertes candidatos para realizar este tipo de terapias debido a sus propiedades terapéuticas y a su fácil obtención y mantenimiento en cultivo. Se realizaron numerosos estudios preclínicos que demostraron las propiedades terapéuticas de estas células en términos de inmunomodulación, apoyo trófico y regeneración y diferenciación a algunos tipos celulares [130].

2.2.1. Propiedades tróficas de las MSC

Las MSC secretan una amplia gama de factores paracrinicos, que en su conjunto se denominan secretoma, que favorecen procesos regenerativos [130]. Dentro de estos factores paracrinicos se incluyen quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento o moléculas de adhesión, entre otros [131]. Estos factores tróficos tienen efectos regenerativos a través de la inhibición de la muerte celular y la fibrosis, la estimulación de la vascularización, la promoción de la remodelación y reparación tisular o la inducción de la cicatrización de heridas [132]. Los factores tróficos que suelen liberar las MSC son el factor de crecimiento transformante β -1 (TGF- β -1), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la prostaglandina E2 (PGE2), el interferón γ (IFN- γ), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y el óxido nítrico. Estas moléculas inducen la proliferación celular de fibroblastos y células endoteliales, entre otras, promoviendo la angiogénesis y reparación tisular. Además, también contribuyen a la quimiotaxis de

queratinocitos, fibroblastos y células del sistema inmune favoreciendo la regeneración tisular y la cicatrización de las lesiones [133]–[135].

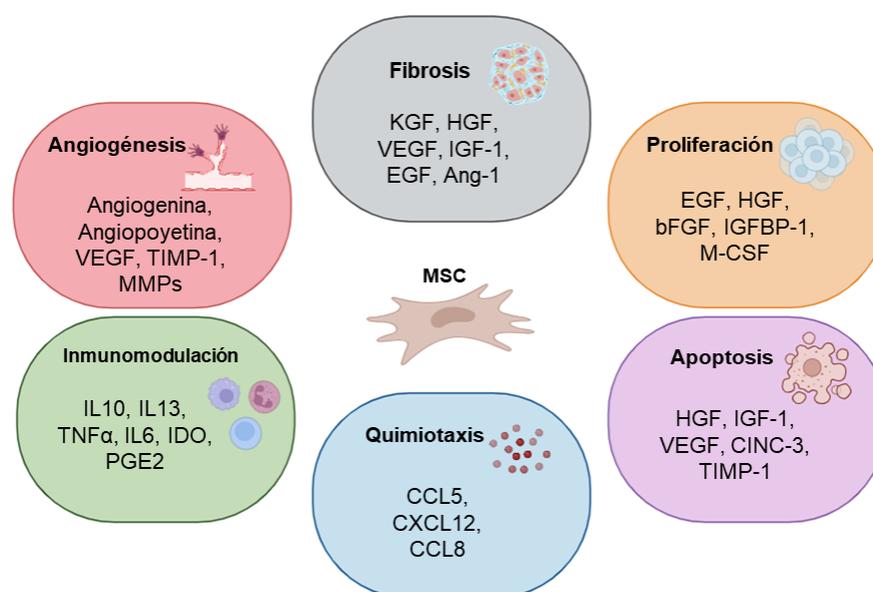


Figura 9. Mecanismos implicados en las propiedades terapéuticas de las MSC. Creada con BioRender.

2.2.2. Propiedades inmunomoduladoras de las MSC

Una de las principales características de las MSC que ha aumentado su interés clínico es la capacidad inmunomoduladora que presentan. Las MSC tienen la capacidad de interactuar y regular la función de la mayoría de las células efectoras implicadas en la respuesta inmune [136], lo que las convierte en candidatas para la terapia celular de enfermedades que cursan con trastornos inflamatorios. Las MSC ejercen efectos inmunomoduladores sobre células tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa. Por un lado, son capaces de promover la polarización de los macrófagos desde un fenotipo proinflamatorio (macrófagos M1) hacia un fenotipo pro-resolutivo (macrófagos M2) [137], [138] mediante la secreción de moléculas y metabolitos inmunosupresores como la prostaglandina E2 (PGE2) o el lactato, entre otros [139], [140]. Además, son capaces de limitar la movilización de neutrófilos, monocitos y macrófagos a las zonas dañadas reduciendo su adhesión al endotelio vascular [137], [141]. Las MSC retrasan la apoptosis espontánea de los neutrófilos activados y en reposo mediante un mecanismo dependiente de interleucina (IL)-6, preservándolos en el nicho de la médula ósea [114], [134], [142]. En cuanto a las células dendríticas (DCs de sus siglas en inglés), las MSC han demostrado ser capaces de inhibir la maduración de los monocitos hacia este tipo celular [143], [144] y de alterar su función presentadora de antígenos [144], [145]. Por otro lado, las MSC son capaces de inhibir la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, de sus siglas en inglés) mediante la inhibición del complemento [146], [147]. Las MSC también inmunomodulan a las células asesinas naturales (NK de sus siglas en inglés) inhibiendo su activación y reduciendo su actividad citotóxica [148], [149]. En relación a los mastocitos, las MSC limitan su degranulación y secreción de citocinas proinflamatorias, así como su migración [150].

En cuanto a las células de la respuesta inmune adaptativa, las MSC inhiben la proliferación de linfocitos B [151] y T (tanto CD4+ como CD8+) [152], reducen la síntesis de citocinas proinflamatorias y aumentan la secreción de citocinas antiinflamatorias por parte de los linfocitos [153]; reducen también la secreción de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B [151] y aumentan la población de linfocitos T reguladores (Tregs) [154], [155], entre otras acciones.

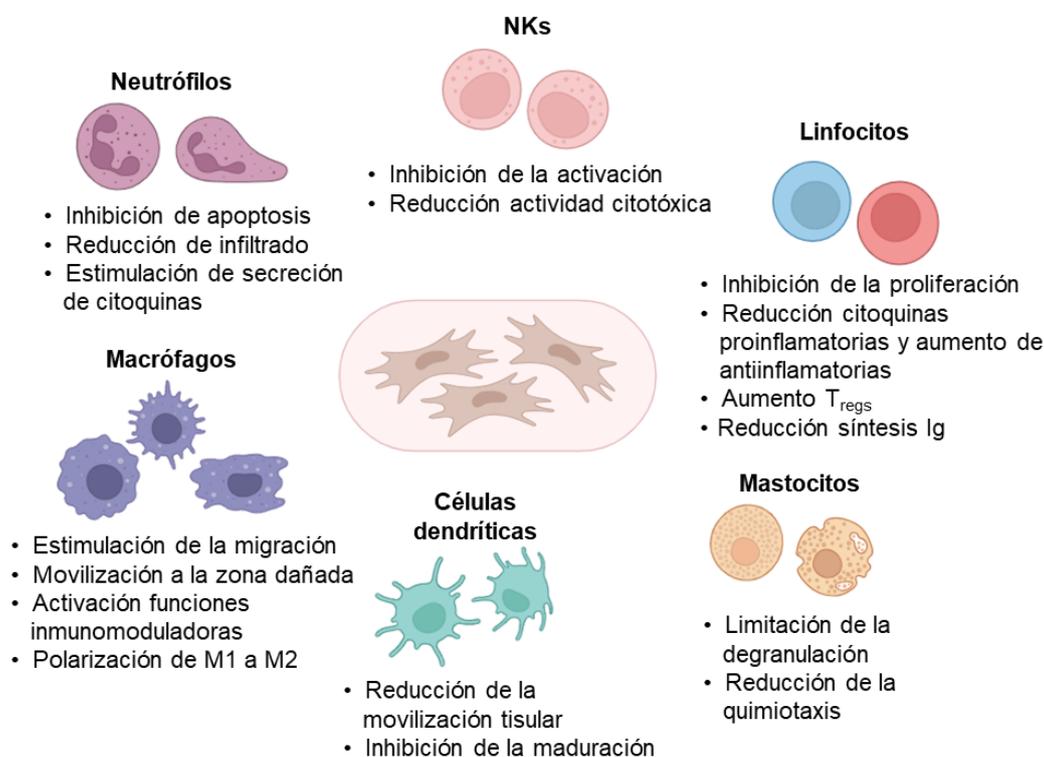


Figura 10. Efecto inmunomodulador de las MSC sobre las distintas poblaciones de células del sistema inmune. Adaptada con BioRender de Andrzejewska, A., Lukomska, B., & Janowski, M. 2019. Stem cells.

2.3. MSC en IAM

Las MSC se consideran una opción interesante en terapia celular por distintas razones: por un lado, son fáciles de aislar, sus propiedades terapéuticas han sido demostradas en números estudios preclínicos aplicados a un abanico amplio de enfermedades (enfermedades musculoesqueléticas [156], enfermedades neurológicas [157]–[159] o enfermedades cardiovasculares [160], [161], entre otras) y se caracterizan por tener muy poca capacidad inmunogénica debido a la ausencia de moléculas del complejo de histocompatibilidad (HLA) de clase II y de moléculas co-estimuladoras de linfocitos T en su superficie celular [162].

Centrándonos únicamente en la patología cardiovascular, se han realizado números ensayos preclínicos en modelos animales de ratón [163], [164], rata [165]–[168] e incluso cerdo [169]–[171], que han mostrado la capacidad de las MSC de mejorar la función cardíaca tras el IAM, reducir el remodelado adverso y contribuir a la regeneración de la zona cardíaca afectada [172], [173]. Aunque inicialmente se pensaba que estos efectos beneficiosos se debían, en parte, a la capacidad de las MSC de

diferenciarse a cardiomiocitos, posteriormente se comprobó que la diferenciación de las MSC a células cardíacas era extremadamente difícil, por lo que se estableció que la acción terapéutica de las MSC se debe fundamentalmente a sus efectos paracrinos [174]. El secretoma liberado por las MSC modula numerosos procesos celulares que contribuyen a la protección y reparación cardiovascular [175]. El tratamiento con MSC promueve la supervivencia y proliferación de los cardiomiocitos a través de rutas de señalización mediadas por Akt [176]; favorece el remodelado de la matriz extracelular reduciendo la fibrosis y la formación excesiva de tejido cicatricial [177]; y favorece la angiogénesis en la zona afectada [178], [179]. Sin embargo, uno de los principales mecanismos por los que las MSC ejercen un efecto beneficioso en el IAM es su efecto inmunomodulador sobre las distintas células del sistema inmune [175]. Las MSC actúan sobre los macrófagos presentes en la zona infartada promoviendo su diferenciación hacia macrófagos pro-resolutivos [180], [181]; reducen la liberación de citocinas proinflamatorias y aumentan la secreción de citocinas anti-inflamatorias; y disminuyen la activación de linfocitos T y su actividad citotóxica [182], [183]. En conjunto, promueven la transición a la resolución de la inflamación en la zona de infarto, favoreciendo una mejora de la función cardíaca y del remodelado.

Los efectos beneficiosos observados en los tratamientos con MSC en el ámbito de las patologías cardiovasculares condujeron a la realización de ensayos clínicos con estas células (Tabla 1) [160], [184]. Estos ensayos han mostrado también ciertas mejoras en los pacientes, sin embargo, estos beneficios no han sido tan grandes como se esperaba inicialmente. Una de la hipótesis de esto es que realmente el efecto beneficioso de las MSC no se debe a la propia célula en sí, ya que, dependiendo de la vía de administración de las mismas, el número de células que llega a la zona afectada y que sobrevive ahí es muy bajo, por lo que el efecto beneficioso se debe a su secretoma. Dentro del secretoma, las vesículas extracelulares (EVs de sus siglas en inglés) se han postulado como el principal efector de los beneficios observados con el tratamiento de las MSC [185], [186]. Esto ha conducido a lo largo de los últimos años a terapias basadas únicamente en las EVs obtenidas de las MSC, logrando efectos terapéuticos similares o incluso mejores que el tratamiento con las células.

Título del estudio	Enfermedad	Tratamiento	Fase	Referencia
In Vivo Tracking of USPIO Labeled MSC in the Heart	Enfermedad isquémica coronaria	Inyección de MSC marcadas con USPIO	Fase I	NCT03651791
Intravenous MSC Therapy on Ischemia-Reperfusion Injury in Patients With Myocardial Infarction	Infarto de miocardio	WJ-MSCs	Fase I/II	NCT03533153
UC-MSC Transplantation for Left Ventricular Dysfunction After AMI	Disfunción del VI AMI	UC-MSC	Fase I	NCT03902067
Treatment of Heart Failure Using Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells(hUC-MSC)	Isquemia miocárdica. Disfunción del VI	hUC-MSC alogénicas	Fase I/II	NCT04939077
Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Improve Cardiac Function on ST-elevation Myocardial Infarction (STEMI) Patients	STEMI	UC-MSC	Fase III	NCT05935423

Human Umbilical Cord Stroma MSC in Myocardial Infarction	Cardiopatía isquémica crónica	UC-MSC	Fase I/II	NCT02323477
Mesenchymal STROMAL CELL Therapy in Patients With Chronic Myocardial Ischemia (MyStromalCell Trial)	Cardiopatía isquémica crónica	MSC	Fase II	NCT01449032
Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells (MSC) Administration in Weaning From Left Ventricular Assist Device	Isquemia miocárdica crónica	BM-MSC autólogas	Fase I	NCT02460770
Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS)	Disfunción del VI	Inyección de MSC autólogas a dosis baja y alta	Fase I/II	NCT00587990
Intracoronary Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) Transfer in Patients With Acute Myocardial Infarction (AMI)	STEMI	WJ-MSC	Fase II	NCT01291329
Administration of Mesenchymal Stem Cells in Patients With Chronic Ischemic Cardiomyopathy (MESAMI2)	Isquemia miocárdica crónica	BM-MSC autólogas	Fase II	NCT02462330
Clinical Trial of Human Allogenic Culture-expanded Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells (CardiALLO)	Fallo cardíaco, sistólico	CardiALLO™ hBM-MSC alogénicas	Fase I	NCT05925608
Randomized Study of Coronary Revascularization Surgery With Injection of WJ-MSCs and Placement of an Epicardial Extracellular Matrix	Fallo cardíaco. Enfermedad coronaria	WJ-MSC	Fase I/II	NCT04011059
Combination of Mesenchymal and C-kit+ Cardiac Stem Cells as Regenerative Therapy for Heart Failure	Cardiomiopatía isquémica	MSC y células C-kit+	Fase II	NCT02501811
Safety Study of Adult Mesenchymal Stem Cells (MSC) to Treat Acute Myocardial Infarction	Infarto de miocardio	Provacel (hMSC)	Fase I	NCT00114452
The Transendocardial Autologous Cells (hMSC) or (hMSC) and (hCSC) in Ischemic Heart Failure Trial.	Infarto de miocardio	hMSC autólogas	Fase I/II	NCT02503280
Prochymal® (Human Adult Stem Cells) Intravenous Infusion Following Acute Myocardial Infarction (AMI)	Infarto de miocardio	Prochymal® (hMSC)	Fase II	NCT00877903

Tabla 1. Ensayos clínicos con MSC en enfermedades coronarias isquémicas. Fuente: clinicaltrials.org

3. Vesículas extracelulares (EVs)

3.1. Definición y biogénesis

Las EVs son pequeñas partículas liberadas por células tanto procariontas como eucariotas que están delimitadas por una bicapa lipídica y no se pueden replicar, ya que carecen de núcleo funcional [187]. La secreción de EVs por parte de las células es un proceso conservado evolutivamente [188], de forma que las EVs de una determinada especie tienen potencial para regular procesos celulares en otras especies [189]. En los organismos pluricelulares, las EVs se liberan al medioambiente extracelular a partir de

diferentes tejidos, por lo que en humanos se pueden aislar EVs en cualquier fluido corporal [190], [191]. Las EVs contienen en su interior una gran variedad de moléculas, entre las que se incluye DNA, RNA mensajero (RNAm), micro-RNAs (miRNAs), proteínas, lípidos y otros metabolitos [192]. Este cargo de las EVs varía en función del origen celular y de si las condiciones celulares son fisiológicas o patológicas [193].

Tradicionalmente, las EVs se han dividido en tres grupos diferentes en función de su biogénesis: exosomas, microvesículas (MVs) y cuerpos apoptóticos. Los exosomas son EVs de origen endosómico de entre 30-200 nm de diámetro que se originan por invaginación de las membranas de los endosomas. Esto conduce a la formación de vesículas intraluminales (ILVs, de sus siglas en inglés) que posteriormente pasan a formar parte de cuerpos multivesiculares (MVBs, de sus siglas en inglés) que se liberan en el espacio extracelular al fusionarse con la membrana plasmática [194]. Por su parte, las MVs, que presentan un tamaño de entre 150-1000 nm, se ensamblan en la membrana plasmática a partir de la cual se liberan por gemación [190] y su biogénesis implica distintos mecanismos que la biogénesis de los exosomas [192]. El tercer tipo de EVs, los cuerpos apoptóticos, se liberan cuando la célula de origen sufre un proceso apoptótico y se caracterizan por ser heterogéneas y tener un mayor tamaño (entre 50-5000 nm) [192], [195].

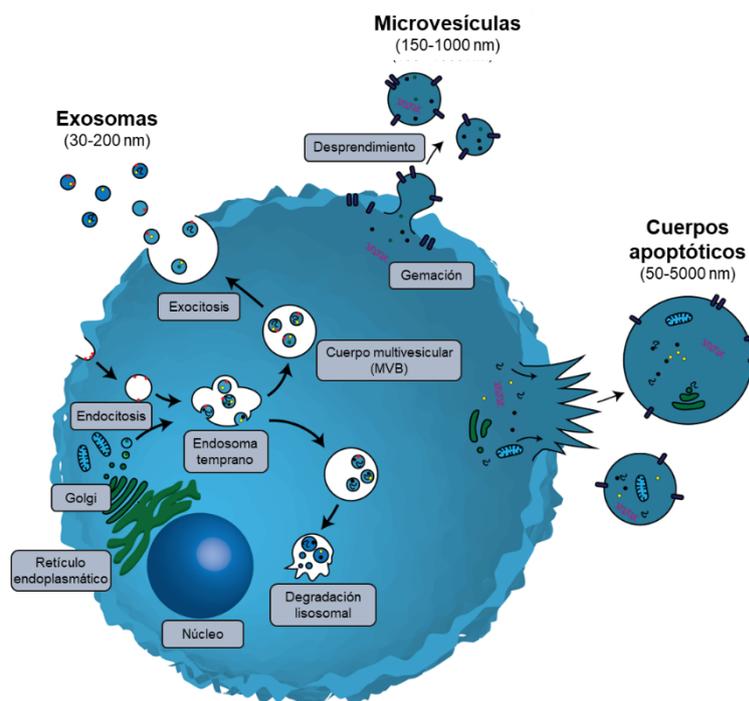


Figura 11. Clasificación tradicional de las EVs en exosomas, microvesículas (MVs) y cuerpos apoptóticos. Los exosomas tienen origen endosómico a partir de la invaginación de la membrana. Las MVs se generan por gemación de la membrana y los cuerpos apoptóticos se originan cuando la célula entra en apoptosis. Adaptada de Dispertech.

Aunque tradicionalmente esta ha sido la clasificación empleada, actualmente, debido a la falta de marcadores específicos de los distintos subtipos de EVs y al solapamiento en tamaño y carga de los exosomas, MVs y cuerpos apoptóticos, la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV de sus siglas en inglés) ha decidido

realizar una nueva clasificación de las EVs. Según la normativa actual, las EVs se dividen en función de su tamaño en EVs de pequeño tamaño (sEVs de sus siglas en inglés), que tienen menos de 200 nm de diámetro, y EVs de mediano o gran tamaño (m/IEVs de sus siglas en inglés), que tienen más de 200 nm de diámetro [196].

Aunque las EVs se descubrieron hace más de cuatro décadas, el interés por ellas se ha incrementado a lo largo de los últimos años, al comprobar que tienen una gran importancia en la comunicación intercelular [197], [198] y que participan en procesos tanto fisiológicos como patológicos [199]. Las sEVs, que se corresponderían con lo que antes se denominaba exosomas, son el tipo de EVs más estudiadas y con mayor interés terapéutico. Tal y como se ha mencionado anteriormente, las sEVs se generan como ILVs dentro de los MVBs, que al fusionarse con la membrana plasmática liberan al medio extracelular las ILVs en forma de sEVs. Los procesos que gobiernan la formación de ILVs dentro de los MVBs y la subsiguiente fusión con la membrana plasmática para liberar las sEVs al espacio extracelular todavía no se conocen completamente, aunque sí que se ha establecido parte de la maquinaria molecular que participa en esta biogénesis [192], [200]. El mecanismo de generación de sEVs mejor descrito es en el que participa la maquinaria de los complejos de clasificación endosómica necesarios para el transporte (ESCRT, por sus siglas en inglés). Esta maquinaria constituida por diferentes proteínas con funciones específicas se encarga de promover la gemación y liberación de las ILVs [201] y es importante a la hora de establecer el cargo de las EVs. Sin embargo, también hay otros mecanismos independientes de ESCRT [202] en los que se cree que las ILVs y la formación de sEVs implica la conversión de esfingomielina en ceramida por esfingomielinasas [203], aunque esta vía no está completamente investigada. Dependiendo de la ruta de biogénesis por la que se generen las sEVs el cargo y los marcadores de membrana de las vesículas serán distintos en su composición o en su proporción [194].

Una vez liberadas en el espacio extracelular, las EVs pueden llegar a las células receptoras y liberar su contenido modificando su expresión génica de forma pre y/o post-transcripcional y promoviendo cambios fenotípicos que pueden afectar su estado fisiológico o patológico [204]. Las EVs pueden inducir cambios en las células receptoras a través de una simple interacción entre los receptores de superficie y los ligandos de las células diana, mediante su internalización o mediante la fusión de su membrana con la membrana plasmática de la célula receptora [187]. En concreto, se han descrito cuatro mecanismos diferentes por los que las EVs interactúan con las células diana:

- Unión superficial: consiste en una interacción directa entre los lípidos o las proteínas transmembrana de las EVs con receptores presentes en la membrana plasmática de la célula diana, promoviendo la activación de cascadas de señalización intracelular [194].
- Fusión de membranas: consiste en la fusión directa de la membrana de las EVs con la membrana plasmática de la célula diana, liberando su contenido en el citoplasma celular. Este proceso no se comprende todavía

completamente, pero parece ser uno de los mecanismos más importante en la liberación de ácidos nucleicos [200], [205].

- Captación: las EVs pueden internalizarse en la célula diana mediante macropinocitosis, fagocitosis, endocitosis mediada por caveolina, endocitosis mediada por clatrina o endocitosis mediada por balsas lipídicas. Una vez dentro de la célula las EVs pueden liberar su contenido en el citosol [206].

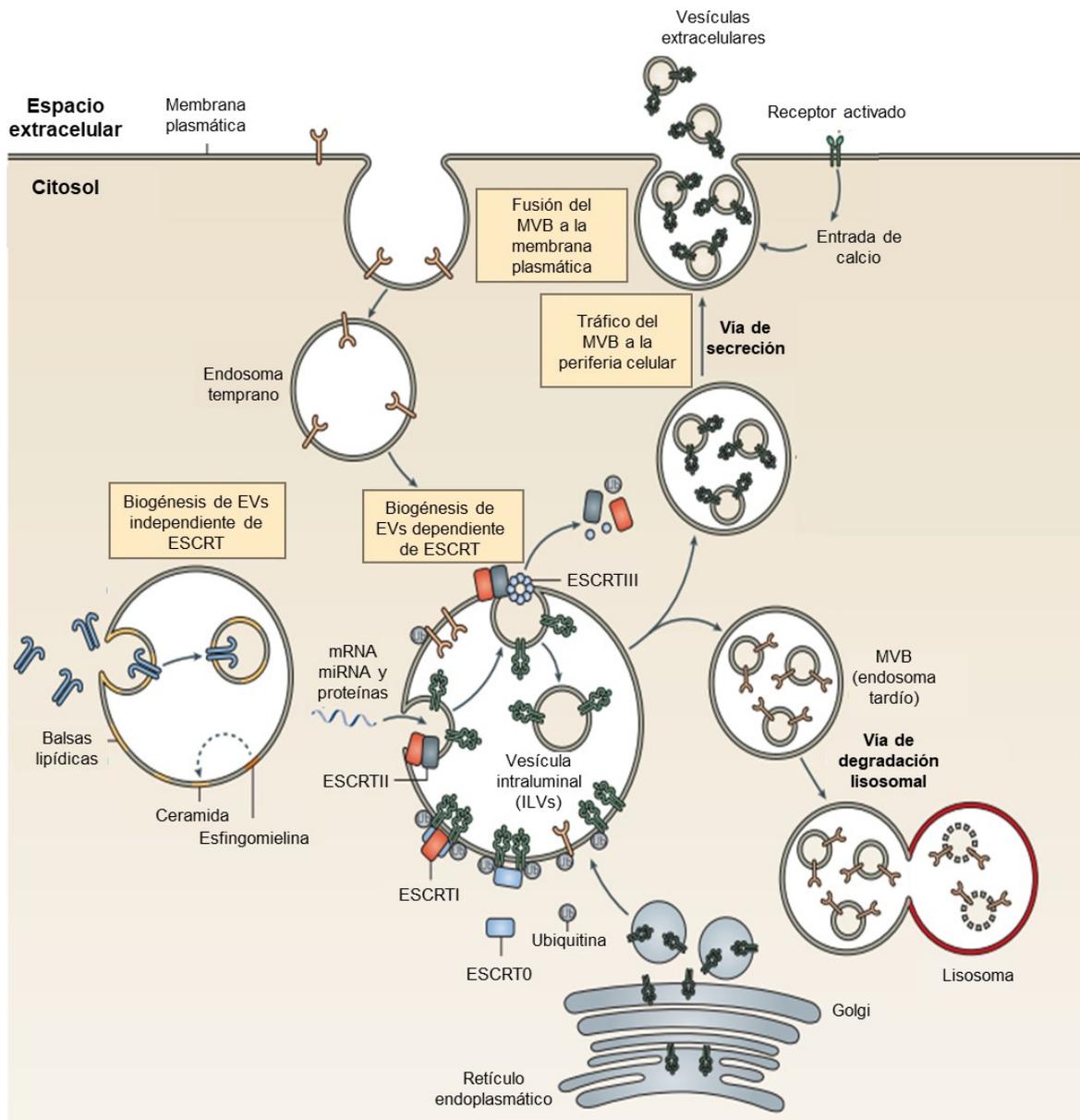


Figura 12. Mecanismos de biogénesis de sEVs. Se ha descrito un mecanismo de biogénesis dependiente de la maquinaria celular ESCRT y mecanismos independientes de ESCRT. En los mecanismos independientes participan las balsas lipídicas de los endosomas y la ceramida. En el mecanismo dependiente de ESCRT los endosomas tempranos que se generan por invaginación de la membrana plasmática dan lugar a endosomas tardíos (MVBs) que contienen en su interior ILVs. Estos MVBs o bien se degradan por vía lisosomal o se fusionan con la membrana plasmática para liberar las sEVs. Adaptada de Robbins, P. D., & Morelli, A. E. 2014. Nature Reviews Immunology.

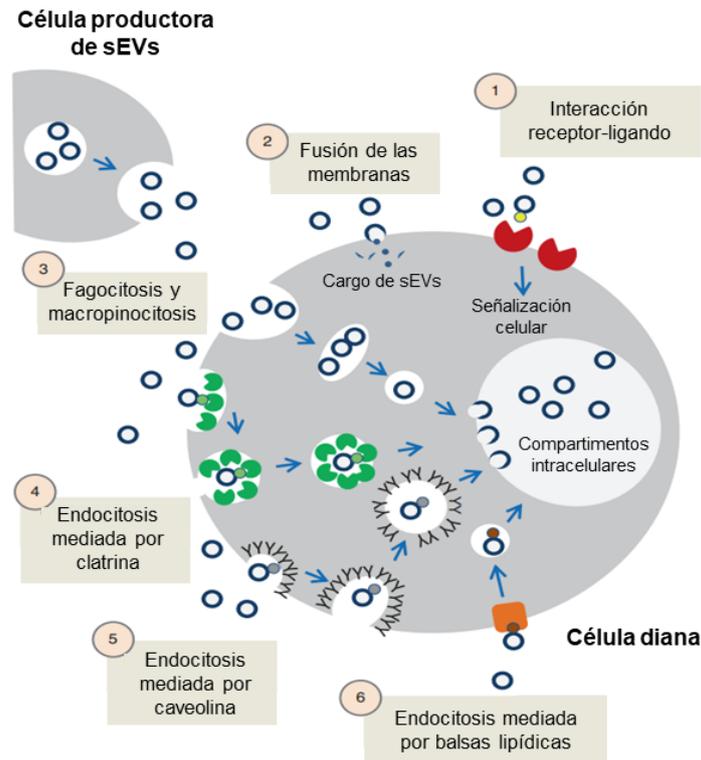


Figura 13. Vías implicadas en la captación de sEVs por parte de las células diana. Las sEVs pueden ejercer sus efectos en las células receptoras mediante la interacción superficial, fusión de membranas o captación. Adaptada de Arenaccio, C., & Federico, M. 2017. Exosomes in Cardiovascular Diseases: Biomarkers, Pathological and Therapeutic Effects.

3.2. Composición

Las EVs están constituidas por una bicapa lipídica que envuelve un pequeño citosol libre de orgánulos en el que hay una mezcla heterogénea de distintas macromoléculas [194], [207]. El cargo de las EVs contiene predominantemente proteínas citosólicas derivadas de la célula de origen, mientras que la composición de la bicapa lipídica normalmente difiere de la de la membrana plasmática de la célula de la que provienen [208]. En cuanto al cargo proteico, las proteínas típicas que se encuentran en los exosomas incluyen aquellas involucradas en la formación de MVBs (Alix, TSG101), en el transporte y fusión de membranas (anexinas, flotilinas, GTPasas), en la adhesión (integrinas) o en la presentación de antígenos (moléculas MHC clase I y II). Además, también son típicas las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), las proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90) y proteínas relacionadas con los lípidos [209]–[211]. Todas estas proteínas suelen identificarse en las EVs independientemente del tipo celular de origen. Sin embargo, además de estas proteínas comunes, las EVs suelen tener una firma proteica específica de tejido o tipo celular [209]. Algunas proteínas específicas se cargan preferentemente en las EVs, pero aún no está claro el mecanismo por el cual esto ocurre.

Además de proteínas, las EVs también están enriquecidas en lípidos particulares, principalmente ceramida, colesterol, fosfatidilserina y esfingolípidos [212]. Se ha observado que los lípidos no solo tienen un papel estructural en las membranas de las

EVs, sino que también son esenciales en la formación y liberación de las vesículas al entorno extracelular [213]. La abundancia relativa de los lípidos en las membranas de las EVs puede variar según el tipo de célula de la que se originan, el estado fisiológico de la célula y el destino y la función de la vesícula [214]. Además, estudios lipidómicos recientes han mostrado que algunos lípidos se distribuyen de forma exclusiva o preferencial en ciertos tipos de EVs, lo que sugiere la existencia de varios procesos altamente controlados que involucrados en la biogénesis y el empaquetamiento del cargo en los que los lípidos juegan un papel indispensable.

Otro de los componentes moleculares presentes en el interior de las EVs es el RNA. Se ha descrito que las EVs transportan RNAm, miRNAs y algunos RNAs no codificantes [204]. Cuando se transfieren a las células diana, los RNAm se traducen en proteínas [215] y los miRNAs pueden silenciar los genes diana [216]. Estos hallazgos han dado paso al estudio del papel del RNA extracelular liberado por las EVs en diferentes procesos biológicos, como la respuesta inmunitaria, el cáncer o las infecciones virales, entre otros. Sin embargo, los mecanismos que controlan la carga específica de ciertos RNAs en las EVs todavía no se conocen perfectamente.

Las EVs también incorporan DNA genómico mediante mecanismos que todavía se desconocen. Probablemente, este proceso esté mediado por la liberación de fragmentos de DNA en el citoplasma celular durante la mitosis después de la ruptura de la membrana nuclear. Las EVs pueden contener tanto oncogenes como elementos transponibles del DNA genómico [217]. No obstante, la función del DNA incorporado en las EVs aún no está clara y se necesitan más estudios para comprender su posible papel en los procesos fisiológicos y patológicos.

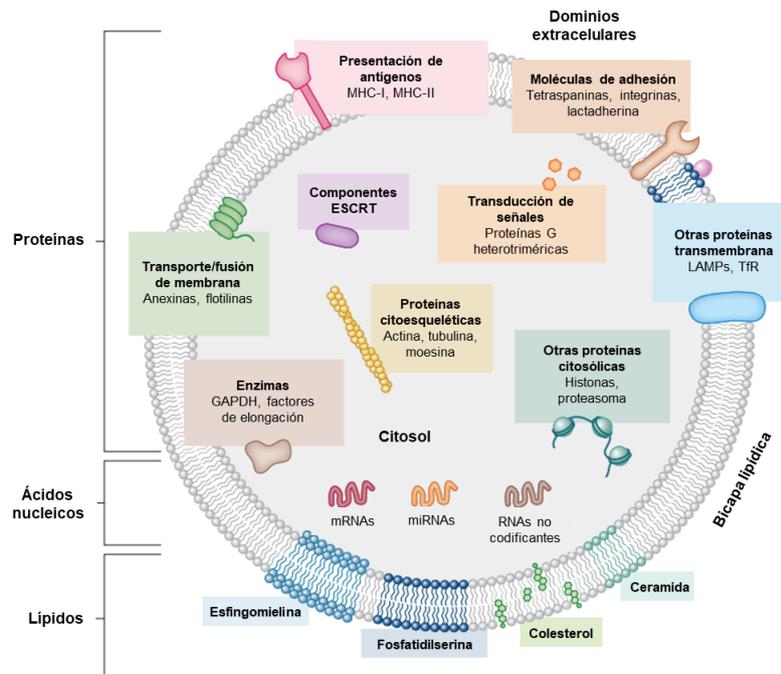


Figura 14. Composición de las sEVs. Las sEVs contienen proteínas tanto citosólicas como de membrana, así como ácidos nucleicos y lípidos. Adaptada de Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. 2014. Annual review of cell and developmental biology.

3.3. Métodos de aislamiento y caracterización de las EVs

3.3.1. Aislamiento de las EVs

En la actualidad se han desarrollado muchas técnicas para la separación de las EVs que dependen en gran medida de sus rasgos biofísicos y/o bioquímicos, como el tamaño, la densidad, la forma y los marcadores de superficie que presentan [218]. La selección de la técnica de aislamiento es importante, ya que se ha comprobado que afecta a la integridad estructural y a la actividad funcional de las EVs [219]. Aunque existen diferentes técnicas de separación, todavía no se desarrollado ninguna estrategia de aislamiento ideal que combine una alta pureza, un alto rendimiento e integralidad estructural y funcional [220].

Los métodos de aislamiento de EVs que más se emplean actualmente son: ultracentrifugación diferencial, centrifugación en gradiente de densidad, ultrafiltración, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, de sus siglas en ingles), precipitación, captura por inmutofafinidad y otras técnicas de separación basadas en la carga de las EVs [218], [221], [222].

La ultracentrifugación diferencial (UC) es la técnica más comúnmente empleada para el aislamiento de las EVs [223]. Se basa en la eliminación de partículas de mayor tamaño y otros desechos mediante la centrifugación a baja velocidad, de manera que estos precipitan, mientras que las EVs se quedan en el sobrenadante. A continuación, para aislar estas EVs libres de otras impurezas se realizan centrifugaciones a velocidades más elevadas. Se trata de una técnica fácil y de bajo coste, pero la pureza con la que se obtienen las EVs no es demasiado elevada, ya que se arrastran contaminantes que coprecipitan junto con las EVs [224]. La centrifugación en gradiente de densidad se basa en el principio de que las partículas con una densidad específica permanecerán suspendidas tras la centrifugación en una capa líquida que presenta una densidad similar [218].

La ultrafiltración (UF) es una técnica de aislamiento basada en el tamaño de las EVs. Se utilizan membranas con un corte determinado de peso molecular, lo que permite separar las partículas por su tamaño. Esta técnica permite concentrar las EVs en volúmenes más pequeños, con los que posteriormente realizar otra técnica de separación. Dentro de la ultrafiltración, recientemente ha cobrado importancia la técnica de filtración de flujo tangencial (TFF de sus siglas en inglés), en la que las partículas fluyen paralelas a la membrana en vez de perpendicularmente, evitando problemas de obstrucción [225].

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC de sus siglas en inglés) es un método ampliamente conocido que utiliza polímeros para formar una fase estacionaria porosa en una columna cromatográfica. Las EVs se separan del resto de componentes por el tiempo que tardan en salir de la columna, que depende directamente de su tamaño. El aislamiento con SEC permite conservar mejor la estructura física y las funciones biológicas de los EVs en comparación con otras técnicas como la UC y además, permite obtener rendimientos altos de aislamiento [226].

A lo largo de los últimos años, varios estudios han demostrado que el aislamiento de EVs mediante la combinación de varias técnicas da mejores resultados [227]. Concretamente, la combinación de TFF seguida de SEC permite aislar EVs con un mayor rendimiento, preservando las características biofísicas de las vesículas y manteniendo su funcionalidad [228], [229].

Los métodos de precipitación consisten en añadir agentes precipitantes que permiten separar las EVs mediante un proceso de centrifugación. No obstante, los agentes precipitantes a veces son difíciles de separar de las EVs aisladas y en muchas ocasiones también arrastran otros contaminantes [218]. La captura por inmunoadinidad se basa en el aislamiento de las EVs en función de marcadores específicos presentes en su superficie. Se suelen emplear anticuerpos específicos unidos a beads magnéticas que reconocen ligandos presentes en las EVs. De esta forma, mediante el uso de un imán, se pueden aislar las EVs de interés del resto de componentes [221].

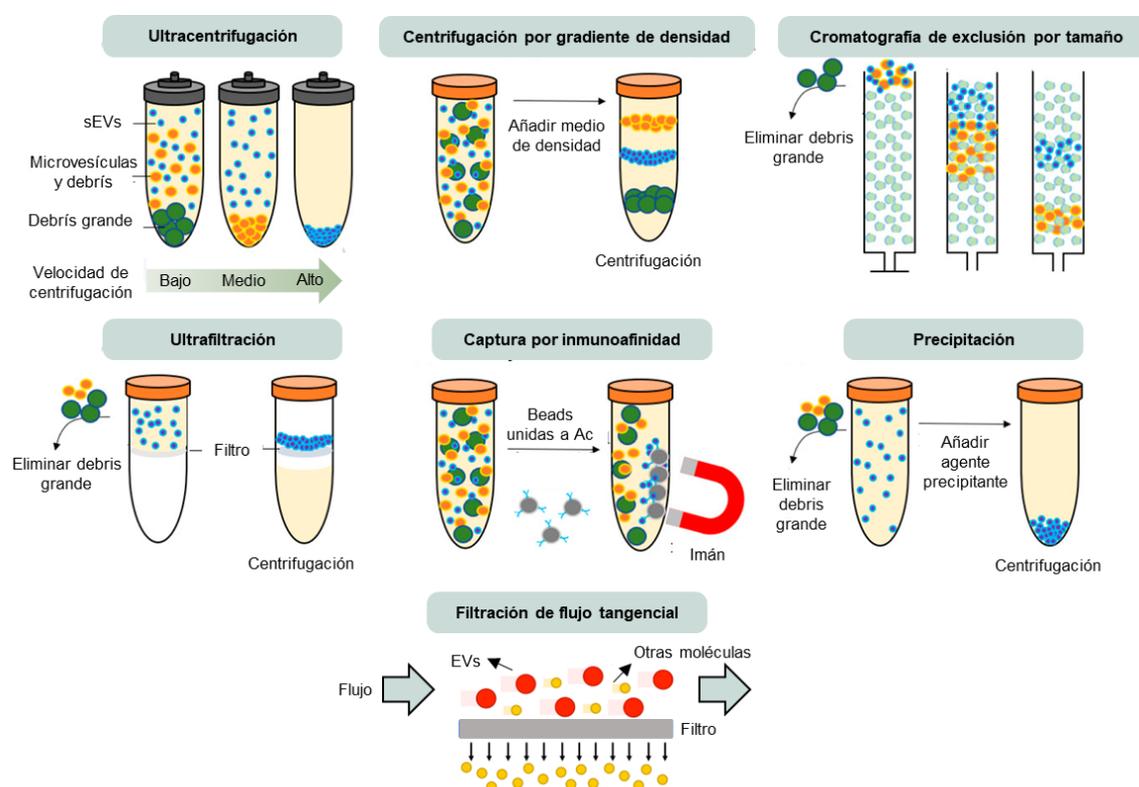


Figura 15. Métodos de aislamiento de EVs más empleados. Cada uno de los métodos presenta características diferentes en cuanto a la facilidad y rapidez de realización o la pureza del producto obtenido. Algunos de estos métodos se pueden combinar como la filtración de flujo tangencial y la cromatografía de exclusión por tamaño. Adaptada de Wang, Y. et al. 2020. *Cancers*.

3.3.2. Caracterización de las EVs

La ISEV ha establecido una serie de requisitos mínimos para la caracterización de las EVs [196]. Por un lado, actualmente es necesario describir cuantitativamente tanto la fuente a partir de la que se han obtenido las EVs (número de células, volumen de partida o peso del tejido) como la preparación de EVs obtenida (cantidad total de proteínas o lípidos, cantidad total de partículas o ratios entre estos valores). Además, es necesaria una caracterización general en la que se muestren al menos tres marcadores

proteicos positivos, dentro de los cuales uno tiene que ser una proteína transmembrana y otro una proteína citosólica. La técnica por la que se hace normalmente esto es Western Blot, caracterizando marcadores típicos como CD9, CD81, HSP70 o TSG101. Actualmente también es necesario mostrar un marcador proteico negativo para las EVs, como la calnexina, para demostrar que el extracto de EVs es puro. Finalmente es necesario realizar una caracterización de vesículas individuales empleando dos tipos de técnicas, la microscopía electrónica, que permite describir el tamaño y la morfología de las partículas y el análisis de seguimiento de partículas (NTA, de sus siglas en inglés) u otra técnica similar, que permite describir la trayectoria de las EVs y analizar su tamaño y su concentración.

3.4. Efectos terapéuticos de las EVs derivadas de MSC

Las EVs derivadas de MSC (MSC-EVs) recapitulan los efectos terapéuticos de las células de origen. Como se ha mencionado previamente, diversos estudios realizados a lo largo de los últimos años demostraron que el efecto de las MSC en diferentes patologías estaba mediado por las EVs liberadas por estas células. Todos estos estudios cambiaron la forma de ver la terapia con MSC, que a partir de ese momento se ha centrado mayoritariamente en la terapia con las EVs derivadas de estas células. Este tipo de terapia permite recapitular los efectos beneficiosos de las células, eliminando a su vez los riesgos que conlleva la terapia celular.

Los mecanismos subyacentes que se atribuyen a la acción terapéutica de las EVs son diversos e incluyen la reducción o inducción de respuestas inmunitarias, la reducción de la inflamación, la inhibición de la apoptosis, la minimización del estrés oxidativo, la estimulación de la regeneración de heridas y la promoción de la angiogénesis, que actúan en conjunto para mejorar los efectos adversos de las enfermedades, promover la curación y restaurar la función del tejido dañado [230].

3.4.1. Efecto inmunomodulador de las EVs

Diferentes estudios, tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que las MSC-EVs pueden ejercer efectos sobre las diferentes células del sistema inmune, modulando la respuesta inmunitaria. Los efectos inmunomoduladores de las EVs están relacionados con las moléculas bioactivas que cargan (miRNAs, proteínas o lípidos) que son capaces de regular las respuestas de macrófagos, células T, células B, DCs y otras células inmunes [231]. Además, las EVs también pueden inducir cambios en el fenotipo de las células inmunitarias y, en su conjunto, reducir la respuesta proinflamatoria.

Efecto inmunomodulador de las EVs en macrófagos

Los macrófagos, tal y como se ha descrito previamente, son células del sistema inmune derivadas de monocitos que participan activamente en los procesos inflamatorios, siendo uno de los componentes clave al inicio de la respuesta inflamatoria. Como se ha comentado anteriormente y a grandes rasgos, los macrófagos se pueden clasificar en macrófagos activados clásicamente o M1, que tienen características proinflamatorias y macrófagos alternativamente activados o M2, que tienen

características pro-resolutivas o antiinflamatorias [232]. Se ha observado que las MSC-EVs son capaces de inducir la polarización de los macrófagos M1 hacia macrófagos M2 [233], [234]. Esto conlleva el cese de la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL1 β o IL12 y la liberación de citocinas antiinflamatorias como IL10. Se cree que, en parte, las EVs son capaces de repolarizar los macrófagos mediante la acción de los miRNAs presentes en ellas, que inducen cambios en la señalización celular de los macrófagos, favoreciendo la liberación de citocinas antiinflamatorias y suprimiendo la liberación de citocinas proinflamatorias [231]. Algunos de los miRNAs presentes en las MSC-EVs con capacidad de repolarizar los macrófagos hacia el fenotipo M2 son el miR-223-5p [235] y el miR146a [236]. El aumento de los macrófagos M2 en presencia de las EVs ha mostrado resultados clínicos beneficiosos en modelos de colitis [237], [238] o de regeneración de tendones [239], entre otros. Además de inducir la polarización de macrófagos M1 hacia M2, las MSC-EVs también han demostrado reducir la infiltración de los macrófagos M1 en la zona dañada [240].

Efecto inmunomodulador de las EVs en neutrófilos

Los neutrófilos son otro de los tipos celulares clave en la respuesta inflamatoria. Estas células se encargan de fagocitar los restos celulares y de matriz de la zona dañada, liberando ROS y citocinas proinflamatorias. En general su tiempo de vida es corto y entran en apoptosis, siendo fagocitados por los macrófagos (eferocitosis) que reciben señales para cambiar su fenotipo hacia uno más pro-resolutivo. En algunas enfermedades como la neutropenia congénita severa o la enfermedad granulomatosa crónica, el tiempo de vida de los neutrófilos está acortado, de forma que no pueden realizar correctamente sus funciones. En estos casos se ha observado que el tratamiento con MSC-EVs aumenta el tiempo de vida de los neutrófilos y su capacidad fagocítica [241]. En otros estudios se ha visto que las EVs inhiben la activación mediada por el complemento de los neutrófilos, reduciendo la formación de NETs por parte de estas células [242]. No obstante, el efecto de las MSC-EVs sobre los neutrófilos en distintas enfermedades, como enfermedades cardiovasculares, todavía no está explorado.

Efecto inmunomodulador de las EVs en células dendríticas

Las DCs son las células presentadoras de antígenos (APCs de sus siglas en inglés) más eficientes. Ingieren y procesan los antígenos para presentárselos posteriormente a los linfocitos T y activar la respuesta inmune adaptativa. Se pueden encontrar en estado inmaduro (iDCs), que se caracteriza porque expresan niveles bajos de citocinas y moléculas co-estimuladoras, o en estado maduro (mDCs), en el aumenta la expresión de las moléculas co-estimuladoras y las citocinas, favoreciendo la activación de los linfocitos T [243]. En este proceso de maduración y activación de las DCs es donde se pueden ejercer efectos inmunomoduladores [244]. Las MSC-EVs han demostrado en diferentes estudios que son capaces de limitar la activación y migración de las DCs, así como de favorecer el estado inmaduro de estas células [245], [246]. De esta forma se consigue reducir la presentación de antígenos a los linfocitos T y la activación de los mismos.

Efecto inmunomodulador de las EVs en NKs

Las células NK son linfocitos que se encargan de la destrucción de células infectadas y células cancerígenas mediante la citólisis de su membrana plasmática [247]. Las MSC-EVs ejercen sus funciones inmunomoduladoras sobre las NKs regulando su proliferación, activación y liberación de compuestos citotóxicos. Varios estudios han demostrado la capacidad de las EVs de reducir el infiltrado de NKs en los sitios de lesión disminuyendo la expresión de CX3CL1 y TLR2 [248], así como de inhibir la activación y la citotoxicidad de estas células, reduciendo la señalización de la vía de TGF β [249].

Efecto inmunomodulador de las EVs en linfocitos B y T

Los linfocitos B son células del sistema inmune adaptativo que, tras su activación y proliferación, sintetizan grandes cantidades de anticuerpos específicos y los secretan al torrente sanguíneo [247]. Existen resultados controvertidos acerca de como las MSC-EVs regulan los linfocitos B [250], ya que estudios distintos han dado lugar a resultados diferentes. Se cree que esto se puede deber en parte a la fuente de MSC a partir de la cuales se obtienen las EVs, siendo algunas de ellas, como las MSC de médula ósea, más efectivas a la hora de regular los linfocitos B. Además, también se ha hipotetizado que el método de aislamiento puede estar relacionado con la obtención de resultados distintos. En general, se ha observado que algunas MSC-EVs son capaces de inhibir la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, inhibiendo así la síntesis de inmunoglobulinas por estas células [251], [252]. Por otro lado, también se ha visto que las MSC-EVs son capaces de inducir un incremento en la población de linfocitos B reguladores (Bregs) a través de la modulación de la vía de señalización PI3K-AKT [253].

Los linfocitos T son células especializadas del sistema inmune adaptativo. Tienen múltiples funciones, dentro de las cuales se incluyen tanto la eliminación directa de células diana, como la regulación de la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. Los linfocitos T se pueden clasificar en varias subpoblaciones, los CD4+ o linfocitos cooperadores, que activan cascadas de respuesta inmune, y los CD8+ o citotóxicos, que destruyen células diana [247]. Muchas proteínas presentes en el cargo o en la superficie de las MSC-EV son capaces de modular a los linfocitos T. Entre ellas se incluyen la proteína del gen 6 estimulada por TNF (TSG-6), el factor de crecimiento tumoral β (TGF β), CD73, el ligando de muerte programada-1 (PD-L1) o GM-CSF, entre otras [254]–[256]. Varios estudios han demostrado que las MSC-EVs son capaces de inducir un incremento en la población de linfocitos Tregs (CD4+CD25+Foxp3+) mediante el incremento de FOXP3 [255]. Además, son capaces de inhibir la activación y proliferación de linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+ y de inducir la apoptosis de linfocitos T activados [244], [257], [258].

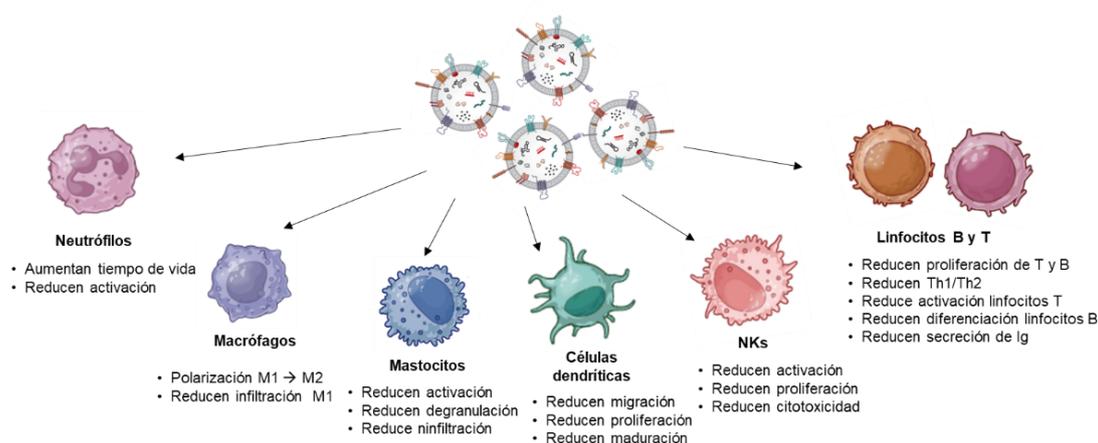


Figura 16. Efecto inmunomodulador de las EVs derivadas de MSC. Las EVs son capaces de actuar sobre las diferentes células del sistema inmune disminuyendo, en muchos casos, su activación y promoviendo un fenotipo menos inflamatorio. Adaptada mediante BioRender de Liu, X., et al. 2023. *Frontiers in Immunology*.

3.4.2. Efecto regenerativo

Las MSC-EVs han demostrado que su efecto terapéutico no se debe exclusivamente a su capacidad inmunomoduladora, sino que también son capaces de inducir la regeneración de tejidos dañados mediante otros mecanismos como la inducción de la angiogénesis o la disminución de la fibrosis. Esta capacidad de regeneración a través de múltiples mecanismos ha hecho que las MSC-EVs se empleen en el desarrollo de terapias frente a numerosas enfermedades, como la osteoartritis, las lesiones cutáneas, o afecciones renales, cerebrales o cardíacas, entre otras [259].

Varios estudios han mostrado la capacidad de estas EVs de inducir la proliferación y migración de células endoteliales para constituir nuevos vasos sanguíneos [260]–[265], proceso que se conoce como angiogénesis. Se ha visto que las EVs son capaces de inducir angiogénesis en diferentes modelos de enfermedad, como la lesión de médula ósea [266], lesiones cutáneas [267], infarto de miocardio [268], [269] o isquemia de miembros [270].

Además, las MSC-EVs son capaces de reducir la fibrosis y promover la regeneración de tejidos dañados, como nuestro grupo demostró en el caso de la fibrosis inducida por agonistas de los receptores β -adrenérgicos [271]. La fibrosis es el proceso por el cual se genera nueva matriz extracelular para restablecer la integridad del tejido dañado. Este proceso está estrechamente relacionado con la inflamación y, cuando se desregula, se produce una acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular que pueden conducir a la disrupción de la arquitectura tisular y a la disfunción del órgano dañado, lo que finalmente puede provocar el fallo orgánico [272]. La fibrosis está implicada en muchas enfermedades, por lo que el desarrollo de estrategias terapéuticas que permitan controlar la fibrosis es muy importante. Diferentes estudios han demostrado que las MSC-EVs pueden reducir la fibrosis en varios modelos animales de enfermedad mediante distintos mecanismos, entre los que se incluyen la inhibición de la diferenciación de los fibroblastos hacia miofibroblastos [273], [274] y la reducción del depósito excesivo de componentes de la matriz extracelular como el

colágeno de tipo I [273], [275]. Muchos de estos mecanismos se regulan a través de la vía de TGF β y la síntesis de MMPs y de inhibidores tisulares de MMPs (TIMP). Los efectos beneficiosos de las MSC-EVs a la hora de reducir la fibrosis se han observado en modelos de fibrosis cardiaca [276], [277], hepática [278], renal [279], [280] y pulmonar [281], [282], entre otros. No obstante, la regulación de la fibrosis por parte de las MSC-EVs es muy compleja, ya que en otras ocasiones el tratamiento con estas EVs puede favorecer la activación de los fibroblastos para generar nueva matriz extracelular y regenerar el tejido dañado, como puede ocurrir en las lesiones cutáneas [283] o en el IAM.

3.5. Efecto terapéutico de las MSC-EVs en IAM

Al igual que las MSC, las EVs derivadas de estas células se han estudiado ampliamente en el IAM debido a sus características terapéuticas. Múltiples estudios preclínicos han demostrado que el tratamiento con MSC-EVs es capaz de reducir el tamaño del infarto significativamente [269], [284], [285]. Los mecanismos por los que las MSC-EVs inducen mejoras en el IAM van desde la inducción de la angiogénesis hasta la reducción de la apoptosis de células cardiacas, pasando por la modulación de la respuesta inmune o la inhibición de la formación de cicatrices desadaptativas [286].

La angiogénesis, como se ha comentado previamente, es el proceso fisiológico por el que se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente. Tras el IAM, la zona isquémica pierde parte de su capacidad angiogénica [287] de forma que, si esta pérdida es muy grave, la falta de suministro de oxígeno provoca disfunción contráctil e insuficiencia cardiaca. Las MSC-EVs han mostrado tener potencial pro-angiogénico en el IAM [288], lo que las convierte en una aproximación terapéutica prometedora. Diferentes estudios han mostrado que el tratamiento con EVs aumenta la producción de VEGF, factor clave en la inducción de la angiogénesis. El efecto pro-angiogénico de las EVs no solo se debe a la liberación de moléculas angiogénicas contenidas en su cargo, como VEGF, TGF β , PDGF o el inductor de metaloproteinasa de matriz extracelular (EMMPRIN) [289], [290], sino también al efecto que tienen los miRNAs presentes en las EVs sobre las células diana [291]. Uno de estos miRNAs es el miR-21-5p, que promueve la activación de rutas de señalización pro-angiogénicas [292] como la vía de señalización de NF κ B, la de Wnt4/ β -catenina [293]. En este sentido, nuestro grupo ha descrito recientemente que el miR-4732-3p también es capaz de inducir angiogénesis en el contexto de la isquemia cardiaca [276]. Se ha observado que el efecto en la angiogénesis de las MSC-EVs depende del origen tisular de las células, siendo las EVs obtenidas a partir de tejido adiposo las que mayor potencial angiogénico presentan [294]. Se ha comprobado también que someter a hipoxia a las MSC o la sobreexpresión de HIF-1 α en dichas células hace que las EVs obtenidas a partir de ellas tengan un mayor potencial pro-angiogénico [293].

Otro de los mecanismos por los que las MSC-EVs ejercen efectos beneficiosos tras el IAM es la reducción de la apoptosis de los cardiomiocitos. En el IAM muchos cardiomiocitos entran en apoptosis provocando una pérdida de miocardio que puede conducir a la insuficiencia cardiaca [295]. Las MSC-EVs son capaces de reducir la

apoptosis de los cardiomiocitos mediante varios mecanismos [296], [297]. Por un lado, modulan la vía de señalización PI3K/AKT [298]–[300], que es clave en la regulación de la apoptosis y la supervivencia. Por otro lado, se ha visto que las MSC-EVs reducen la fosforilación y la activación de las quinasas c-Jun N-terminal (c-JNK), que son activadoras de señales pro-apoptóticas. También se ha observado que el tratamiento con MSC-EVs de cardiomiocitos en cultivo, preserva su contractilidad y previene la pérdida de conexina 43 [276]. Además, las EVs liberan enzimas oxidativas que reducen el estrés oxidativo en la zona de infarto y restauran la bioenergética de los cardiomiocitos reduciendo su apoptosis [301], [302]. En definitiva, las EVs reducen la apoptosis de los cardiomiocitos mediante diferentes vías moleculares, incluso a través de algunos de los miRNAs presentes en ellas.

El efecto inmunomodulador de las MSC-EVs también se ha estudiado en el ámbito del IAM. Se ha visto que las EVs son capaces de reducir la respuesta inmune que se produce en el IAM, favoreciendo el desarrollo de un entorno más pro-resolutivo. Diferentes estudios han demostrado que las EVs reducen el infiltrado de células inmunes [303] y la proliferación de células T CD3+ en el IAM [268], [304], así como la síntesis de citocinas proinflamatorias [304]–[308]. Además, también se ha visto que las MSC-EVs reducen la lesión por isquemia reperusión mediando la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2 o pro-resolutivo [309]. Sin embargo, el efecto de estas EVs sobre los macrófagos en el ámbito del IAM todavía no se conoce demasiado bien.

Es necesario comprender que las MSC-EVs promueven efectos beneficiosos en el IAM ejerciendo todos estos mecanismos de forma simultánea y coordinada, existiendo una sinergia entre ellos. De esta forma, la reducción de la apoptosis de las células cardíacas junto con la reducción de la inflamación y el aumento de la angiogénesis en la zona dañada promueven un remodelado cardíaco adaptativo y la generación de una cicatriz adecuada. Esto en su conjunto favorece la reducción del tamaño del infarto y promueve mejores resultados clínicos de la función cardíaca. Pese a los buenos resultados obtenidos en todos los estudios preclínicos del tratamiento con EVs del IAM, todavía es necesario investigar en mayor profundidad los mecanismos por los que las EVs ejercen todos sus efectos beneficiosos y la interacción entre todos estos mecanismos para poder desarrollar un producto biológico que sea más trasladable a la clínica.

3.6. Las MSC-EVs como producto biológico terapéutico: ventajas y retos

Las terapias basadas en EVs han adquirido gran importancia durante los últimos años debido a las ventajas que presenta respecto a la terapia celular. Sin embargo, el camino hacia el desarrollo de un producto biológico basado en MSC-EVs que consiga llegar a la clínica como cualquier otra terapia todavía es largo y tiene que superar numerosos retos.

3.6.1. Ventajas de las terapias basadas en MSC-EVs

Las terapias basadas en EVs para la regeneración de tejidos ofrecen numerosas ventajas respecto a la terapia celular [310]. Por un lado, la terapia con EVs es más

segura que la terapia con células debido a que las EVs carecen de capacidad de autorreplicación, lo que reduce el riesgo de transformación maligna y formación de tejido ectópico [311]. Por otro lado, aunque las MSC generalmente tienen una inmunogenicidad baja y son adecuadas para el trasplante alogénico, la falta de proteínas inmunogénicas en la superficie de las EVs reduce aún más la probabilidad de que se desencadene una respuesta inmunogénica, lo que permite su uso clínico directo para la realización de alotrasplantes [312]. Además, la presencia de la bicapa lipídica mejora la estabilidad de las EVs y reduce la toxicidad de su carga durante su administración *in vivo*. Las EVs tienen la capacidad intrínseca de cruzar el epitelio y la barrera hematoencefálica, lo que las convierte en vehículos potenciales para la administración de fármacos con baja biodisponibilidad oral y escasa penetración epitelial [313]–[315]. Por último, a lo largo de los últimos años, se ha visto que las MSC-EVs se pueden modificar para mejorar sus capacidades terapéuticas y para dirigir las específicamente a los lugares de interés. Estas modificaciones se pueden realizar directamente sobre las EVs, cambiando su superficie o su carga [316], [317], o sobre las MSC de las que se derivan, ya que se ha visto que las modificaciones genéticas o microambientales de las MSC modifican las capacidades terapéuticas de sus EVs [318]–[320]. Esto ha hecho que aumente el interés por las MSC-EVs como portadores de fármacos específicos que permitan una mayor regeneración de los tejidos dañados. Todas estas ventajas, junto con el menor coste y la facilidad de almacenamiento de las EVs [321], han hecho que las MSC-EVs constituyan una potencial alternativa terapéutica a las MSC en la regeneración de tejidos.

Los buenos resultados obtenidos a nivel preclínico con las MSC-EVs y las ventajas que suponen como estrategia terapéutica han llevado a la realización de ensayos clínicos con las MSC-EVs. Actualmente hay 34 ensayos clínicos en marcha en los que se emplean MSC-EVs como agente terapéutico. El resumen de estos ensayos clínicos aparece detallado en la Tabla 2.

Título del estudio	Enfermedad	Tratamiento	Fase	Referencia
Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles Infusion Treatment for Acute Respiratory Distress Syndrome: A Phase I/II Clinical Trial	Síndrome de dificultad respiratoria aguda	BMSC-EVs (ExoFlo) humanas alogénicas. 10/15 ml IV	Fase I/II	NCT05127122
Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles Infusion Treatment: A Global Expanded Access Protocol for Patients With COVID-19 Associated ARDS Who Do Not Qualify for Phase II Randomized Control Trial	Síndrome de dificultad respiratoria aguda asociado a COVID-19	BMSC-EVs (ExoFlo) humanas alogénicas. IV	Acceso expandido	NCT04657458
Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles Infusion Treatment for COVID-19 Associated Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): A Phase II Clinical Trial	Síndrome de dificultad respiratoria aguda asociado a COVID-19	BMSC-EVs (ExoFlo) humanas alogénicas. IV	Fase II	NCT04493242
Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles as Early Goal Directed Therapy for COVID-19 Moderate-to-Severe Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)	Síndrome de dificultad respiratoria aguda asociado a COVID-19	BMSC-EVs (ExoFlo) humanas alogénicas. IV	Fase III	NCT05354141
Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles Infusion Treatment for Mild-to-Moderate COVID-19: A Phase II Clinical Trial	COVID-19	BMSC-EVs (ExoFlo) humanas alogénicas. IV 7·10 ¹¹ -10,5·10 ¹¹	Fase II	NCT05125562
ExoFlo™ Infusion for Post-Acute COVID-19 and Chronic Post-COVID-19 Syndrome	Síndrome agudo y crónico post-COVID	BMSC-EVs (ExoFlo) humanas alogénicas. IV 10,5·10 ⁸	Fase I/II	NCT05116761
Intermediate Size Expanded Access for the Use of ExoFlo in the Treatment of Abdominal Solid Organ Transplant Patients Who Are at Risk of Worsening Allograft Function with Conventional Immunosuppressive Therapy Alone	Rechazo al trasplante de órganos	BMSC-EVs (ExoFlo) humanas alogénicas. IV	Acceso expandido	NCT05215288
A Phase I Study of ExoFlo, an ex Vivo Culture-expanded Adult Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicle Isolate Product, for the Treatment of Medically Refractory Crohn's Disease	Enfermedad de Crohn refractaria	BMSC-EVs (ExoFlo) humanas alogénicas. IV	Fase I	NCT05130983
A Phase I Study of ExoFlo, an ex Vivo Culture-expanded Adult Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicle Isolate Product, for the Treatment of Medically Refractory Ulcerative Colitis	Colitis ulcerosa refractaria	BMSC-EVs (ExoFlo) humanas alogénicas. IV	Fase I	NCT05176366
A Pilot Safety Study of the Administration of Mesenchymal Stem Cell Extracellular Vesicles in the Treatment of Burn Wounds	Heridas por quemaduras de segundo grado	BMSC-EVs humanas alogénicas (AGLE-102). Aplicación directa	Fase I	NCT05078385

A Safety Study of the Administration of Mesenchymal Stem Cell Extracellular Vesicles in the Treatment of Dystrophic Epidermolysis Bullosa Wounds	Herida de epidermolisis bullosa distrófica	BMSC-EVs humanas alogénicas (AGLE-102)	Fase I/IIA	NCT04173650
A Safety Study of Intravenous Infusion of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles (UNEX-42) in Preterm Neonates	Displasia broncopulmonar	BMSC-EVs humanas alogénicas (UNEX-42) IV	Fase I	NCT03857841
Effect of Adipose Derived Stem Cells Exosomes as an Adjunctive Therapy to Scaling and Root Planning in the Treatment of Periodontitis: A Human Clinical Trial	Periodontitis	ADSC-Exos autólogos. Inyección local	Fase I temprana	NCT04270006
Study of Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells on the Therapy for Children with Severe Infection	Sepsis y enfermedad crítica	MSC-Exos	Fase no específica da	NCT04850469
A Pilot Clinical Study on Inhalation of Mesenchymal Stem Cells Exosomes Treating Severe Novel Coronavirus Pneumonia	Neumonía por COVID-19	ADSC-Exos alogénicos. Inhalación aerosoles	Fase I	NCT04276987
Exosome of Mesenchymal Stem Cells for Multiple Organ Dysfunction Syndrome After Surgical Repair of Acute Type A Aortic Dissection: A Pilot Study	Fallo multiorgánico	HUMSC-Exos alogénicos. IV	Fase no específica da	NCT04356300
Effect of Umbilical Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes on Dry Eye in Patients with Chronic Graft Versus Host Diseases	Enfermedad de ojo seco	HUMSC-Exos alogénicos. Gota ocular	Fase I/II	NCT04213248
A Tolerance Clinical Study on Aerosol Inhalation of Mesenchymal Stem Cells Exosomes in Healthy Volunteers	Voluntarios sanos	ADSC-Exos humanos alogénicos. Inhalación aerosoles	Fase I	NCT04313647
Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes Promote Healing of Large and Refractory Macular Holes	Agujeros maculares refractarios	HUMSC-Exos alogénicos	Fase I temprana	NCT03437759
Phase 1 Study of The Effect of Cell-Free Cord Blood Derived Microvesicles On β -cell Mass in Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) Patients	Diabetes Mellitus tipo 1	Exosomas y microvesículas de MSC derivadas de la sangre del cordón umbilical alogénico	Fase I	NCT02138331
Mesenchymal Stem Cell Exosomes for the Treatment of COVID-19 Positive Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome and/or Novel Coronavirus Pneumonia	Síndrome de dificultad respiratoria aguda y neumonía asociado a COVID-19	MSC-Exos perinatales alogénicos	Fase I/II	NCT04798716
A Phase I Study Aiming to Assess Safety and Efficacy of a Single Intra-articular Injection of MSC-derived Exosomes (CelliStem®OA-sEV) in Patients with Moderate Knee Osteoarthritis (ExoOA-1)	Osteoartritis de rodilla	MSC-Exos alogénicos. Inyección intra-articular	Fase I	NCT05060107

A Phase II Trial to Investigate Clinical Efficacy of Autologous Synovial Fluid Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome Application in Patients with Degenerative Meniscal Injury	Lesión degenerativa de menisco	MSC-Exos derivados de líquido sinovial autólogos	Fase II	NCT05261360
The Protocol of Evaluation of Safety and Efficiency of Method of Exosome Inhalation in SARS-CoV-2 Associated Two-Sided Pneumonia	Neumonía asociada a COVID-19	MSC-Exos (EXO1 y EXO2) inhalados	Fase I/II	NCT04491240
The Extended Protocol of Evaluation of Safety and Efficiency of Method of Exosome Inhalation in COVID-19 Associated Two-Sided Pneumonia	Neumonía asociada a COVID-19	MSC-Exos (EXO1 y EXO2) inhalados	Fase II	NCT04602442
A Multiple, Randomized, Double-blinded, Controlled Clinical Study of Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cell Exosomes (hMSC-Exos) Nebulized Inhalation in the Treatment of Acute Respiratory Distress Syndrome	Síndrome de dificultad respiratoria aguda	MSC-Exos humanos alogénicos inhalados	Fase I/II	NCT04602104
A Clinical Study of Allogeneic Human Adipose-derived Mesenchymal Progenitor Cell Exosomes (haMPC-Exos) Nebulizer for the Treatment of Carbapenem-resistant Gram-negative Bacilli-induced Pulmonary Infection	Infecciones pulmonares causadas por bacterias resistentes	Exos derivados de células mesenquimales progenitoras	Fase I/II	NCT04544215
Open-Label, Single-Center, Phase I/II Clinical Trial to Evaluate the Safety and the Efficacy of Exosomes Derived from Allogeneic Adipose Mesenchymal Stem Cells in Patients with Mild to Moderate Dementia Due to Alzheimer's Disease	Alzheimer	ADSC-Exos alogénicos. Goteo nasal	Fase I/II	NCT04388982
Phase I Study of Mesenchymal Stromal Cells-Derived Exosomes with KrasG12D siRNA for Metastatic Pancreas Cancer Patients Harboring KrasG12D Mutation	Cáncer pancreático con mutación KrasG12D	MSC-Exos cargados con siRNA KrasG12D. IV	Fase I/II	NCT03608631
Safety and Efficacy of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Derived Exosome on Disability of Patients with Acute Ischemic Stroke: A Randomized, Single-blind, Placebo-controlled, Phase 1, 2 Trial	Accidente cerebrovascular isquémico agudo	MSC-Exos alogénicos enriquecidos en miR-124. Estereotaxis/intrarenquimal	Fase I/II	NCT03384433
Safety and Efficacy of Injection of Human Placenta Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes for Treatment of Complex Anal Fistula	Fístulas anales refractarias	MSC-Exos de placenta alogénicos	Fase I/II	NCT05402748
Efficacy and Safety of EXOSOME-MSC (Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes) Therapy to Reduce Hyper-inflammation In Moderate COVID-19 (2019- New Corona Virus Disease) Patients	COVID-19	MSC-Exos	Fase I/II	NCT05216562
Exosome-based Nanoplatform for Ldlr mRNA Delivery in Familial Hypercholesterolemia	Hipercolesterolemia familiar homocigota	BMSC-Exos cargados con Ldlr	Fase I/II	NCT05043181
The Effect of Wharton Jelly-derived Mesenchymal Stem Cells and Stem Cell Exosomes on Visual Functions in Patients with Retinitis Pigmentosa	Retinitis pigmentosa	WJMSC-Exos	Fase II/III	NCT05413148

Tabla 2. Ensayos clínicos con EVs de MSC actualmente en marcha. Fuente clinicaltrials.org

3.6.2. Retos de las terapias basada en MSC-EVs

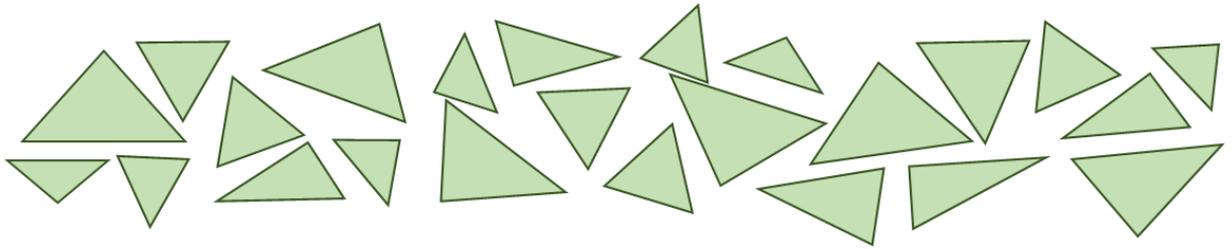
A pesar del éxito terapéutico de las MSC-EV en numerosos estudios preclínicos, el salto a la clínica tiene que venir acompañado de la solución de varios aspectos relacionados con la obtención y seguridad de las EVs [322].

Uno de estos aspectos es la producción a gran escala de las MSC-EVs. Los métodos tradicionales para el mantenimiento y la expansión de las MSC se basan en el cultivo bidimensional, realizando pases de estas células. Sin embargo, la realización de pases durante un largo periodo de tiempo para producir cantidades suficientes de EVs puede hacer que las células pierdan su capacidad clonal y sufran alteraciones [323]. Para evitar que se produzcan estas alteraciones es necesario aislar periódicamente nuevas biopsias de MSC, lo cual conlleva a su vez una variabilidad inter-biopsia que se puede ver reflejada en las EVs. Por ello, existe una necesidad urgente de desarrollar métodos que permitan la expansión confiable de MSC para producir cantidades enormes de EVs para su uso clínico. Se ha planteado el empleo de biorreactores para la expansión de las MSC, pero todavía es necesario poner a punto estos métodos de cultivo. Otra de las posibilidades es la inmortalización de los cultivos de MSC, que permitiría aumentar la producción de EVs. No obstante, esto conlleva un aumento de las pruebas de seguridad que tendrían que pasar las EVs como producto biológico antes de llegar a clínica.

Por otro lado, existe la necesidad de desarrollar técnicas de aislamiento de EVs con un alto rendimiento y alta pureza que permitan estandarizar y escalar la obtención de las MSC-EVs. Esto se debe a que actualmente, dependiendo de la técnica de aislamiento que se emplee, las EVs obtenidas pueden variar en cuanto a sus características y funcionalidad [219]. Además, muchas de las técnicas empleadas son laboriosas, lo que dificulta su escalado.

Finalmente, es necesario estudiar en profundidad la biodistribución y la seguridad de las EVs. Se han realizado diferentes estudios de biodistribución marcando las EVs en los que se ha comprobado que estas no solo llegan al sitio de lesión, sino que también se distribuyen por distintos órganos como el hígado, el bazo o los riñones [324]. En cuanto a la seguridad de las EVs como producto biológico, aunque parten con ventajas respecto a las terapias celulares en aspectos como la inmunogenicidad o la tumorigenicidad, es necesario demostrar que el tratamiento con ellas no genera efectos adversos graves para que puedan llegar a la clínica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



1. Hipótesis

Las EVs derivadas de MSC han demostrado recapitular los efectos terapéuticos de sus células de origen, lo que ha incrementado su interés como agentes para el tratamiento de diferentes patologías. Uno de los mecanismos por lo que ejercen su función terapéutica es la inmunoregulación, lo que ha llevado a su estudio para el tratamiento de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios. Aunque el desarrollo de terapias basadas en EVs derivadas de MSC ha evolucionado mucho a lo largo de los últimos años, todavía hay aspectos que mejorar y que seguir investigando. Por un lado, la mayor parte de los estudios preclínicos y clínicos realizados con EVs se han llevado a cabo con EVs derivadas de MSC de médula ósea o de tejido adiposo, mientras que otras fuentes celulares de MSC están poco exploradas. Además, el problema de la heterogeneidad entre fuentes celulares o entre biopsias aún no se ha investigado en profundidad. Teniendo en cuenta todo esto, en este trabajo se establecieron dos hipótesis diferentes:

La hipótesis de este trabajo postula que las EVs derivadas de distintas biopsias de MSC de pulpa dental (DP-MSC) actúan sobre las poblaciones leucocitarias durante de la inflamación generada por el IAM, induciendo un efecto inmunomodulador y el proceso resolutorio de la inflamación en el contexto de la lesión miocárdica.

Como hipótesis secundaria se postuló que las EVs de diferentes biopsias de DP-MSC contenían una composición similar, lo que permitiría estandarizar su producción y utilizarlas como agentes terapéuticos libres de células.

2. Objetivos

Para evaluar si las EVs derivadas de DP-MSC presentaban las mismas características fisicoquímicas y funcionales y se podían emplear como producto terapéutico se establecieron los siguientes objetivos:

- Caracterizar en profundidad las EVs obtenidas a partir de tres biopsias de DP-MSC inmortalizadas.
- Comparar el contenido en proteínas, lípidos y miRNAs de las EVs obtenidas a partir de las tres biopsias de DP-MSC.
- Analizar funcionalmente la capacidad inmunoreguladora de estas EVs sobre macrófagos, neutrófilos y PBMCs *in vitro*, así como su efecto sobre fibroblastos cardíacos

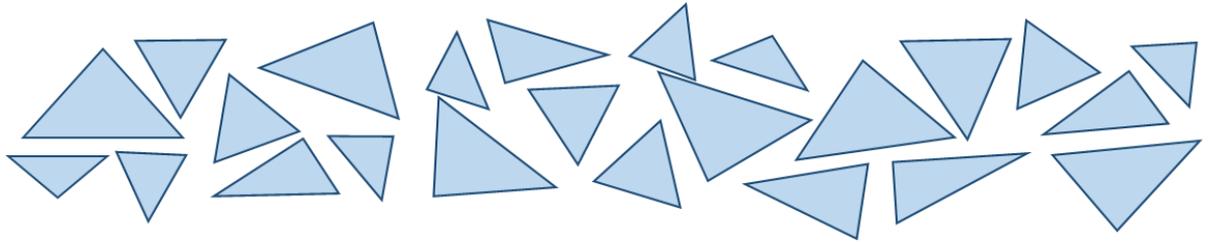
Para evaluar si las EVs de DP-MSC tienen efecto inmunoregulador y se pueden emplear como agente terapéutico en el IAM se establecieron los siguientes objetivos:

- Determinar el efecto terapéutico de la administración de EVs en un modelo de IAM en rata estudiando la función cardíaca, la extensión del tejido fibrótico

(cicatriz del infarto) y la formación de nuevos vasos 7 y 21 días después de realizar el infarto.

- Determinar el efecto inmunoregulador de la administración de EVs en un modelo de IAM en rata evaluando el efecto sobre los macrófagos y los neutrófilos presentes en la zona de infarto, así como el ambiente pro o antiinflamatorio a 7 días tras la realización del infarto.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Declaraciones éticas

Todos los donantes que participaron en el estudio firmaron previamente un consentimiento informado. Además, los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y el protocolo realizado fue anteriormente aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, España.

Los procedimientos animales fueron aprobados por los comités éticos institucionales y locales de cuidado de animales conforme a las directrices de la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo en la protección de animales empleados con fines científicos, reforzada por la ley española bajo el Real Decreto 1201/2005. Protocolo N°2020/VSC/PEA/0122 para el modelo de infarto agudo de miocardio en rata.

2. Cultivos celulares

2.1. Cultivos primarios

2.1.1. MSC inmortalizadas mediante la sobreexpresión de hTERT

Las MSC empleadas en este trabajo provienen de pulpa dentaria (DP, del inglés dental pulp). Estas células se aislaron y se inmortalizaron en el laboratorio para obtener una fuente celular estable. El aislamiento de las DP-MSc se realizó a partir de terceros molares de donantes sanos y jóvenes, que fueron extraídos por razones ortodónticas. Inmediatamente después de la extracción, los molares se sumergieron en una solución fisiológica con antibióticos para evitar contaminaciones provocadas por microorganismos presentes en la cavidad bucal. Se fracturó la corona dental y el tejido de la pulpa dentaria se aisló y procesó en condiciones estériles. Para su procesamiento la pulpa fue fragmentada y estos fragmentos se digirieron durante 90 minutos a 37°C en una solución de Colagenasa/Dispasa® (3 mg/ml) (Merk, Kenilworth, NJ, EE.UU.). Los explantes resultantes de la digestión se sembraron en placas de cultivo con medio de MSC (Tabla 3) a 37°C y 5% CO₂. A las 48 horas se cambió el medio de cultivo para eliminar las células no adherentes. Se siguieron realizando cambios de medio de cultivo cada 72 horas y tras 10-12 días, las células se tripsinizaron y se volvieron a cultivar a una densidad de unas 2·10³ células/cm².

Las distintas biopsias de DP-MSc aisladas se inmortalizaron mediante transducción con un lentivirus que contiene el gen de la telomerasa humana (hTERT) y resistencia a higromicina (pLV-hTERT-hygro) como método de selección de las células infectadas y, por tanto, inmortalizadas. Una vez aisladas las MSC inmortalizadas (MSC_{TERT}), se sembraron y amplificaron hasta conseguir un stock que permitiese utilizar las MSC_{TERT} como una línea celular.

2.1.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Los cultivos primarios de monocitos se aislaron a partir de sangre periférica de donantes sanos tras su consentimiento informado a través del Banco de Sangre del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. La sangre obtenida se diluyó a partes iguales

con Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 1X (Gibco, ThermoFisher Scientific) y se centrifugó a 3950 rpm durante 9 minutos sin freno ni aceleración. Se recogió la capa del medio y las PBMCs se aislaron mediante centrifugación por gradiente de densidad empleando Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania). Las PBMCs, dentro de las cuales se incluyen linfocitos, monocitos y otros tipos celulares, se quedan formando una capa de menor densidad que el Histopaque®-1077, que es fácil de recoger tras la centrifugación. Una vez aisladas, las PBMCs se cultivaron en medio RPMI completo, en condiciones estándar de cultivo (37°C y 5% CO₂).

2.1.3. Aislamiento y diferenciación de monocitos

Los monocitos se aislaron a partir de las PBMCs obtenidas mediante el gradiente de densidad. Se empleó el kit comercial CD14 Dynabeads® Flow-Comp™ (Invitrogen, Waltham, MA, EEUU) para aislar los monocitos por separación magnética positiva mediante la unión a CD14, un marcador de monocitos presente en su membrana. Para el aislamiento, se siguieron los pasos descritos por el fabricante. Resumidamente, las PBMCs se incubaron a 4°C con un anticuerpo frente a CD14 y, tras hacer un lavado, se incubaron con Dynabeads® capaces de unirse al anticuerpo. Posteriormente, empleando un imán se aislaron las células CD14 positivas, que son las que estaban unidas a las beads magnéticas y se eliminaron el resto de tipos celulares. Finalmente, se realizó una incubación con un buffer específico del kit comercial que permitía separar las beads magnéticas de las células CD14 ya aisladas. Los monocitos aislados se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 10 µg/mL de ciprofloxacino. La densidad celular utilizada para llevar a cabo la diferenciación de los monocitos fue $1 \cdot 10^6$ células/ml. Para diferenciar los monocitos hacia los fenotipos de macrófagos M1 y M2, se añadió al medio completo, en el día 0 de diferenciación, 5 ng/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante humano (rhGM-CSF, Invitrogen, Waltham, MA, USA) o 20 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos recombinante humano (rhM-CSF, Invitrogen) respectivamente. La adición de estas citocinas se repitió al tercer día de diferenciación. En el día 5 de diferenciación, se administraron 10 ng/ml de lipopolisacárido (LPS, Invitrogen) y 20 ng/ml de interferón γ (IFN- γ , R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) a los macrófagos M1, mientras que a los macrófagos M2 se les administró 40 ng/ml de interleucina-4 (IL-4, Pepro-Tech, Londres, Reino Unido) y 20 ng/ml de interleucina-13 (IL-13, PeproTech). En algunos de los pocillos destinados a diferenciarse a M1 se añadieron a día 0, $2 \cdot 10^9$ o $4 \cdot 10^9$ partículas/ml de EVs de DP-MSC.

2.1.4. Aislamiento y cultivo de neutrófilos

Los neutrófilos humanos se aislaron a partir de sangre periférica de donantes, previo consentimiento informado. La sangre se diluyó en una proporción 1:1 con HBSS 1X y se centrifugó durante 60 minutos a 450 rcf (sin aceleración ni freno) en un gradiente de densidad generado por Lympholyte®-poly (Cedarlane®, Burlington, Canadá). Lympholyte®-poly es una mezcla de metrizoato sódico y Dextrano 500 estéril que permite el aislamiento de granulocitos de la sangre, generando dos bandas separadas. En la banda superior se localizan los monocitos y linfocitos, mientras que en la inferior

se encuentran separados los granulocitos polimorfonucleares (PMNs), entre los que predominan principalmente los neutrófilos. Teniendo esto en cuenta, se recogió la banda inferior de PMNs y se lavaron las células centrifugándolas en tampón fosfato salino (PBS) durante 10 minutos a 400 rcf. Las células se resuspendieron en PBS o RPMI, de acuerdo al experimento en el que se fuesen a utilizar, y se cultivaron. En algunos experimentos, los neutrófilos se cultivaron con 10 ng/ml de LPS para simular un ambiente inflamatorio. $2 \cdot 10^9$ o $4 \cdot 10^9$ partículas/ml de EVs se añadieron a los pocillos de neutrófilos correspondientes.

Medio de cultivo	Tipo celular	Compuesto	Concentración	Casa comercial
DMEM bajo en glucosa completo	MSC	DMEM 1g/L glucosa	-	Gibco
		FBS	10%	Gibco
		Ciprofloxacino	10 µg/mL	Sigma-Aldrich
RPMI completo	Monocitos, neutrófilos PBMCs y THP1	RPMI 1640	-	Gibco
		FBS	10%	Gibco
		Ciprofloxacino	10 µg/mL	Sigma-Aldrich
Diferenciación M1	Macrófagos M1	RPMI completo	-	
		GM-CSF	10 ng/ml	Peprtech
Diferenciación M2	Macrófagos M2	RPMI completo	-	
		M-CSF	20 ng/ml	Peprtech
Activación de macrófagos M1	Macrófagos M1	RPMI completo	-	
		LPS	10 ng/mL	Invitrogen
		IFN γ	50 ng/ml	R&D
Activación de macrófagos M2	Macrófagos M2	RPMI completo	-	
		IL-4	40 ng/ml	Peprtech
		IL-13		Peprtech
Medio crecimiento de fibroblastos 3	Fibroblastos cardíacos humanos	Fibroblast Growth Medium 3	-	PromoCell
		Ciprofloxacino	10 µg/mL	Sigma-Aldrich
Medio basal fibroblastos	Fibroblastos cardíacos humanos	DMEM 4,5g/L glucosa	-	Gibco
		FBS	0,5%	Gibco
		NAAS	1%	Gibco
		Ciprofloxacino	10 µg/mL	Sigma-Aldrich

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo utilizados en los distintos tipos celulares. FBS = suero bovino fetal, NAAS = aminoácidos no esenciales.

2.1.5. Cultivo de fibroblastos cardíacos humanos

El cultivo primario de fibroblastos cardíacos humanos (HCF, de sus siglas en inglés) se adquirió de Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE.UU.) (C-12375). Las células se expandieron y se congelaron en crioviales con 1 millón de células. Los HCF se cultivaron en medio de crecimiento 3 (C-23130, PromoCell, Heidelberg, Alemania). Para realizar los experimentos con EVs, se sembraron los HCF a una densidad de 25000 células/cm². Se dejaron durante 24 horas en cultivo con el medio de crecimiento y, al día siguiente, se cambió el medio de cultivo por un medio basal compuesto por DMEM alto en glucosa con 0,5% de FBS, 1% de aminoácidos no esenciales (NEEA, de sus siglas en inglés) y 10 µg/ml de ciprofloxacino. Este cambio de medio se realiza porque el medio de crecimiento tiene una cantidad de suero elevada, lo que provoca un estado activado de los fibroblastos. Para observar variaciones en aspectos relacionados con fibrosis conviene reducir la cantidad de suero presente en el medio, de forma que los fibroblastos no se encuentren activados. Los HCF se dejaron en cultivo durante 24 horas en medio basal y, transcurrido este tiempo se indujo la activación de los mismos añadiendo 10 ng/ml de TGFβ (Sigma-Aldrich). Se añadió además las EVs (2·10⁹ o 4·10⁹ partículas/ml). Como control se utilizaron células no estimuladas con TGFβ y células no tratadas. 24 horas después se recogió el RNA para determinar cambios en la expresión génica.

3. Aislamiento de vesículas extracelulares

Para obtener las EVs, las MSC se cultivaron durante 48 horas en medio de extracción de vesículas, cuya diferencia con el medio de MSC habitual (Tabla 3) es que el FBS que contiene ha sido previamente depletado para eliminar las vesículas que hay en él de forma natural. El FBS depletado se obtuvo mediante ultracentrifugación a 100000 g durante 16 horas de FBS normal mezclado en una proporción 1:1 con DMEM bajo en glucosa. De esta forma nos aseguramos de eliminar las vesículas presentes en el suero, consiguiendo que las EVs que obtenemos en el proceso final de aislamiento sean únicamente de MSC. Cada extracción de EVs se llevó a cabo a partir de 200 ml de medio de extracción. El aislamiento de las EVs se realizó mediante dos técnicas diferentes que fueron comparadas entre sí en cuanto a rendimiento. En ambos casos, tras recoger el medio de extracción del cultivo de MSC, se realizó una centrifugación del mismo a 2000 g durante 25 minutos (centrífuga de sobremesa Eppendorf 5804, rotor A-4-62) para eliminar el debris celular de mayor tamaño.

3.1. Ultracentrifugaciones seriadas (UC)

El medio de extracción obtenido tras la centrifugación arriba mencionada se centrifugó a 10000 g durante 70 minutos (centrífuga Hitachi CP100NX, rotor Beckman Coulter 50.2 Ti) para eliminar, en este caso, el debris de menor tamaño. El sobrenadante resultante se filtró con filtros de 0,22 µm de tamaño de poro y las EVs se concentraron mediante dos rondas de ultracentrifugación a 100000 g de dos horas cada una (centrífuga Hitachi CP100NX, rotor Beckman Coulter 50.2 Ti). Entre ambas

ultracentrifugaciones se realizó un paso de lavado del pellet de EVs con PBS. Tras la última ultracentrifugación, las EVs, que se encontraban formando un pellet, se resuspendieron en PBS y se filtraron con un filtro de 0,22 μm para esterilizarlas y poderlas usar en experimentos *in vitro*.

3.2. Filtración de flujo tangencial-cromatografía de exclusión por tamaño (TFF-SEC)

El otro método de aislamiento de EVs que se llevó a cabo fue la combinación de la filtración de flujo tangencial (TFF, del inglés tangential Flow filtration) seguida de una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, del inglés size exclusion chromatography). Con la TFF consigues concentrar las EVs presentes en el medio de extracción en un volumen más pequeño, mientras que con la SEC separas estas EVs del resto de componentes presentes en el medio. Resumidamente, los 200 ml de medio de extracción se pasaron por un filtro de flujo tangencial (TFF Easy, HansaBioMed, Tallinn, Estonia) hasta conseguir un volumen final de 2 ml. A continuación, las EVs contenidas en los 2 ml de medio concentrado se aislaron mediante columnas SEC de vesículas extracelulares (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canadá) siguiendo las instrucciones del fabricante hasta conseguir EVs resuspendidas en PBS. Estas EVs se filtraron mediante un filtro de 0,22 μm para esterilizarlas y se utilizaron en experimentos de análisis funcional y de caracterización de las propias EVs.

4. Caracterización de EVs

4.1. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)

Las muestras de EVs se resuspendieron en PBS estéril y se diluyeron hasta obtener una concentración adecuada para el análisis en cada caso. La distribución del tamaño y la cuantificación del número de partículas se realizó utilizando el sistema Nanosight NS3000 (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido).

4.2. Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica fue llevada a cabo por la unidad de microscopía del Centro de Investigación Príncipe Felipe, tal y como se describe anteriormente [325]. Las EVs se diluyeron en PBS, se cargaron en rejillas recubiertas de carbón Formvar y se contrastaron con acetato de uranilo al 2%. Finalmente, las EVs se examinaron 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).

4.3. Análisis por dispersión dinámica de luz (DLS)

La caracterización de las EVs mediante DLS fue realizada en la unidad de Química Analítica de la Universidad de Valencia. Brevemente, el sistema AF4 (AF2000 MultiFlow FFF, Postnova Analytics Inc., Landsberg am Lech, Alemania) se acopló en línea al detector SPD-20AV UV-Vis (Shimadzu Corporation, Japón) y al detector Zetasizer Nano

ZS DLS (Malvern, Reino Unido). Los caudales se obtuvieron mediante dos bombas isocráticas PN1130 separadas (Postnova Analytics Inc.) equipadas con el desgasificador PN7520. El flujo cruzado se obtuvo mediante una bomba de pistón separada que se podía ajustar constantemente. El soporte líquido AF4-UV-Vis-DLS (0,1 μm filtrado) se preparó con PBS. El detector DLS también puede funcionar en modo discontinuo y mediante microelectroforesis doppler láser permite obtener la magnitud del potencial zeta.

4.4. Caracterización mediante reflectancia total atenuada - Infrarrojo por transformada de Fourier (ATR-FTIR)

Para caracterizar las EVs se estudió también su espectro infrarrojo en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} . Para ello se utilizó un espectrómetro Alpha II (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemania) equipado con un ATR de platino con elemento de interfaz de medición de diamante monolítico (reflexión simple), una fuente IR CenterGlow™ y un detector DTGS de temperatura estabilizada sin necesidad de sistema de purga. Para el análisis de datos se empleó el software OPUS 8.5 (Bruker Optics GmbH). Se depositaron 2 μl de la suspensión de EVs sobre el cristal ATR y se secaron durante 20 segundos a temperatura ambiente utilizando una corriente intermitente de aire. Los espectros se recogieron coadjuntando 32 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} con un tiempo de adquisición de 20 segundos.

4.5. Imágenes de fluorescencia e interferometría de una sola partícula con ExoView®

La tecnología ExoView® se basa en imágenes obtenidas por interferometría de una única partícula de EVs. Permite realizar el análisis de una única vesícula para determinar el tamaño y el perfil proteico de la misma. Las EVs son capturadas en un chip de sustrato de silicio, constituido por una matriz de puntos impresos en la que hay diferentes anticuerpos. Esto se puede combinar con la inmunotinción de las EVs empleando anticuerpos conjugados a fluoróforos, de manera que se pueden caracterizar diferentes marcadores en la misma vesícula de forma simultánea. Para la caracterización de las EVs se utilizó el kit comercial ExoView® Human Tetraspanin Kit (NanoView Biosciences, Brighton, MA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se caracteriza porque cada chip tiene unidos anticuerpos frente a CD9, CD81 y CD63, tres tetraspaninas que son marcadores característicos de exosomas. Las EVs aisladas se diluyeron 1:10 en la Solución de Incubación 1X del kit y se añadieron 50 μl de la muestra diluida sobre un chip de silicio depositado en un pocillo de p24. Las muestras se incubaron con los chips durante toda la noche y posteriormente se realizaron 3 lavados de 3 minutos en agitación utilizando la Solución A. A continuación, los chips se incubaron en agitación durante 1 hora con una mezcla de anticuerpos fluorescentes constituida por anti-CD81 (CF® 555), anti-CD9 (CF® 488A), y anti-CD63 (CF® 647) en solución de bloqueo. Tras esto, se realizó un lavado con Solución A, 3 con Solución B y un último lavado en agua desionizada. La adquisición de datos e imágenes se realizó en un

ExoView® R100 (NanoView Biosciences) y el análisis de los datos se llevó a cabo con el software ExoView Analyzer 3.1.4.

5. Análisis proteómico de las EVs

El análisis proteómico se realizó en la instalación de proteómica de la SCSIE Universidad de Valencia, perteneciente a Proteored, PRB3, y cuenta con el apoyo de la subvención PT17/0019, del PE I+D+i 2013-2016, financiada por el ISCIII y FEDER. Las EVs obtenidas a partir de diferentes biopsias se sometieron a un análisis proteómico para comparar su cargo proteico. Las muestras se resuspendieron en buffer RIPA y la concentración de proteína se determinó mediante el kit comercial de ensayo de proteínas Qubit™ (Invitrogen). Se mezclaron 10 µg de muestra proteica de cada biopsia con bicarbonato amónico (ABC) hasta una concentración final de 50 mM. Los residuos de cisteína se redujeron con DL-Ditiotreitol (DTT) 2 mM en 50 mM de ABC a 60°C durante 20 minutos. Los grupos sulfhidrilos se alquilaron con 5 mM de yodoacetamida en 50 mM de ABC en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. El exceso de yodoacetamida se neutralizó con 10 mM de DTT en 50 mM de ABC durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se sometieron a una digestión utilizando tripsina modificada de grado de secuenciación (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) a 37°C durante toda la noche. La reacción se detuvo con ácido tri-fluoroacético (TFA) a una concentración final del 0,1%. La mezcla de digestión se secó en una centrifuga de vacío y se resuspendió en 25 µl de ACN al 2% y TFA al 0,1%. Para la cromatografía líquida y la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) se cargaron 4 µl de cada muestra en una columna trampa (NanoLC Column, 3µ C18-CL, 350 mm x 0.5mm; Eksigent) y se desalaron con TFA al 0,1% a 5 µl/min durante 5 min. A continuación, los péptidos se cargaron en una columna analítica (3µ C18-CL 120 Å, 0.075 x 150 mm; Eksigent) equilibrada en acetonitrilo al 5% y ácido fórmico (AF) al 0,1%. La elución se realizó con un gradiente lineal de entre 10-37% de B en A durante 45 min (A: 0,1 % FA; B: ACN, 0,1 % FA) a un caudal de 300 nL/min. Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qTOF (6600plus TripleTOF, ABSCIEX). Las muestras se ionizaron en una fuente de electrospray Optiflow < 1 µL Nano aplicando 3,0 kV al emisor del spray a 175 °C. El análisis se realizó en modo dependiente de datos. Se adquirieron barridos MS1 de sondeo de 350-1400 m/z durante 250 ms. La resolución del cuadrupolo se ajustó a "BAJA" para los experimentos MS2, que se adquirieron a 100-1500 m/z durante 25 ms en modo de "alta sensibilidad". Se utilizaron los siguientes criterios de conmutación: carga: 2+ a 4+; intensidad mínima; 250 cuentas por segundo (cps). Se seleccionaron hasta 100 iones para la fragmentación después de cada barrido de sondeo. La exclusión dinámica se fijó en 15 s. La sensibilidad del sistema se controló analizando 500 ng de extracto digerido de proteínas de K562 (SCIEX). En estas condiciones, se identificaron 1900 proteínas (FDR <1%) en un gradiente de 45 minutos. Se utilizaron los parámetros por defecto de ProteinPilot para generar listas de picos a partir de los archivos wiff del sistema TripleTOF 6600 plus. El algoritmo Paragon [326] de ProteinPilot v 5.0 se utilizó para buscar en SwissProt (versión 200601) con los siguientes parámetros: especificidad de tripsina, cis-alquilación, taxonomía no

restringida y taxonomía humana, y el esfuerzo de búsqueda se fijó en mediante análisis FDR. Las proteínas que mostraron una puntuación del valor unused >1,3 se identificaron con una confianza $\geq 95\%$.

Finalmente, los datos se analizaron con el software String. Las proteínas con un valor de unused > 1,3 se utilizaron para el análisis de enriquecimiento funcional que permitía detectar asociaciones entre GOs y grupos experimentales. Esta caracterización funcional mostró procesos biológicos relacionados con las proteínas seleccionadas que fueron representados en un TreeMap utilizando la página web REVIGO.

6. Análisis lipidómico de las EVs

Para el análisis de las muestras se utilizó un equipo de cromatografía líquida (UPLC) acoplado a un espectrómetro de masas (MS) de alta resolución con detector Orbitrap UPLC-QExactive Plus (UPLC-TOF/MS-Orbitrap QExactive Plus MS) disponible en la Unidad Analítica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IISLaFe, Valencia, España), encargada del análisis de las muestras.

La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna Acquity UPLC CSH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm) de Waters. La fase móvil en el modo de ionización positiva fue acetonitrilo/agua (60:40, v/v) con formiato de amonio (10 mM) (A), y alcohol isopropílico/acetonitrilo (90: 10, v/v) con formiato de amonio (10 mM) (B); mientras que en el modo de ionización negativa, fue acetonitrilo/agua (60:40, v/v) con acetato de amonio (10 mM) (A) y alcohol isopropílico/acetonitrilo (90:10, v/v) con acetato de amonio (10 mM) (B). El procesamiento de datos, la selección de picos, la alineación del tiempo de retención y la integración de picos se realizaron utilizando el paquete LipidMSv3 R [327] para obtener los lípidos presentes en las muestras.

7. Secuenciación de miRNAs presentes en las EVs

Las EVs se resuspendieron en PBS y se enviaron a la Unidad de Genómica del Centro de Regulación Genómica de Barcelona, donde se llevó a cabo la secuenciación de los miRNAs de las EVs. Las bibliotecas se prepararon utilizando el kit NEBNext® Small RNA Library Prep Set de Illumina® (E7330, San Diego, California, EE.UU), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, entre 1-5 ng de ARN aislado de las EVs se sometieron a ligadura de adaptadores 3' y 5' y a la síntesis de ADNc de primera cadena. La amplificación de las bibliotecas se realizó mediante PCR utilizando los cebadores indexados suministrados en el kit. Todos los pasos de purificación se realizaron con beads AgenCourt AMPure XP (ref. A63882, Beckman Coulter). Las bibliotecas finales se analizaron con el bioanalizador Agilent (5067-4626) para estimar la cantidad y comprobar la distribución de tamaños. Se realizó un pool para realizar la selección de tamaño utilizando geles Novex TBE PAGE al 6 % (EC6265BOX) y el conjunto final se cuantificó mediante qPCR utilizando el kit KAPA Library Quantification (KK4835, KapaBiosystems, Wilmington, MA, EE.UU.). Finalmente se secuenciaron en el NextSeq2000 de Illumina.

El análisis de la secuenciación fue llevado a cabo por el Grupo de Ingeniería Estadística Multivariante (GEIM) de la Universidad Politécnica de Valencia. Los archivos FASTQ fueron tratados con Cutadapt y alineados con Kallisto para obtener la tabla de conteos de cada miRNA. Se emplearon varios métodos de expresión diferencial para buscar miRNAs alterados entre grupos: prueba binomial negativa de edgeR, modelos de regresión de lima y prueba no paramétrica de NOISeq. El modelo edgeR se aplicó a los recuentos de miARN no normalizados y a la normalización proporcionada por CQN, mientras que el modelo limma se aplicó solo a los datos normalizados por CQN, que incluían una transformación logarítmica de los valores de expresión. Los datos normalizados por CQN sin transformación logarítmica se analizaron con el modelo NOISeq. Para seleccionar los miRNAs expresados diferencialmente a partir de los resultados de edgeR y limma se utilizó un valor de corte p de 0.05, mientras que para el valor p ajustado por FDR de NOISeq se utilizó un valor de corte de 0.10.

8. Análisis de expresión génica

8.1. Extracción de ARN

Para aislar el ARN de las células y las muestras de tejido, estos se mantuvieron en hielo y se lavaron con PBS. Se añadió a cada una de las muestras tampón de lisis RLT y se recogió el lisado celular en tubos eppendorf. En este punto del procedimiento, se puede continuar con la extracción del ARN, o el lisado celular se puede congelar a -80°C para realizar la purificación del ARN en otro momento. Para continuar con la extracción, el lisado se mezcló con el mismo volumen de etanol al 70% y se siguieron los pasos establecidos en el kit comercial de purificación de ARN en columna RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración de ARN se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). La calidad del ARN extraído se determinó en base a los ratios de absorbancia 260/280, que indica contaminación por proteínas, y 260/230, que indica contaminación por componentes orgánicos.

8.2. Retrotranscripción de ARN

Una vez aislado y cuantificado el ARN, este se utilizó como molde para obtener ADN complementario (ADNc) mediante retrotranscripción. Se utilizó el kit comercial PrimeScript RT Reagent Kit (Takara, Kusatsu, Japón), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de $1\ \mu\text{g}$ de ARN de todas las muestras y la reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf. Se realizó un único ciclo de 15 minutos a 37°C y 5 segundos a 85°C , manteniendo después las muestras a 4°C . El ADNc se almacenó a -20°C hasta la realización de la RT-qPCR.

8.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

La RT-qPCR permite cuantificar la cantidad de ARNm que hay en las muestras y comparar los niveles relativos entre diferentes muestras. Para realizar la RT-qPCR se

necesita añadir a la reacción cebadores sentido y antisentido que permitan amplificar el producto de PCR. Los cebadores utilizados en este trabajo, tanto humanos como de rata, se diseñaron mediante la herramienta informática Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y se compraron a Condalab (Madrid, España). Para realizar la RT-qPCR se utilizó el kit comercial TB Green® Premix Ex Taq™ (Takara). Cada reacción se llevó a cabo con 2 µl de ADNc diluido, (previamente se diluyó 1:10 en agua libre de nucleasas), 0,34 µl de cada cebador, 2,32 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl del Master Mix. El volumen total de cada reacción fue de 10 µl. Se realizaron triplicados para cada muestra y gen. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos (A36931; Thermo Fisher Scientific) en un termociclador Viia 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, EE. UU.). El protocolo de la reacción consiste en un paso de desnaturalización inicial a 95°C de 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minutos a 60°C, en los que se produce la desnaturalización y la hibridación/extensión. Tras estos 40 ciclos se lleva a cabo la fase de enfriamiento a 4°C. Los cebadores empleados en este trabajo son los que aparecen detallados en la Tabla 4.

Gen	Cebador forward	Cebador reverse
<i>hGAPDH</i>	CCCCTCTGCTGATGCCCCCA	TGACCTTGCCAGGGGTGCT
<i>hCD206</i>	ACCTGCGACAGTAAACGAGG	TGTCTCCGCTTCATGCCATT
<i>hCD163</i>	GCTCATCCCGTCAGTCATCC	TCCCGGTATTGAATTTGGTGGA
<i>hALOX15</i>	TTCTATGCCCAAGATGCGCT	TGCAGCCCCGATTTTCAGTGAT
<i>hCXCL10</i>	TGCAAGCCAATTTTGTCCACGTGT	GCAGCCTCTGTGTGGTCCATCC
<i>hCXCL11</i>	TGTCTTTGCATAGGCCCTGGGGT	AGCCTTGCTTGCTTCGATTTGGGA
<i>hCCL5</i>	TACATTGCCCGCCCACTGCC	GGGTTGGCACACACTTGGCG
<i>hMPO</i>	GCCCATCCTTGACTCTCTTGG	CCTTTACAACCAGGGGTCCA
<i>hTLR2</i>	AGGCAGCGAGAAAGCGCAGC	CCCCAAGACCCACACCATCCA
<i>hTLR4</i>	CCCTGCGTGGAGGTGGTTCCTA	CTCCCAGGGCTAAACTCTGGATGGG
<i>hALX</i>	TTGCTCCACAGGAAGCCAAG	CAGGGCCAGGTTTCAGGTAAC
<i>hCOL3A1</i>	GCCCTCCTAATGGTCAAGG	TTCTGAGGACCAGTAGGGCA
<i>hCOL1A1</i>	GCTCGTGGAAATGATGGTGC	ACCCTGGGGACCTTCAGAG
<i>hACTA2</i>	AGCGTGGCTATTCCTTCGTT	GCAGTGGCCATCTCATTTTC
<i>hTIMP1</i>	GGATACTTCCACAGGTCCAC	CAGGGGATGGATAAACAGGGA
<i>hMMP1</i>	GTGTCTCACAGCTTCCCAGCGAC	GCACTCCACATCTGGGCTGCTTC
<i>rTnfa</i>	GATCGGTCCCAACAAGGAGG	GCTTGGTGGTTTTGCTACGAC
<i>riNos</i>	AGTCAACTACAAGCCCCACG	GCAGCTTGTCCAGGGATTCT
<i>rGapdh</i>	GCATCTTCTTGTGCAGTGCC	GATGGTGATGGGTTTCCCGT
<i>rCd274</i>	CTCCTCGCCTACAGGTAAGTC	ACACCACTAAGGCAAGCAGG
<i>rCxcl10</i>	GCAAGTCTATCCTGTCCGCA	CTAGCCGCACACTGGGTAAA
<i>rCcl5</i>	CTGCTTTGCCTACCTCTCCC	TCTTCTCTGGGTTGGCACAC

<i>rMsr1</i>	CTGTGGGCCAGATGCTGAAA	CCTGAACGGAGGAGCCATTT
<i>rAlox12</i>	ACTTGACTTGGATCGCCTCC	AGTCCTCGGCAACATCGAAA
<i>rCx3cr1</i>	TCGTCCTGCCCTTGCTTATC	GTCTCCGTCCACTAAGGGC
<i>rIl10</i>	CTGGCTCAGCACTGCTATGT	GCAGTTATTGTCACCCCGGA
<i>rCcl17</i>	ATCAGGAAGCTGGTGACGTG	TCTCAAATGACTCGCTGGG
<i>rCol3</i>	TCCACCTGGTGGCCAGAATT	GATAGCCACCCATTCTCCG
<i>rCol1</i>	GTACATCAGCCAAACCCCA	TCGTTCCATACTCGAACTG
<i>raSma</i>	ACCATCGGGAATGAACGCTT	TAGGTGGTTTCGTGGATGCC
<i>rTimp1</i>	AGAAGGGCTACCAGAGCGAT	GACCCCAAGGTATTGCCAGG
<i>rSod1</i>	GTCCAGCGGATGAAGAGAGG	TTCCACCTTTGCCCAAGTCA

Tabla 4. Listado de los cebadores utilizados en las reacciones de RT-qPCR

9. Análisis de expresión proteica

9.1. Western Blot

El western blot es una técnica analítica que permite identificar proteínas específicas en una muestra biológica mediante una reacción antígeno-anticuerpo. La técnica se divide en tres pasos: la separación de las proteínas mediante electroforesis, la transferencia de las proteínas a una membrana y la inmunodetección de las mismas. No obstante, previo a estos pasos es necesario obtener el extracto de proteína y cuantificarlo para poder añadir la misma cantidad de cada una de las muestras.

9.1.1. Extracción de proteína

Las células, las vesículas extracelulares o el tejido se lisaron en una solución de tampón RIPA (1% NP40, 0,5% desoxicolato, 0,1% dodecil sulfato sódico en solución salina tamponada con Tris) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU.) suplementado con inhibidor de proteasas (Complete, Sigma-Aldrich) e inhibidor de fosfatasa (PhosSTOP, Sigma-Aldrich). Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso para evitar la degradación proteica. El lisado se recogió en tubos eppendorf y se centrifugó a 12000 g y a 4°C durante 15 minutos en una centrífuga Eppendorf 5417 R para eliminar los restos celulares. El sobrenadante, que contenía las proteínas se recogió en tubos nuevos y se almacenó congelado a -80°C. Antes de su almacenamiento se guardaron 10 µl de muestra para su cuantificación.

9.1.2. Cuantificación de proteínas mediante ensayo de BCA

La cuantificación de proteínas en las muestras extraídas se realizó mediante un ensayo BCA, empleando el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Se trata de un ensayo colorimétrico en el que la reacción entre las proteínas y los reactivos del kit generan un color morado que se puede cuantificar por absorbancia. Para realizar el ensayo se emplearon placas de 96 pocillos. En cada uno de los ensayos se realizó una curva patrón para lo cual se añadieron 10 µl de distintas concentraciones conocidas (de 20 a 2000 µg/ml) de albúmina de suero bovino (BSA) diluida en RIPA. Además de la curva patrón, se añadieron 10 µl del extracto de proteínas de cada una

de las muestras. Para iniciar la reacción colorimétrica se agregó a cada uno de los pocillos 190 μ l de una mezcla 1:50 de los reactivos A y B del kit comercial. Se incubó durante 30 minutos a 37°C y, transcurrido este tiempo, se determinó la absorbancia a 550 nm de cada pocillo en un lector de placas Halo LED 8. Con los datos de absorbancia de la curva patrón y la concentración de proteína de esos pocillos se estableció una recta a partir de la cual se podía determinar la concentración de proteína de las muestras de interés.

9.1.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Este paso permite la separación de las proteínas a lo largo de un gel poroso al aplicar un campo eléctrico constante. Los geles utilizados para esta técnica son de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS). La adición del SDS, un detergente aniónico, provoca la desnaturalización de las proteínas y les aporta una carga neta negativa, enmascarando su carga intrínseca. Esto permite que la separación de las proteínas en este tipo de electroforesis se base únicamente en su peso molecular. La fabricación de los geles se llevó a cabo con una solución de acrilamida 30%/bisacrilamida 0,8% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). El porcentaje de esta solución de acrilamida en el gel es lo que determina el tamaño de poro que se genera al polimerizarse, de forma que un mayor porcentaje de acrilamida dará lugar a geles con un tamaño de poro más pequeño y, como consecuencia de esto, las proteínas tardarán más en migrar a lo largo del gel. Los geles de mayor porcentaje de acrilamida se utilizan para separar proteínas de bajo peso molecular, mientras que los geles de bajo porcentaje de acrilamida se utilizan para separar proteínas de alto peso molecular. El porcentaje de acrilamida utilizado en los geles de este trabajo fue del 10% y la polimerización se realizó siguiendo la receta que aparece detallada en la Tabla 5. A la hora de fabricar los geles se dividen en dos fases, el stacking, que se localiza en la parte superior y es donde se cargan las proteínas, y el running, que es donde realmente se produce la separación de las proteínas.

Geles de poliacrilamida			
Running (10%)		Stacking (8%)	
Agua MilliQ	9,6 ml	Agua MilliQ	7,2 ml
Tris 1,5M pH 8,8	5 ml	Tris 1M pH 6,8	1,5 ml
Acrilamida 29:1 40%	5 ml	Acrilamida 29:1 40%	1,5 ml
SDS 10%	200 μ l	SDS 10%	100 μ l
APS 10%	200 μ l	APS 10%	100 μ l
TEMED	8 μ l	TEMED	10 μ l
Volumen total	20 ml	Volumen total	10 ml

Tabla 5. Composición de los geles de poliacrilamida empleados en el Western Blot.

Además de preparar los geles, antes de comenzar la electroforesis se prepararon las muestras de proteína que se iban a cargar. Para ello, 30 μ g de cada una de las muestras de proteína de interés se mezclaron con tampón de carga Laemmly 6X (Bio-Rad Laboratories) suplementado con β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y se incubaron

a 95°C durante 5 minutos para su desnaturalización. Las muestras de proteínas ya preparadas se cargaron en el gel, junto con el marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ (Bio-Rad) para identificar el tamaño de las proteínas. La electroforesis se llevó a cabo a amperaje constante de 50 mA en un tampón compuesto por 25 mM de Tris, 190 mM de glicina y 0,1% de SDS.

9.1.4. Transferencia a membrana de PVDF

Tras la electroforesis, las proteínas separadas se transfirieron del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P; Millipore). La membrana se activó previamente pasándola por metanol puro durante 15 segundos, agua ultrapura durante 2 minutos y 15 minutos en tampón de transferencia (0,25 M Trizma Base, 2 M glicina y 20% de metanol). La transferencia se llevó a cabo en frío en el mismo tampón antes mencionado, manteniendo el amperaje constante a 250 mA durante 3 horas.

9.1.5. Inmunodetección

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Para ello, se utilizó una solución de bloqueo constituida por leche desnatada en polvo al 5% (p/v) diluida en tampón salino Tris (TBS). El TBS está compuesto por 50 mM de Tris-HCl y 150 mM de NaCl a pH 7,6. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios de interés (diluidos en tampón de bloqueo) durante toda la noche a 4°C y en agitación. Al día siguiente, se lavaron las membranas 3 veces con TBS durante 10 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Tras esto, se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) correspondientes durante 90 minutos en agitación y temperatura ambiente. Se volvieron a realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno en TBS y agitación. Finalmente, se revelaron las membranas utilizando el kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) en un revelador Amersham Imager 600 (GA Healthcare, Chicago, IL, EE.UU.). La expresión proteica se determinó por densitometría utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.).

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia	Casa comercial
Anti-tubulina	Ratón	1:4000	T5168	Sigma-Aldrich
Anti-GAPDH	Conejo	1:1000	#5174	Cell Signaling Technology®
Anti-CD81	Ratón	1:200	sc-7637	Santa Cruz Biotechnology
Anti-HSP70	Conejo	1:500	#4876	Cell Signaling Technology®
Anti-TSG101	Ratón	1:200	(C-2) Sc-7964	Santa Cruz Biotechnology
Anti-CD9	Ratón	1:500	(C-4) Sc-13118	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ALIX	Ratón	1:200	(3A9) sc-53538	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Calnexina	Conejo	1:1000	(H-70) Sc-11397	Santa Cruz Biotechnology
Anti-hTERT	Conejo	1:500	600-401-252S	Rockland Immunochemicals
Anti-CX3CR1	Conejo	1:500	(1H14L7) 702321	Thermo Fisher Scientific
Anti-CCR2	Conejo	1:500	PA5-23037	Thermo Fisher Scientific
Anti-PDL1	Conejo	1:500	A11273	ABclonal Technology
Anti-MSR1	Conejo	1:500	PA5-102519	Thermo Fisher Scientific
Anti-ARG1	Conejo	1:5000	PA5-29645	Thermo Fisher Scientific
Anti-iNOS	Conejo	1:500	PA1-036	Thermo Fisher Scientific
Anti-CD206	Conejo	1:1000	Ab64693	Abcam
Anticuerpos secundarios				
Anti-IgG de conejo	Cabra	1:5000	P0448	Dako
Anti-IgG de ratón	Conejo	1:5000	A9044	Sigma-Aldrich

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en Western Blot.

9.2. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)

Los niveles de las citocinas IL-10, IL-1 β y TNF α presentes en los sobrenadantes de los macrófagos se determinaron mediante kits comerciales de ELISA (BMS215-2, BMS224-2, BMS223-4, ThermoFisher Scientific), siguiendo las instrucciones del

fabricante. Una vez finalizada la diferenciación de los monocitos, se recogieron los sobrenadantes de los macrófagos M1 tratados y no tratados y M2 y se centrifugaron para eliminar el debris celular. Los sobrenadantes ya centrifugados se utilizaron directamente para realizar el ensayo o se guardaron a -80°C si el ELISA no se iba a realizar a continuación. Para llevar a cabo el ensayo, se lavaron los pocillos con solución de lavado y, tras secarse, se plaqueó la curva patrón tal y como viene detallado en el protocolo. A continuación, se añadieron las muestras de interés diluidas en la Solución de Ensayo a los pocillos y se incubaron con Conjugado de Biotina durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación. Se realizaron 3 lavados de los pocillos y se añadieron $100\ \mu\text{l}$ de Streptavidina-HRP diluida a todos los pocillos, dejándolo incubar durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se volvieron a realizar 3 lavados y se añadieron $100\ \mu\text{l}$ de Solución de Sustrato TMB a cada pocillo, incubándolo durante 10-20 minutos en oscuridad. Finalmente, se detuvo la reacción enzimática añadiendo $100\ \mu\text{l}$ de Solución de Stop a cada pocillo. Los valores de absorbancia se determinaron en un espectrofotómetro Halo LED 8 a $450\ \text{nm}$. La concentración de cada muestra se determinó teniendo en cuenta los valores de la curva patrón y la dilución de la muestra.

9.3. Ensayo MPO

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima lisosomal que se encuentra abundantemente en los gránulos de los neutrófilos. Esta enzima cataliza la producción de ácido hipocloroso (HClO) a partir de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión cloruro (Cl^-). El ensayo colorimétrico de actividad MPO se basa en que el HClO producido en esta reacción enzimática reacciona con la taurina para generar la cloramina taurina. Este compuesto reacciona posteriormente con la sonda DTNB presente en el kit comercial, lo que produce una reducción del color, de manera que la absorbancia que se mide es inversamente proporcional a la cantidad de enzima MPO presente en las muestras. Para realizar el ensayo se utilizó el kit comercial Ensayo Colorimétrico de Actividad MPO (Abcam, Cambridge, Reino Unido), siguiendo los pasos indicados por el fabricante. Resumidamente, se añadió Solución de ensayo a los pocillos de la curva estándar, las muestras y el control positivo, que se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con el mix de reacción, que incluía una solución de H_2O_2 . Transcurrido este tiempo se añadió Solución de Stop a cada uno de los pocillos y se incubó la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadió el TNB a las muestras y a los pocillos de la curva estándar, se incubó durante 10 minutos y se leyó la absorbancia a $412\ \text{nm}$ en un lector de placas Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, EE.UU.). La cantidad de TNB en cada una de las muestras (B) se extrapola a partir de la curva estándar y a partir de este valor se determinó la actividad MPO aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad MPO} = \frac{B}{\Delta T \times V} \times \text{Factor de dilución}$$

10. Análisis de marcadores de monocitos por citometría de flujo

Una vez diferenciados los monocitos *in vitro*, se determinó la presencia de marcadores de macrófagos M1 y M2 mediante citometría de flujo. Para realizar este análisis, las células se tripsinizaron y se lavaron con PBS. A continuación, se incubaron durante 10 minutos en solución de bloqueo, hecha de PBS con un 10 % de suero normal de ratón (NMS, del inglés *normal mouse serum*). Transcurrido este tiempo, se añadieron los anticuerpos primarios de interés conjugados con fluorocromos y se incubaron las muestras durante 1 hora a 4°C. La concentración de los anticuerpos utilizada fue la recomendada en cada caso por el fabricante. La lista de anticuerpos primarios conjugados que se han utilizado en este trabajo aparece descrita en la Tabla 7. Finalmente, tras la incubación con los anticuerpos, se realizó un lavado de las muestras con PBS y se llevó a cabo el análisis en un citómetro FACS Canto II (BD Bioscience, San Diego, CA, EE.UU.). El porcentaje de células positivas para los marcadores se analizó utilizando el programa informático FlowJo X (TreeStar Inc., Ashland, OR, EE.UU.).

Anticuerpos citometría			
Anticuerpo	Fluorocromo	Referencia	Casa comercial
Anti-CD14	RPE	TUK4	Dako
Anti-CD163	PerCP-Cy	GHI/61	BD Biosciences
Anti-CD80	Pacific Blue	FUN-1	BD Biosciences
Anti-CD86	APC	V450	BD Biosciences
Anti-HLA-DR	FITC	AC122	Miltenyi Biotec

Tabla 7. Anticuerpos conjugados a fluorocromos empleados en citometría de flujo

11. Ensayo funcional de eferocitosis

Los neutrófilos aislados se cultivaron en PBS durante 24 horas para inducir su apoptosis. Al día siguiente, se levantaron con la ayuda de un raspador de células, se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de PBS. A continuación, se tiñeron con rojo Texas (APC, Thermo Fisher Scientific), añadiendo 1 μ l de este compuesto a la suspensión de neutrófilos y dejándolo incubar a 37°C durante 20 minutos en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar los restos de la tinción. Los neutrófilos apoptóticos teñidos se co-cultivaron con macrófagos diferenciados M1 y M2 (en una proporción celular 1:1) durante 2 horas. Algunos de los monocitos diferenciados a M1 se trataron con EVs en el día 0 de diferenciación. Los macrófagos se lavaron después del co-cultivo y se tiñeron con anti-CD14 humano (RPE, Dako, TUK4). Se utilizó citometría de flujo para analizar el porcentaje de células CD14 y APC doblemente positivas, que representaban macrófagos que habían eferocitado los neutrófilos apoptóticos.

12. Ensayo de apoptosis con Anexina V y yoduro de propidio (PI)

La determinación del porcentaje de células apoptóticas se realizó mediante la tinción con Anexina V-FITC y yoduro de propidio (PI, de sus siglas en inglés) (R&D Systems, Mineápolis, MN, EE. UU.). La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos que, en este caso, se une a la fosfatidilserina que queda expuesta en la hemimembrana celular externa cuando las células entran en apoptosis. El PI se une a las células que han perdido la integridad de la membrana, de forma que, con el doble marcaje, se pueden diferenciar las células que están en apoptosis temprana (solo Anexina V-FITC positivas) y las que están en apoptosis tardía o necrosis (Anexina V-FITC y PI positivas).

La tinción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lavaron con PBS, guardando el sobrenadante antes y después del lavado. Se despegaron las células con tripsina/EDTA y se juntaron con los sobrenadantes guardados. Tras centrifugarlas se resuspendieron en el buffer de unión con Anexina V-FITC y PI y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se añadió el mismo volumen del tampón de unión y se cuantificó el porcentaje de células positivas para Anexina V y PI mediante citometría de flujo empleando un citómetro FACS Canto II.

13. Ensayo de proliferación de linfocitos T

Se realizó un ensayo de proliferación de linfocitos T siguiendo el protocolo descrito anteriormente [328]. Las PBMCs aisladas se tiñeron con CFSE (compuesto fluorescente éster de succinimidil-carboxifluoresceína) 5 μ M durante 15 minutos a 37°C utilizando el kit comercial CellTrace CFSE Cell Proliferation (ThermoFisher Scientific). Tras realizar un lavado de las células, se activaron con Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 (ThermoFisher Scientific), utilizando una proporción 1:1 de beads y PBMCs. Para evaluar su potencial inmunosupresor, se añadieron 2·10⁹ partículas/ml de EVs a 5·10⁴ PBMCs teñidas y activadas en 250 μ l de medio RPMI completo en placas de 48 pocillos. Se mantuvieron 5 días en cultivo y se recogieron las PBMCs en tubos eppendorf.

En general, los linfocitos T, que se caracterizan por el marcador CD3, constituyen entre el 45-70% de las PBMCs. Además, la activación de estas células con las Dynabeads CD3/CD28 induce una mayor expansión de la población de linfocitos, por lo que, al cabo de 5 días de cultivo, la mayor parte de las PBMCs eran linfocitos T CD3+. No obstante, para garantizar el análisis de esta población, las PBMCs recogidas se tiñeron con el anticuerpo primario CD3-PerCP-Cy (SK7; BD Biosciences, Nueva Jersey, EE.UU.).

Una vez identificada esta población por citometría, se estudió la proliferación de los linfocitos T utilizando como método la dilución del CFSE. Este compuesto atraviesa la membrana celular y se une de forma estable a los grupos aminos de moléculas presentes en el citoplasma, confiriendo fluorescencia a las células. Cuando la célula se

divide, esta intensidad de fluorescencia se divide también a partes iguales entre las células hijas, por lo que, con cada división celular, la fluorescencia del CFSE en las células se va dividiendo aproximadamente a la mitad. Esto permite estudiar por citometría de flujo la proliferación de las poblaciones celulares en distintas condiciones, en este caso, la proliferación de los linfocitos T activados en presencia y ausencia de EVs. Teniendo esto en cuenta, a partir de los datos obtenidos por citometría de flujo, se determinó el índice de expansión (IE) [329]. Este valor tiene en cuenta el número de divisiones y el número de células que se han dividido en cada ciclo (N^oD). Se utilizaron PBMCs no activadas como control, en las cuales la fluorescencia del CFSE era máxima, ya que no se habían producido ciclos de división. El porcentaje de células en un ciclo determinado (N^oD) se divide por dos elevado a la potencia del N^oD para calcular el porcentaje de células originales, sin dividir, de las que surgieron (número de cohorte indivisa). La suma de estos valores para cada ciclo da como resultado la cohorte indivisa total de cada cultivo. La suma de las cohortes que se han dividido representa el número de precursores que se han activado y han proliferado a lo largo de los 5 días de activación.

El porcentaje de inmunosupresión de las EVs se determinó normalizando los datos a una escala de 0 a 100%, en la que el 0% de inmunosupresión es el IE de las PBMCs activadas sin tratar y el 100% de inmunosupresión es el IE de las PBMCs no activadas. Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inmunosupresión} = \frac{IE^{PBMC \text{ act}} - IE^{PBMC \text{ EVs}}}{IE^{PBMC \text{ act}} - IE^{PBMC \text{ no act}}} \times 100$$

14. Ensayo de estrés oxidativo in vitro con DCFH-DA

Se llevó a cabo el estudio de la cantidad total de especies reactivas de oxígeno (ROS) utilizando una tinción con DCFH-DA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato; Sigma-Aldrich). Este compuesto atraviesa la membrana celular y sufre un proceso de desacetilación, dando lugar a un producto que es sensible a las ROS. Cuando el producto desacetilado es oxidado por las ROS da lugar a un compuesto que emite fluorescencia verde. Por tanto, cuanto mayor sean las cantidades de ROS presentes en la célula, mayor intensidad de fluorescencia verde va a emitir. Para realizar el ensayo, los neutrófilos se lavaron con PBS y se incubaron con DCFH-DA 5 µM en medio de cultivo sin suero durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado de las células con PBS para eliminar el exceso de tinción. Finalmente, se determinó la intensidad de fluorescencia de las células mediante citometría de flujo en un citómetro FACS Canto II. Los datos se analizaron con el software FlowJo X.

15. Modelo experimental de infarto agudo de miocardio in vivo

15.1. Animales

En este estudio se utilizaron ratas macho nude atímicas (cepa Hsd:RH-Foxn1^{mu}, Envigo, Indianápolis, Indiana, EE.UU.) de 250-300 gramos. Los animales se estabularon en las instalaciones del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe en la sección SPF (del inglés *specific pathogen free*) debido a su condición de ratas nude. El número inicial de animales que se incluyeron en el estudio fue 35, 6 de los cuales murieron antes de finalizar los experimentos debido a complicaciones en el procedimiento. Todos los procedimientos realizados fueron aprobados previamente por los comités institucionales de ética y cuidado de los animales.

15.2. Procedimiento de infarto agudo de miocardio y administración de EVs

El infarto agudo de miocardio (IAM) se realizó mediante ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD, del inglés left anterior descending artery). Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de O₂ y sevoflurano (Sevorane™, AbbVie Limited, Dublín, Irlanda) en una cámara estanca. Una vez dormidas, las ratas fueron intubadas para poder mantener la respiración artificial y la anestesia a lo largo de todo el procedimiento. Para ello, se empleó el respirador de oxígeno para pequeños animales (modelo 683, Harvard Apparatus, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.) a un flujo de 100 ventilaciones por minuto y 2 ml de volumen tidal con un porcentaje de sevoflurano del 3%. Se administró a las ratas una dosis de Fentanilo al 20% en suero fisiológico, que actúa como analgésico y sedante, evitando así que los animales sientan ningún tipo de dolor durante el procedimiento. Se colocaron los animales en posición lateral y se rasuraron en la zona de las costillas, lugar por el cual se realizó una incisión que permitía observar el corazón del animal. Cuidadosamente se retiró el pericardio del animal con unas pinzas y se procedió a realizar la ligadura de la arteria coronaria descendente utilizando sutura de polipropileno 6/0 (B. Braun, Melsungen, Alemania). La zona infartada se visualizó tras la ligadura por el desarrollo de un color pálido en el miocardio distal. Inmediatamente después de la ligadura, se inyectaron intramiocárdicamente $2,5 \cdot 10^9$ EVs o solución salina divididas en dos inyecciones de 10 µl, las cuales se realizaron en dos localizaciones discretas de la zona del borde del infarto con una jeringa Hamilton™ 80350 (Hamilton, Reno, Nevada, EE.UU.). Tras esto, se procedió a cerrar al animal. Una vez finalizada la operación, se inyectó a las ratas 0,5 ml del analgésico Buprex 0,3 mg diluido 1:5 en suero fisiológico y se procedió a retirar la anestesia inhalada y la respiración artificial. Una vez recuperados los animales se volvieron a estabular.

Concretamente, en este trabajo se dividieron los animales en dos grupos (eutanasiados a 7 y 21 días tras el IAM), divididos a su vez en dos subgrupos (salino y tratamiento con EVs).

15.3. Ecocardiografía en ratas

La ecocardiografía transtorácica es una prueba diagnóstica de imagen que permite evaluar el funcionamiento del corazón. En este ensayo *in vivo* se utilizó esta técnica para estudiar la función cardíaca de las ratas antes y después del procedimiento. La ecocardiografía transtorácica se realizó bajo anestesia inhalatoria (Sevorane™) empleando un sistema ecocardiográfico (General Electrics, Milwaukee, WI, EE. UU.) dotado con un transductor de matriz lineal de 10 MHz, tal y como se ha descrito previamente [330]. Se realizaron mediciones al inicio del estudio y a los 7 y 21 días tras la intervención. Se realizaron ecocardiografías en modo M y bidimensionales (2D) a nivel de los músculos papilares en el eje corto paraesternal. Los parámetros funcionales se calcularon durante cinco ciclos cardíacos consecutivos utilizando métodos estándar ya descritos [331]. Se tomaron medidas del ventrículo izquierdo (LV) en fin de diástole (LVDd) y fin de sístole (LVDs), el grosor de la pared anterior y la posterior (AWT y PWT) en diástole y sístole y el área de fin de diástole (EDA) y de sístole (ESA). El cambio porcentual de área (CAP) se calculó con la siguiente fórmula: $CAP = [(EDA-ESA)/EDA] \cdot 100$. La fracción de acortamiento (FA) se calculó como $FA = [(LVDd-LVDs)/LVDd] \cdot 100$.

15.4. Sacrificio de los animales

Las ratas se sacrificaron 7 o 21 días después del IAM y se extrajeron los corazones. En primer lugar, se inyectó intraperitonealmente a cada rata 0,5 ml de tiopental sódico, un agente anestésico, y 0,1 ml de fentanilo, que actúa como agente analgésico. Se comprobó que los animales estaban completamente anestesiados mediante la pérdida del reflejo podal, que consiste en que el animal no retira la pata trasera al apretarla con una pinza. A continuación, se procedió a la apertura de la cavidad torácica para dejar expuesto el corazón. En este punto, dependiendo de si los corazones se iban a utilizar en técnicas histológicas o en técnicas moleculares (como qPCR o WB), el protocolo que se siguió es ligeramente distinto. En el caso de los corazones destinados a histología se llevó a cabo una fijación por perfusión del órgano, mientras que en el caso de los corazones destinados a técnicas moleculares se realizó una criopreservación de los mismos.

15.4.1. Fijación por perfusión

Los corazones de las ratas destinadas a histología se fijaron por perfusión. Para ello, una vez abierto el tórax y expuesto el corazón, se clavó una palometa en el ápex, en la zona del ventrículo izquierdo, y otra palometa en la vena cava. A través de ambas palometas se inyectaron de forma simultánea 5 ml de una solución compuesta por cloruro de cadmio 62 mM y cloruro de potasio 1,5 M para detener el corazón en diástole. A continuación, se retiró la palometa de la vena cava y con unas tijeras se cortó esta vena. Por la palometa que todavía seguía inyectada en el ventrículo, se administraron 10 ml de PBS para lavar el corazón y, seguidamente, 5 ml de paraformaldehído (PFA) al 2%. Se retiró la palometa que todavía seguía conectada al ventrículo izquierdo y se inyectó una nueva por la aorta, a través de la cual se perfundió PFA al 2% durante 15

minutos utilizando una bomba de perfusión a velocidad 4,3 ml/min. Una vez finalizada la perfusión se extrajo el corazón y se lavó con PBS. Se cortó ligeramente la parte superior de las aurículas para favorecer la entrada del PFA al tejido y se dejó el corazón incubando en PFA al 2% durante toda la noche en agitación para finalizar la fijación del tejido.

15.4.2. Criopreservación de tejido

Los corazones que iban destinados a técnicas moleculares se criopreservaron. Para ello, una vez abierto el tórax, con el corazón expuesto, se cortó la vena cava y la aorta. Con la ayuda de pinzas y tijeras se fue separando el corazón hasta extraerlo completamente. Se lavó en PBS y la zona de infarto se dividió en dos fragmentos, cada uno de los cuales se introdujo en un tubo eppendorf y se congeló directamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, se guardaron los tubos a -80°C para su almacenamiento.

15.5. Técnicas histológicas

15.5.1. Inclusión en parafina y corte de los corazones

Tras fijar los corazones, se procedió a incluirlos en parafina para poder cortarlos posteriormente. A lo largo del proceso de inclusión, el agua presente en el tejido va siendo sustituido por parafina, que es sólida a temperatura ambiente. Esto hace que el tejido sea lo suficientemente consistente para obtener secciones muy finas con un microtomo. El protocolo de inclusión en parafina que se llevó a cabo fue el siguiente:

- Incubar en etanol 70% durante toda la noche en agitación (225 rpm) a 4°C.
- Incubar en etanol 70% durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.
- Incubar en etanol 96% durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente (2 veces).
- Incubar en etanol 100% durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente (2 veces).
- Incubar en xilol durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación (2 veces).
- Dejar el tejido en parafina líquida durante 1 hora a 60°C en estufa.
- Cambiar el tejido a parafina "limpia" y dejarlo durante toda la noche en la estufa a 60°C
- Hacer los bloques de parafina al día siguiente y dejar que se solidifiquen en una placa fría a -15°C. Una vez hechos los bloques, se pueden almacenar a temperatura ambiente durante meses antes de cortar el tejido.

A la hora de cortar los bloques se utilizó un microtomo para obtener secciones de 5 µm de grosor. Los cortes se depositaron en portaobjetos recubiertos previamente de gelatina-alumbre. Estos portaobjetos con el tejido se guardaron a temperatura ambiente y posteriormente se utilizaron para realizar las tinciones o las inmunofluorescencias.

15.5.2. Desparafinación del tejido

Para realizar inmunofluorescencias o cualquier otra tinción acuosa es necesario desparafinar los cortes, ya que la parafina no se puede mezclar con el agua. El protocolo de desparafinación que se realizó fue el siguiente:

- Mantener los cortes en una estufa a 60°C durante 25 minutos.
- Incubar dos veces los cortes en xilol durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Incubar los cortes dos veces en etanol 100% durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Incubar los cortes dos veces en etanol 96% durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Incubar los cortes dos veces en etanol 70% durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Mantener los cortes en PBS a 4°C hasta realizar la tinción o la inmunofluorescencia de interés.

15.5.3. Tinción de Tricrómico de Masson

El tricrómico de Masson es una tinción que permite diferenciar las fibras de colágeno de tipo I del resto del tejido. Esto se debe a que estas fibras se tiñen de color azul, mientras que el resto de tejido muscular se tiñe de color rojo. Esta tinción es muy útil a la hora de cuantificar el daño que se produce tras un IAM, ya que la zona afectada se teñirá de azul (debido a una mayor proporción de tejido fibrótico, rico en colágeno), mientras que la zona sana se quedará teñida en rojo. El protocolo de tinción que se llevó a cabo fue el siguiente:

- Incubar los portaobjetos con los cortes desparafinados en una cubeta con solución de Bouin (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos a 56°C.
- Lavar con agua corriente hasta enfriar los cortes.
- Incubar los cortes en una cubeta con hematoxilina férrica de Weigert (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos en oscuridad.
- Lavar los cortes en tres cubetas con agua corriente caliente de mayor a menor temperatura.
- Aclarar los cortes con agua destilada.
- Incubar los cortes en una cubeta con fucsina ácida-escarlata (Sigma-Aldrich) durante 2 minutos.
- Aclarar con agua destilada.
- Incubar los cortes en una cubeta con ácido fosfomolibdico (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos en oscuridad.
- Incubar 1 minuto los cortes en azul de anilina (Sigma-Aldrich).
- Incubar 1 minuto los cortes en ácido acético al 1%.
- Hacer 20 pases de los cortes por etanol al 70%.
- Hacer 20 pases de los cortes por etanol al 96%.
- Hacer 20 pases de los cortes por etanol al 100%.

- Mantener los cortes en xilol hasta el montaje.

Para el montaje de los cortes, se empleó el medio de montaje para histología DPX (Sigma-Aldrich) y una vez unido los portaobjetos a los cubres se dejaron secar y se almacenaron a temperatura ambiente. Los cortes se visualizaron en un microscopio óptico invertido Leica DM6000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania).

15.5.4. Inmunofluorescencia en tejido

Los cortes de tejido desparafinado se sometieron a un proceso de desenmascaramiento antigénico incubándolos en tampón citrato 10 mM a 90°C durante 25 minutos. A continuación, se pasaron por dos cubetas de agua corriente para reducir la temperatura y se lavaron con PBS. Posteriormente, los cortes se incubaron con solución de bloqueo durante 90 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 8) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS y se incubaron una hora con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 9). Se volvieron a lavar y se incubaron 15 minutos con DAPI. Transcurrido este tiempo, los cortes se lavaron brevemente con PBS y se montaron con FluorSave™. Finalmente, los cortes se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM2500 y se analizaron con ImageJ.

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia	Casa comercial
Anti-elastasa	Conejo	1:200	PA5-115648	Thermo Fisher Scientific
Anti- α SMA	Conejo	1:200	14395-1-AP	Proteintech®
Anti-vimentina	Ratón	1:200	(V9) MA5-11883	Thermo Fisher Scientific
Anti-F4/80	Rata	1:200	Ab6640	Abcam
Anti-CX3CR1	Conejo	1:200	(1H14L7) 702321	Thermo Fisher Scientific
Anti-CCR2	Conejo	1:50	PA5-23037	Thermo Fisher Scientific
Anti-PDL1	Conejo	1:200	A11273	ABclonal Technology
Anti-MSR1	Conejo	1:200	PA5-102519	Thermo Fisher Scientific
Anti-ARG1	Conejo	1:200	PA5-29645	Thermo Fisher Scientific
Anti-iNOS	Conejo	1:50	PA1-036	Thermo Fisher Scientific
Anti-CD206	Conejo	1:200	Ab64693	Abcam

Tabla 8. Listado de anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencias de tejido

Anticuerpos secundarios				
Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia	Casa comercial
Alexa Fluor® 555 anti-rata	Cabra	1:200	A21434	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor® 555 anti-conejo	Cabra	1:200	A21428	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor® 488 anti-conejo	Burro	1:200	A21206	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor® 555 anti-ratón	Cabra	1:200	A21424	Thermo Fisher Scientific

Tabla 9. Listado de anticuerpos secundarios empleados en inmunofluorescencias de tejido.

15.5.5. Medida del tamaño de infarto

A partir de los cortes teñidos con Tricrómico de Masson se cuantificó el área de infarto utilizando el software ImageJ. El tamaño del infarto se midió en 8-12 cortes transversales y se expresó como la media del porcentaje del área fibrótica ventricular izquierda de todos los cortes de cada corazón.

15.6. Homogeneizado de tejido

Las muestras de corazones destinadas a realizar técnicas analíticas se homogeneizaron en las soluciones tampón correspondientes, dependiendo de la técnica con la que se iban a analizar. Para el homogeneizado del tejido se utilizó una ULTRA-TURRAX® (IKA, Staufen, Alemania). Para cada uno de los experimentos, se realizó la cuantificación de la cantidad de proteína de cada muestra tras el homogeneizado, para relativizar los valores a esta cantidad en caso de que fuese necesario.

15.7. Array de citocinas

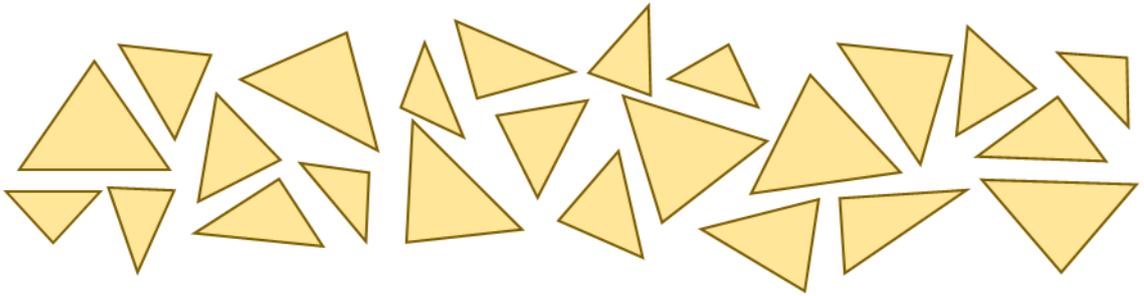
Se estudió el perfil de citocinas en las muestras de corazón de rata mediante el kit comercial Proteome Profiler Rat Cytokine Array (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de corazón criopreservadas se homogeneizaron en una solución de PBS con inhibidor de proteasas Complete (Sigma-Aldrich) y 1% de Triton® X-100 y se mantuvieron en frío. Las membranas de nitrocelulosa con los anticuerpos de interés capturados se incubaron en Solución de Ensayo 6 durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Simultáneamente, las muestras homogeneizadas se incubaron con 15 µl del Cóctel de Anticuerpos de Detección a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido este tiempo, se aspiró la solución de ensayo en la que se encontraban las membranas y se añadieron las mezclas de muestra/anticuerpos a las membranas, dejándolo incubarse durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3

veces, durante 10 minutos cada una, en agitación y se incubaron con 2 ml de una solución de Streptavidina-HRP en Solución de Ensayo 6 durante 30 minutos a temperatura ambiente y agitación. Se volvieron a lavar las membranas 3 veces y se revelaron con el mix de reactivos proporcionados por el kit comercial. Las imágenes se adquirieron en un revelador Amersham Imager 600 (GA Healthcare). La expresión proteica se determinó por densitometría utilizando el software ImageJ.

16. Análisis estadístico

Los datos se representaron como la media \pm la desviación estándar (SD). La normalidad de la distribución de los datos se analizó mediante el test Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó el test t de Student, pareado o no pareado dependiendo del experimento, para comparar la media de una variable en dos grupos experimentales con una distribución normal. Cuando la distribución no se ajustaba a la normalidad se utilizó el test U de Mann-Whitney. Para comparar la media de una variable entre tres o más grupos experimentales con una distribución normal se aplicó el test de análisis de la varianza de una vía (ANOVA). El ANOVA de dos vías se utilizó para evaluar el efecto de dos factores sobre una única variable entre tres o más grupos. El test de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar la media de una variable entre tres o más grupos que no presentan una distribución normal. Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un $p < 0,05$ con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS



1. Mejora del rendimiento en la extracción de MSC-EVs

Las EVs derivadas de MSC recapitulan los efectos terapéuticos de las células que las liberan. En concreto, las MSC-EVs presentan capacidad terapéutica frente a diferentes patologías, por lo que su uso como agentes terapéuticos se está incrementando a lo largo de los últimos años. Aunque el orden de presentación de los resultados no coincide con el orden cronológico en el que se realizaron los experimentos a lo largo de los años de trabajo, se ha optado por describirlos agrupados en un bloque de estudio *in vitro* de caracterización fenotípica y funcional de las MSC-EVs, y un segundo bloque que describe el efecto *in vivo* del trasplante intracardiaco de MSC-EVs en el contexto de la inflamación producida durante la isquemia miocárdica.

El aislamiento y la purificación de las EVs es un paso clave, ya que dependiendo de la técnica utilizada el rendimiento y la pureza del producto puede ser diferente. El método estándar de aislamiento de EVs de mayor rigor consiste en ultracentrifugaciones seriadas (UC). Sin embargo, este método no tiene recorrido en el entorno de producción clínica, por lo que en este trabajo se quiso poner a punto un método que permitiese aumentar el rendimiento de las extracciones sin afectar a la funcionalidad de las EVs purificadas. El método de aislamiento que se probó consistía en la combinación de la filtración de flujo tangencial (TFF) del medio de extracción de las EVs, seguido de una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), ya que, según diferentes estudios, la combinación de métodos de aislamiento genera extractos de EVs de mayor pureza y proporciona un mayor rendimiento. Las EVs se aislaron mediante las dos técnicas siguiendo el esquema que aparece representado en la Figura 1. A diferencia de la UC, la técnica combinada TFF-SEC permite purificar las EVs sin arrastrar restos proteicos que pueden afectar a la funcionalidad del producto final purificado. Esto supone un beneficio ya que permite asegurarse que el efecto funcional que está realizando el extracto purificado se debe exclusivamente a las EVs y no a otros restos moleculares que se hayan podido quedar junto a ellas.

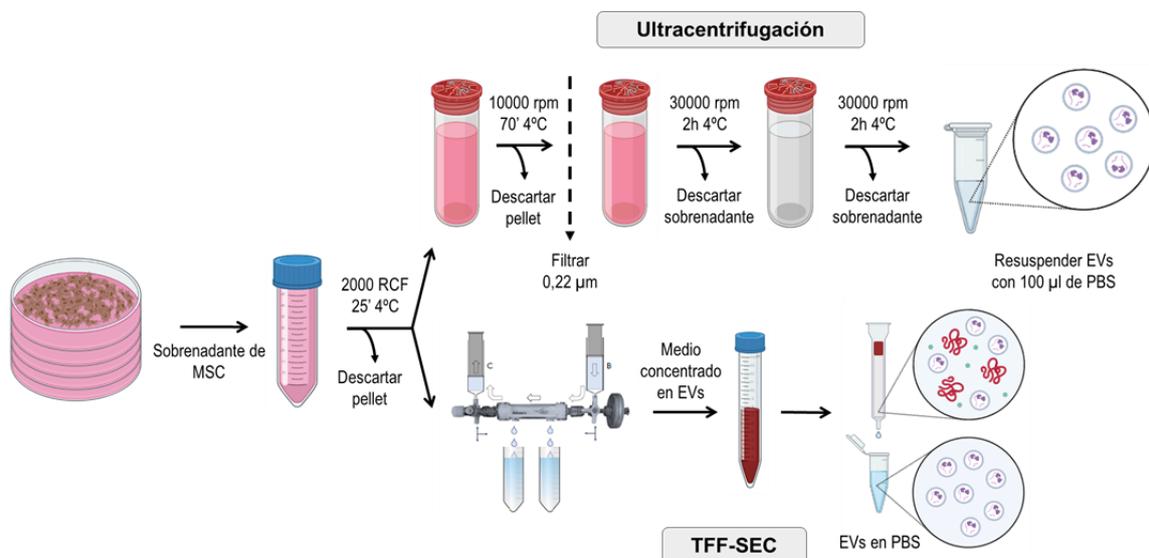


Figura 1. Representación esquemática del protocolo de cada una de las técnicas de aislamiento y purificación de EVs realizada. En la parte superior se visualizan los pasos de la UC, mientras que en la parte inferior aparece representada la técnica combinada TFF-SEC.

Para optimizar la extracción de las EVs mediante TFF-SEC, se empleó la técnica de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) para medir el tamaño hidrodinámico de las poblaciones de EVs presentes en cada una de las fracciones que se obtienen por SEC. La Figura 2 muestra el tamaño hidrodinámico obtenido en cada una de las fracciones recolectadas de MSC-EVs. Como se puede observar, el conjunto de fracciones numeradas como 7, 8, 9, 10 y 11 muestra una población única de un tamaño alrededor de los 200 nm que corresponde con el tamaño de las sEVs. Sin embargo, las fracciones 12 y 13 muestran dos poblaciones diferentes con tamaño alrededor de los 30 y 170 nm, correspondiendo posiblemente el pico de menor tamaño con proteínas contaminantes. Estos resultados indican las fracciones que hay que recoger para poder obtener EVs más concentradas y libres de proteínas contaminantes.

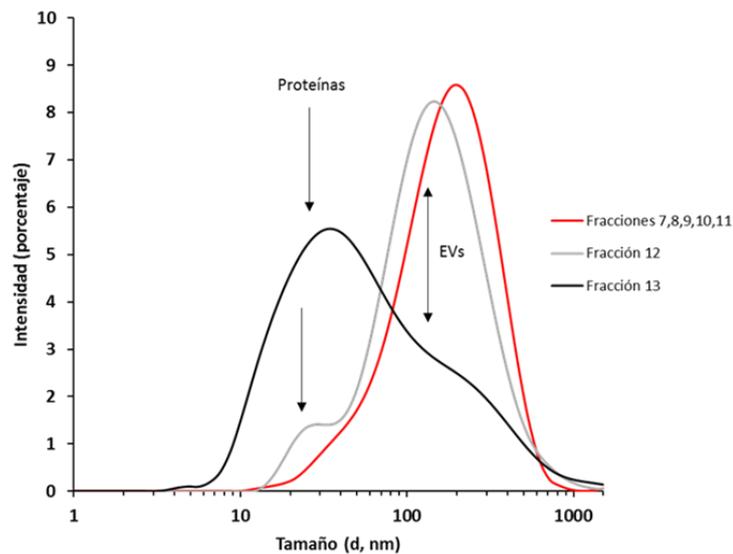


Figura 2. Comparación del tamaño hidrodinámico (nm) de MSC-EVs obtenidas en diferentes fracciones (volumen de cada fracción - 500µl) mediante SEC tras haber sido concentradas por TFF. La línea roja corresponde al conjunto de fracciones 7, 8, 9, 10 y 11, la línea gris corresponde con la fracción 12 y la línea negra con la fracción 13. Desde la fracción 12 en adelante ya se muestra contaminación por proteínas.

Las EVs obtenidas mediante UC y TFF-SEC se caracterizaron en relación a su tamaño, su morfología y la presencia de marcadores de membrana característicos. Estos parámetros están incluidos en las guías de caracterización de EVs establecidas por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), que tienen como objetivo la estandarización en la obtención de EVs para aumentar la reproducibilidad de los estudios con ellas.

El tamaño de las EVs obtenidas por UC y TFF-SEC se determinó mediante análisis de seguimiento de partículas (NTA), mostrando un tamaño medio de las vesículas comprendido entre 100 y 200 nm (Figura 3A, 3B). El estudio mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostró la morfología característica de las vesículas extracelulares con ambas técnicas y ratificó el tamaño de las vesículas que se había observado previamente con el NTA (Figuras 3C y 3D). Como se puede observar en las

Figuras 3C y 3D, la extracción de las EVs mediante TFF-SEC da lugar a un extracto más limpio y uniforme en cuanto al tamaño de las vesículas. Por último, se determinó la presencia de marcadores de membrana típicos de sEVs mediante la técnica de Western Blot. Como se observa en la Figura 3E, tanto las EVs obtenidas mediante UC, como las obtenidas mediante TFF-SEC expresaban los marcadores CD81, HSP70, TSG101 y CD9. En definitiva, esta caracterización demostró que los dos métodos de extracción permiten el aislamiento de vesículas que reúnen todas las características intrínsecas de las sEVs, aunque la extracción mediante TFF-SEC permite que el aislamiento de las EVs sea más limpio.

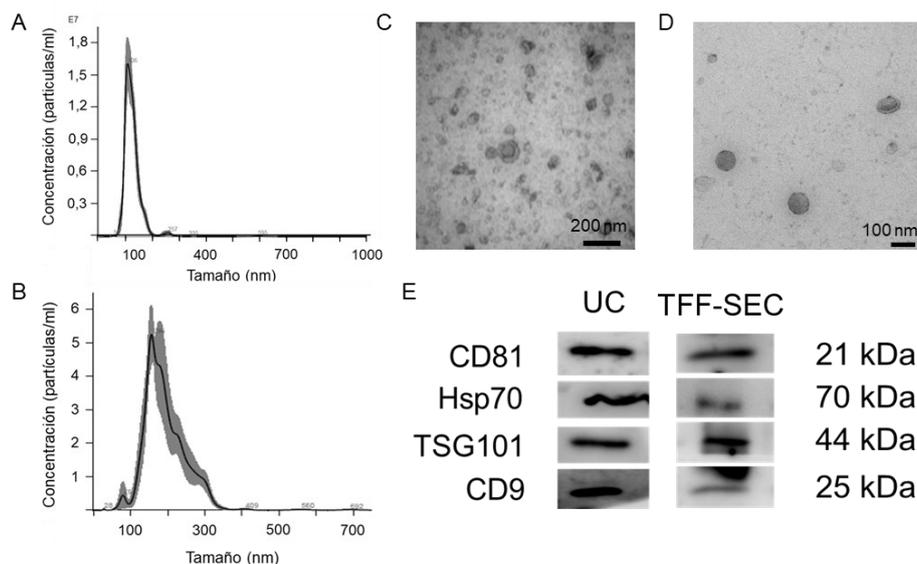


Figura 3. Caracterización de las EVs aisladas mediante UC y TFF-SEC. (A) Histograma representativo del análisis de NTA de las EVs aisladas mediante UC. (B) Histograma representativo del análisis de NTA de las EVs aisladas mediante TFF-SEC. (C) Imagen representativa de TEM de EVs aisladas por UC. Barra de escala = 200 nm (D) Imagen representativa de TEM de EVs aisladas por TFF-SEC. Barra de escala = 100 nm (E) Western Blots representativos de CD81, HSP70, TSG101 y CD9 de las EVs aisladas por UC y TFF-SEC.

Tras comprobar que mediante los dos métodos se obtenían vesículas con las mismas características, se quiso comparar la eficiencia de la extracción entre ambos. Basándonos en los datos de NTA, se observó que el número total de partículas obtenidas por TFF-SEC era 100 veces mayor en comparación con UC (Figura 4A). Esta relación fue aún mayor al normalizar el número total de partículas respecto al volumen de medio de cultivo de MSC utilizado en el proceso de aislamiento (Figura 4B). Se determinó también el rendimiento de la purificación, considerando el número de partículas que se necesita utilizar para cada experimento respecto al número total de partículas aisladas (Figura 4C), comprobando que era unas 200 veces mayor con el método TFF-SEC. Teniendo todo esto en cuenta, se pudo determinar que el método de aislamiento TFF-SEC es significativamente más eficiente que el UC.

Tras comprobar que la eficiencia en la extracción de EVs era mayor con el método TFF-SEC, se decidió continuar todo el trabajo con EVs derivadas de MSC obtenidas mediante este método de aislamiento y purificación.

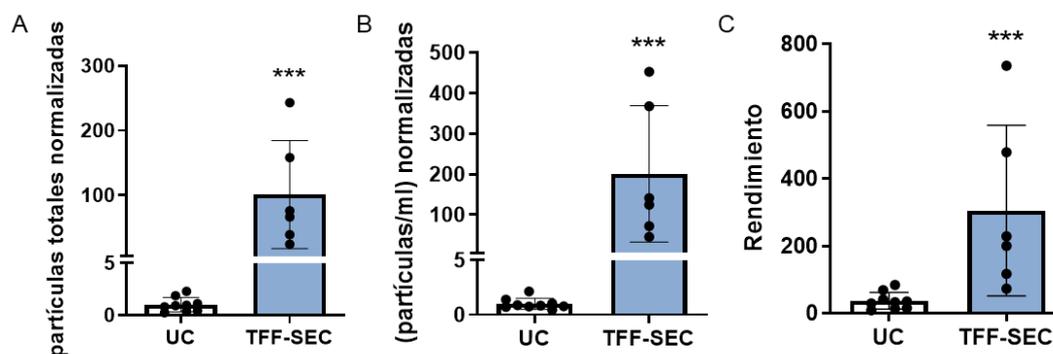


Figura 4. Comparativa de la eficacia de extracción de EVs entre los métodos UC y TFF-SEC. (A) Número de EVs cuantificado por NTA de las extracciones de UC y TFF-SEC normalizado al promedio de partículas obtenidas mediante UC. (B) Número de EVs por ml de medio de las extracciones de UC y TFF-SEC normalizado al promedio de partículas/ml obtenido mediante UC. (C) El rendimiento se ha calculado como el número de experimentos que puedes realizar con una extracción, teniendo en cuenta la dosis normal de EVs que se utiliza en cada experimento.

Debido a que en numerosas ocasiones las EVs se tienen que conservar hasta el momento de su utilización, se realizaron diferentes ensayos para estudiar su estabilidad en el tiempo cuando son congeladas a -80°C en PBS. Para ello, se analizó mediante DLS el tamaño y el índice de polidispersidad (PDI), que indica la homogeneidad de la población de EVs, de una muestra recién extraída (muestra 1), de una muestra congelada a menos 80°C dos días (muestra 2) y otra congelada durante un año (muestra 3). Como se muestra en la Tabla 1, el tamaño medio entra dentro de los estándares en las tres muestras analizadas (143 ± 5 nm en la muestra 1, 180 ± 19 nm en la muestra 2 y 222 ± 77 nm en la muestra 3), aunque la variación en el tamaño es mayor a medida que aumenta el tiempo de congelación. Probablemente esto se deba a pequeñas aglomeraciones o agregaciones que se forman durante el almacenamiento. El valor de PDI es similar en las tres muestras, lo que indica que el almacenamiento no afecta significativamente a la homogeneidad y estabilidad del producto de EVs.

	Almacenamiento	Tiempo	Tamaño medio (nm)	PDI
Muestra 1	4°C	0	143 ± 5	0,34
Muestra 2	-80°C	2 días	180 ± 19	0,35
Muestra 3	-80°C	1 año	222 ± 77	0,45

Tabla 1. Análisis de la estabilidad de tres muestras de MSC-EVs almacenadas durante diferentes tiempos de -80°C . Se muestran las medidas del tamaño medio de la población de EVs, así como el PDI, analizadas ambas mediante DLS.

Finalmente, tras elegir el método de TFF-SEC para realizar el resto de los experimentos y teniendo en cuenta que las EVs se obtenían a partir de MSC inmortalizadas mediante la sobreexpresión de la telomerasa humana, se quiso comprobar si las EVs aisladas contenían en su interior el producto de inmortalización TERT tanto a nivel proteico como a nivel génico. Por un lado, se realizó un Western Blot utilizando como control positivo el extracto celular de las MSC inmortalizadas. Se comprobó que las EVs obtenidas a partir de estas células no presentaban el producto proteico de TERT de forma detectable (Figura 5B). Por otro lado, se comprobó la

presencia del gen hTERT en las MSC-EVs mediante qPCR, utilizando también como control positivo a las MSC immortalizadas. En este caso, a diferencia de los que ocurre a nivel proteico, se observó la presencia del gen hTERT en las EVs, aunque la expresión de este era mucho menor que la que tenían las células immortalizadas (Figura 5C). Esto indica que hTERT sí está presente en las EVs, pero no se traduce a proteína.

Esto es importante de cara a intentar desarrollar un producto biológico terapéutico que pueda llegar a la clínica, ya que la presencia del producto de immortalización podría llegar a suponer un problema de seguridad, por lo que antes de desarrollar el producto biológico final para la clínica es necesario optimizar la immortalización para que TERT no esté presente de ninguna manera en las MSC-EVs.

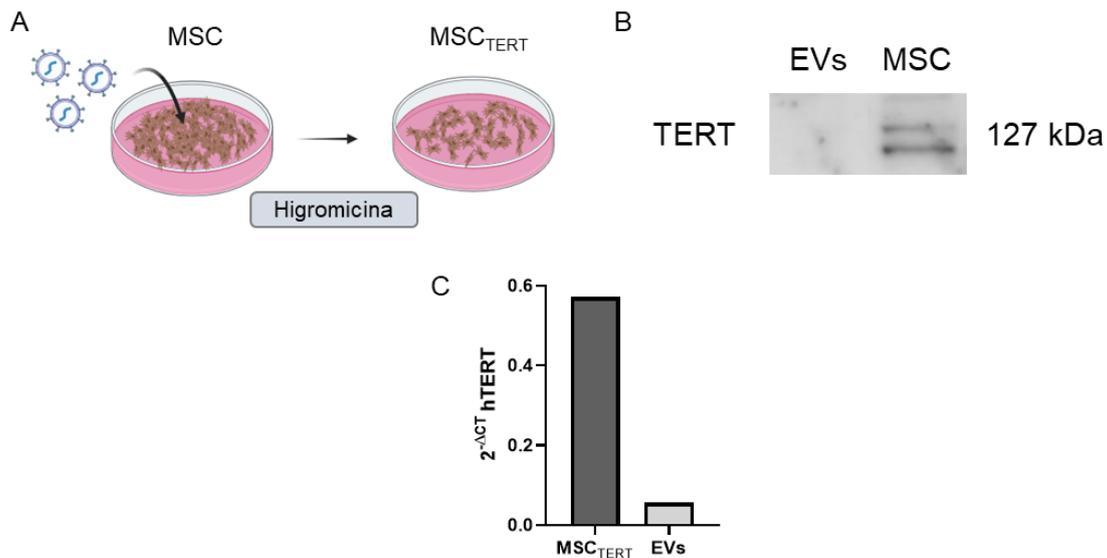


Figura 5. Determinación de la presencia del producto proteico y génico de immortalización TERT en las MSC-EVs obtenidas por TFF-SEC. (A) Esquema representativo de la immortalización de las MSC. (B) Western Blot de TERT en las MSC-EVs (izquierda) y control positivo de células immortalizadas (derecha). (C) Análisis por qPCR de la presencia de hTERT en las MSC-EVs. Como control positivo se emplearon MSC immortalizadas. Se representa como $2^{-\Delta\Delta CT}$, normalizándolo frente al valor de GAPDH.

2. Las EVs obtenidas de tres biopsias distintas de MSC presentan características y cargos similares.

El aislamiento y purificación de EVs a partir de MSC implica un proceso laborioso con pasos limitantes como el cultivo de las células y el protocolo de purificación en sí. A esto se suma el problema de la variabilidad que puede existir en el producto de EVs obtenido tras el proceso. Teniendo en cuenta las capacidades terapéuticas que han demostrado las EVs a lo largo del tiempo, conseguir aumentar y estandarizar la producción de EVs es un paso crucial para poder utilizar las vesículas extracelulares en clínica. Para poder llegar a esto se necesita más de una única fuente celular del mismo tipo a partir de la cual obtener EVs con las mismas características y capacidades funcionales. Teniendo esto en cuenta, se quiso comprobar que la producción y purificación de EVs a partir de tres biopsias distintas de DP-MSC, aisladas a partir de

tres donantes sanos independientes, permitía obtener vesículas con las mismas características y la misma funcionalidad. Para tener una fuente celular estable de EVs, se llevó a cabo la inmortalización de cada una de las biopsias de MSC. Mediante infección lentiviral con un vector que contenía el gen de la telomerasa, se generaron tres líneas inmortalizadas de MSC (MSC-TERT). Debido a la presencia de un gen de resistencia a higromicina en el vector lentiviral, se pudieron seleccionar las células inmortalizadas y generar una línea estable con cada una de las biopsias.

A partir de estas líneas, se extrajeron EVs mediante el método TFF-SEC y se procedió a su caracterización para comprobar si las EVs eran iguales independientemente de la biopsia de células.

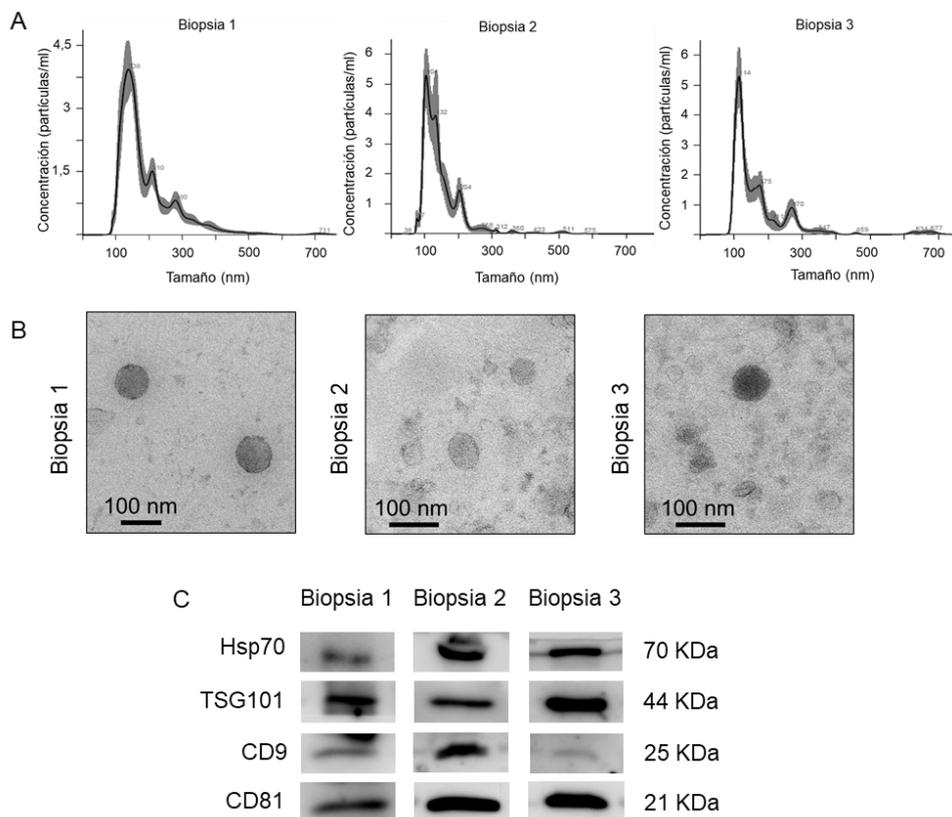


Figura 6. Caracterización de las EVs obtenidas a partir de las tres biopsias de DP-MSC mediante TFF-SEC. (A) Histogramas representativos del análisis de NTA de las EVs aisladas a partir de las biopsias 1,2 y 3 de DP-MSC. (B) Imágenes representativas de TEM de EVs de las tres biopsias. Barra de escala = 100 nm. (C) Western Blots representativos de los marcadores de EVs HSP70, TSG101, CD9 y CD81 en las tres biopsias.

Se determinó mediante NTA que las EVs de las tres biopsias presentaban una distribución de tamaño de partícula comprendida entre 100 y 200 nm (Figura 6A), valores normales para las sEVs. El estudio mediante TEM mostró una morfología parecida en todos los casos y permitió comprobar de nuevo que el tamaño de las EVs era el adecuado (Figura 6B). Se analizaron también los marcadores mediante Western Blot y se comprobó que, independientemente de la fuente de MSC, todas las vesículas contenían los marcadores HSP70, TSG101, CD9 y CD81 (Figura 6C).

En este caso, se quiso hacer una caracterización más exhaustiva de las EVs, para comprobar que, efectivamente, no había diferencias significativas entre las vesículas que se obtenían de diferentes biopsias. Mediante la tecnología ExoView®, que se basa en la obtención de imágenes de fluorescencia e interferometría de una sola partícula, se comprobó que las EVs de las tres biopsias de MSC presentaban una composición similar en cuanto al porcentaje de los marcadores CD63, CD81 y CD9 presentes en su membrana (Figura 7A). Como se puede apreciar en la Figura 7A, las poblaciones de EVs positivas para uno, dos o los tres marcadores simultáneamente son muy similares en las vesículas de las tres biopsias. El análisis mediante reflectancia total atenuada -infrarrojo por transformada de Fourier (ATR-FTIR), demostró que el perfil molecular era igual en los tres tipos de EVs (Figura 7B). Finalmente se analizaron mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*), observando de nuevo un tamaño de partículas similar entre las EVs de las distintas biopsias (Figura 7C), que se correspondía con el tamaño observado con el resto de las técnicas descritas anteriormente. El análisis por DLS permitió también analizar el índice de polidispersidad (PDI) de las EVs, comprobando que era bajo en todas las biopsias, lo cual indicaba que la población obtenida de EVs era bastante homogénea en todos los casos (Tabla 2). Se midió también el valor de potencial Z de cada tipo de EVs obtenidas. Este valor describe la carga eléctrica neta de las moléculas presentes en la superficie de las EVs y es una medida de la estabilidad coloidal y la agregación de las vesículas [310]. Por lo tanto, cuanto más negativo sea el valor de potencial Z mayor es la estabilidad del producto purificado de EVs. En este caso, como se puede observar en la Tabla 1, todas las biopsias muestran un valor de potencial Z similar entre ellas, que indica que se trata de formulaciones estables.

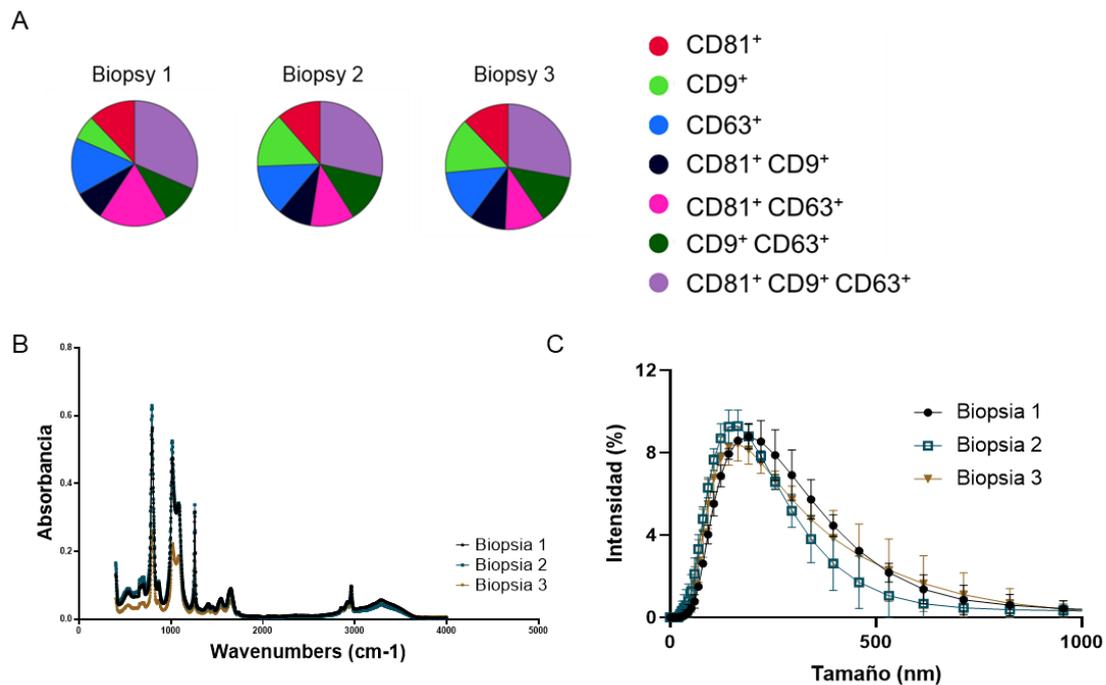


Figura 7. Caracterización de las EVs obtenidas de las tres biopsias de DP-MSC. (A) Análisis mediante ExoView® de los marcadores CD81, CD9 y CD63 presentes en las EVs de las tres biopsias. Se muestran las EVs positivas para un solo marcador, para dos y para los tres marcadores simultáneamente. (B) Análisis

mediante ATR-FTIR del perfil molecular de las EVs de las tres biopsias de MSC. (C) Análisis mediante DLS del tamaño de las EVs. Aparece representada la media \pm la SD de tres medidas independientes.

	Biopsia 1	Biopsia 2	Biopsia 3
PDI	0,398 \pm 0,004	0,389 \pm 0,07	0,415 \pm 0,06
Potential Z (mV)	-11,23 \pm 3,55	-12,33 \pm 2,9	-12,65 \pm 1,72

Tabla 2. Valores de PDI y potencial Z de las EVs obtenidas a partir de las tres biopsias de MSC. Los valores se muestran como la media \pm la SD de tres medidas independientes de cada una de las biopsias.

2.1. Los procesos biológicos en los que está implicado el cargo proteico de las EVs son iguales independientemente de la biopsia

Además de la caracterización previamente mencionada, se quiso realizar una caracterización fisicoquímica y funcional de las EVs de las tres biopsias más profunda, analizando el contenido molecular de las vesículas. Dentro de esta caracterización se llevó a cabo el análisis del contenido proteico de las EVs obtenidas a partir de las tres biopsias para corroborar que no existían grandes diferencias entre ellas. Se realizó la identificación del contenido proteico mediante LC-MS/MS a partir de la misma cantidad de EVs. El análisis permitió identificar 120 proteínas en las EVs de la biopsia 1, 89 proteínas en las EVs de la biopsia 2 y 103 proteínas en las EVs de la biopsia 3 (Figura 8). Del total de proteínas, 58 (que representaban el 36,9%) son comunes a las EVs de las tres biopsias y 97 (61,8%) son comunes al menos a dos de las biopsias.

A partir de la lista de proteínas presentes en las EVs de cada una de las tres biopsias de DP-MSC se quisieron determinar los procesos biológicos en los que estaban implicadas. Para ello se mapearon las proteínas de cada tipo de EVs en la base de datos String (www.string-db.org). Se comprobó que los procesos biológicos más significativos eran aquellos relacionados con la organización de la matriz extracelular, la adhesión celular o la regulación de la exocitosis en los tres tipos de EVs. Sin embargo, también había numerosos procesos biológicos significativos relacionados con la regulación del sistema inmune. Teniendo en cuenta que las MSC se caracterizan por su papel inmunoregulatorio y que las EVs han demostrado recapitular estos efectos, es destacable que el análisis del contenido proteico de las EVs indique esa relación con el sistema inmune.

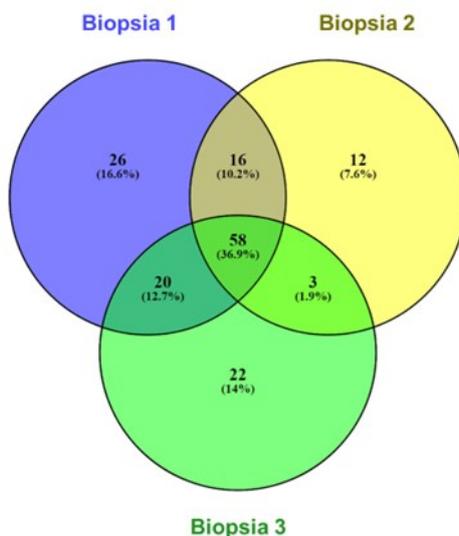


Figura 8. Análisis proteómico de las EVs obtenidas a partir de tres biopsias de DP-MSC. Diagrama de Venn de las proteínas detectadas en las EVs de las biopsias 1, 2 y 3. 58 proteínas (36,9%) son comunes a las EVs de las tres biopsias y 97 (61,8%) a EVs de al menos dos biopsias.

Se compararon los procesos biológicos de las EVs obtenidas a partir de las tres biopsias en función de los valores de FDR (de sus siglas en inglés *false discovery rate*) y strength. El valor de FDR hace referencia a un p-valor ajustado y permite saber los procesos biológicos que son estadísticamente significativos. Al compararlas se observó que prácticamente no hay diferencias entre las EVs obtenidas de diferentes biopsias en cuanto a los procesos biológicos en los que están implicadas y su significancia (Figura 9A). Esto indica, en parte, que independientemente de la biopsia de DP-MSC, si la biopsia es funcional, las EVs también lo son y presentan perfiles similares. El hecho de que los procesos biológicos en los que están implicadas las EVs sean parecidos en todas las biopsias indica que las EVs derivadas de DP-MSC son un producto biológico relativamente estable, que se podría emplear como un pull de EVs terapéutico, lo que facilitaría su salto a la clínica.

Se analizaron también los procesos biológicos en los que están implicadas las proteínas presentes en las EVs de las tres biopsias mediante la herramienta online REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>). Esta herramienta permite representar los procesos biológicos en un Treemap, organizándolos en "clusters". Como se puede observar en la Figura 9B, muchos de los procesos biológicos obtenidos coinciden con los que se analizaron con String. En este caso, además de procesos relacionados con la biología de las EVs (endocitosis, migración, procesos celulares, adhesión, etc), también se observaron procesos relacionados con el sistema inmune (procesos efectoros inmunes, procesos inmunitarios, respuesta inflamatoria) y con la capacidad regenerativa de las EVs (curación de heridas, respuesta a estrés).

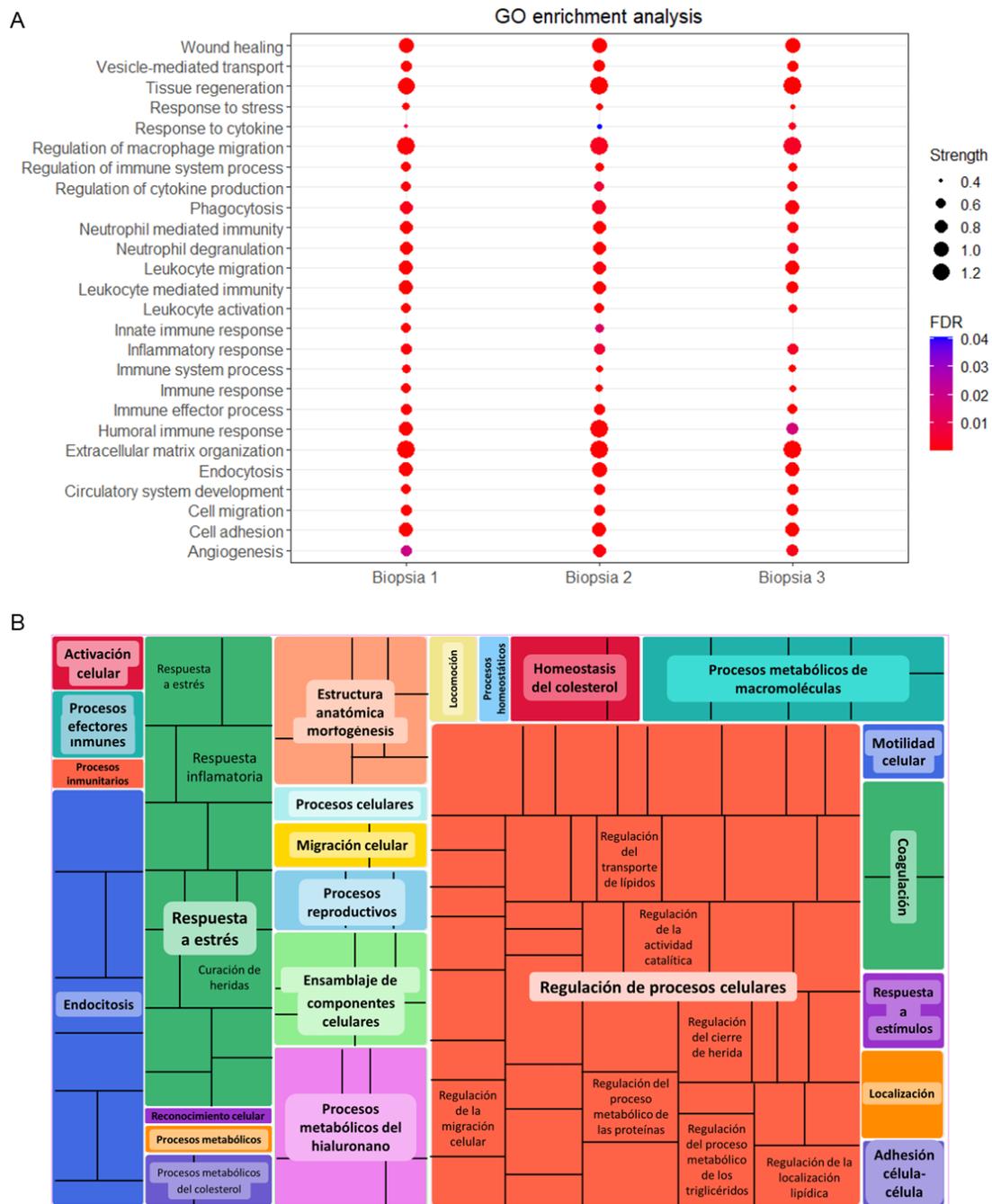


Figura 9. Análisis proteómico de las EVs obtenidas a partir de tres biopsias de DP-MS. (A) Diagrama comparativo de los procesos biológicos significativos en las EVs de las tres biopsias. FDR = false discovery rate. (B) Treemap de los procesos biológicos del cargo de las EVs obtenido mediante el software REVIGO.

En general, el análisis proteómico de las EVs obtenidas a partir de tres biopsias de MSC mostró un contenido proteico muy similar en todas las EVs. Esto indica que las diferentes biopsias de MSC de pulpa dental producen EVs con características similares en cuanto a su contenido en proteínas. Además, demuestra que la estandarización del proceso de cultivo de las MSC y del aislamiento de las EVs, permite obtener vesículas con un contenido proteico estable.

2.2. El contenido lipídico de las EVs no varía entre las distintas biopsias de MSC

A continuación, se realizó el análisis lipídómico con la finalidad de identificar los grupos lipídicos presentes en las EVs de las tres biopsias. Como se puede observar en la Figura 10, la proporción de los diferentes grupos lipídicos es prácticamente igual en las EVs de las distintas biopsias. Todas ellas presentaban como grupos lipídicos mayoritarios la fosfatidilcolina, seguido de las esfingomielininas y los triglicéridos.

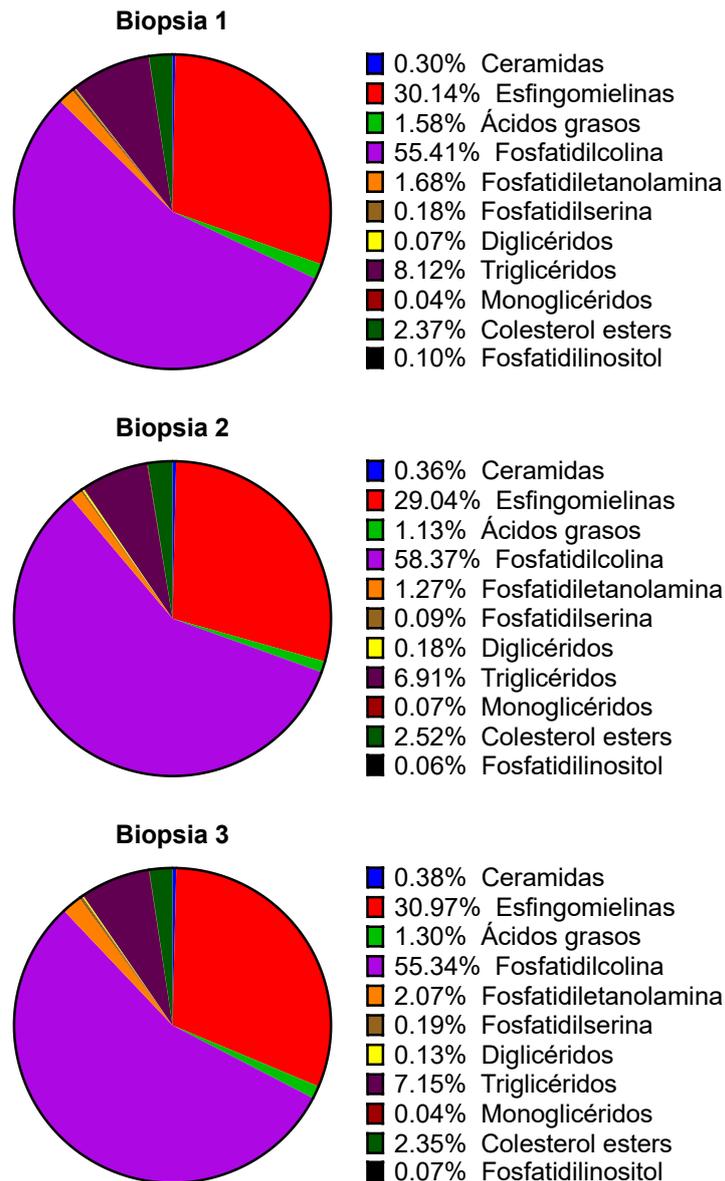


Figura 10. Análisis lipídómico de las EVs obtenidas a partir de tres biopsias de DP-MSC. Se muestran los diferentes grupos lipídicos presentes en la EVs junto con su proporción respecto al total de lípidos.

La fosfatidilcolina representa aproximadamente el 55-60% de los lípidos presentes en las EVs, mientras que la esfingomielinina representa alrededor de un 30% y los triglicéridos ya bajan hasta el 7% aproximadamente. La esfingomielinina se encuentra en

la mayor parte de las EVs constituyendo su membrana y participando en procesos como la formación de ILVs durante la biogénesis de las EVs. La fosfatidilcolina se ha descrito también como un componente de las EVs extracelulares derivadas de MSC, sin embargo, no es un lípido que suele estar presente de forma tan abundante en otro tipo de EVs. En conjunto, el análisis lipidómico ha mostrado que las EVs derivadas de distintas biopsias de DP-MSC presentan la misma composición lipídica, caracterizada por la abundancia de fosfatidilcolina.

2.3. Los miRNAs cargados en las EVs son similares entre las biopsias y participan en procesos de inmunoregulación

Además del análisis proteico y de lípidos, se quiso analizar el contenido en miRNAs de las EVs derivadas de las tres biopsias. Los miRNAs presentes en las EVs fueron secuenciados por el CRG en Barcelona y el análisis de las secuencias se realizó con la ayuda del grupo de Ingeniería Estadística Multivariante de la UPV. Se evaluaron los miRNAs presentes en las EVs de las tres biopsias y se comprobó la similitud en cuanto al contenido de miRNAs entre ellas (Figura 11) Se identificaron 176 miRNAs en las EVs derivadas de la biopsia 1 de MSC, 122 en las de la biopsia 2 y 188 en las de la biopsia 3. Al comparar el contenido en miRNAs de las EVs de las tres biopsias se comprobó que 99 miRNAs eran comunes a las tres, lo que suponía un 46% del total de miRNAs encontrados, y 172 miRNAs (un 80% del total) estaban presentes en las EVs de al menos dos biopsias.

Una vez comparada la composición de miRNAs entre las biopsias se procedió a filtrar los resultados para obtener aquellos miRNAs más representativos en las EVs de DP-MSC. Teniendo en cuenta el número de conteos de cada uno de los miRNAs presentes en cada biopsia, se seleccionaron un total de 20 miRNAs que estaban presentes en las tres biopsias de forma abundante. La lista de miRNAs seleccionados es la que aparece en la Figura 11.

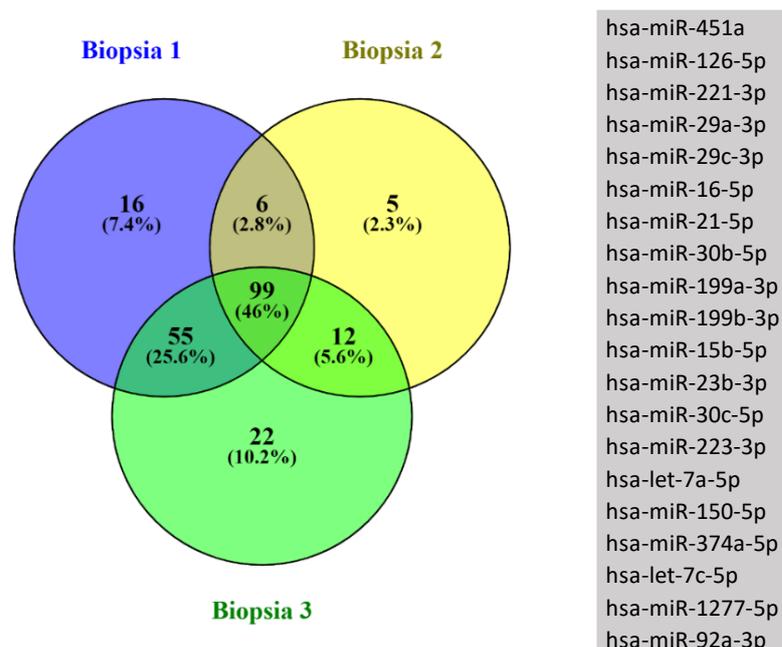


Figura 11. Análisis de miRNAs presentes en las EVs de las tres biopsias de MSC. (A) Diagrama de Venn de los miRNAs detectados en las EVs de las biopsias 1,2 y 3. 99 miRNAs (46%) son comunes a las EVs de las tres biopsias y 172 (80%) a EVs de al menos dos biopsias. (B) Listado de los 20 miRNAs más abundantes en las EVs derivadas de distintas biopsias de DP-MS. C.

A continuación, se estudiaron los procesos biológicos en los que estaban implicados estos miRNAs presentes en las EVs. En la Tabla 3 aparecen representados algunos de los procesos biológicos significativos y el número de miRNAs seleccionados que participan en ese proceso biológico. Como se puede observar en la tabla, un número destacable de procesos biológicos significativos en los que participan estos miRNAs abundantes en las EVs de DP-MS. C están relacionados con la respuesta inmune y la inflamación, al igual que se había observado en el análisis proteómico de las EVs. Esto es consecuente con la actividad inmunomoduladora que ya se ha demostrado en las EVs derivadas de MSC. Cabe destacar que uno de los procesos biológicos con mayor significatividad es la diferenciación de macrófagos, una de las principales acciones en la capacidad inmunoreguladora tanto de las MSC como de las EVs derivadas de ellas. También destacan procesos biológicos relacionados con respuestas a estrés oxidativo, hipoxia, remodelado de la ECM (a través de la vía de TGF β) o procesos relacionados con la respuesta a estrés.

		p-valor ajustado	Nº miRNAs implicados
GO:0071407	cellular response to organic cyclic compound	1.61978E-08	17
GO:0042542	response to hydrogen peroxide	3.44475E-08	16
GO:0030225	macrophage differentiation	3.44475E-08	15
GO:0016477	cell migration	5.22284E-08	19
GO:0001666	response to hypoxia	5.77997E-08	18
GO:0006955	immune response	2.30175E-07	17
GO:0045766	positive regulation of angiogenesis	4.53534E-07	18
GO:0031100	animal organ regeneration	4.84127E-07	14
GO:0001782	B cell homeostasis	5.18394E-07	13
GO:0043029	T cell homeostasis	5.30736E-07	13
GO:0006935	chemotaxis	5.81504E-07	14
GO:0010506	regulation of autophagy	6.51283E-07	14
GO:0006959	humoral immune response	9.35672E-07	13
GO:0042981	regulation of apoptotic process	9.96707E-07	17
GO:0033627	cell adhesion mediated by integrin	1.17716E-06	10
GO:0007507	heart development	1.57569E-06	18
GO:0050729	positive regulation of inflammatory response	1.57569E-06	13
GO:0042060	wound healing	1.74554E-06	16
GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	2.05333E-06	14
GO:0006954	inflammatory response	2.75674E-06	16
GO:0006897	endocytosis	4.01995E-06	12
GO:0007179	TGF β receptor signaling pathway	5.94433E-06	15
GO:0030198	extracellular matrix organization	6.31778E-06	13
GO:0030224	monocyte differentiation	9.051E-06	10
GO:0001776	leukocyte homeostasis	1.64812E-05	10
GO:0034097	response to cytokine	1.93737E-05	13
GO:0001819	positive regulation of cytokine production	3.10932E-05	9
GO:0002548	monocyte chemotaxis	3.58858E-05	8
GO:0002376	immune system process	3.77893E-05	14
GO:0072593	reactive oxygen species metabolic process	3.98203E-05	10
GO:0030217	T cell differentiation	4.36905E-05	11
GO:0034599	cellular response to oxidative stress	5.30847E-05	10

Tabla 3. Procesos biológicos significativos en los que están implicados los miRNAs seleccionados previamente. La tabla muestra la referencia del proceso biológico (izquierda), el nombre del proceso biológico, el p-valor ajustado de cada uno de los procesos biológicos y el número de miRNAs, de entre los seleccionados, que están implicados en ese proceso biológico. En negrita aparecen destacados algunos de los procesos biológicos relacionados con el sistema inmune y la inflamación.

3. Las MSC-EVs inducen la polarización *in vitro* de los macrófagos M1 hacia un fenotipo pro-resolutivo similar al de los M2.

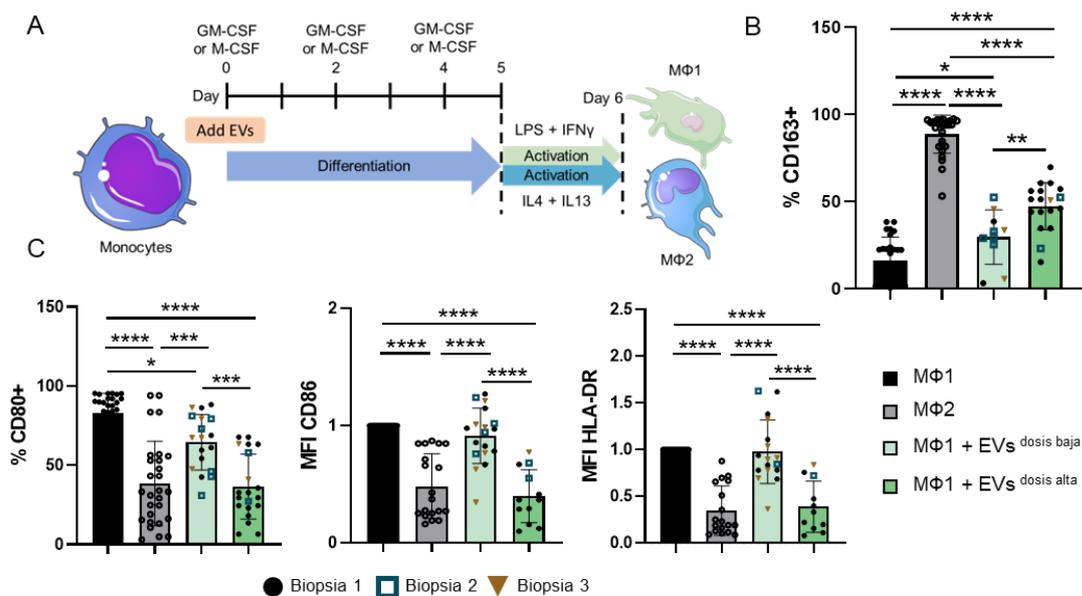
3.1. El tratamiento con EVs modifica los marcadores de membrana presentes en los macrófagos M1

Una vez caracterizadas en profundidad las EVs de las tres biopsias y tras haber comprobado que son muy similares en cuanto a sus características fisicoquímicas y su carga, se procedió a analizar su funcionalidad en el ámbito de la inmunoregulación. Teniendo en cuenta que las EVs recapitulan los efectos inmunomoduladores de las MSC, se quiso estudiar si estas EVs podrían emplearse como tratamiento para patologías que cursan con inflamación. Nuestro grupo previamente ha demostrado el efecto pro-resolutivo de las EVs de DP-MSC en modelos de enfermedades inmunomediadas como la colitis ulcerosa [237], pero en este caso se ha querido estudiar este efecto en el contexto de la inflamación producida tras el daño miocárdico. En los procesos inflamatorios, las células del sistema inmune innato, principalmente macrófagos y neutrófilos, son las primeras en actuar y las encargadas de inducir la resolución de la inflamación. El proceso inflamatorio tras la infección o el insulto isquémico está altamente regulado, sin embargo, cuando se altera o falla esta regulación se pueden desencadenar procesos de inflamación crónica, que pueden conducir a peores resultados de la patología de origen.

En este trabajo se quiso estudiar el efecto de las EVs sobre las células del sistema inmune innato, concretamente sobre macrófagos y neutrófilos. Las MSC ya han demostrado previamente su capacidad de inmunomodular a los macrófagos promoviendo su polarización hacia un fenotipo M2 [138], por lo que en este trabajo se quiso evaluar si las EVs obtenidas de las DP-MSC recapitulaban esos efectos y si el efecto era el mismo independientemente de la biopsia a partir de la cual se habían aislado las EVs, así como de la dosis de EVs empleada. Para ello se llevó a cabo un protocolo de diferenciación de macrófagos a partir de monocitos de sangre periférica. Los macrófagos se diferenciaron hacia M1 o M2 añadiendo GM-CSF o M-CSF respectivamente y activándolos con distintas citocinas, en el caso de los M1 con LPS e IFN- γ , mientras que los M2 se activaron con IL-4 e IL-13. De esta forma se conseguía obtener macrófagos M2b, que son el subtipo de macrófagos M2 que participan en los procesos de resolución de la inflamación. Para evaluar si las EVs eran capaces de inducir la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo pro-resolutivo o M2, se trataron los macrófagos que recibían las señales de diferenciación a M1 con dos dosis distintas de EVs ($2 \cdot 10^9$ y $4 \cdot 10^9$ partículas/ml) en el día 0 de la diferenciación. De esta

forma se quería determinar si, aun habiendo señales ambientales que inducen la generación de macrófagos pro-inflamatorios, las EVs son los suficientemente potentes como para evitar la diferenciación hacia M1 e inducir la generación de macrófagos M2. En la Figura 12A se puede observar un diagrama resumen del proceso de diferenciación de los monocitos primarios.

Una vez finalizada la diferenciación de los monocitos, se evaluó el fenotipo de los macrófagos tratados y no tratados con EVs. Se analizaron marcadores clásicos de M1 (CD80, CD86 y HLA-DR) y de M2 (CD163) mediante citometría de flujo. La población de monocitos se marcó con CD14 y se analizaron las células doble positivas para CD14 y los distintos marcadores previamente mencionados. Se observó que los macrófagos M1 diferenciados en presencia de EVs presentaban un aumento significativo del marcador de M2 CD163 con ambas dosis de EVs (Figura 12B) y una reducción de los marcadores de M1 CD80, CD86 y HLA-DR (Figura 12C). En el caso de estos marcadores únicamente la reducción en CD80 era significativa con la dosis baja de EVs, mientras que con la dosis alta todos los marcadores de M1 se redujeron significativamente. El marcador CD80, al igual que CD163 se analizó como el porcentaje de células que eran positivas para ese marcador, mientras que en el caso de los marcadores CD86 y HLA-DR el análisis se realizó cuantificando la intensidad media de fluorescencia (MFI) para ese marcador. Esto se hizo así porque, a diferencia de CD80 y CD163 que están presentes fundamentalmente en M1 y M2 respectivamente, CD86 y HLA-DR se expresan en los dos tipos de macrófagos, por lo que los cambios en la expresión se observan más con la MFI que con el porcentaje de células, ya que lo que ocurre en muchos casos es que la expresión de estos marcadores aumenta en las células individuales, de manera que un M1 expresa muchas más moléculas de CD86 y HLA-DR que un M2, aunque los dos lo expresen.



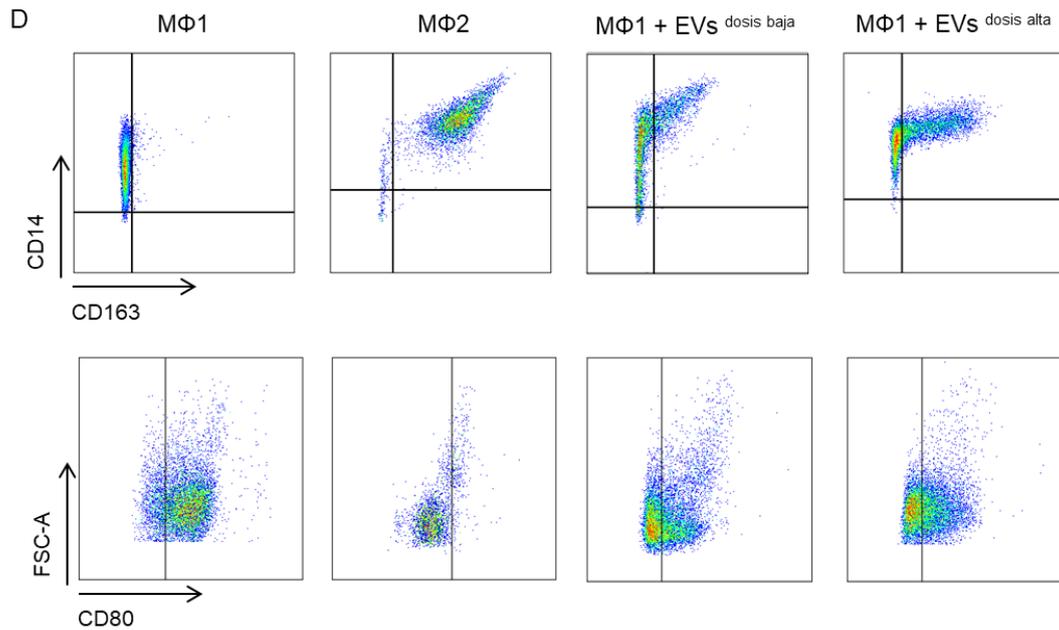


Figura 12. Las MSC-EVs promueven la diferenciación de los macrófagos hacia un fenotipo M2-like de forma dosis-dependiente. (A) Diagrama del diseño experimental de la diferenciación de macrófagos *in vitro*. (B) Cuantificación del porcentaje de células CD14⁺CD163⁺ analizadas mediante citometría de flujo al final de la diferenciación. (C) Cuantificación de los marcadores de M1 (CD80, CD86 y HLA-DR) mediante citometría de flujo al final de la diferenciación. El gráfico de la izquierda representa el porcentaje de células CD80⁺, mientras que el central y el de la derecha representan la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los marcadores CD86 y HLA-DR respectivamente. (D) Gráficos representativos del porcentaje de células positivas para los marcadores CD163 y CD80 para las condiciones M1, M2, M1 + EVs ^{dosis baja} y M1 + EVs ^{dosis alta}. Los gráficos representan la media \pm SD de experimentos independientes. Se aplicó un test ANOVA para el análisis estadístico. Cada biopsia de MSC-EVs aparece representada con un símbolo diferente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Tras observar por citometría los cambios en los marcadores de membrana que producían las EVs en los macrófagos, se quiso determinar los cambios en la expresión génica de marcadores de ambos tipos de macrófagos. Los marcadores CD206 y CD163 de M2 tendían a aumentar en los macrófagos tratados con EVs, sobre todo a la dosis alta, pero no había un aumento estadísticamente significativo en ninguno de ellos. Por el contrario, la expresión génica de ALOX15, una enzima encargada de sintetizar mediadores lipídicos pro-resolutivos (SPMs), aumentaba significativamente en los macrófagos tratados con la dosis alta de EVs (Figura 13A). Sin embargo, el tratamiento con EVs sí que redujo significativamente la expresión génica de los marcadores de macrófagos M1 CXCL10, CXCL11 y CCL5 a la dosis alta (Figura 13B). En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con las EVs de monocitos que se encuentran en un entorno inflamatorio reduce el fenotipo M1 tanto a nivel de marcadores de superficie como a nivel génico y promueve el cambio progresivo hacia un fenotipo M2, aunque parece que no se trata de un fenotipo M2 completamente maduro, sino de un M2-like.

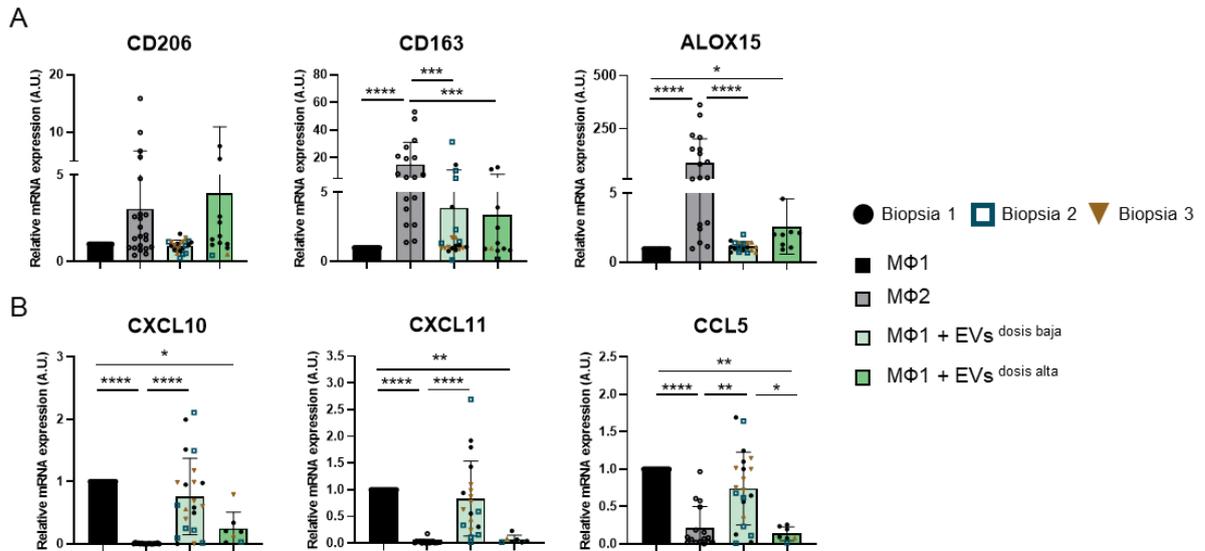


Figura 13. La expresión génica de marcadores de M1 se reduce significativamente con las EVs. (A) Niveles de expresión de ARN mensajero de CD206, CD163 y ALOX15, marcadores de M2, cuantificados por RT-qPCR en macrófagos M1, M2 y M1 tratados con EVs. Los macrófagos M1 se utilizaron como control. Los niveles de expresión están normalizados al nivel de expresión de GAPDH. (B) Niveles de expresión de ARN mensajero de CXCL10, CXCL11 y CCL5, marcadores de M1, cuantificados por RT-qPCR en macrófagos M1, M2 y M1 tratados con EVs. Los macrófagos M1 se utilizaron como control. Los niveles de expresión están normalizados al nivel de expresión de GAPDH. Los gráficos representan la media \pm SD de experimentos independientes. Se aplicó un test ANOVA para el análisis estadístico. Cada biopsia de MSC-EVs aparece representada con un símbolo diferente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Teniendo en cuenta estos resultados, se quiso analizar si la liberación de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias características de estos macrófagos también se alteraba con el tratamiento de las EVs (Figura 14). La adición de las EVs en el proceso de diferenciación de los macrófagos M1 aumentó significativamente la liberación de la citocina antiinflamatoria IL-10 (Figura 14A) y redujo significativamente la liberación de las citocinas proinflamatorias IL-1 β (Figura 14B) y TNF α (Figura 14C), siendo este fenotipo más parecido al de los macrófagos M2.

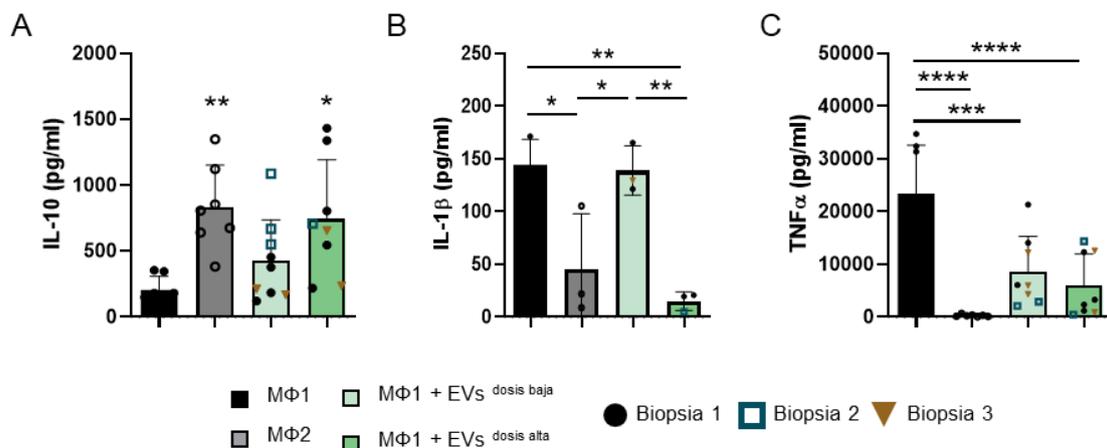


Figura 14. El perfil de citocinas secretadas por los macrófagos tratados con EVs es similar al de los macrófagos M2. (A) Cuantificación de la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 por parte de los macrófagos tratados y sin tratar mediante ELISA. (B) Cuantificación de la producción de la citocina proinflamatoria IL-1 β por parte de los macrófagos tratados y sin tratar mediante ELISA. (C) Cuantificación

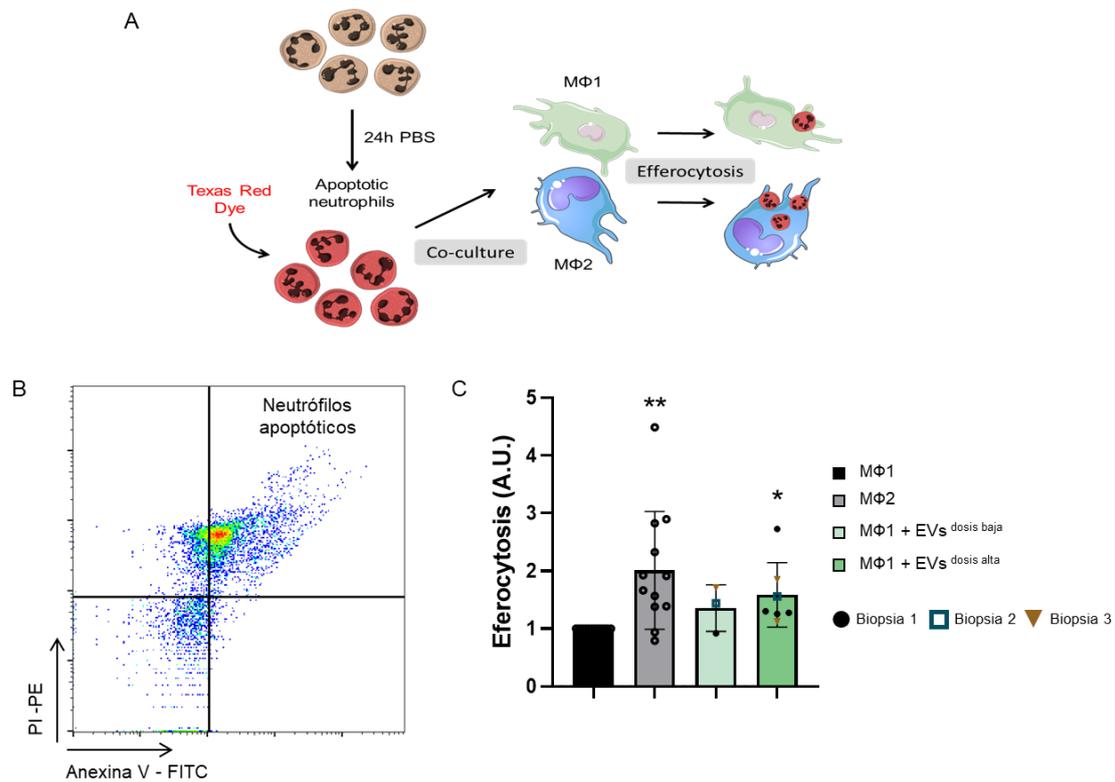
de la producción de la citocina proinflamatoria TNF α por parte de los macrófagos tratados y sin tratar mediante ELISA. Los gráficos representan la media \pm SD de experimentos independientes. Se aplicó un test ANOVA para el análisis estadístico. Cada biopsia de MSC-EVs aparece representada con un símbolo diferente. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

En definitiva, estos resultados indican que el tratamiento con MSC-EVs en la diferenciación de los macrófagos M1 impide esta diferenciación como tal e induce la polarización hacia un fenotipo más parecido al de los macrófagos M2, tanto a nivel de marcadores de superficie como a nivel de expresión génica y liberación de citocinas. Por lo tanto, las EVs inducen la generación de macrófagos con un perfil más resolutivo, sin haber diferencias entre las EVs obtenidas de distintas biopsias de MSC, aunque sí que existen diferencias en la funcionalidad de estas EVs dependiendo de la dosis que se emplee, de manera que dosis más elevadas inducen mayores cambios que las dosis más bajas.

3.2. Las EVs aumentan la capacidad de eferocitosis de los macrófagos

Para restablecer la homeostasis tras desencadenarse un proceso inflamatorio se tienen que eliminar las células apoptóticas presentes en el lugar de la inflamación, entre ellas los neutrófilos, que previamente también se han encargado de eliminar otros restos celulares. Al proceso por el cual se eliminan los neutrófilos apoptóticos se le conoce como eferocitosis y es llevado a cabo fundamentalmente por los macrófagos, que se encargan de reconocer, fagocitar y eliminar a estas células. La eferocitosis es esencial para que se produzca la resolución de la inflamación, ya que, si las células apoptóticas no se eliminan, siguen emitiendo señales que prolongan la inflamación e incluso pueden acentuar el daño tisular que se está produciendo.

Cuando se desencadena un daño y se inicia el proceso inflamatorio, algunas de las células presentes en el lugar afectado comienzan a emitir señales de muerte que atraen a los macrófagos. Entre estas células se incluyen los neutrófilos, que son reclutados en el sitio afectado nada más desencadenarse la inflamación. Sin embargo, estas células tienen un tiempo de vida corto y rápidamente entran en apoptosis para promover el inicio de la resolución de la inflamación y prevenir que se desencadene una respuesta inflamatoria excesiva. Por lo tanto, la eferocitosis de los neutrófilos por parte de los macrófagos es esencial para volver a reestablecer la homeostasis. Estudios previos han demostrado que la eferocitosis llevada a cabo por los macrófagos pro-resolutivos o M2 es más eficiente que la de los M1, debido a la mayor presencia de receptores de eferocitosis como MERTK o CD36 [332], [333]. Se quiso comprobar el efecto que tenía el tratamiento de las EVs sobre los macrófagos en cuanto a su capacidad de eferocitosis de neutrófilos apoptóticos (Figura 15A).



El porcentaje de apoptosis de los neutrófilos se comprobó mediante citometría de flujo marcando las células con Anexina V y yoduro de propidio (PI de sus siglas en inglés) (Figura 15B). Se observó que el tratamiento con EVs durante la diferenciación de los macrófagos M1 aumentaba significativamente la capacidad de estos macrófagos de internalizar y eliminar neutrófilos apoptóticos, siendo más parecida a la capacidad de eferocitosis que presentaban los macrófagos M2 (Figura 15C).

En conjunto, los experimentos realizados con macrófagos *in vitro* indicaban que los macrófagos que se obtenían tras el tratamiento con EVs de los M1 durante su diferenciación no solo presentaban marcadores similares a los de los M2, sino que funcionalmente también se comportaban de forma parecida a los macrófagos pro-resolutivos. Por lo tanto, la hipótesis que se genera a partir de estos resultados es que las EVs derivadas de DP-MSC podrían ser buenos agentes terapéuticos en patologías que cursen con procesos inflamatorios, favoreciendo la resolución de esta inflamación. Además, a partir de estos resultados se pudo comprobar que las EVs de diferentes biopsias de MSC no solo eran iguales en cuanto a sus características físicoquímicas, sino que su potencial terapéutico a nivel funcional no variaba entre las distintas biopsias de MSC de origen.

4. Las EVs modulan la expresión génica y el estrés oxidativo de los neutrófilos en presencia y ausencia de estímulos inflamatorios

Aunque los macrófagos sean uno de los tipos celulares clave en los procesos inflamatorios, también se quiso evaluar el efecto que tenían las EVs sobre otro tipo celular que participa activamente en la inflamación, los neutrófilos. Los neutrófilos son las células que primero llegan a la zona inflamada y al hacerlo comienzan a secretar señales pro-inflamatorias que atraen al lugar dañado a otras células del sistema inmune, principalmente más neutrófilos y macrófagos. Esto induce una mayor respuesta inflamatoria que activa señales en los neutrófilos para que cese la liberación de moléculas pro-inflamatorias y comiencen a activar señales apoptóticas. Al inducir su apoptosis favorecen que los macrófagos los fagociten y promueven el cambio de fenotipo en los macrófagos induciendo la resolución de la inflamación.

Debido a su papel relevante en la inflamación, se quiso determinar el efecto que tenían las EVs sobre la expresión génica de receptores y moléculas que informan sobre la activación de los neutrófilos tanto en presencia como en ausencia de un estímulo inflamatorio, como es la adición de lipopolisacárido (LPS), una molécula bacteriana que induce la activación de los neutrófilos y otras células del sistema inmune. Se comprobó que la adición de EVs por si solas inducía una mayor expresión de los receptores TLR2, TLR4 y ALX en los neutrófilos (Figura 16), mientras que no cambiaban la expresión génica de MPO, un marcador de activación. TLR2 y TLR4 son receptores que activan vías de síntesis y secreción de citocinas proinflamatorias, mientras que ALX es un receptor que activa la síntesis de mediadores lipídicos pro-resolutivos (SPMs). El tratamiento con EVs indujo una sobreexpresión tanto de receptores “proinflamatorios” como de receptores “pro-resolutivos”, aunque el aumento de la expresión es mucho mayor en el caso de ALX. Esta descrito que los neutrófilos activados expresan en gran medida el receptor ALX, incluso en el ámbito del IAM [84], [334]. Una posible explicación de esto son los propios circuitos inflamatorios que se generan dentro de los neutrófilos; una señal (DAMPs, LPS u otras moléculas) activa la respuesta de los neutrófilos, que inicialmente es proinflamatoria, lo que induce un aumento de la expresión de moléculas como TLR2 y TLR4. Sin embargo, la activación de la secreción de moléculas proinflamatorias acaba promoviendo la activación de rutas de síntesis de moléculas antiinflamatorias para que los neutrófilos se puedan autorregular y no se desencadene una respuesta inflamatoria crónica. Dentro de estas moléculas antiinflamatorias se incluye la anexina A1, que es el ligando del receptor ALX, el cual, a su vez, induce la síntesis de moléculas pro-resolutivas. De esta forma, la unión de la anexina A1 al receptor ALX inhibe el reclutamiento de nuevos neutrófilos a la zona dañada y promueve la activación de rutas apoptóticas en los neutrófilos [335], [336], así como la secreción de moléculas pro-resolutivas que van a favorecer el cambio fenotípico de los macrófagos que se encargan de eferocitar los neutrófilos apoptóticos. En definitiva, se trata de un circuito inflamatorio finamente regulado que acaba desencadenando la secreción de señales resolutivas para que no se prolongue en exceso la respuesta inflamatoria.

Por su parte, el tratamiento con LPS también induce el aumento de la expresión génica de TLR2, TLR4 y ALX, siendo este incremento incluso ligeramente mayor que con el tratamiento solo de las EVs. Sin embargo, la adición conjunta de LPS y EVs exagera esta respuesta, aumentando más la expresión de TLR4 y ALX de manera dosis-dependiente, mientras que TLR2 no muestra diferencias en la expresión independientemente de si los neutrófilos se estimulan solo con EVs, LPS o se estimulan en conjunto con las dos cosas. La expresión génica de MPO tampoco varía significativamente cuando se añaden LPS y EVs.

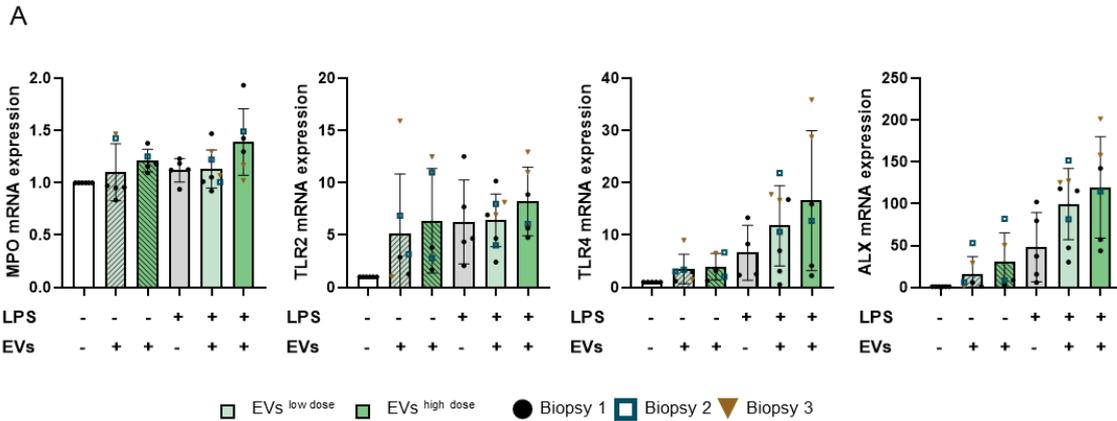


Figura 16. Las EVs modulan la expresión génica de los neutrófilos en presencia y ausencia de estímulos inflamatorios. (A) Cuantificación de los niveles de expresión de ARNm de Mpo, Tlr2, Tlr4 y Alx mediante RT-qPCR tras el tratamiento con EVs, LPS y ambos. Los neutrófilos no tratados se utilizaron como control para la normalización. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto al nivel de expresión de Gapdh. Los gráficos representan la media \pm SD de experimentos independientes. Se aplicó un test ANOVA para el análisis estadístico. Cada biopsia de MSC-EVs aparece representada con un símbolo diferente.

En general, estos resultados indican que el tratamiento con EVs, tanto en presencia como en ausencia de un estímulo inflamatorio, induce la activación y la respuesta inflamatoria básica de los neutrófilos, que consiste en el aumento de expresión de receptores proinflamatorios con la consiguiente activación de la síntesis de compuestos proinflamatorios que termina desencadenado en la síntesis de compuestos pro-resolutivos al activarse rutas de señalización como la que se inicia tras el receptor ALX. Finalmente, esto desencadena en la activación de la apoptosis de los neutrófilos y la activación de la resolución de la inflamación. Por lo tanto, el tratamiento con las EVs estaría favoreciendo en última instancia la resolución de la inflamación también a través de su efecto sobre los neutrófilos.

Otro de los aspectos importantes de los neutrófilos en la inflamación es el estrés oxidativo. Al activarse, los neutrófilos se encargan de eliminar células apoptóticas y restos de matriz extracelular presentes en la zona dañada, pero, en este proceso, los neutrófilos también liberan ROS. La acumulación de ROS puede inducir daños en células sanas que estén cercanas a la zona dañada. En el ámbito del IAM, las ROS liberadas por los neutrófilos pueden acabar induciendo daños en los cardiomiocitos sanos, aumentando la lesión. Por ello, se quiso determinar el efecto que tenían las EVs de DP-MSC en el estrés oxidativo de los neutrófilos. Para ello, se trataron los neutrófilos con EVs en presencia y en ausencia del estímulo inflamatorio del LPS. Como se puede

observar en la Figura 17, en ausencia de LPS, el tratamiento con EVs no induce un aumento del estrés oxidativo en los neutrófilos. Sin embargo, la adición del LPS sí que aumenta significativamente la generación de ROS por parte estas células. La adición de EVs a los neutrófilos tratados con LPS consigue reducir el estrés oxidativo causado por el estímulo inflamatorio, aunque esta reducción no llega a ser significativa. En definitiva, este experimento muestra que las EVs de MSC por sí mismas no aumentan la producción de ROS por parte de los neutrófilos y la reducen en presencia de estímulos inflamatorios. Esto podría traducirse en efectos beneficiosos en un tratamiento *in vivo*, ya que la reducción de la liberación de ROS por parte de los neutrófilos podría traducirse en un menor daño en las células adyacentes.

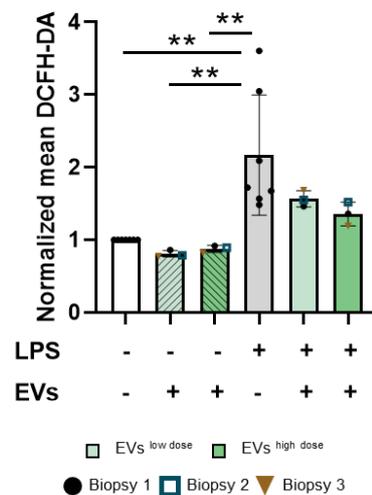


Figura 17. Efecto de las EVs de DP-MSC en el estrés oxidativo de los neutrófilos. Los neutrófilos se tiñeron con DCFH-DA y el estrés oxidativo se determinó mediante citometría de flujo. Se cuantificó el estrés oxidativo de los neutrófilos en presencia y ausencia de EVs y LPS. Los niveles de ROS se normalizaron respecto al control sin tratar. Los gráficos representan la media \pm SD de experimentos independientes. Se aplicó un test ANOVA para el análisis estadístico. Cada biopsia de MSC-EVs aparece representada con un símbolo diferente. **p < 0.01.

5. Las EVs reducen la proliferación de PBMCs activadas

Se quiso evaluar el efecto que tenían las EVs sobre otras poblaciones de células inmunes, en concreto sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, de sus siglas en inglés). Dentro de las PBMCs la población mayoritaria son los linfocitos, por lo que se llevó a cabo un experimento para comprobar como afectaban las EVs a la proliferación de linfocitos activados. Cuando se induce la activación de las PBMCs aumenta la proliferación de la población de linfocitos, por lo que aumenta la proporción de esta población celular respecto al resto convirtiéndose en la población celular mayoritaria. Tras inducir la activación de las PBMCs, se comprobó por citometría el efecto que tenían las EVs en la proliferación de los linfocitos. Para ello se marcaron las células con CFSE, de manera que a medida que proliferaban la señal del CFSE se iba diluyendo. De esta forma, mediante el marcaje de la población CD3⁺ se pudo comprobar si las EVs afectaban a la proliferación de los linfocitos determinando mediante citometría la señal del CFSE (Figura 18A). Como se puede observar en la Figura 18B el tratamiento

con EVs redujo significativamente la activación de la proliferación de linfocitos respecto al control de PBMCs activadas sin tratar con EVs.

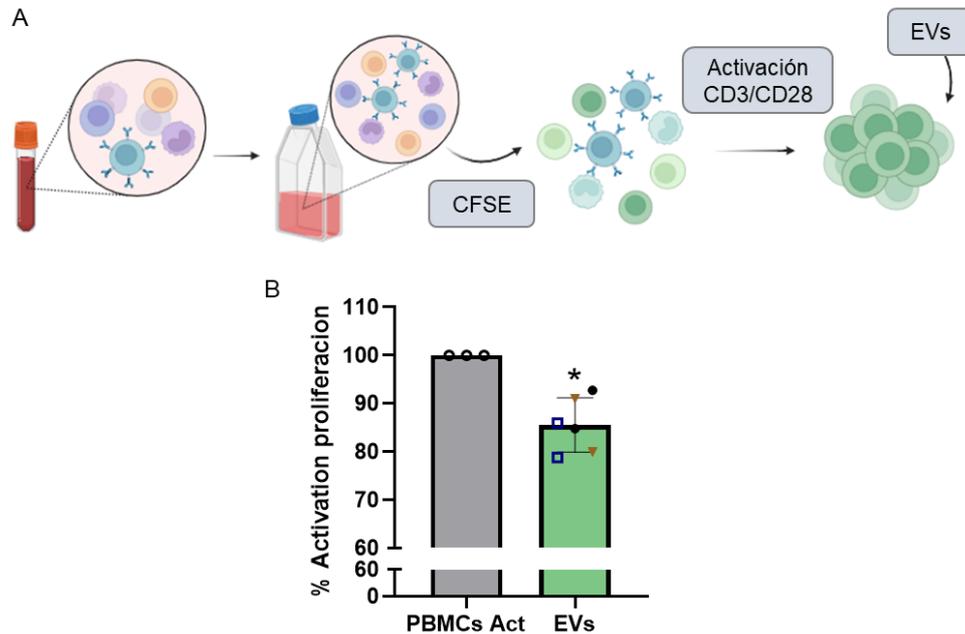


Figura 18. La proliferación de los linfocitos T activados se reduce tras el tratamiento con EVs. (A) Esquema representativo del experimento de proliferación de linfocitos T activados. (B) Cuantificación del porcentaje de activación de la proliferación de células CD3+ activadas, mediante citometría de flujo. Los valores están normalizados de forma que las PBMCs activadas control presentan un 100% de activación de la proliferación. Los gráficos representan la media \pm SD de experimentos independientes. Se aplicó un t-test para el análisis estadístico. Cada biopsia de MSC-EVs aparece representada con un símbolo diferente. *p < 0.05.

Por lo tanto, las EVs tienen efecto en distintas poblaciones de células inmunes, ejerciendo una actividad inmunomoduladora que induce la reducción en la activación linfocitaria y promueve el cambio de otras poblaciones como los macrófagos hacia un fenotipo pro-resolutivo. En conjunto, esto indica que las EVs modulan la respuesta inmune promoviendo la resolución de la misma.

6. Las EVs modifican la expresión de genes implicados en el depósito de matriz extracelular en fibroblastos cardiacos humanos (HCF)

Además de células del sistema inmune, se quiso evaluar el efecto que tenían las EVs sobre HCF, debido a la importancia que tienen estas células en el ámbito del IAM. Los HCF son los encargados de generar nueva matriz extracelular que constituya la cicatriz de la zona infartada. Además, también contribuyen a la degradación de la matriz extracelular dañada en las primeras fases tras el infarto. La contribución de los HCF es muy importante, ya que las características que presente la cicatriz en el IAM van a determinar en gran medida los resultados clínicos, de manera que una cicatriz demasiado débil puede favorecer la expansión del infarto, mientras que una demasiado rígida pueden dificultar la funcionalidad contráctil del corazón. Debido al papel esencial

que cumplen estas células se quiso determinar el efecto que tenían las EVs sobre ellas. Por un lado, se quiso evaluar el efecto directo de las EVs de DP-MSC sobre los HCF sin estimular, simulando el efecto que podrían tener las EVs sobre fibroblastos en estado basal. Pero, por otro lado, para evaluar de forma más realista el efecto que podrían tener sobre fibroblastos presentes en la zona de infarto, se trataron los fibroblastos con TGF β , un factor de crecimiento que liberan las células del sistema inmune en las primeras fases tras el infarto y que contribuyen a activar a los fibroblastos cambiando su fenotipo hacia uno más profibrótico. Estos fibroblastos “activados” se trataron con las EVs y se evaluó la expresión de genes relacionados con la degradación y síntesis de la matriz celular (COL3A1, COL1A1, MMP1, TIMP1, FN1), así como genes relacionados con el cambio fenotípico de los fibroblastos hacia miofibroblastos (ACTA2, que codifica α SMA, y el propio TGF β).

Como se puede observar en la Figura 19, solo se produjeron cambios significativos en la expresión de tres genes, ACTA2, TGF β y TIMP1. La expresión de COL3A1 y COL1A1 se mantiene estable tanto con el tratamiento de EVs como con TGF β o ambos juntos. No obstante, el hecho de no ver cambios no quiere decir que las EVs o el TGF β no afecten a la producción de colágeno en los HCF, sino que puede deberse simplemente a que las condiciones experimentales no son las adecuadas para observar estos cambios. En el caso de ACTA2, el gen que codifica para α SMA, se observó un aumento significativo en su expresión tras la estimulación con TGF β , tanto en presencia como en ausencia de tratamiento con EVs. Sin embargo, no se vieron diferencias significativas cuando los HCF se trataban únicamente con las EVs. MMP1, una metaloproteinasa que se encarga de degradar matriz extracelular y FN1, un gen implicado en la síntesis de nueva matriz, tampoco mostraron cambios significativos con ninguno de los tratamientos. No obstante, sí que se puede apreciar que cuando los HCF están estimulados con TGF β , el tratamiento con EVs induce una ligera reducción en la expresión génica de MMP1. Por el contrario, la FN1, aunque de forma no significativa, parece aumentar su expresión en presencia de los tratamientos. En cuanto a TIMP1, un inhibidor de metaloproteinasas, y TGF β , el tratamiento con EVs aumenta su expresión de forma significativa, así como el tratamiento con TGF β . El tratamiento conjunto con ambos compuestos aumenta la expresión respecto al control, pero no tiene un efecto aditivo, ya que los niveles de expresión son parecidos a los de los tratamientos por separado.

Todo esto en su conjunto parece indicar que las EVs promueven en cierta medida un fenotipo de HCF en transición hacia miofibroblasto, ya que aumenta la expresión de TGF β , así como la expresión de genes encargados de inhibir la degradación de matriz extracelular (TIMP1) y de genes que favorecen la síntesis de nueva matriz (COL1A1 y FN1), aunque estos últimos de forma no significativa. Además, una vez activados los HCF, el tratamiento con EVs reduce la secreción de MMP1, una metaloproteinasa encargada de destruir la matriz extracelular dañada. Observando estos resultados de forma global parece que las EVs inducen un estado de los HCF similar al que presentan en la fase intermedia tras el IAM, en el que pasan de fibroblastos antifibróticos e inflamatorios a convertirse en fibroblastos profibróticos.

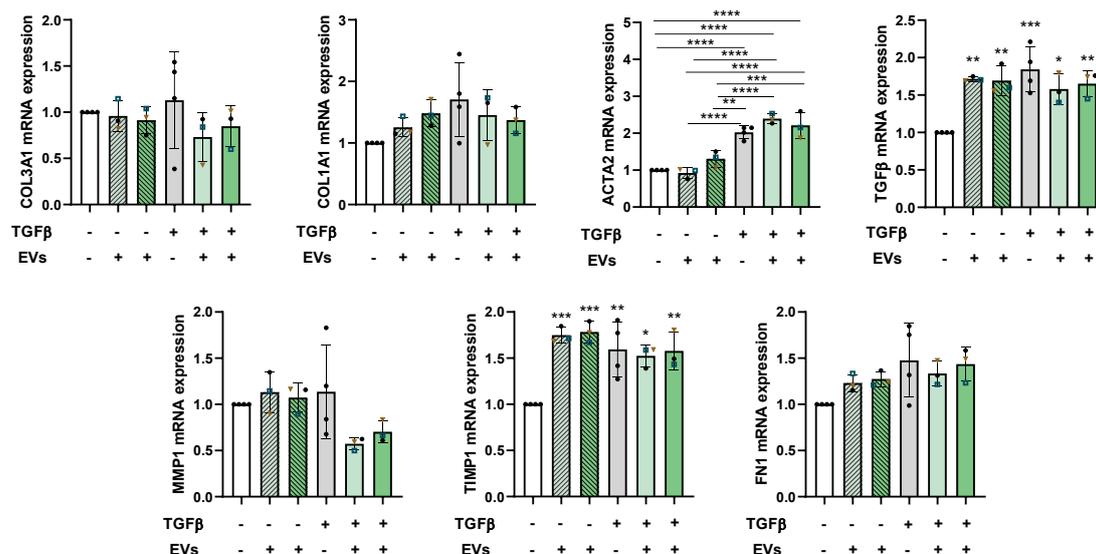


Figura 19. Las EVs modulan la expresión génica de los HCF. Cuantificación de los niveles de expresión de ARNm de COL3A1, COL1A1, ACTA2, TGFβ, MMP1, TIMP1 y FN1 mediante RT-qPCR tras el tratamiento con EVs, TGFβ y ambos. Los HCF no tratados se utilizaron como control para la normalización. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto al nivel de expresión de *GAPDH*. Los gráficos representan la media \pm SD de experimentos independientes. Se aplicó un test ANOVA para el análisis estadístico. Cada biopsia de MSC-EVs aparece representada con un símbolo diferente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

En definitiva, todos estos experimentos realizados *in vitro* permitieron comprobar que las EVs derivadas de DP-MSK afectan fundamentalmente a las células del sistema inmune, y entre ellas, los resultados más robustos se observaron en los macrófagos. En general, parece que las EVs favorecen un entorno pro-resolutivo mediante diferentes acciones. Por un lado, favorecen la polarización de los macrófagos M1 hacia un fenotipo M2-like tanto a nivel de marcadores como a nivel funcional. Además, contribuyen a la activación de los neutrófilos, activando vías de señalización tanto proinflamatorias como pro-resolutivas y disminuyen el estrés oxidativo en estas células. Por otro lado, reducen la proliferación de linfocitos T activados y modulan también la expresión génica de los fibroblastos contribuyendo a la aparición de un fenotipo más profibrótico. Cabe destacar que esta capacidad inmunomoduladora se observa por igual en las EVs obtenidas de distintas biopsias de DP-MSK, lo que refuerza la hipótesis de que se podría generar un producto biológico homogéneo y estable basado en EVs obtenidas de distintas biopsias de una misma fuente celular.

Teniendo en cuenta todos estos resultados obtenidos *in vitro*, a continuación, se quiso evaluar el efecto de estas EVs en un modelo *in vivo*.

7. Potencial inmunomodulador de las EVs en un modelo *in vivo* de infarto agudo de miocardio (IAM)

Los procesos inflamatorios son altamente complejos y afectan a numerosos tipos celulares simultáneamente que se coordinan entre sí a lo largo de toda la respuesta

inflamatoria. Los ensayos *in vitro* permiten observar el efecto de las EVs sobre tipos celulares aislados, pero no permiten tener una visión más completa de la respuesta inflamatoria en su conjunto. Para ello se requieren modelos animales que permitan estudiar de forma global la respuesta inflamatoria. En este trabajo se quiso evaluar el efecto inmunomodulador de las EVs derivadas de DP-MSK en un modelo de infarto agudo de miocardio (IAM) en rata.

Cuando se produce un IAM, el daño y la muerte celular que se genera en el corazón desencadena la activación de la respuesta inmune, que es esencial para volver a restaurar la homeostasis del tejido y contener el daño tisular. Por lo tanto, la inflamación juega un papel esencial en el IAM, lo que ha llevado a plantearse la necesidad de nuevas terapias que tengan como diana la respuesta inmunológica que se da en el corazón tras el infarto.

Para determinar si las EVs podían constituir una terapia innovadora frente al IAM, se procedió a realizar un modelo de esta patología en ratas nude. El IAM se realizó mediante la ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda y las EVs se administraron intramiocárdicamente, inmediatamente después de la ligadura. Basándonos en datos previos del laboratorio y teniendo en cuenta que las dos dosis de EVs empleadas *in vitro* mostraban efectos, se decidió utilizar una dosis intermedia de $2,5 \cdot 10^9$ partículas/ml en cada una de las ratas atímicas. Hay que destacar que estos animales carecen de inmunidad adaptativa pero mantienen la inmunidad innata, lo que nos permitió analizar los efectos en las poblaciones mieloides disminuyendo el posible efecto de la destrucción del xenoinjerto que se observaría al trasplantar EVs humanas en ratas inmunocompetentes. Se emplearon EVs obtenidas de las tres biopsias de pulpa dental. Decidimos realizar dos experimentos independientes de IAM, en cada uno de los cuales se dividieron los animales en un grupo control tratado con PBS y un grupo tratado con EVs, ambos con IAM. La diferencia entre los dos experimentos fue el tiempo que se mantuvieron vivos a los animales, que fueron 7 y 21 días tras el IAM. Se realizó a dos tiempos para observar la evolución de la respuesta inflamatoria, a los 7 días es el momento aproximado en el que ocurre la fase de resolución de la inflamación, mientras que a los 21 días la resolución ya ha terminado y se ha producido el remodelado cardíaco. Teniendo esto en cuenta, quisimos estudiar cómo afectaban las EVs en los primeros días del proceso inflamatorio y las consecuencias que tenían a largo plazo sobre el remodelado y la función cardíaca.

Las ratas eutanasiadas a los 7 días tras el IAM se emplearon para estudiar a nivel génico y proteico el ambiente inflamatorio, así como para evaluar histológicamente las poblaciones inmunes y la formación de tejido cicatricial. Sin embargo, las ratas eutanasiadas a los 21 días tras el infarto se evaluaron histológicamente, pero no se midieron los niveles de expresión de genes y proteínas relacionadas con la inflamación debido, en parte, porque tras ese periodo de tiempo el proceso inflamatorio debe estar concluido. En la figura 20 aparece representado un diagrama resumen del modelo *in vivo*.

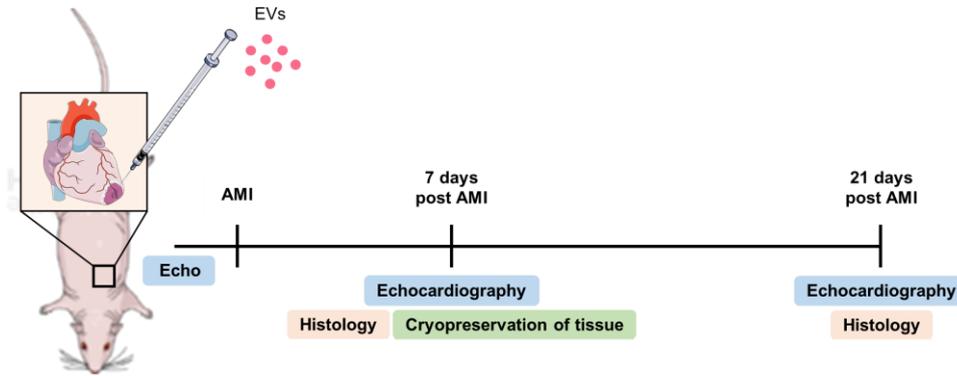
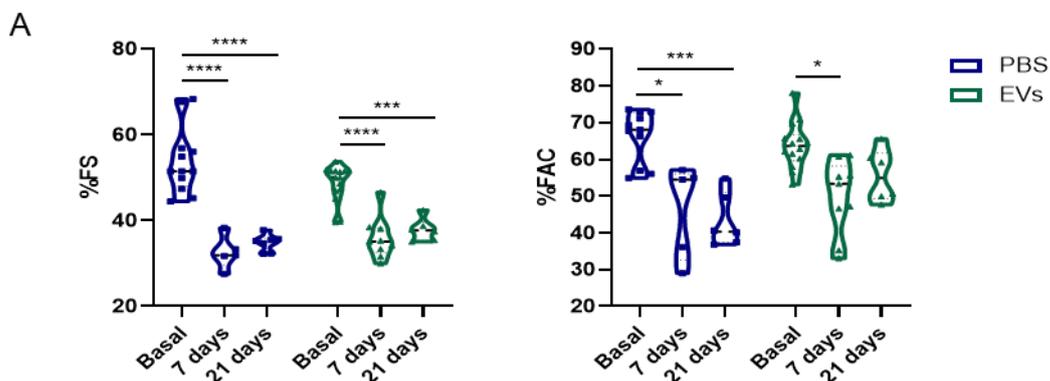


Figura 20. Esquema representativo del modelo *in vivo* de IAM en rata nude. La administración de las EVs se realizó intramiocárdicamente. Las ecocardiografías se llevaron a cabo antes del IAM y a los 7 y 21 días tras el infarto. Los corazones de las ratas sacrificadas a 7 días se utilizaron para histología y criopreservación, mientras que los de las ratas sacrificadas a 21 días solo se emplearon en histología.

7.1. Las EVs amortiguan el deterioro de la función cardíaca tras el IAM

Antes del IAM (basal) y la eutanasia de los animales, se evaluó la función cardíaca mediante ecocardiografía. Se estudiaron los parámetros de fracción de acortamiento (FA) y cambio porcentual de área (CPA). La FA representa el porcentaje de cambio en la dimensión interna del ventrículo izquierdo de la diástole a la sístole y refleja el grado de contracción del ventrículo izquierdo durante cada latido [337]. El CPA es un parámetro similar a la FA, en este caso, representa el porcentaje de cambio en el área del ventrículo izquierdo desde la diástole hasta la sístole y proporciona una evaluación del cambio global en el tamaño y la contractilidad del ventrículo durante el ciclo cardíaco [337]. Valores de FA y CPA más altos indican una mejor función contráctil.

Evaluando la FA y el CPA en las ratas antes del IAM y a 7 y 21 días tras el infarto, se observó que, aunque todos los animales presentaban una pérdida de su función cardíaca (Figura 21A), los grupos tratados con EVs tenían una menor variación en estos parámetros que los grupos PBS, siendo casi estadísticamente significativa a los 21 días tras el infarto (Figura 21B). En el parámetro de la FA, solo se observaron diferencias a los 21 días tras el infarto, mientras que en el parámetro del CPA se observaron diferencias entre los grupos PBS y tratadas con EVs tanto a los 7 como a los 21 días tras el IAM.



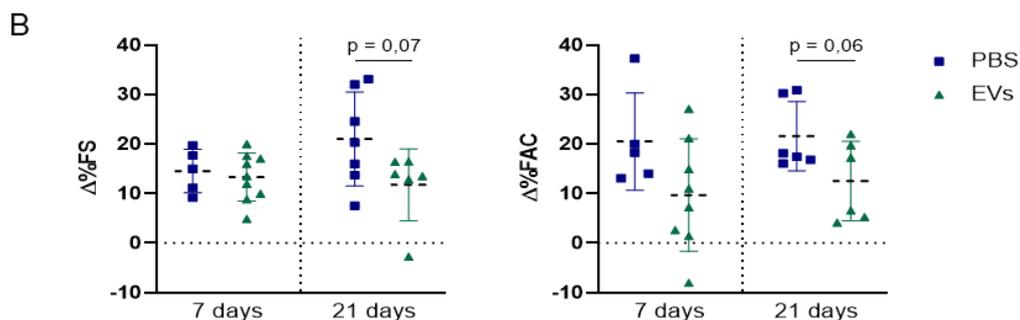


Figura 21. Las EVs reducen la caída de la función cardíaca inducida por el IAM. (A) Porcentaje de fracción de acortamiento (FA) y cambio porcentual de área (CPA) en los grupos tratados con PBS y EVs antes del procedimiento de IAM (basal) y 7 y 21 días después del infarto. Los datos se extrajeron de la ecocardiografía de cada animal. (B) Representación de la variación de FA y CPA a los 7 y 21 días en los grupos tratados con PBS y EVs. La variación se calculó como el valor de cada animal a los 7 o 21 días después del IAM menos el valor basal antes del IAM. Los gráficos representan la media \pm SD de experimentos independientes. Se aplicó un test ANOVA para el análisis estadístico de los gráficos del panel A y un t-test para el análisis estadístico de los gráficos del panel B. * $p < 0.05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

En definitiva, la evaluación de la función cardíaca permitió comprobar que el tratamiento con MSC-EVs del IAM amortigua la caída en la función cardíaca que se desencadena tras el infarto, lo cual se relaciona con un mejor pronóstico y una menor probabilidad de sufrir fallo cardíaco tras el infarto.

7.2. El tejido cicatricial que se genera tras el IAM es menor tras el tratamiento con EVs

La extensión del tejido fibrótico cicatricial tras el IAM es un parámetro directamente relacionado con una mayor probabilidad de insuficiencia cardíaca. Teniendo esto en cuenta, evaluamos el efecto de las EVs sobre la formación de la cicatriz tras el infarto, midiendo el tejido fibrótico generado a los 7 y 21 días postinfarto en ambos grupos. Para la medida del tejido fibrótico se empleó la tinción de Tricrómico de Masson, que marca este tejido en un color azul, mientras que el tejido no fibrótico se tiñe de rojo. El tratamiento con EVs dio lugar a una menor formación de tejido cicatricial en comparación con el tratamiento de PBS. A los 7 días post-IAM, observamos una disminución de la extensión de la cicatriz en el grupo tratado con EVs, aunque no fue estadísticamente significativa. A los 21 días de la IAM, la extensión de la cicatriz en relación con el tamaño del corazón disminuyó significativamente en el grupo tratado con EVs (Figura 22).

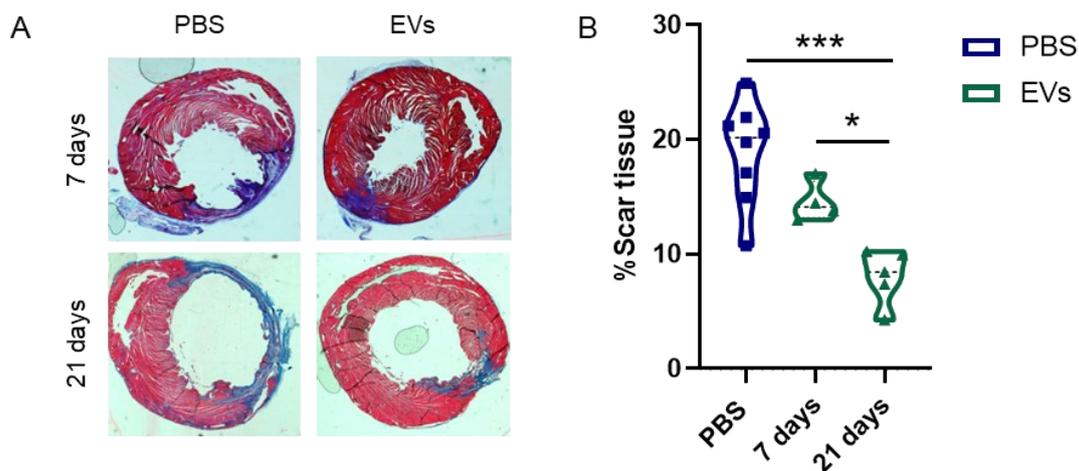


Figura 22. El tejido cicatricial que se genera tras el infarto es menor con el tratamiento de EVs. La tinción con tricrómico de Masson (TM) se utilizó para cuantificar el porcentaje de tejido cicatricial 7 y 21 días después del IAM. (A) Imágenes representativas de secciones de corazón teñidas con tricrómico de Masson (barra de escala = 500 μ m). (B) Cuantificación del área fibrótica a 7 y 21 días tras el IAM. El área fibrótica en las secciones teñidas se calculó como el porcentaje del área azul dividido por el área total de tejido. Los gráficos representan la media \pm SD. Se utilizó un test ANOVA para el análisis estadístico. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

7.3. Las EVs reducen la expresión génica y proteica de marcadores de macrófagos M1 en la zona infartada a los 7 días tras el IAM

Teniendo en cuenta la importancia de la respuesta inflamatoria en el IAM y que las EVs derivadas de las tres biopsias de DP-MSC eran capaces de ejercer efectos inmunomoduladores sobre células del sistema inmune *in vitro*, se quiso evaluar su capacidad inmunomoduladora en el modelo de infarto. Los grupos de ratas tratados con PBS y EVs y eutanasiados a los 7 días tras el IAM se utilizaron para analizar la expresión génica y proteica de diferentes marcadores relacionados con macrófagos M1 y M2, con el objetivo de determinar si el tratamiento con las EVs inducía un ambiente pro-resolutivo, al igual que ocurría *in vitro*.

Los corazones de las ratas se criopreservaron en el momento de su sacrificio y se utilizaron posteriormente. Los niveles de expresión de genes relacionados con un ambiente pro-inflamatorio (*Tnf- α* , *iNos*, *Cd274*, *Cxcl10* y *Ccl5*) o pro-resolutivo (*Msr1*, *Alox12*, *Cx3cr1* y *Il10* y *Ccl17*) se analizaron mediante RT-qPCR. Los niveles de RNA mensajero de los marcadores inflamatorios *Tnf- α* , *iNos*, *Cd274* y *Ccl5* mostraban una tendencia, aunque no significativa, a estar reducidos en los animales tratados con EVs en comparación a los tratados con PBS (Figura 23A). Sin embargo, *Cxcl10*, una citocina quimioatrayente, que se caracteriza por ser pro-inflamatoria, parecía estar más aumentada en el grupo tratado con EVs. Por otro lado, los marcadores de macrófagos M2 (Figura 23B), como *Msr1* o *Cx3cr1* aumentaron en la zona infartada de los animales tratados con EVs, siendo este aumento significativo en el caso de *Cx3cr1*. Las citocinas antiinflamatorias *Il10* y *Ccl17* no mostraron cambios entre los dos grupos de animales. Se estudió además la expresión de *Alox12*, una enzima encargada de la síntesis de

mediadores lipídicos pro-resolutivos (SPMs), que participan activamente en los procesos de inflamación favoreciendo la resolución de la misma y que son liberados por células del sistema inmune, entre ellas los macrófagos. Se observó una tendencia a aumentar la expresión de *Alox12* en los animales tratados con EVs.

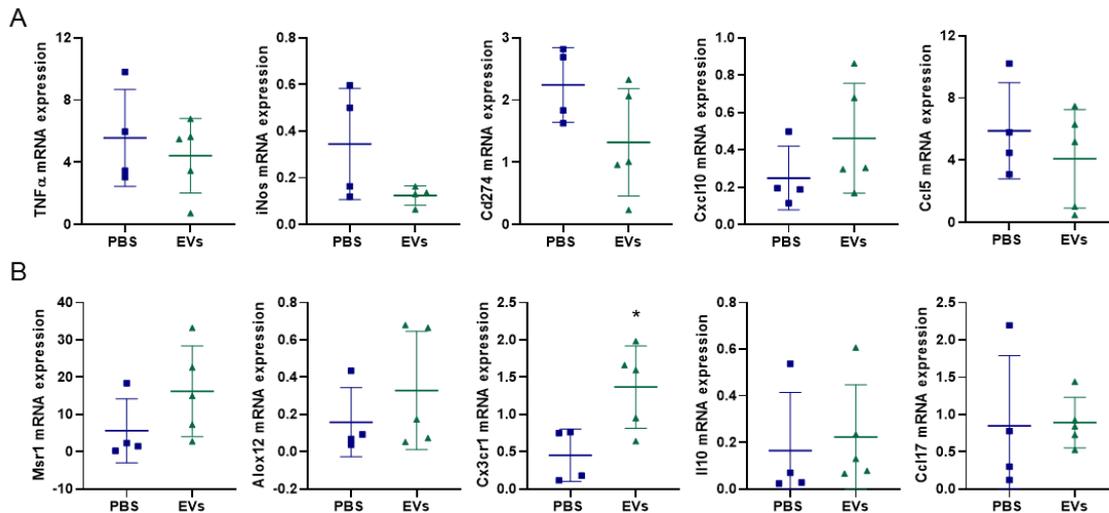


Figura 23. Las EVs modifican la expresión génica en la zona de infarto a 7 días reduciendo la expresión de marcadores de M1. (A) Niveles de expresión del ARNm de genes relacionados con macrófagos M1 e inflamación (*Tnf-α*, *iNos*, *Cd274*, *Cxcl10* y *Ccl5*). (B) Niveles de expresión del ARNm de genes relacionados con macrófagos M2 y resolución de la inflamación (*Msr1*, *Alox12*, *Cx3cr1* y *Il10* y *Ccl17*). Los niveles de expresión génica se cuantificaron mediante RT-qPCR a partir de tejido de la zona infarto de ratas tratadas con PBS y EVs y se normalizaron en cada caso respecto a la expresión de *Gapdh*. Los gráficos representan la media \pm SD. Se utilizó un t-test no pareado para el análisis estadístico. * $p < 0,05$.

Se quiso estudiar también a nivel proteico la expresión de marcadores concretos de macrófagos M1 y M2 en la zona de infarto para determinar la abundancia relativa de ambos fenotipos (Figura 24). En cuanto a los macrófagos M1 se comprobó mediante Western Blot la expresión de iNOS, CCR2 y PD-L1 (Figura 24D). iNOS y CCR2 estaban reducidos significativamente en el grupo de animales tratados con EVs, mientras que PD-L1, a nivel proteico no mostraba diferencias entre el grupo tratado con EVs y el tratado con PBS. En cuanto a los marcadores de macrófagos M2, se estudió la expresión de CX3CR1, MSR1 y CD206 (Figura 24E). La expresión proteica de CX3CR1 era similar en el grupo tratado con EVs y el tratado con PBS, a diferencia de lo que ocurría con su expresión génica, que sí que estaba aumentada significativamente en el grupo tratado con EVs, tal y como se ha mencionado anteriormente. MSR1 tampoco mostró diferencias entre los dos grupos. CD206, a diferencia de los marcadores anteriores, estaba disminuido en el grupo de ratas tratadas con EVs, aunque no de forma significativa.

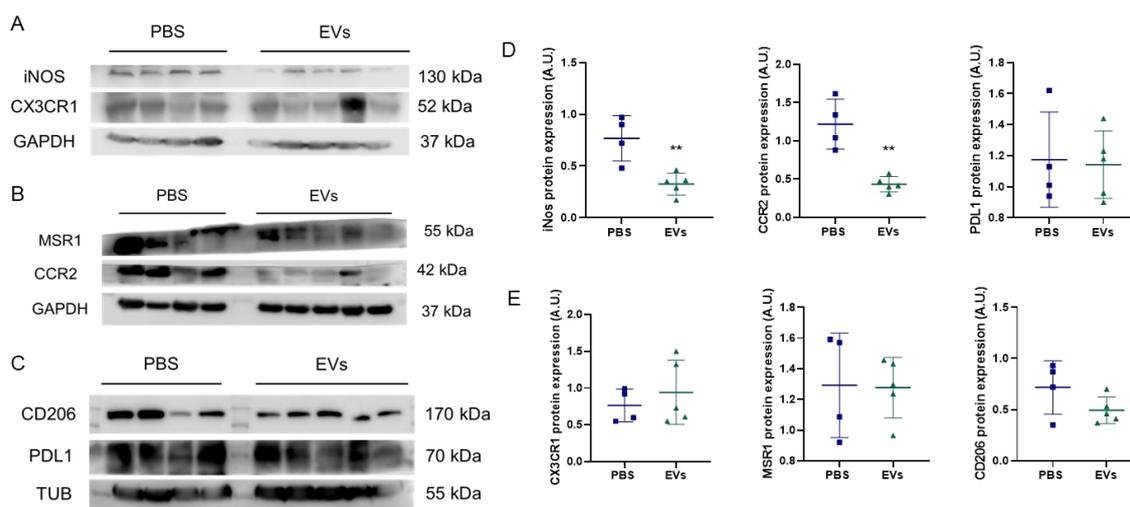


Figura 24. Las EVs reducen la expresión proteica de marcadores de M1. (A) Imágenes representativas de Western Blot de los marcadores de macrófagos iNOS (M1) y CX3CR1 (M2) realizadas a partir de extracto proteico de la zona de infarto de ratas tratadas con PBS y EVs. (B) Imágenes representativas de Western Blot de los marcadores de macrófagos CCR2 (M1) y MSR1 (M2) realizadas a partir de extracto proteico de la zona de infarto de ratas tratadas con PBS y EVs. (C) Imágenes representativas de Western Blot de los marcadores de macrófagos PDL1 (M1) y CD206 (M2) realizadas a partir de extracto proteico de la zona de infarto de ratas tratadas con PBS y EVs. (D) Gráficos representativos de la expresión proteica de los marcadores de M1 iNOS, CCR2 y PDL1. La cuantificación se realizó por densitometría utilizando el software ImageJ. La expresión proteica de iNOS y CCR2 está normalizada a los valores de expresión de GAPDH, mientras que la de PDL1 está normalizada a los valores de expresión de Tubulina. (E) Gráficos representativos de la expresión proteica de los marcadores de M2 CX3CR1, MSR1 y CD206. La cuantificación se realizó por densitometría utilizando el software ImageJ. La expresión proteica de CX3CR1 y MSR1 está normalizada a los valores de expresión de GAPDH, mientras que la de CD206 está normalizada a los valores de expresión de Tubulina. Los gráficos representan la media \pm SD. Se utilizó un t-test no pareado para el análisis estadístico. **p < 0,01.

7.4. El tratamiento con EVs reduce el número de macrófagos M1 infiltrados en la zona de infarto.

Para comprobar si los cambios observados en los niveles de expresión génica y proteica se reflejaban en cambios en el número de macrófagos infiltrados en la zona del infarto, se realizaron inmunofluorescencias marcando diferentes proteínas características de M1 o M2. Se realizó un doble marcaje de las proteínas de interés (verde) junto con el marcaje de F4/80 (rojo), un marcador general de macrófagos. El análisis de los marcadores de M1 CCR2, iNOS y PDL1 mostró que el tratamiento con las EVs reduce la cantidad de macrófagos pro-inflamatorios infiltrados en la zona del infarto (Figura 25), ya que hay una reducción significativa en el número de macrófagos positivos para CCR2 y iNOS (Figura 25A-D) y una tendencia en la disminución de macrófagos positivos para PDL1 (Figura 25E-F).

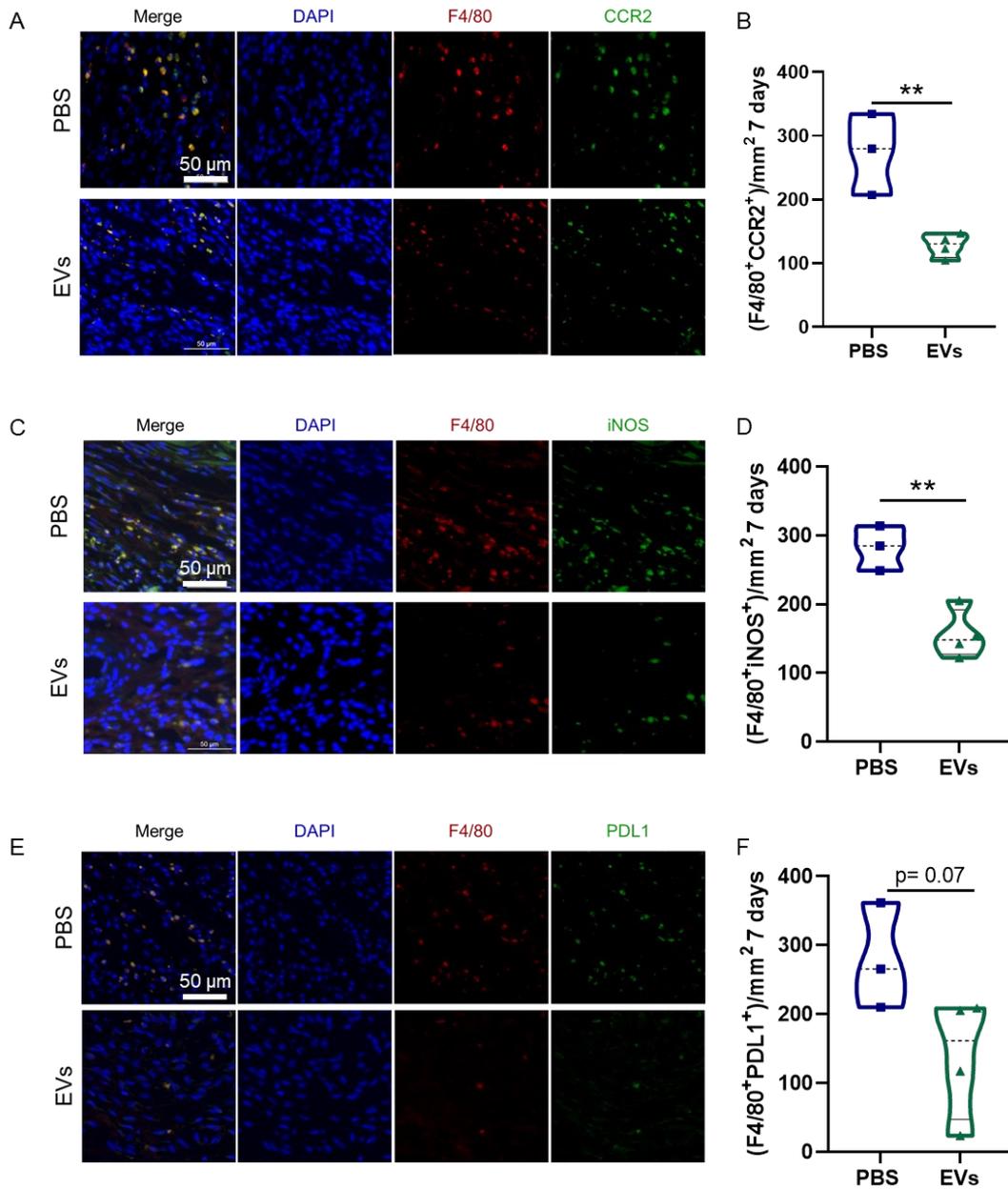
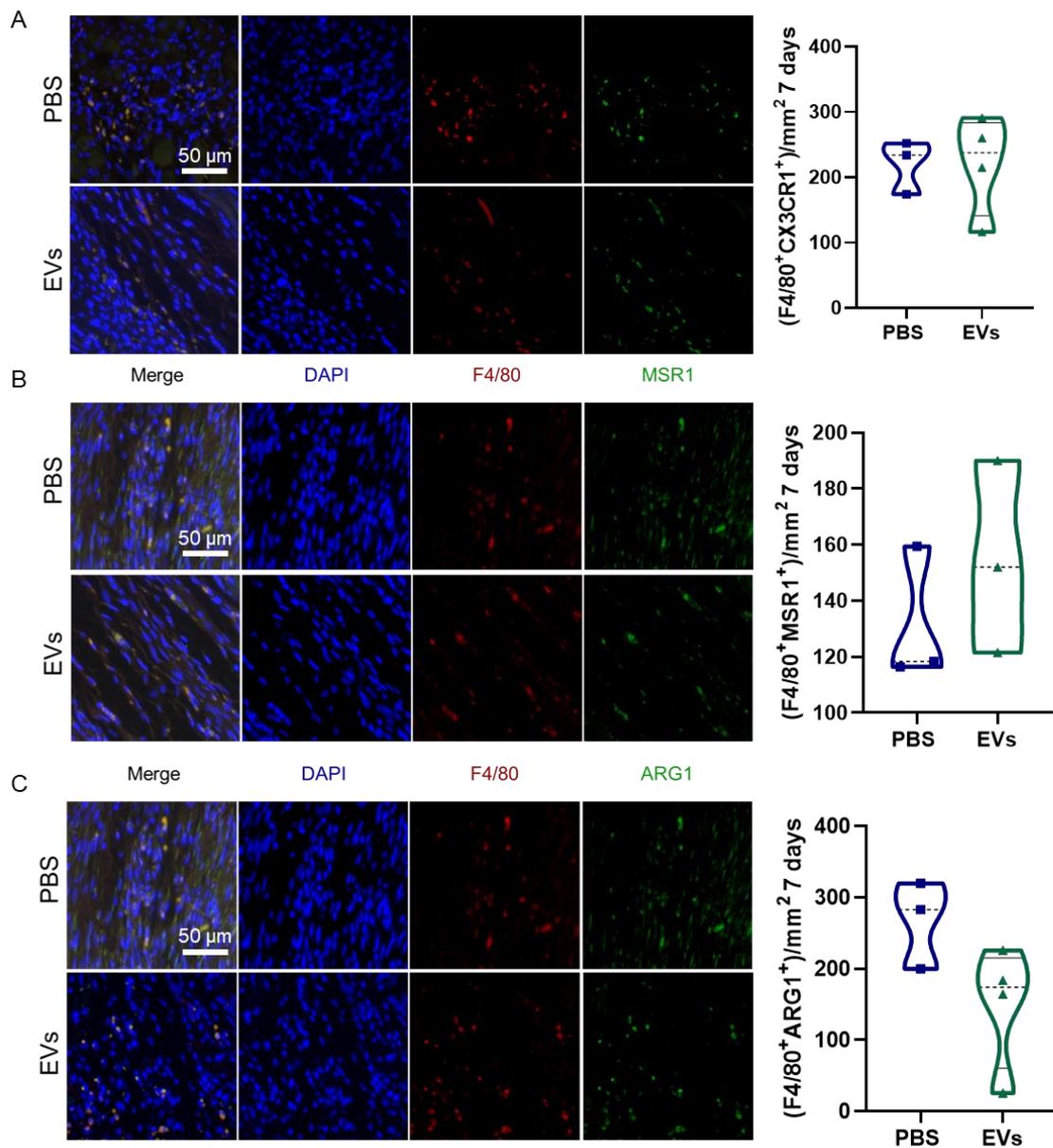


Figura 25. El número de macrófagos M1 infiltrados en la zona infartada a 7 días tras el infarto es menor en el grupo tratado con EVs. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia frente a F4/80 (marcador general de macrófagos, rojo) y CCR2 (marcador de M1, verde) en la zona infartada de secciones de corazón 7 días después del IAM. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 50 μ m. (B) Cuantificación de células doblemente positivas F4/80⁺CCR2⁺ por mm² en el área infartada de ratas tratadas con PBS o EVs 7 días después del IAM. (C) Imágenes representativas de inmunofluorescencia frente a F4/80 (marcador general de macrófagos, rojo) e iNOS (marcador de M1, verde) en la zona infartada de secciones de corazón 7 días después del IAM. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 50 μ m. (D) Cuantificación de células doblemente positivas F4/80⁺iNOS⁺ por mm² en la zona infartada de ratas tratadas con PBS o EVs 7 días después del IAM. (E) Imágenes representativas de inmunofluorescencia frente a F4/80 (marcador general de macrófagos, rojo) y PDL1 (marcador de M1, verde) en la zona infartada de secciones de corazón 7 días después del IAM. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 50 μ m. (F) Cuantificación de células F4/80⁺PDL1⁺ doblemente positivas por mm² en la zona infartada de ratas tratadas con PBS o EVs 7 días después del IAM. Los gráficos representan la media \pm SD. Se utilizó un t-test no pareado para el análisis estadístico. **p < 0,01.

Por otro lado, se evaluó la presencia de macrófagos M2 en la zona del infarto mediante el marcaje de CX3CR1, MSR1, ARG1 y CD206 (Figura 26). Al igual que en el caso anterior, se realizó un doble marcaje de estas proteínas (verde) con F4/80 (rojo) para determinar el número de macrófagos y no interferir con otras células del sistema inmune que expresen esos marcadores pero que no son macrófagos. En este caso, el tratamiento con las EVs no indujo cambios significativos en los macrófagos M2, aunque los macrófagos que expresaban los marcadores ARG1 (Figura 26C) y CD206 (Figura XD) parecían estar reducidos en el grupo tratado con EVs. Por el contrario, el número de macrófagos que expresaban CX3CR1 (Figura 26A) presentes en la zona del infarto era similar entre los grupos tratados con PBS y EVs y el número de macrófagos que expresaban MSR1 (Figura 26B) parecía ser un poco mayor en el grupo tratado con EVs.



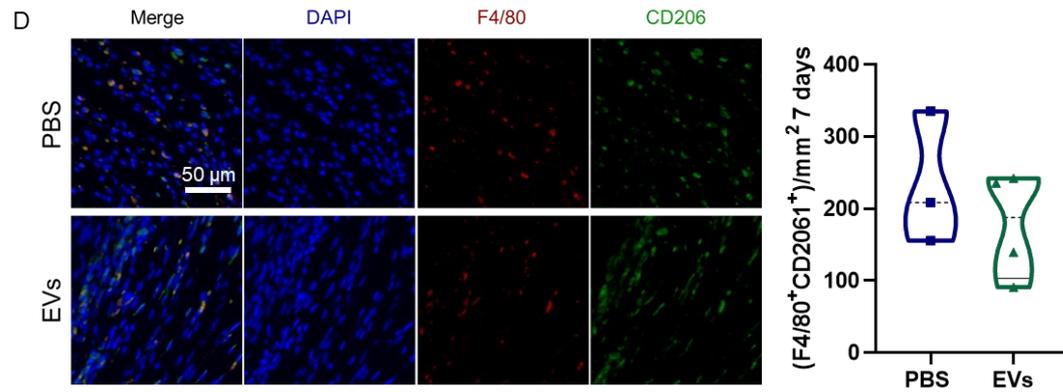


Figura 26. El tratamiento con EVs no produce cambios significativos en el número de M2 infiltrados en la zona de infarto a 7 días tras el IAM. (A) En la izquierda se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia frente a F4/80 (marcador general de macrófagos, rojo) y CX3CR1 (marcador de M2, verde) en la zona infartada de secciones de corazón 7 días después del IAM. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 50 μm . En la derecha se muestra la cuantificación de células doblemente positivas F4/80⁺CX3CR1⁺ por mm^2 en el área infartada de ratas tratadas con PBS o EVs 7 días después del IAM. (B) En la izquierda se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia frente a F4/80 (marcador general de macrófagos, rojo) y MSR1 (marcador de M2, verde) en la zona infartada de secciones de corazón 7 días después del IAM. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 50 μm . En la derecha se muestra la cuantificación de células doblemente positivas F4/80⁺MSR1⁺ por mm^2 en el área infartada de ratas tratadas con PBS o EVs 7 días después del IAM. (C) En la izquierda se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia frente a F4/80 (marcador general de macrófagos, rojo) y ARG1 (marcador de M2, verde) en la zona infartada de secciones de corazón 7 días después del IAM. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 50 μm . En la derecha se muestra la cuantificación de células doblemente positivas F4/80⁺ARG1⁺ por mm^2 en el área infartada de ratas tratadas con PBS o EVs 7 días después del IAM. (D) En la izquierda se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia frente a F4/80 (marcador general de macrófagos, rojo) y CD206 (marcador de M2, verde) en la zona infartada de secciones de corazón 7 días después del IAM. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 50 μm . En la derecha se muestra la cuantificación de células doblemente positivas F4/80⁺CD206⁺ por mm^2 en el área infartada de ratas tratadas con PBS o EVs 7 días después del IAM. Los gráficos representan la media \pm SD. Se utilizó un t-test no pareado para el análisis estadístico.

Para visualizar mejor los cambios en las poblaciones de macrófagos se representaron los resultados de los diferentes marcadores de forma conjunta (Figura 27). En esta gráfica se pueden apreciar la reducción en el número de macrófagos M1 infiltrados en la zona de infarto entre los grupos tratados con PBS e EVs, mientras que en el caso de los macrófagos M2, el número de células infiltradas no mostraba cambios apreciables entre los grupos tratados con PBS y los tratados con EVs.

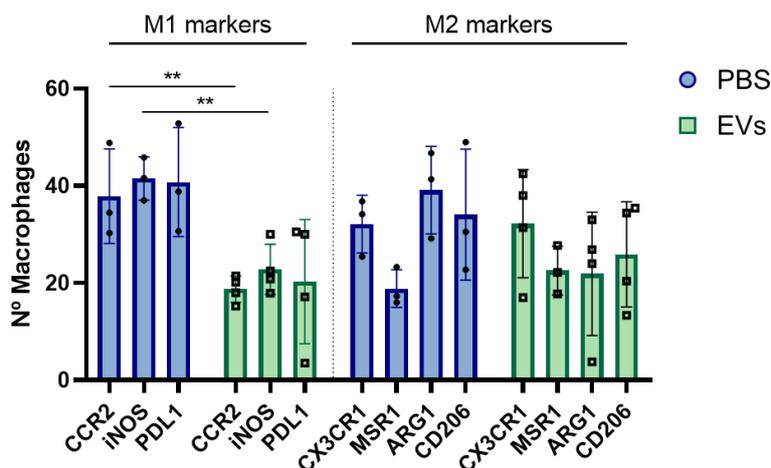


Figura 27. El tratamiento con EVs reduce el número de macrófagos M1 en la zona de infarto sin alterar el número de macrófagos M2 a 7 días tras el IAM. En la gráfica aparece representada la cuantificación conjunta de todos los marcadores de macrófagos estudiados, tanto de M1 como de M2. Se muestra el número de macrófagos infiltrados para cada uno de los marcadores de M1 y M2 en los grupos tratados con PBS (azul) y EVs (verde). Los gráficos representan la media \pm SD. ** $p < 0,01$.

Teniendo en cuenta estos resultados, el tratamiento con EVs conseguía reducir el número de macrófagos M1 pro-inflamatorios infiltrados en la zona del infarto 7 días después del IAM, mientras que no inducía cambios significativos en el número de macrófagos M2 o pro-resolutivos.

El hecho de que no aumenten los macrófagos M2 en la zona del infarto no indica que las EVs no estén favoreciendo el proceso de resolución, simplemente hay que tener en cuenta que las variaciones en los niveles de citocinas y en las poblaciones de células inmunes cambian mucho a lo largo de los días y siguen patrones de expresión distintos a lo largo del tiempo, por lo que la bajada en marcadores de M2 como ARG1 se puede deber al momento concreto en el que se han analizado las poblaciones de macrófagos, pero puede que posteriormente esos niveles aumenten, para ello sería necesario evaluar todas las poblaciones a distintos tiempos tras el IAM. No obstante, es concluyente la bajada que induce el tratamiento con EVs en el número de macrófagos pro-inflamatorios, lo que está indicando que, en parte, las EVs están promoviendo una entrada en la fase de resolución de la inflamación más rápida que el tratamiento con el salino.

Se quiso estudiar también el perfil de macrófagos presentes en la zona del infarto a 21 días tras el IAM. Al igual que en el experimento anterior, se realizó un doble marcaje de los marcadores de M1 (PDL1 y CCR2) y M2 (CD206 y CX3CR1) junto con F4/80. Como se puede observar en la Figura 28, el tratamiento con EVs mantenía un infiltrado de macrófagos M1 bajo en la zona del infarto respecto a los animales tratados con PBS, mientras que el número de macrófagos M2 era similar en los dos grupos. Esto indica que el efecto de las EVs no solo se produce durante los primeros días tras el IAM, sino que se mantiene a lo largo de las diferentes fases, incluida la fase de remodelado que es la que se produce a partir del séptimo día. El hecho de que haya un menor número de macrófagos M1 en la zona de infarto a los 21 días tras el IAM indica que hay un

ambiente menos inflamatorio y, por tanto, se está produciendo la resolución de la inflamación de manera más efectiva que en el caso de los animales tratados con PBS, en los que el número de macrófagos M1 es mayor.

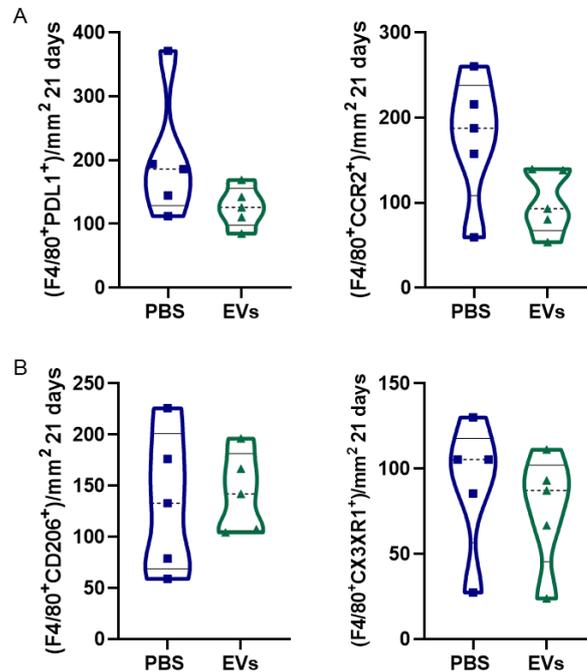


Figura 28. El tratamiento con EVs reduce el número de M1, aunque no significativamente, y no altera el número de M2 infiltrados en la zona de infarto a 21 días tras el IAM. (A) Cuantificación de macrófagos M1 en la zona de infarto. En la izquierda se muestra la cuantificación de células doblemente positivas F4/80⁺PDL1⁺ por mm² en el área infartada de ratas tratadas con PBS o EVs 21 días después del IAM. En la derecha se muestra la cuantificación de células doblemente positivas F4/80⁺CCR2⁺ por mm² en el área infartada de ratas tratadas con PBS o EVs 21 días después del IAM. (B) Cuantificación de macrófagos M2 en la zona de infarto. En la izquierda se muestra la cuantificación de células doblemente positivas F4/80⁺CD206⁺ por mm² en el área infartada de ratas tratadas con PBS o EVs 21 días después del IAM. En la derecha se muestra la cuantificación de células doblemente positivas F4/80⁺CX3XR1⁺ por mm² en el área infartada de ratas tratadas con PBS o EVs 21 días después del IAM. Los gráficos representan la media \pm SD. Se utilizó un t-test no pareado para el análisis estadístico de cada uno de los marcadores.

En definitiva, estos resultados muestran que el tratamiento con las EVs derivadas de DP-MSK induce cambios en las poblaciones de los macrófagos, no solo a nivel génico y proteico, sino que estos cambios se traducen en variaciones en el número de macrófagos presentes en la zona de infarto.

7.5. La zona infartada de ratas tratadas con EVs tienen un perfil de citocinas diferente a la de ratas tratadas con PBS

A continuación, se quiso hacer un estudio más profundo del ambiente inflamatorio en la zona infartada 7 días después de que tuviese lugar el IAM. Para ello se evaluó a nivel proteico la expresión de diferentes citocinas relacionadas con la inflamación mediante el uso de un array de citocinas que permitía estudiar la expresión simultánea de moléculas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. Se empleó el extracto proteico obtenido a partir de tejido de la zona infartada de 4 animales tratados con PBS y 4 tratados con EVs. Únicamente se observaron cambios significativos en la expresión

de cuatro citocinas, IL-10, CXCL10, GM-CSF y LIX (Figura 29B). El resto de las que aparecen representadas en la Figura 29 (TIMP-1, VEGF, CXCL7, CCL3 y CCL20) mostraron pequeños cambios entre los dos grupos, aunque no significativos. Por el contrario, todas las citocinas que no aparecen representadas en la figura pero que estaban en el array, no mostraron cambios apreciables entre los dos grupos, por lo que se decidió no incluirlas.

IL10, una de las citocinas que muestra cambios significativos entre los dos grupos, es una citocina antiinflamatoria que aparece más expresada en los animales tratados con EVs. Este resultado refuerza la hipótesis de que las EVs inducen mejoras en el IAM en parte, favoreciendo la resolución de la inflamación. CXCL10 en general se considera una citocina proinflamatoria. En este caso también está aumentada significativamente en el grupo de los animales tratados con EVs, como ya ocurrió al determinar por RT-qPCR su expresión génica en la zona de infarto. Esto puede venir explicado porque el aumento de CXCL10 se ha visto que está relacionado con la supresión de la fibrosis que ocurre a lo largo de los primeros días tras el IAM. Está descrito que GM-CSF, también considerada una citocina proinflamatoria, aumenta en la zona infartada tras el IAM, siendo su papel esencial en el proceso inflamatorio. Estudios previos indican que GM-CSF es sintetizado principalmente por los fibroblastos presentes en la zona dañada y contribuye al reclutamiento de macrófagos y neutrófilos en la zona isquémica, que a su vez comienzan a sintetizar otras citocinas como CCL2. En general parece que esta citocina está presente durante las primeras fases tras el IAM y sus niveles descienden en la fase resolutive. El hecho de que su expresión fuese significativamente mayor en el grupo tratado con EVs podría deberse al momento en el que se han realizado los experimentos, ya que es un punto temporal de transición entre la fase inflamatoria y el inicio de la resolución. Teniendo en cuenta que la expresión de citocinas cambia mucho a lo largo del tiempo, el hecho de observar citocinas proinflamatorias aumentadas (como CCL3, CCL20 o CXCL7) puede deberse al momento del estudio, por lo que sería necesario evaluar la expresión de estas citocinas a lo largo de diferentes días tras el IAM. De esta forma se podría comprobar si el tratamiento con EVs altera los ciclos de expresión de estas citocinas.

El tratamiento con EVs produjo también un aumento en la expresión de VEGF, que es el principal inductor de angiogénesis en la fase reparativa tras el IAM. TIMP-1, un inhibidor de MMPs, también presentaba una expresión mayor en el grupo de animales tratados con EVs. Esta molécula es muy importante en la transición hacia la fase reparativa, ya que se encarga de inhibir a las MMPs que rompen la matriz extracelular dañada durante las primeras etapas tras el IAM para poder comenzar la fase de generación de nueva matriz extracelular que acabará constituyendo la cicatriz del infarto.

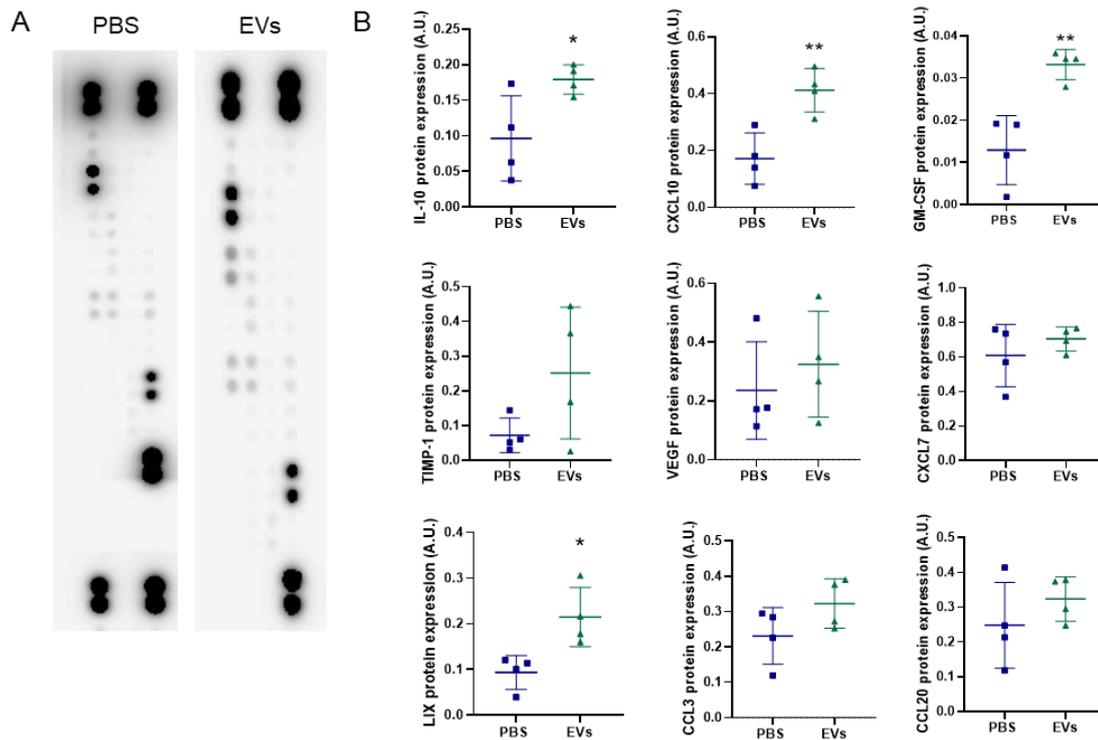


Figura 29. Las EVs modifican la expresión de citocinas en la zona de infarto a 7 días tras el IAM. (A) Imágenes representativas del array de citocinas realizado en homogeneizado proteico de la zona infartada de ratas tratadas con PBS y EVs. Cada citocina aparece representada por duplicado. (B) Cuantificación por densitometría de la expresión proteica de IL10, CXCL10, GM-CSF, TIMP-1, VEGF, CXCL7, LIX, CCL3 y CCL20 en ratas tratadas con PBS y EVs. Los gráficos representan la media \pm SD. Se utilizó un t-test no pareado para el análisis estadístico. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

En general este experimento indicó que, aunque las EVs parecen estar ejerciendo una transición hacia la resolución de la inflamación debido a la reducción en la expresión de marcadores proinflamatorios de macrófagos y en el número total de macrófagos M1 infiltrados, parece que a los 7 días, el grupo tratado con EVs todavía se encuentra en una fase intermedia en la que alguna citocinas proinflamatorias están aumentadas y todavía no se ha incrementado el número de macrófagos M2.

7.6. Las EVs reducen la infiltración y la activación de los neutrófilos tras el IAM

Además del efecto sobre los macrófagos, se quiso determinar si el tratamiento con EVs inducía cambios sobre otra de las poblaciones del sistema inmune más importantes en el contexto del infarto, los neutrófilos. Los neutrófilos son de las primeras células del sistema inmune que acuden a la zona dañada, por lo que tienen un pico de infiltrado en la zona del infarto durante los primeros días tras el IAM. Marcando la elastasa, un marcador de neutrófilos, se comprobó mediante inmunofluorescencia que los animales tratados con EVs presentaban una tendencia a tener menor número de neutrófilos infiltrados que los animales tratados con PBS (Figura 30). Normalmente el pico de neutrófilos se produce a los 3-4 días tras el IAM y posteriormente van disminuyendo para favorecer el cambio fenotípico de los macrófagos, de manera que a medida que disminuyen los neutrófilos, aumentan los macrófagos M2. En este estudio,

la eutanasia de las ratas se realizó al séptimo día tras el IAM, por lo que no se pudo analizar la población de neutrófilos en su pico de infiltrado. No obstante, sí que se pudo observar una tendencia de las EVs a reducir el número de neutrófilos presentes a los 7 días. Esto podría deberse a un menor pico de infiltrado de los neutrófilos desde los primeros días tras el IAM; pero para comprobar esto habría que hacer nuevos experimentos *in vivo*, eutanasiando a las ratas a diferentes días tras el IAM.

En general, los resultados obtenidos en el estudio de los macrófagos y de los neutrófilos tienen sentido en su conjunto, ya que, lo que dan a entender es que el tratamiento con las EVs está reduciendo la fase proinflamatoria al reducir el infiltrado de células proinflamatorias como los neutrófilos o los macrófagos M1.

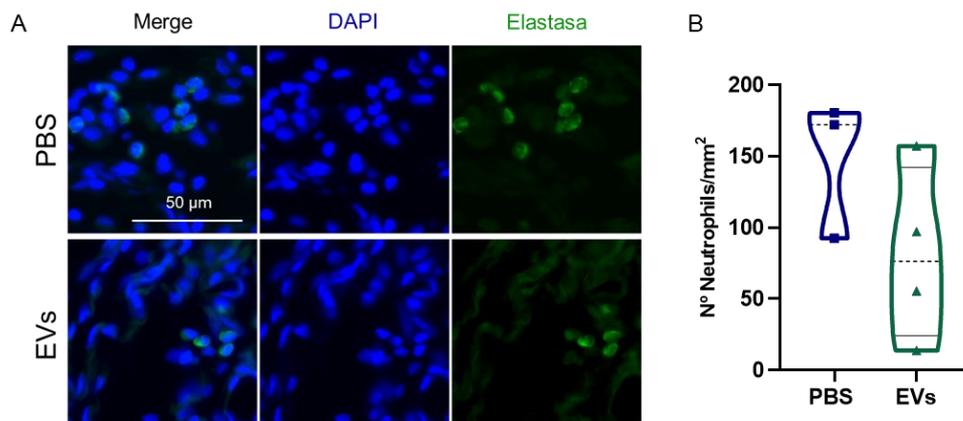


Figura 30. Las EVs parecen reducir el número de neutrófilos infiltrados en el infarto a 7 días tras el IAM. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia frente a elastasa (marcador de neutrófilos, verde) en la zona infartada de secciones de corazón 7 días después del IAM. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 50 µm. (B) Cuantificación de células positivas para elastasa por mm² en el área infartada de ratas tratadas con PBS o EVs 7 días después del IAM. Los gráficos representan la media ± SD. Se utilizó un t-test no pareado para el análisis estadístico.

Por otro lado, se quiso comprobar si el tratamiento con EVs afectaba a la activación de los neutrófilos. Para ello se cuantificaron los niveles de mieloperoxidasa (MPO), cuya liberación está directamente relacionada con la activación de este tipo de células. Se comprobó que el tratamiento con EVs promovía una reducción significativa en los niveles de MPO a 7 días tras el IAM (Figura 31), lo cual, junto con el hecho de que haya menos neutrófilos en la zona del infarto, podría estar indicando una aceleración del proceso de resolución de la inflamación.

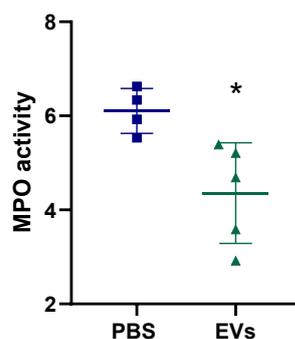


Figura 31. La activación de los neutrófilos es menor en el grupo tratado con EVs a 7 días tras el IAM. Cuantificación de la actividad MPO en tejido homogeneizado de la zona de infarto de ratas tratadas con PBS o EVs. La cuantificación se realizó mediante un kit comercial colorimétrico. Los gráficos representan la media \pm SD. Se utilizó un t-test no pareado para el análisis estadístico. * $p < 0,05$.

7.7. El tratamiento con EVs de DP-MSC no afecta a la angiogénesis tras el IAM

Para tener una visión global de lo que estaba sucediendo en el infarto en presencia o ausencia del tratamiento con EVs, se quiso evaluar también la formación de vasos sanguíneos en la zona afectada. Este estudio se realizó marcando por inmunofluorescencia α -SMA que además de ser un marcador de miofibroblastos, es una proteína que aparece expresada en la vasculatura, por lo que mediante técnicas de inmunomarcaje se pueden observar fácilmente los vasos. Se realizó la cuantificación de los vasos sanguíneos en cortes de la zona de infarto tanto de ratas eutanasiadas a los 7 días tras el IAM (Figura 32A) como de ratas eutanasiadas a los 21 días tras el IAM (Figura 32B). Como se puede observar en la Figura 32, el tratamiento con EVs no produjo ningún cambio significativo en la angiogénesis de las ratas ni a 7 ni a 21 días tras el infarto.

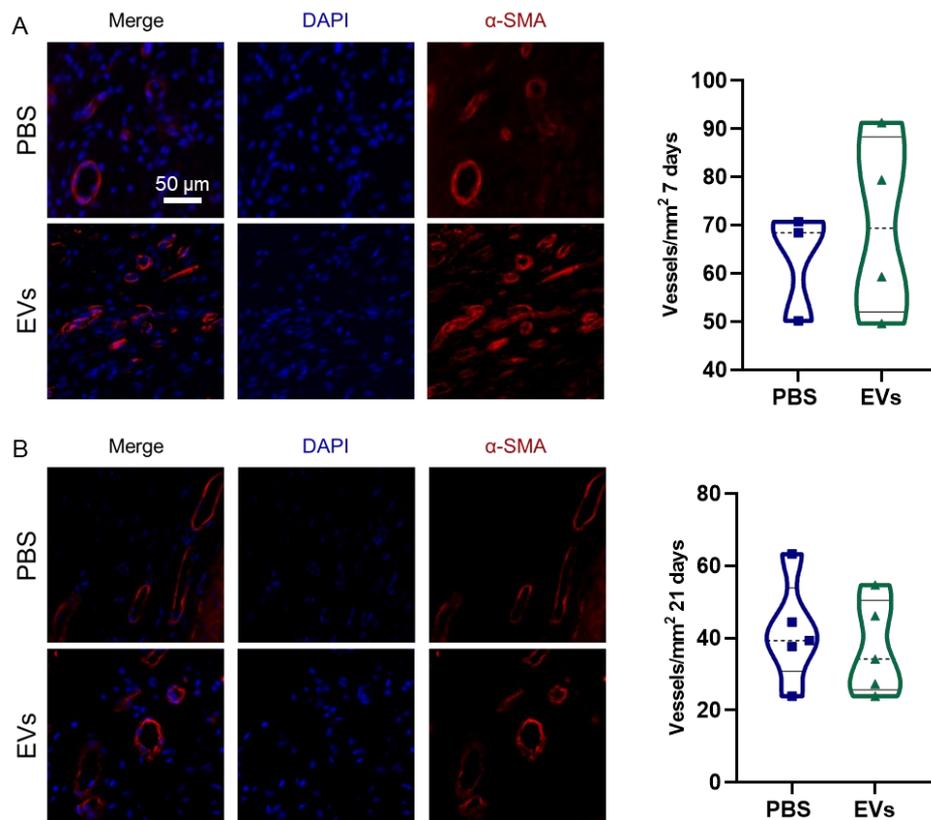
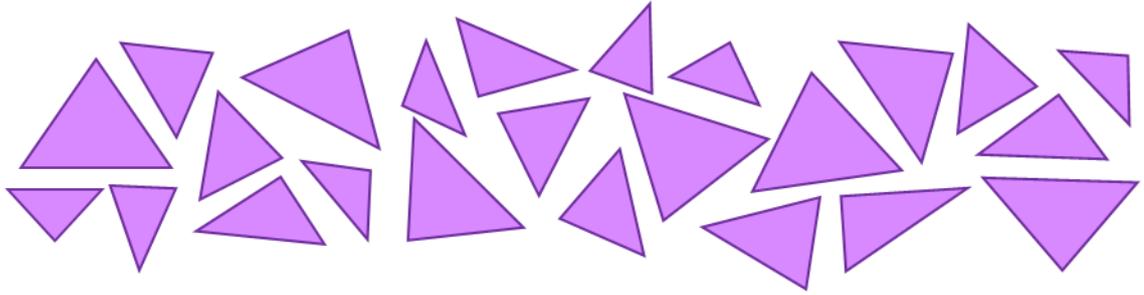


Figura 32. Las EVs derivadas de DP-MSC no producen cambios a nivel de angiogénesis en el IAM. (A) En la izquierda se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia frente a α -SMA (marcador de vasos, rojo) en la zona infartada de secciones de corazón 7 días después del IAM. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 50 μ m. En la derecha se muestra la cuantificación del número de vasos por mm² a 7 días tras el IAM en los grupos tratados con PBS y con EVs (B) En la izquierda se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia frente a α -SMA (marcador de vasos, rojo) en la zona infartada de secciones de corazón 21 días después del IAM. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra

de escala = 50 μm . En la derecha se muestra la cuantificación del número de vasos por mm^2 a 21 días tras el IAM en los grupos tratados con PBS y con EVs. Los gráficos representan la media \pm SD. Se utilizó un t-test no pareado para el análisis estadístico.

DISCUSIÓN



1. Las EVs derivadas de MSC como producto biológico

Una de las estrategias terapéuticas que está emergiendo en los últimos años frente al IAM es el empleo de la terapia celular, que ya ha demostrado tener efectos beneficiosos en diferentes tipos de patologías. Teniendo en cuenta que una de las características de la patofisiología del IAM es la respuesta inflamatoria que se desencadena tras el proceso isquémico [48], dentro de la terapia celular, las MSC se han postulado como buenos candidatos debido a sus capacidades inmunomoduladoras [136]. Aunque tradicionalmente no se le ha dado mucha importancia al tratamiento de la inflamación en el contexto del IAM, a lo largo de los últimos años se ha visto que los diferentes componentes del proceso inflamatorio pueden ser buenas dianas terapéuticas para reducir las consecuencias negativas del IAM a largo plazo, como puede ser el remodelado cardíaco adverso y el aumento del riesgo de fallo cardíaco.

La terapia con MSC ha demostrado su potencial terapéutico en diferentes patologías, entre ellas la patología cardíaca. No obstante, los estudios con estas células han mostrado que el efecto terapéutico de las mismas viene dado por su acción paracrina, mediada principalmente por las EVs secretadas por las células. Las EVs recapitulan los efectos terapéuticos de las células de las que se originan, por lo que las EVs derivadas de MSC también presentan efectos inmunomoduladores [244]. No obstante, dependiendo de la fuente tisular de la que provengan las MSC, los efectos terapéuticos de las EVs pueden cambiar ligeramente. En general las fuentes de MSC más empleadas en terapia son la médula ósea, el tejido adiposo y el cordón umbilical o gelatina de Wharton [338]. En este trabajo se han empleado EVs derivadas de MSC de pulpa dental (DP-MSC), una fuente de MSC con un uso poco extendido, pero que demostrado tener capacidades inmunomoduladoras y ser una fuente de fácil acceso con una capacidad proliferativa elevada [339].

El uso de EVs en terapia presenta todavía diferentes retos que dificultan su empleo como producto biológico para el tratamiento de enfermedades. Uno de estos retos consiste en conseguir un producto final estandarizado que se pueda obtener en grandes cantidades y que presente las mismas características fisicoquímicas y funcionales independientemente de la fuente individual de la que se obtenga. Como ya se ha mencionado, fuentes tisulares distintas dan lugar a EVs con propiedades diferentes; sin embargo, también se ha visto que puede existir variabilidad en las EVs obtenidas de la misma fuente tisular de distintos individuos. Actualmente, la cantidad de EVs que se necesitan para realizar un tratamiento es muy grande, lo que hace difícil que se puedan obtener de una única biopsia. Esto ha llevado a la necesidad de buscar alternativas que permitan obtener cantidades mucho más grandes de EVs sin que esto afecte a la funcionalidad de las mismas. Algunas de estas estrategias se basan en la modificación de las MSC de origen para aumentar la liberación de EVs por parte de estas células. En este trabajo, por ejemplo, se han empleado MSC inmortalizadas genéticamente mediante la sobreexpresión de TERT para conseguir alargar su tiempo de vida en cultivo y poder obtener más EVs de la misma biopsia celular. En este sentido, hemos comprobado que las EVs derivadas de las líneas inmortalizadas no presentan el

producto proteico de TERT en su interior, pero sí que contienen el RNAm codificante para hTERT. A la hora de dar el salto a la clínica, la presencia de *hTERT* en las EVs puede suponer un problema, ya que, al tratarse de un oncogen, la AEMPS no lo podría aprobar como producto biológico de administración clínica. Esto hace necesario optimizar el protocolo de immortalización de las MSC, reduciendo y controlando el número de copias del gen de *hTERT* que se integra en las células, hasta conseguir el menor número de copias que permita la immortalización de las MSC sin que se cargue el producto génico en las EVs.

Pese a la mejora en el rendimiento de producción de EVs que se consigue al immortalizar la fuente celular, esta estrategia todavía sigue siendo insuficiente para conseguir la cantidad de EVs que se necesitan en modelos preclínicos con animales de gran tamaño o en ensayos clínicos. Por ello, hasta que se desarrollen estrategias que permitan obtener de manera continuada EVs de la misma fuente de MSC sin que cambien sus características a largo plazo, es necesario utilizar distintas biopsias de MSC para conseguir las cantidades necesarias para los tratamientos. Uno de los objetivos de este trabajo ha consistido en comparar EVs obtenidas a partir de tres biopsias distintas de DP-MSK immortalizadas en cuanto a sus características fisicoquímicas, su contenido en proteínas, lípidos y miRNAs y su funcionalidad. La caracterización de las EVs mediante NTA, DLS y microscopía electrónica ha mostrado una distribución de tamaño de entre 50-200 nm en las EVs de todas las biopsias de MSC, siendo este el tamaño estándar que presentan las sEVs (antes conocidas como exosomas), de acuerdo a las guías de la ISEV [196]. Estas técnicas de caracterización también han permitido comprobar que, independientemente de la biopsia, las EVs presentan la misma morfología y composición fisicoquímica en cuanto a marcadores de sEVs analizados por Western Blot y por ExoView. Para la comparación en mayor profundidad de las EVs procedentes de las tres biopsias, se realizó un análisis ómico del contenido en proteínas, lípidos y miRNAs.

El análisis proteómico mostró que un 36,9% del total de proteínas encontradas estaban presentes en las EVs de las tres biopsias, mientras que un 61,8% eran comunes, al menos, a dos biopsias. Tras analizar los procesos biológicos en los que estaban implicadas las proteínas presentes en las EVs de todas las biopsias por separado, se pudo comprobar que, aunque el porcentaje de proteínas comunes a todas las EVs no era muy elevado, los procesos biológicos en los que estaban implicadas las proteínas de cada tipo de EVs eran iguales en las de las tres biopsias. Esto indica que las funciones biológicas en las que están implicadas las EVs son similares independientemente de la biopsia de la que se obtengan. Los procesos biológicos en los que estaban implicadas las proteínas presentes en las EVs estaban relacionados con la organización de la matriz extracelular, el transporte, la adhesión o la respuesta inmune. Esto mismo ha sido descrito en otros estudios proteómicos de EVs de MSC [340], [341], pero obtenidas de otras fuentes tisulares, fundamentalmente médula ósea. El hecho de que las proteínas presentes en las EVs de MSC de distintas fuentes estén relacionadas con los mismos procesos biológicos indica que, en parte, el cargo proteico de las EVs ejerce funciones similares independientemente del origen de las MSC.

El análisis lipidómico mostró también que la composición lipídica de las EVs obtenidas de diferentes biopsias era prácticamente la misma, indicando que, a diferencia de lo que ocurre con el cargo proteico que es más variable, el contenido en lípidos es estable cuando la fuente celular tiene el mismo origen tisular. Las EVs de DP-MSC tienen un alto contenido en fosfatidilcolina y esfingomiélin. Esto ya fue descrito por Lai, R. C. *et al*, quienes describieron que los exosomas contenidos en el medio condicionado de MSC contenían colesterol, esfingomiélin y fosfatidilcolina [285]. En este caso los exosomas procedía de MSC obtenidas a partir de células embrionarias, que habían demostrado tener las mismas características que la de médula ósea y tejido adiposo [342]. Otro estudio de Zhan, Q. *et al*. demostró que un mayor contenido de fosfatidilcolina en la membrana de las EVs aumenta su captación por parte de la línea celular MDA-MB-231 [343]. Teniendo en cuenta que este grupo lipídico es el mayoritario en las EVs de DP-MSC, puede que la captación de este tipo de EVs sea más fácil que la de otras que tengan un contenido menor de fosfatidilcolina. En definitiva, el contenido lipídico varía en función de la fuente tisular y puede afectar a aspectos como la estabilidad de las EVs o su captación por parte de las células receptoras.

Por último, el análisis del contenido en miRNAs mostró que todas las EVs contenían más de 100 miRNAs distintos. De todos ellos, 99, lo que suponía un 46% del total, estaban presentes en las EVs de las tres biopsias, y 172, el 80%, en las EVs de al menos dos de las biopsias. Esto indica que el contenido en miRNAs es más estable entre las distintas biopsias que el contenido proteico. El análisis de miRNAs en las EVs derivadas de MSC se ha realizado en numerosos estudios, pero en la mayoría de ellos se empleaban MSC de médula ósea o tejido adiposo, por lo que el estudio de los miRNAs presentes en las EVs de DP-MSC todavía está poco explorado. Baglio, S. R. *et al*. demostraron que el contenido en RNAs no codificantes de las EVs de MSC dependía del origen tisular de las MSC, afectando a sus propiedades terapéuticas [344]. En su estudio, establecieron los 20 miRNAs más abundantes en EVs derivadas de MSC de médula ósea y tejido adiposo. Comparando sus datos con los obtenidos en este trabajo, hay tres miRNAs que se sitúan entre los 20 más abundantes en las EVs obtenidas a partir de las MSC de los tres tejidos (hsa-let-7a-5p, hsa-miR-21-5p y hsa-miR-92a-3p). Estos miRNAs parecen estar conservados en las EVs de las MSC independientemente de la fuente celular. Por otro lado, atendiendo al resto de los 20 miRNA más abundantes en las EVs de DP-MSC se ha observado la presencia de miRNAs como el miR-223-3p, o el let-7c-5p, que se han descrito como miRNAs capaces de inducir la polarización hacia macrófagos M2 [345]. Se ha descrito también que el miR-223 induce mejoras en el ámbito del IAM [346]. Además de estos, el miR-125a-5p, que, aunque no forma parte de los 20 más abundantes también se ha encontrado en las EVs de DP-MSC, se ha relacionado con la polarización hacia macrófagos M2. El miR-451a, el miR que se ha encontrado más expresado en las EVs de DP-MSC, se ha relacionado con la polarización de macrófagos y con la atenuación de la inflamación [347]. El miR-21-5p, uno de los que están presentes en las EVs de los distintos tipos de MSC, se ha relacionado con la activación de rutas de señalización pro-angiogénicas [292]. El miR-150b, otro de los 20 más abundantes, se ha relacionado con una mejora

de la función cardíaca y una disminución de la apoptosis en el IAM [348]. El análisis de los procesos biológicos con los 20 miRNAs más abundantes en las EVs, mostró que muchos de estos procesos en los que estaban implicados los miRNAs tenían relación con el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. En concreto, el tercer proceso biológico con una mayor significancia estadística era la diferenciación de macrófagos. Todo esto indica que, en parte, la capacidad inmunomoduladora de las EVs está mediada por los miRNAs contenidos en su interior, que son capaces de actuar sobre células del sistema inmune modulando sus respuestas.

En conjunto, toda la caracterización de las EVs mediante las distintas técnicas ha demostrado que las EVs obtenidas de diferentes biopsias no son exactamente iguales, pero son bastante parecidas y comparten las características esenciales que tienen que tener las sEVs en cuanto a tamaño, marcadores y morfología. El análisis de su cargo ha mostrado que el contenido en proteínas y miRNAs se mantienen más o menos estable, siendo más parecido el contenido en miRNAs entre las EVs de diferentes biopsias. Sin embargo, el contenido en lípidos es prácticamente igual entre las biopsias, probablemente porque la mayor parte de los lípidos se encuentran constituyendo la membrana de las EVs y son menos los que se seleccionan como cargo para transportarlos en el interior de las EVs. Pese a las pequeñas diferencias que puedan existir en el contenido de las EVs obtenidas de diferentes biopsias, no parece que esto afecte a su funcionalidad, ya que tanto en los ensayos *in vitro* como en los ensayos *in vivo* las EVs de las tres biopsias de DP-MSC funcionan por igual, sin haber cambios significativos entre ellas.

2. Capacidad inmunosupresora de las EVs de DP-MSC *in vitro*

En este estudio, además de determinar las características fisicoquímicas de las EVs y comprobar que no había una gran diferencia entre las EVs de distintas biopsias de DP-MSC, se quiso determinar si estas diferencias tampoco existían a nivel funcional. Teniendo en cuenta que uno de los objetivos del trabajo consistía en determinar el efecto de las EVs sobre la respuesta inmune que se produce en el IAM, se realizaron previamente ensayos *in vitro* para evaluar el efecto funcional de estas EVs sobre células del sistema inmune.

Como se ha descrito en la introducción, los macrófagos son uno de los tipos celulares que mayor implicación tienen en la respuesta inmune tras el IAM [60], por lo que se quiso ver el efecto de las EVs sobre estas células. Diferentes estudios han demostrado que las EVs de MSC pueden polarizar los macrófagos desde un fenotipo pro-inflamatorio o M1 hacia un fenotipo pro-resolutivo o M2 [233], [234]. En todos estos casos, las EVs se obtenían a partir de médula ósea o tejido adiposo; no obstante, nuestro grupo hizo un estudio previo en el que demostró que las EVs de DP-MSC precondicionadas con un cóctel de citocinas era capaces de inducir esta polarización en los macrófagos [237]. En el trabajo actual se quiso demostrar que en ausencia de precondicionamiento de las MSC, las EVs eran capaces de inducir la polarización hacia

M2 y que esta capacidad era independiente de la biopsia de células empleada. La diferenciación de los macrófagos se realizó a partir de monocitos derivados de sangre periférica, ya que permitía obtener fenotipos de M1 y M2 más realistas que los que se obtienen a partir de líneas celulares comerciales como la línea THP1. Se observó que las EVs derivadas de las tres biopsias de DP-MSC eran capaces de repolarizar los macrófagos que recibían señales de diferenciación a M1 hacia un fenotipo M2-like que se caracterizaba por un aumento del marcador de M2 CD163 y una reducción de los marcadores de M1 CD80, CD86 y HLA-DR al analizarlos por citometría. La comprobación de marcadores de M1 y M2 por RT-qPCR y ensayos ELISA demostró que, efectivamente, el tratamiento con las EVs inducía la aparición de un fenotipo de macrófagos similar al de los M2, aunque sin ser exactamente iguales. Los experimentos *in vitro* se realizaron con dos dosis distintas de EVs ($2 \cdot 10^9$ y $4 \cdot 10^9$ partículas/ml) para comprobar si los efectos dependían de la dosis empleada. Se vio que, aunque la dosis baja era capaz de inducir cambios en el fenotipo acercándolo hacia el de los M2, la dosis alta era más efectiva en la repolarización de estas células. Además de comprobar el fenotipo de los macrófagos, se determinó que a nivel funcional también eran más similares a los M2 tras el tratamiento con las EVs realizando un experimento de eferocitosis. La eferocitosis es esencial en las primeras etapas tras el IAM para que se acabe desencadenando la resolución de la inflamación [39], por lo que el hecho de que las EVs aumenten la capacidad de eferocitosis de los macrófagos *in vitro* podría indicar que es uno de los mecanismos por los que en modelos *in vivo* también inducen efectos terapéuticos.

Además de los macrófagos, los neutrófilos son otro de los tipos celulares esenciales en la respuesta inflamatoria. Cuando hay un estímulo inflamatorio los neutrófilos se activan y viajan hacia la zona dañada. Estas células se encargan de fagocitar bacterias o microorganismos causantes del estímulo inflamatorio o, en el caso de la inflamación estéril, como ocurre en el IAM, fagocitan restos celulares presentes en la zona afectada [84]. Al activarse los neutrófilos se degranulan liberando compuestos como MPO que aumentan la respuesta inflamatoria. Sin embargo, pese a que su acción pueda inducir un mayor reclutamiento de células inmunes o daño tisular si se mantienen más tiempo de lo necesario, se ha visto que el papel de los neutrófilos en los procesos inflamatorios es esencial y que, si no están presentes, los resultados clínicos pueden ser adversos [85], [86]. Por ello, se decidió estudiar también el efecto que tenían las EVs sobre los neutrófilos, primero *in vitro* y posteriormente en el modelo *in vivo*. Por un lado, se quiso ver el efecto de las EVs en presencia de un estímulo inflamatorio que indujese la activación de los neutrófilos y, por otro lado, se quiso ver el efecto de las EVs sobre neutrófilos sin estimular. El estímulo inflamatorio empleado fue el LPS, que ya se ha descrito en estudios previos que induce una respuesta inflamatoria en los neutrófilos *in vitro* [349]. El tratamiento de los neutrófilos con LPS indujo su activación, aumentando la expresión de los receptores TLR2 y TLR4, así como del receptor ALX. La sobreexpresión de los receptores TLR en los neutrófilos tras un estímulo inflamatorio ya fue descrita previamente por Tsuda, Y. *et al.* [350], quienes describieron dos subtipos de neutrófilos, siendo el subtipo más inflamatorio el que presentaba una mayor expresión

de los receptores TLR. La señalización que se produce a través de estos receptores activa la síntesis de citocinas proinflamatorias que promueven un mayor reclutamiento de neutrófilos. Por otro lado, la estimulación con LPS también aumenta la expresión del receptor ALX. Este receptor, también conocido como FPR2, se ha relacionado con la activación de rutas de resolución de la inflamación, por lo que en varios estudios lo han considerado una posible diana terapéutica frente a enfermedades que cursan con inflamación [336], [351]–[353]. Aunque parezca contradictorio, se ha descrito que este receptor se puede activar tanto con ligandos pro-resolutivos como proinflamatorios dando lugar a respuestas opuestas [354]. En relación a los estímulos inflamatorios, la activación de este receptor ya se ha descrito previamente en presencia de estímulos bacterianos [355], [356], que podría ser similar a lo que está ocurriendo en presencia del LPS. Sin embargo, en nuestro estudio no solo el LPS induce un aumento en la expresión de este receptor, sino que el tratamiento de los neutrófilos con las EVs también aumenta su expresión. En este caso nosotros hipotetizamos que las EVs, debido a su naturaleza inmunomoduladora, estarían activando rutas de resolución de la inflamación a través de ALX y no rutas pro-inflamatorias, aunque es necesario hacer experimentos más dirigidos para poder comprobar esta hipótesis. Volviendo de nuevo a la expresión de los receptores TLR, las EVs también aumentan su expresión en los neutrófilos en ausencia de LPS y en el caso de TLR4 el aumento es sinérgico cuando se añaden las EVs junto con el LPS. En conjunto estos resultados parecen indicar que *in vitro* las EVs favorecen en cierta medida la activación de los neutrófilos, pero también es cierto que para que los neutrófilos alcancen un fenotipo resolutivo pueden pasar previamente por una fase inflamatoria que active finalmente en las propias células circuitos de señalización pro-resolutivos. Para comprobar el efecto que tenían las EVs sobre los neutrófilos a nivel funcional se realizó un ensayo de estrés oxidativo que permitía determinar la liberación de ROS por parte de los neutrófilos tratados con LPS, EVs y ambos compuestos. De esta forma se comprobó que las EVs por si solas no inducen un aumento del estrés oxidativo en los neutrófilos, a diferencia del LPS, pero sí que reducen el estrés oxidativo de los neutrófilos activados. Esto puede ser beneficioso, ya que se ha comprobado que los ROS liberados por los neutrófilos pueden inducir daños en las células de su entorno [357].

Otro de los efectos inmunomoduladores de las EVs de MSC ya descrito es la capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos T [257], [258]. Aunque este trabajo está centrado en la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria inicial, se evaluó el efecto que tenían *in vitro* las EVs sobre los linfocitos para tener una visión más global del efecto inmunomodulador de las EVs de DP-MSC. Mediante un ensayo de proliferación de PBMCs activadas se comprobó que las EVs inhiben la proliferación de los linfocitos T en comparación con aquellos no tratados, de acuerdo con lo descrito en la bibliografía respecto a otras EVs de MSC.

Finalmente, antes de pasar al estudio del potencial inmunomodulador de estas EVs en un modelo *in vivo* de IAM, se quiso determinar el efecto que tenían sobre fibroblastos cardíacos, ya que son una de las principales células que forman parte del corazón, además de ser los responsables de la formación de la cicatriz tras el infarto. Se utilizaron

fibroblastos estimulados con TGF β , que activa las vías de señalización de fibrosis, y sin estimular. Se comprobó *in vitro* que las EVs aumentan por sí mismas la expresión de TGF β en los fibroblastos sin estimular, aunque este efecto no es sinérgico cuando los fibroblastos se estimulan, sino que la expresión de este gen se mantiene estable. Por otro lado, se observó que la estimulación con TGF β y con TGF β más EVs induce un aumento significativo de la expresión de α -SMA, un marcador de diferenciación hacia miofibroblastos, que son los encargados de secretar los componentes de la nueva matriz extracelular. Al igual que la expresión génica de TGF β , la expresión de TIMP-1, un inhibidor de MMPs, aumenta significativamente con el tratamiento de las EVs en ausencia de estimulación. Las EVs empleadas en este trabajo a un tiempo de tratamiento y una concentración concreta no indujeron grandes cambios en los fibroblastos cardíacos aislados, sin embargo, nuestro grupo ya describió previamente que la modificación de estas EVs para que expresen Oncostatina M sí que promueve cambios en los fibroblastos cardíacos, tanto *in vitro* como *in vivo* [271]. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que, en las condiciones experimentales que se han probado, las EVs de DP-MSC no inducen cambios en los fibroblastos cardíacos. Por ello, sería necesario probar diferentes condiciones de dosis y tiempos de tratamiento para ver el efecto que pueden llegar a tener las EVs sobre estas células.

Los experimentos realizados *in vitro* han puesto de manifiesto que las EVs de DP-MSC son capaces de provocar cambios en las poblaciones de células inmunes, favoreciendo, en el caso de los macrófagos de forma más clara, la transición hacia un fenotipo pro-resolutivo. A la luz de estos resultados, parece que el mayor efecto que presentan estas EVs se produce en los macrófagos, mientras que los efectos en los neutrófilos no son tan claros. No obstante, es cierto que en este trabajo se ha realizado un estudio más profundo de los macrófagos que del resto de células inmunitarias debido, en parte, al papel principal que tienen estas células en la respuesta inflamatoria tras el IAM.

Cabe destacar también, que todos los experimentos *in vitro* han mostrado que las EVs obtenidas a partir de las diferentes biopsias de MSC presentan la misma funcionalidad, sin haber diferencias entre ellas. Esto indica que, pese a que puedan presentar algunas diferencias en su cargo, no parece que esto afecte a su capacidad terapéutica, por lo que hipotéticamente se podrían llegar a utilizar como un pull para formar un producto biológico que se pueda administrar clínicamente.

3. Potencial terapéutico de las EVs de DP-MSC en un modelo *in vivo* de IAM

El IAM es una patología muy compleja en la que participan numerosos procesos celulares. A lo largo de los últimos años se ha demostrado la importancia que tienen la respuesta inflamatoria en la patogénesis del IAM y su implicación en los resultados clínicos a largo plazo [358]. Esto ha hecho que la respuesta inflamatoria y más en concreto, alguno de sus componentes, se hayan postulado como potenciales dianas terapéuticas [359].

La respuesta inflamatoria que se produce tras desencadenarse el infarto está implicada en la eliminación de las células y la matriz extracelular dañada de la zona isquémica, así como en la formación de nueva matriz extracelular para constituir la cicatriz del infarto. Se ha descrito que el proceso inflamatorio está directamente relacionado con el tamaño del infarto y la calidad de la cicatriz, por lo que una respuesta inflamatoria excesiva puede dar lugar a una mayor extensión de la zona infartada y a un remodelado cardíaco adverso que aumenta la probabilidad de sufrir fallo cardíaco con el tiempo [26]. Teniendo en cuenta la capacidad inmunomoduladora que habían mostrado las EVs de DP-MSC en los experimentos *in vitro*, se quiso comprobar si estas EVs podrían llegar a emplearse como un agente terapéutico frente a la respuesta inflamatoria del IAM. Para ello, como se ha descrito previamente, se empleó un modelo de IAM en ratas, a las que se les realizó la ligadura permanente de la arteria coronaria. Se decidió hacer este experimento en ratas nude, principalmente por la experiencia previa del laboratorio con este modelo. No obstante, aunque las ratas nude mantienen parte de la inmunidad innata, probablemente esta sea una de las debilidades de este trabajo, ya que está demostrado que las EVs no provocan rechazo inmunológico y en la mayoría de los casos se emplean EVs alogénicas como tratamiento, por lo que probablemente el uso de EVs humanas no hubiese generado un rechazo inmunológico potente al inyectarlas en ratas inmunocompetentes. Además, las ratas nude tienen una respuesta inmune más atenuada, por lo que quizá el uso de un modelo de rata inmunocompetente hubiese permitido observar más diferencias con el tratamiento. No obstante, debido al control del equipo en la realización del modelo de IAM en las ratas nude, se decidió seguir con este tipo de animales y no poner a punto el modelo en otros animales que no se habían utilizado previamente.

La administración de las EVs se realizó de forma intramiocárdica. Esta metodología nos permitía asegurarnos de que la mayor parte de las EVs iban a ejercer su efecto en la zona del infarto. Numerosos estudios con modelos de IAM inyectan los compuestos terapéuticos, incluidas EVs de MSC en el miocardio directamente [167], [360], aunque en muchos otros casos la administración del producto terapéutico se realiza de forma intravenosa [284], [361]. A la hora de una posible administración clínica en humanos, sería mucho más sencillo y práctico la administración intravenosa, el problema actual es que para que ese tipo de administración llegue a la clínica es necesario hacer estudios muy exhaustivos de la biodistribución de las EVs cuando se administran por vía intravenosa y del efecto de estas EVs a nivel sistémico y en cada órgano individual, para descartar cualquier tipo de efecto adverso. En definitiva, está claro que la administración intramiocárdica es mucho más compleja y menos cómoda técnicamente, sin embargo, el avance de las técnicas médicas hoy en día permite poder realizar una administración intramiocárdica sin necesidad de recurrir a cirugías de corazón abierto que pueden aumentar mucho el riesgo de muerte del paciente.

El estudio *in vivo* se llevó a cabo con EVs pertenecientes a las tres biopsias de DP-MSC, aunque en este caso ya no se han diferenciado a nivel gráfico las tres biopsias. No obstante, no hubo diferencias significativas entre ellas, igual que ocurría en los ensayos *in vitro*. El estudio *in vivo* se realizó a dos tiempos, 7 días y 21 días tras el IAM, para poder estudiar, por un lado, la respuesta inflamatoria, que ocurre en los primeros días tras el infarto y, por otro lado, el remodelado y la reparación del infarto, que tiene lugar semanas después de que se produzca el evento isquémico. La administración de EVs amortiguó la caída de la función cardíaca tanto a 7 como a 21 días tras el IAM,

siendo este efecto más notable a los 21 días. Esta preservación de la función cardíaca se vio reflejada en una menor disminución de la fracción de acortamiento (FA) y del cambio porcentual de área (CPA), parámetros que se pueden obtener mediante la ecocardiografía de los animales antes y después del IAM. Varios estudios han obtenido estas mismas mejoras en la función cardíaca tras el tratamiento con EVs, pero en estos casos las EVs se obtenían de otras fuentes de MSC, como cordón umbilical [362] e incluso en muchos de estos estudios las EVs no eran humanas, sino de la especie en la que se realizaba el modelo *in vivo* [363]. Las EVs de DP-MSC también promovieron un tamaño de infarto menor que el del grupo control tratado con PBS tanto a 7 como a 21 días, siendo la reducción a 21 días significativa estadísticamente. Esto apoya lo descrito en estudios como los de Zhao, Y., que también describieron la capacidad de las EVs de MSC de reducir el tamaño del infarto [284]. El hecho de que las EVs consigan reducir la expansión del tamaño de infarto indica que el riesgo a sufrir fallo cardíaco posteriormente es menor, ya que la zona del corazón con una funcionalidad y una contractilidad alterada es menor.

Se quiso estudiar de forma más exhaustiva la respuesta inflamatoria del IAM y el comportamiento de los macrófagos. Se comprobó que el tratamiento con EVs modificaba la expresión génica en la zona del infarto, afectando a marcadores proinflamatorios y antiinflamatorios. Algunas citocinas como TNF α o CCL5 tenían una menor expresión génica a 7 días tras el IAM en el grupo de animales tratados con EVs que en el grupo control, aunque sin llegar a haber diferencias significativas entre ellos. Puede que el hecho de no observar diferencias significativas se deba a que las citocinas proinflamatorias tienen su mayor pico de expresión durante los primeros 2-3 días tras el infarto, tras los cuales comienzan a disminuir para dar paso al inicio de la fase reparadora en la que hay una transición hacia la resolución de la inflamación. Cuando los niveles de citocinas proinflamatorias como TNF α se mantienen elevados en la zona de infarto o en la circulación sanguínea, hay una mayor relación con un pronóstico grave tras el infarto [364]. No obstante, el hecho de que los niveles de *Tnfa* y *Ccl5* disminuyan en el grupo tratado con EVs a los 7 días post-IAM es una buena señal, ya que hay estudios que demuestran que menores niveles de estas citocinas tras el IAM mejoran la función cardíaca y reducen el tamaño de infarto [365], [366]. Además de estas citocinas, el tratamiento con EVs redujo los niveles de expresión génica en la zona de infarto de *iNos* y *Cd274*, dos marcadores de macrófagos M1, siendo la reducción *iNos* bastante más marcada en el grupo de EVs. Otro de las citocinas proinflamatorias que se evaluó a nivel de expresión génica fue *Cxcl10* que, a diferencia de las anteriores estaba ligeramente aumentada en el grupo de animales tratados con EVs. El papel de la citocina CXCL10 en el IAM es complejo y no solo se ha relacionado con un mayor reclutamiento de células inmunitarias durante los primeros días tras el infarto, sino que también se ha observado que puede presentar efectos angiostáticos y antifibróticos afectando a las células endoteliales y a los fibroblastos respectivamente [367], [368]. Este efecto angiostático y antifibrótico podría estar dirigido a frenar la neovascularización y la fibrosis prematura antes de que se hayan eliminado todos los restos celulares apoptóticos de la zona dañada. La razón por la que está aumentada la expresión génica de *Cxcl10* y, como se tratará posteriormente, su expresión proteica también, no está clara, pero concuerda con los resultados que se han obtenido en el modelo *in vivo* en cuanto a angiogénesis tras el tratamiento con EVs. Una posible hipótesis, es que el aumento que están induciendo las EVs en la expresión de CXCL10

podría estar induciendo una parada de la angiogénesis en la zona de infarto en este modelo. Algunos modelos knockout de CXCL10 en ratón demostraron que la ausencia de esta citocina induce un mayor infiltrado inflamatorio, peor remodelado cardíaco y mayor extensión de la cicatriz, lo que indica que la presencia de esta citocina es esencial para obtener mejores resultados clínicos tras el IAM. La señalización de CXCL10 se produce a través del receptor CCR3, cuya expresión se ha visto que varía entre especies murinas y el humano, por lo que estos resultados que se observan en el modelo de IAM de este trabajo respecto a la expresión de CXCL10 puede que no sean trasladables al humano.

Por otro lado, se comprobó que el tratamiento con las EVs aumentaba la expresión génica de marcadores de macrófagos M2 como *Msr1* o *Cx3cr1* (este último de forma significativa), aunque no variaba la expresión de otras citocinas como *Il10* o *Ccl17*. Se evaluó también la expresión génica de *Alox12*, una enzima que se encarga de sintetizar mediadores lipídicos pro-resolutivos (SPMs). En los macrófagos, ALOX12 participa en la síntesis de maresinas, una familia de SPMs que se ha relacionado con la polarización de macrófagos hacia un fenotipo pro-resolutivo [369] y que, en general contribuyen a la transición hacia la resolución de la inflamación actuando sobre diferentes tipos celulares. La contribución de los SPMs en el ámbito de la resolución de la inflamación en el IAM es algo que está siendo investigado actualmente y que está mostrando resultados prometedores [370], [371].

Además de estudiar la expresión génica, se determinó también a nivel de expresión proteica que las EVs reducían los marcadores de macrófagos M1 iNOS y CCR2, pero no alteraban significativamente la expresión de los marcadores de M2. Esto se comprobó de forma más específica mediante inmunofluorescencia analizando el infiltrado de macrófagos M1 y M2 en la zona de infarto tanto a los 7 como a los 21 días tras el IAM. El tratamiento con las EVs promueve una menor presencia de macrófagos M1 a los 7 días tras el infarto en comparación con el grupo control. Esta reducción se pudo comprobar a través de diferentes marcadores de M1. Sin embargo, a 7 días las EVs no producen cambios en la población de M2 presente en la zona isquémica respecto al grupo control. El estudio de los macrófagos a 21 días mostró los mismos resultados, una menor presencia de M1 en la zona de infarto y cantidades similares de M2 entre el grupo control y el tratado con EVs. En el estudio realizado por Sun, L. *et al.* con EVs derivadas de MSC de cordón umbilical, también se observó una caída en el infiltrado de macrófagos M1, aunque en este caso se realizó el estudio a tres días después del IAM. En ese trabajo también observaron un aumento en el número de macrófagos M2 infiltrados, pero solo con el tratamiento de EVs obtenidas a partir de cultivos 3D de MSC; cuando se realizaba el tratamiento con EVs obtenidas a partir de cultivos 2D de las células no había un aumento de los macrófagos M2 [362], que es lo mismo que se ha visto en nuestro trabajo. En definitiva, en el modelo *in vivo* las EVs están ejerciendo algún efecto inmunomodulador que contribuye a que haya un menor número de macrófagos M1. La causa de esto no se ha esclarecido en este trabajo, pero podría deberse a que las EVs disminuyen el reclutamiento sucesivo de monocitos en la zona infartada o impiden su diferenciación hacia macrófagos proinflamatorios. Lo más probable es que se trate de una acción coordinada a través del efecto que tienen las EVs sobre las diferentes poblaciones celulares. No obstante, sería muy interesante poder profundizar en los mecanismos por los que las EVs reducen la presencia de los macrófagos M1, pero no afectan a los macrófagos M2 a ese tiempo. También sería

interesante estudiar a diferentes días como van cambiando las poblaciones de macrófagos M1 y M2 en la zona de infarto, para comprobar en qué momento se produce la transición y aumentan los macrófagos pro-resolutivos.

Existe un estudio publicado en el que se investiga a fondo las poblaciones de macrófagos en el IAM tras el tratamiento con EVs de MSC pretratadas con atorvastatina [363]. En este estudio se observa que el tratamiento con EVs de MSC de médula ósea de ratón promueven mejoras terapéuticas tras el IAM, reduciendo la población de macrófagos M1 y aumentando la de macrófagos M2 mediante la acción del miRNA-139-3p. Además de este estudio con EVs, se ha investigado las variaciones de macrófagos en el IAM tras el tratamiento con otros agentes terapéuticos diferentes a las EVs [372], [373], incluso con MSC [374]. Todos estos estudios han demostrado que hay una clara relación entre el menor número de macrófagos inflamatorios y resultados clínicos mejores. En nuestro caso, aunque todavía falta elucidar los mecanismos por los que ocurre, la disminución de los macrófagos M1 en la zona del infarto inducida por las EVs podría estar favoreciendo la menor caída de la función cardíaca y la menor extensión de la zona de infarto.

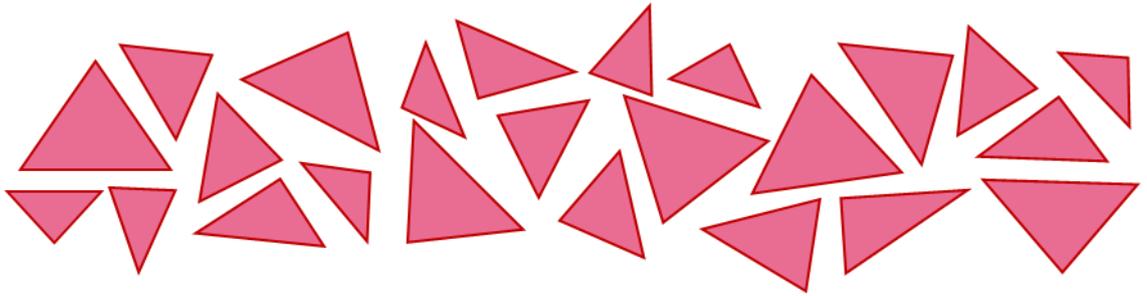
Al igual que se había evaluado a nivel proteico los marcadores de macrófagos, se quiso estudiar el ambiente inflamatorio en general evaluando la expresión proteica de diferentes citocinas. Este experimento nos aportó resultados contradictorios. Por un lado, el tratamiento con EVs inducía un aumento de IL-10, una citocina antiinflamatoria secretada por macrófagos M2 y neutrófilos N2, además de por otros tipos celulares, que favorece la resolución de la inflamación y la reparación de la zona infartada. Sin embargo, también había un incremento en la expresión de varias citocinas proinflamatorias (GM-CSF, CCL3, CCL20, CXCL10). CXCL10, como he comentado previamente, puede estar ejerciendo un efecto angiostático y antifibrótico. GM-CSF también es una citocina secretada por diferentes tipos celulares, fundamentalmente por los fibroblastos cardíacos. El papel de esta citocina en el IAM es complejo. Por un lado, se ha observado que GM-CSF es capaz de interaccionar directamente con las células endoteliales promoviendo la activación de la angiogénesis, probablemente a través de estimular la producción de compuestos angiogénicos como VEGF [375]. Además, se ha visto que GM-CSF promueve el infiltrado de monocitos y neutrófilos en la zona isquémica [376] y que es capaz de mejorar el flujo colateral en pacientes con enfermedad arterial coronaria [377]. Un estudio en pacientes con IAM demostró que la administración de esta citocina es capaz de inducir mejoras en la función ventricular tras 12 meses de administración [378]. Por lo tanto, el aumento de GM-CSF puede inducir tanto efectos beneficiosos como perjudiciales, dependiendo de cuánto exacerbe la respuesta inflamatoria. En conjunto, el hecho de que haya un aumento de citocinas inflamatorias nos podría estar indicando que en el grupo tratado con EVs hay un efecto pleiotrópico que no solo contribuye a aumentar la resolución de la inflamación a través del aumento de IL-10 o de la reducción en el número de macrófagos M1, sino que también hay un aumento del entorno inflamatorio. Los mecanismos por los cuales estas citocinas proinflamatorias están actuando no están claros en este trabajo y se necesitaría profundizar mucho más a nivel molecular para poder esclarecerlo. Sin embargo, a nivel funcional, los cambios que se están produciendo tras el tratamiento de las EVs están induciendo mejoras en la funcionalidad cardíaca y el tamaño de infarto, por lo que finalmente, el efecto general de las EVs es beneficioso.

Para tener una visión más general de lo que estaba ocurriendo en el modelo *in vivo* se determinó también la infiltración de los neutrófilos tras el tratamiento con EVs. Se comprobó que el tratamiento con EVs tendía a reducir el infiltrado de neutrófilos a 7 días tras el infarto y que conseguía disminuir los niveles de MPO en la zona infartada. La reducción en los niveles de MPO respecto al grupo control se relaciona con un menor daño sobre las células adyacentes. La liberación de MPO induce a su vez la liberación de ROS que generan daños en los cardiomiocitos, células endoteliales y fibroblastos, favoreciendo el aumento de la zona de infarto [78]. Por lo tanto, el hecho de que las EVs reduzcan la liberación de esta enzima a 7 días tras el infarto puede ser una de las causas por las que en este trabajo se ha visto que las EVs reducen el tamaño de la zona de infarto.

Por último, el estudio de la formación de nuevos vasos sanguíneos en la zona de infarto tanto a los 7 como a los 21 días no mostró diferencias entre los grupos tratados y sin tratar. Una de las características de las EVs de MSC ya descritas es su capacidad de inducir angiogénesis, sin embargo, se ha descrito también que esta capacidad varía mucho en función de la fuente tisular de las MSC, siendo las de tejido adiposo las que mayor capacidad angiogénica presentan. Es posible que las EVs derivadas de DP-MSc no tengan un perfil tan angiogénico y sean más inmunomoduladoras, por eso no se aprecia una mayor formación de vasos cuando se administran estas EVs. También es cierto, que muchos estudios en los que se expone el potencial angiogénico de las EVs de MSC se basan en el empleo de MSC modificadas genéticamente o condicionadas, de forma que potencian ese aspecto terapéutico. Esto ocurre con MSC sometidas a procesos hipóxicos o MSC modificadas para sobreexpresar HIF-1 α , que se ha visto que aumenta su potencial angiogénico. En definitiva, el empleo de EVs de DP-MSc mejoradas genéticamente puede incrementar la capacidad angiogénica de este producto.

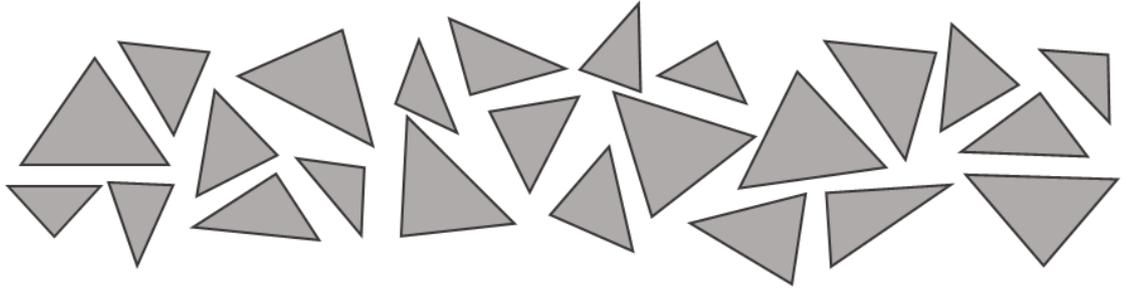
En general, en este trabajo se ha podido comprobar que las EVs derivadas de distintas biopsias de DP-MSc presentan capacidad inmunomoduladora, tanto *in vitro* como *in vivo*, afectando fundamentalmente a los macrófagos. Este efecto inmunomodulador induce, a su vez, mejoras en la función cardíaca y la extensión del infarto en ratas sometidas a un IAM. Con lo cual, teniendo en cuenta todos los resultados, parece que las EVs de DP-MSc pueden ser potenciales agentes terapéuticos en el tratamiento de la inflamación que se genera en el IAM, favoreciendo resultados clínicos beneficiosos. No obstante, hasta llegar a ese punto, es necesario investigar en mayor profundidad el efecto de las EVs a lo largo de diferentes días tras el IAM, así como investigar los mecanismos moleculares por los cuales las EVs están favoreciendo la resolución de la inflamación en el IAM.

CONCLUSIONES



- El aislamiento de las EVs de MSC mediante TFF-SEC aumenta significativamente el rendimiento de la extracción y permite la obtención de un producto de EVs más limpio y concentrado.
- Las EVs obtenidas a partir de MSC immortalizadas con hTERT contienen RNAm del producto de immortalización, pero este no es detectable a nivel proteico.
- Las EVs obtenidas a partir de biopsias diferentes de DP-MSC presentan las mismas características en cuanto a tamaño, morfología y presencia de marcadores.
- Las EVs de diferentes biopsias de DP-MSC no presentan exactamente el mismo cargo proteico, pero los procesos biológicos en los que están implicados las proteínas son los mismos en todos los tipos de EVs. No existen diferencias significativas a nivel lipídico entre las EVs obtenidas de diferentes biopsias de DP-MSC. Y el contenido en miRNAs es similar en las EVs de las diferentes biopsias de DP-MSC. Los procesos biológicos en los que están implicados los miRNAs y las proteínas presentes en las EVs se relacionan con la inmunomodulación de diferentes células del sistema inmune.
- Las EVs de DP-MSC, independientemente de la biopsia, son capaces de polarizar los macrófagos M1 hacia un fenotipo M2-like *in vitro*, aumentando los marcadores de macrófagos M2 y aumentando a nivel funcional la capacidad de eferocitosis. Además, las EVs de DP-MSC promueven el aumento en la expresión génica de receptores relacionados con la activación de neutrófilos y reducen el estrés oxidativo de neutrófilos activados *in vitro*. Las EVs reducen también la proliferación de linfocitos T activados.
- En un modelo *in vivo* de IAM en rata, las EVs de DP-MSC amortiguan la caída de la función cardíaca y reducen la extensión de la zona de infarto a 7 y 21 días.
- El efecto inmunomodulador de las EVs reduce la presencia de macrófagos M1 en la zona de infarto, sin alterar el número de macrófagos M2 a 7 y 21 días tras el IAM. Las EVs también tienden a reducir el infiltrado de neutrófilos y disminuyen la secreción de MPO por parte de estas células. Las EVs de DP-MSC no afectan en estas condiciones experimentales a la angiogénesis en la zona de infarto ni a 7 ni a 21 días tras el IAM.

BIBLIOGRAFÍA



- [1] Y. Sandoval, K. Thygesen, and A. S. Jaffe, "The Universal Definition of Myocardial Infarction: Present and Future," *Circulation*, vol. 141, no. 18. 2020. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.045708.
- [2] J. B. Herrick, "Landmark article (JAMA 1912). Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries. By James B. Herrick," *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, vol. 250, no. 13, 1983, doi: 10.1001/jama.250.13.1757.
- [3] P. W. Armstrong, "Defining myocardial infarction: A work in progress," *Heart*, vol. 94, no. 8. 2008. doi: 10.1136/hrt.2007.135202.
- [4] K. Thygesen, J. S. Alpert, and H. D. White, "Universal definition of myocardial infarction," *Circulation*, vol. 116, no. 22. 2007. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.187397.
- [5] K. Thygesen *et al.*, "Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)," *J Am Coll Cardiol*, vol. 72, no. 18, 2018, doi: 10.1016/j.jacc.2018.08.1038.
- [6] R. B. Jennings, C. E. Murry, C. Steenbergen, and K. A. Reimer, "Development of cell injury in sustained acute ischemia," in *Circulation*, 1990.
- [7] L. Lu, M. Liu, R. R. Sun, Y. Zheng, and P. Zhang, "Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments," *Cell Biochem Biophys*, vol. 72, no. 3, 2015, doi: 10.1007/s12013-015-0553-4.
- [8] S. Boateng and T. Sanborn, "Acute myocardial infarction," *Disease-a-Month*, vol. 59, no. 3. pp. 83–96, Mar. 2013. doi: 10.1016/j.disamonth.2012.12.004.
- [9] D. A. Morrow *et al.*, "National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes," *Circulation*, vol. 115, no. 13. 2007. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.182882.
- [10] K. Thygesen *et al.*, "How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care," *European Heart Journal*, vol. 33, no. 18. 2012. doi: 10.1093/eurheartj/ehs154.
- [11] F. S. Apple, Y. Sandoval, A. S. Jaffe, and J. Ordonez-Llanos, "Cardiac troponin assays: Guide to understanding analytical characteristics and their impact on clinical care," *Clinical Chemistry*, vol. 63, no. 1. 2017. doi: 10.1373/clinchem.2016.255109.
- [12] D. Mozaffarian *et al.*, "Heart disease and stroke statistics-2016 update a report from the American Heart Association," *Circulation*, vol. 133, no. 4. 2016. doi: 10.1161/CIR.0000000000000350.
- [13] A. Mitsis and F. Gragnano, "Myocardial Infarction with and without ST-segment Elevation: a Contemporary Reappraisal of Similarities and Differences," *Curr Cardiol Rev*, vol. 17, no. 4, 2020, doi: 10.2174/1573403x16999201210195702.
- [14] A. R. Chapman, P. D. Adamson, and N. L. Mills, "Assessment and classification of patients with myocardial injury and infarction in clinical practice," *Heart*, vol. 103, no. 1, 2017, doi: 10.1136/heartjnl-2016-309530.

- [15] A. L. Hilliard, D. E. Winchester, T. D. Russell, and R. D. Hilliard, "Myocardial infarction classification and its implications on measures of cardiovascular outcomes, quality, and racial/ethnic disparities," *Clinical Cardiology*, vol. 43, no. 10. 2020. doi: 10.1002/clc.23431.
- [16] J. L. Anderson and D. A. Morrow, "Acute Myocardial Infarction," *N Engl J Med*, vol. 376, no. 21, 2017.
- [17] J. F. Bentzon, F. Otsuka, R. Virmani, and E. Falk, "Mechanisms of plaque formation and rupture," *Circ Res*, vol. 114, no. 12, 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.
- [18] G. Cediel, M. Gonzalez-Del-Hoyo, A. Carrasquer, R. Sanchez, C. Boqué, and A. Bardají, "Outcomes with type 2 myocardial infarction compared with non-ischaemic myocardial injury," *Heart*, vol. 103, no. 8, 2017, doi: 10.1136/heartjnl-2016-310243.
- [19] Y. Sandoval and A. S. Jaffe, "Type 2 Myocardial Infarction: JACC Review Topic of the Week," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 73, no. 14. Elsevier USA, pp. 1846–1860, Apr. 16, 2019. doi: 10.1016/j.jacc.2019.02.018.
- [20] G. W. Reed, J. E. Rossi, and C. P. Cannon, "Acute myocardial infarction," *The Lancet*, vol. 389, no. 10065. Lancet Publishing Group, pp. 197–210, Jan. 14, 2017. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30677-8.
- [21] C. P. Cannon *et al.*, "Relationship of symptom-onset-to-balloon time and door-to-balloon time with mortality in patients undergoing angioplasty for acute myocardial infarction," *JAMA*, vol. 283, no. 22, 2000, doi: 10.1001/jama.283.22.2941.
- [22] R. G. Wilcox, "Randomised, double-blind comparison of reteplase double-bolus administration with streptokinase in acute myocardial infarction (INJECT): trial to investigate equivalence. International Joint Efficacy Comparison of Thrombolytics," *The Lancet*, vol. 346, no. 8971, 1995, doi: 10.1016/S0140-6736(95)92224-5.
- [23] T. Doenst *et al.*, "PCI and CABG for Treating Stable Coronary Artery Disease: JACC Review Topic of the Week," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 73, no. 8. 2019. doi: 10.1016/j.jacc.2018.11.053.
- [24] C. Peet, A. Ivetic, D. I. Bromage, and A. M. Shah, "Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction," *Cardiovascular Research*, vol. 116, no. 6. 2020. doi: 10.1093/CVR/CVZ336.
- [25] I. Kologrivova, M. Shtatolkina, T. Suslova, and V. Ryabov, "Cells of the Immune System in Cardiac Remodeling: Main Players in Resolution of Inflammation and Repair After Myocardial Infarction," *Frontiers in Immunology*, vol. 12. 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.664457.
- [26] S. B. Ong *et al.*, "Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 186. 2018. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.01.001.

- [27] S. D. Prabhu and N. G. Frangogiannis, "The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction," *Circulation Research*, vol. 119, no. 1. 2016. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303577.
- [28] Q. Zhang *et al.*, "Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction," *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 7, no. 1. 2022. doi: 10.1038/s41392-022-00925-z.
- [29] Z. Q. Zhao *et al.*, "Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion," *Apoptosis*, vol. 6, no. 4, 2001, doi: 10.1023/A:1011335525219.
- [30] Z. Q. Zhao *et al.*, "Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death," *Cardiovasc Res*, vol. 45, no. 3, 2000, doi: 10.1016/S0008-6363(99)00354-5.
- [31] H. K. Eltzschig and T. Eckle, "Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation," *Nature Medicine*, vol. 17, no. 11. 2011. doi: 10.1038/nm.2507.
- [32] S. Huang and N. G. Frangogiannis, "Anti-inflammatory therapies in myocardial infarction: failures, hopes and challenges," *British Journal of Pharmacology*, vol. 175, no. 9. 2018. doi: 10.1111/bph.14155.
- [33] Y. Liu, J. Xu, M. Wu, L. Kang, and B. Xu, "The effector cells and cellular mediators of immune system involved in cardiac inflammation and fibrosis after myocardial infarction," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 235, no. 12. 2020. doi: 10.1002/jcp.29732.
- [34] F. Moccetti *et al.*, "Myocardial Infarction Produces Sustained Proinflammatory Endothelial Activation in Remote Arteries," *J Am Coll Cardiol*, vol. 72, no. 9, 2018, doi: 10.1016/j.jacc.2018.06.044.
- [35] N. G. Frangogiannis, "The immune system and cardiac repair," *Pharmacol Res*, vol. 58, no. 2, pp. 88–111, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.phrs.2008.06.007.
- [36] F. Arslan, D. P. De Kleijn, and G. Pasterkamp, "Innate immune signaling in cardiac ischemia," *Nature Reviews Cardiology*, vol. 8, no. 5. 2011. doi: 10.1038/nrcardio.2011.38.
- [37] L. Fang, X. L. Moore, A. M. Dart, and L. M. Wang, "Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction," *Journal of Geriatric Cardiology*, vol. 12, no. 3. 2015. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2015.03.020.
- [38] J. J. De Haan, M. B. Smeets, G. Pasterkamp, and F. Arslan, "Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction," *Mediators of Inflammation*, vol. 2013. 2013. doi: 10.1155/2013/206039.
- [39] E. Wan *et al.*, "Enhanced efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes through myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase links acute inflammation resolution to cardiac repair after infarction," *Circ Res*, vol. 113, no. 8, 2013, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301198.
- [40] M. Nian, P. Lee, N. Khaper, and P. Liu, "Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling," *Circulation Research*, vol. 94, no. 12. 2004. doi: 10.1161/01.RES.0000130526.20854.fa.

- [41] A. Herskowitz, S. Choi, A. A. Ansari, and S. Wesselingh, "Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium," *American Journal of Pathology*, vol. 146, no. 2, 1995.
- [42] T. Kishimoto, S. Akira, M. Narazaki, and T. Taga, "Interleukin-6 family of cytokines and gp130," *Blood*, vol. 86, no. 4, 1995. doi: 10.1182/blood.v86.4.1243.bloodjournal8641243.
- [43] M. Cavalera and N. Frangogiannis, "Targeting the Chemokines in Cardiac Repair," *Curr Pharm Des*, vol. 20, no. 12, 2014, doi: 10.2174/13816128113199990449.
- [44] O. Dewald *et al.*, "CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts," *Circ Res*, vol. 96, no. 8, 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000163017.13772.3a.
- [45] M. Bujak *et al.*, "Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling," *American Journal of Pathology*, vol. 173, no. 1, 2008, doi: 10.2353/ajpath.2008.070974.
- [46] J. Yap, H. A. Cabrera-Fuentes, J. Irei, D. J. Hausenloy, and W. A. Boisvert, "Role of macrophages in cardioprotection," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 10, 2019. doi: 10.3390/ijms20102474.
- [47] N. G. Frangogiannis, "Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration," *Current Opinion in Cardiology*, vol. 30, no. 3, 2015. doi: 10.1097/HCO.0000000000000158.
- [48] N. G. Frangogiannis, "The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling," *Nature Reviews Cardiology*, vol. 11, no. 5, 2014. doi: 10.1038/nrcardio.2014.28.
- [49] A. Mantovani, M. A. Cassatella, C. Costantini, and S. Jaillon, "Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity," *Nature Reviews Immunology*, vol. 11, no. 8, 2011. doi: 10.1038/nri3024.
- [50] M. Horckmans *et al.*, "Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype," *Eur Heart J*, vol. 38, no. 3, 2017, doi: 10.1093/eurheartj/ehw002.
- [51] A. Ortega-Gómez, M. Perretti, and O. Soehnlein, "Resolution of inflammation: An integrated view," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 5, no. 5, 2013. doi: 10.1002/emmm.201202382.
- [52] T. Ben-Mordechai *et al.*, "Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy," *J Am Coll Cardiol*, vol. 62, no. 20, 2013, doi: 10.1016/j.jacc.2013.07.057.
- [53] A. Anzai *et al.*, "Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling," *Circulation*, vol. 125, no. 10, 2012, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.052126.
- [54] U. Hofmann *et al.*, "Activation of CD4 + T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice," *Circulation*, vol. 125, no. 13, 2012, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.044164.

- [55] J. Weirather *et al.*, "Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation," *Circ Res*, vol. 115, no. 1, 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303895.
- [56] T. T. Tang *et al.*, "Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction," *Basic Res Cardiol*, vol. 107, no. 1, 2012, doi: 10.1007/s00395-011-0232-6.
- [57] F. K. Swirski and M. Nahrendorf, "Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease," *Nature Reviews Immunology*, vol. 18, no. 12, 2018. doi: 10.1038/s41577-018-0065-8.
- [58] F. Leuschner and M. Nahrendorf, "Novel functions of macrophages in the heart: Insights into electrical conduction, stress, and diastolic dysfunction," *European Heart Journal*, vol. 41, no. 9, 2020. doi: 10.1093/eurheartj/ehz159.
- [59] M. DeBerge, S. J. Shah, L. Wilsbacher, and E. B. Thorp, "Macrophages in Heart Failure with Reduced versus Preserved Ejection Fraction," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 25, no. 4, 2019. doi: 10.1016/j.molmed.2019.01.002.
- [60] G. Bajpai *et al.*, "The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions," *Nat Med*, vol. 24, no. 8, 2018, doi: 10.1038/s41591-018-0059-x.
- [61] D. Hashimoto *et al.*, "Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes," *Immunity*, vol. 38, no. 4, 2013, doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.004.
- [62] S. Epelman *et al.*, "Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation," *Immunity*, vol. 40, no. 1, 2014, doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.019.
- [63] S. Epelman, P. P. Liu, and D. L. Mann, "Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair," *Nature Reviews Immunology*, vol. 15, no. 2, 2015. doi: 10.1038/nri3800.
- [64] A. R. Pinto *et al.*, "An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile," *PLoS One*, vol. 7, no. 5, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0036814.
- [65] S. Frantz and M. Nahrendorf, "Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease," *Cardiovascular Research*, vol. 102, no. 2, 2014. doi: 10.1093/cvr/cvu025.
- [66] N. G. Frangogiannis *et al.*, "Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- α , initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion," *Circulation*, vol. 98, no. 7, 1998, doi: 10.1161/01.CIR.98.7.699.
- [67] N. G. Frangogiannis, "Chemokines in the ischemic myocardium: From inflammation to fibrosis," *Inflammation Research*, vol. 53, no. 11, 2004. doi: 10.1007/s00011-004-1298-5.

- [68] M. Gwechenberger *et al.*, "Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions," *Circulation*, vol. 99, no. 4, 1999, doi: 10.1161/01.CIR.99.4.546.
- [69] K. Jung *et al.*, "Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts," *Circ Res*, vol. 112, no. 6, 2013, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300484.
- [70] M. Nahrendorf *et al.*, "The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 12, 2007, doi: 10.1084/jem.20070885.
- [71] L. Landsman *et al.*, "CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival," *Blood*, vol. 113, no. 4, pp. 963–972, Jan. 2009, doi: 10.1182/blood-2008-07-170787.
- [72] P. Dutta *et al.*, "Myocardial infarction accelerates atherosclerosis," *Nature*, vol. 487, no. 7407, 2012, doi: 10.1038/nature11260.
- [73] K. J. Eash, J. M. Means, D. W. White, and D. C. Link, "CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions," *Blood*, vol. 113, no. 19, 2009, doi: 10.1182/blood-2008-09-177287.
- [74] S. Devi *et al.*, "Neutrophil mobilization via plerixaform-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 210, no. 11, 2013, doi: 10.1084/jem.20130056.
- [75] K. J. Eash, A. M. Greenbaum, P. K. Gopalan, and D. C. Link, "CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, no. 7, 2010, doi: 10.1172/JCI41649.
- [76] Y. Ma, "Role of neutrophils in cardiac injury and repair following myocardial infarction," *Cells*, vol. 10, no. 7, 2021. doi: 10.3390/cells10071676.
- [77] K. Futosi, S. Fodor, and A. Mócsai, "Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways," *Int Immunopharmacol*, vol. 17, no. 4, 2013, doi: 10.1016/j.intimp.2013.11.010.
- [78] F. Carbone, A. Nencioni, F. Mach, N. Vuilleumier, and F. Montecucco, "Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction," *Thromb Haemost*, vol. 110, no. 3, 2013, doi: 10.1160/TH13-03-0211.
- [79] J. N. Fullerton and D. W. Gilroy, "Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 15, no. 8, 2016. doi: 10.1038/nrd.2016.39.
- [80] N. S. Taichman, S. Young, A. T. Cruchley, P. Taylor, and E. Paleolog, "Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor," *J Leukoc Biol*, vol. 62, no. 3, 1997, doi: 10.1002/jlb.62.3.397.
- [81] S. L. Puhl and S. Steffens, "Neutrophils in Post-myocardial Infarction Inflammation: Damage vs. Resolution?," *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, vol. 6, 2019. doi: 10.3389/fcvm.2019.00025.

- [82] M. R. Elliott and K. S. Ravichandran, "Clearance of apoptotic cells: Implications in health and disease," *Journal of Cell Biology*, vol. 189, no. 7. 2010. doi: 10.1083/jcb.201004096.
- [83] M.-L. N. Huynh, V. A. Fadok, and P. M. Henson, "Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 109, no. 1, 2002, doi: 10.1172/jci11638.
- [84] V. Kain and G. V. Halade, "Role of neutrophils in ischemic heart failure," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 205. 2020. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107424.
- [85] A. Bonaventura *et al.*, "Novel findings in neutrophil biology and their impact on cardiovascular disease," *Cardiovascular Research*, vol. 115, no. 8. 2019. doi: 10.1093/cvr/cvz084.
- [86] B. Vulesevic, M. G. Sirois, B. G. Allen, S. de Denus, and M. White, "Subclinical Inflammation in Heart Failure: A Neutrophil Perspective," *Canadian Journal of Cardiology*, vol. 34, no. 6. 2018. doi: 10.1016/j.cjca.2018.01.018.
- [87] Y. Ma *et al.*, "Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction," *Cardiovasc Res*, vol. 110, no. 1, 2016, doi: 10.1093/cvr/cvw024.
- [88] M. J. Daseke, F. M. Valerio, W. J. Kalusche, Y. Ma, K. Y. DeLeon-Pennell, and M. L. Lindsey, "Neutrophil proteome shifts over the myocardial infarction time continuum," *Basic Res Cardiol*, vol. 114, no. 5, 2019, doi: 10.1007/s00395-019-0746-x.
- [89] M. J. Daseke, M. A. A. Tenkorang, U. Chalise, S. R. Konfrst, and M. L. Lindsey, "Cardiac fibroblast activation during myocardial infarction wound healing: Fibroblast polarization after MI," *Matrix Biology*, vol. 91–92, 2020, doi: 10.1016/j.matbio.2020.03.010.
- [90] C. Vasquez, N. Benamer, and G. E. Morley, "The cardiac fibroblast: Functional and electrophysiological considerations in healthy and diseased hearts," *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, vol. 57, no. 4. 2011. doi: 10.1097/FJC.0b013e31820cda19.
- [91] D. A. Siwik, D. L. F. Chang, and W. S. Colucci, "Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro," *Circ Res*, vol. 86, no. 12, 2000, doi: 10.1161/01.RES.86.12.1259.
- [92] M. Dobaczewski, W. Chen, and N. G. Frangogiannis, "Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 51, no. 4. 2011. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.10.033.
- [93] A. Desmouliere, A. Geinoz, F. Gabbiani, and G. Gabbiani, "Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts," *Journal of Cell Biology*, vol. 122, no. 1, 1993, doi: 10.1083/jcb.122.1.103.

- [94] A. Hanna and N. G. Frangogiannis, "The Role of the TGF- β Superfamily in Myocardial Infarction," *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, vol. 6. 2019. doi: 10.3389/fcvm.2019.00140.
- [95] L. Zhao and M. Eghbali-Webb, "Release of pro- and anti-angiogenic factors by human cardiac fibroblasts: Effects on DNA synthesis and protection under hypoxia in human endothelial cells," *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, vol. 1538, no. 2–3, 2001, doi: 10.1016/S0167-4889(01)00078-7.
- [96] Y. Ma, G. V. Halade, and M. L. Lindsey, "Extracellular matrix and fibroblast communication following myocardial infarction," *J Cardiovasc Transl Res*, vol. 5, no. 6, 2012, doi: 10.1007/s12265-012-9398-z.
- [97] A. J. Mouton *et al.*, "Fibroblast polarization over the myocardial infarction time continuum shifts roles from inflammation to angiogenesis," *Basic Res Cardiol*, vol. 114, no. 2, 2019, doi: 10.1007/s00395-019-0715-4.
- [98] T. F. Lüscher, "The sooner, the better: Anti-inflammation in acute myocardial infarction," *European Heart Journal*, vol. 41, no. 42. 2020. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa752.
- [99] G. H. Gislason *et al.*, "Risk of death or reinfarction associated with the use of selective cyclooxygenase-2 inhibitors and nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs after acute myocardial infarction," *Circulation*, vol. 113, no. 25, 2006, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.616219.
- [100] S. Toldo *et al.*, "Interleukin-1 β blockade improves cardiac remodelling after myocardial infarction without interrupting the inflammasome in the mouse," *Exp Physiol*, vol. 98, no. 3, 2013, doi: 10.1113/expphysiol.2012.069831.
- [101] A. Abbate *et al.*, "Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction," *Circulation*, vol. 117, no. 20, 2008, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.740233.
- [102] P. M. Ridker *et al.*, "Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 377, no. 12, 2017, doi: 10.1056/nejmoa1707914.
- [103] A. Abbate *et al.*, "Interleukin-1 Blockade With Anakinra to Prevent Adverse Cardiac Remodeling After Acute Myocardial Infarction (Virginia Commonwealth University Anakinra Remodeling Trial [VCU-ART] Pilot Study)," *American Journal of Cardiology*, vol. 105, no. 10, 2010, doi: 10.1016/j.amjcard.2009.12.059.
- [104] A. Abbate *et al.*, "Effects of interleukin-1 blockade with anakinra on adverse cardiac remodeling and heart failure after acute myocardial infarction [from the virginia commonwealth university-anakinra remodeling trial (2) (vcu-art2) pilot study]," *American Journal of Cardiology*, vol. 111, no. 10, 2013, doi: 10.1016/j.amjcard.2013.01.287.
- [105] O. Kleveland *et al.*, "Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: A double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial," *Eur Heart J*, vol. 37, no. 30, 2016, doi: 10.1093/eurheartj/ehw171.

- [106] E. Holte *et al.*, "Effect of interleukin-6 inhibition on coronary microvascular and endothelial function in myocardial infarction," *Heart*, vol. 103, no. 19, 2017, doi: 10.1136/heartjnl-2016-310875.
- [107] G. J. Padfield *et al.*, "Cardiovascular effects of tumour necrosis factor α antagonism in patients with acute myocardial infarction: A first in human study," *Heart*, vol. 99, no. 18, 2013, doi: 10.1136/heartjnl-2013-303648.
- [108] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhyan, N. V. Latsinik, A. F. Panasyvk, and I. V. Keiliss-Borok, "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: Cloning in vitro and retransplantation in vivo," *Transplantation*, vol. 17, no. 4, 1974, doi: 10.1097/00007890-197404000-00001.
- [109] A. I. Caplan, "Mesenchymal stem cells," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 9, no. 5, 1991, doi: 10.1002/jor.1100090504.
- [110] M. F. Pittenger *et al.*, "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells," *Science (1979)*, vol. 284, no. 5411, 1999, doi: 10.1126/science.284.5411.143.
- [111] 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, doi: 10.1080/14653240500319234.
- [112] M. Dominici *et al.*, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement," *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, 2006, doi: 10.1080/14653240600855905.
- [113] D. Baksh, L. Song, and R. S. Tuan, "Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 8, no. 3, 2004. doi: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x.
- [114] A. Uccelli, L. Moretta, and V. Pistoia, "Mesenchymal stem cells in health and disease," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 9, 2008. doi: 10.1038/nri2395.
- [115] F. J. Lv, R. S. Tuan, K. M. C. Cheung, and V. Y. L. Leung, "Concise review: The surface markers and identity of human mesenchymal stem cells," *Stem Cells*, vol. 32, no. 6, 2014. doi: 10.1002/stem.1681.
- [116] 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*, vol. 97, no. 25, 2000, doi: 10.1073/pnas.240309797.
- [117] P. A. Zuk *et al.*, "Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies," in *Tissue Engineering*, 2001. doi: 10.1089/107632701300062859.
- [118] 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, doi: 10.1002/art.20203.

- [119] Y. Fukuchi, H. Nakajima, D. Sugiyama, I. Hirose, T. Kitamura, and K. Tsuji, "Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential," *Stem Cells*, vol. 22, no. 5, 2004, doi: 10.1634/stemcells.22-5-649.
- [120] 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, doi: 10.1155/2012/658356.
- [121] H. Wang *et al.*, "Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord," *Stem Cells*, vol. 22, no. 7, 2004, doi: 10.1634/stemcells.2004-0013.
- [122] M. Crisan *et al.*, "A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs," *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 3, 2008, doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
- [123] A. I. Caplan, "All MSCs Are Pericytes?," *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 3, 2008. doi: 10.1016/j.stem.2008.08.008.
- [124] S. Shi and S. Gronthos, "Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 18, no. 4, 2003, doi: 10.1359/jbmr.2003.18.4.696.
- [125] M. Corselli, C. W. Chen, M. Crisan, L. Lazzari, and B. Péault, "Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 30, no. 6, 2010. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.191643.
- [126] J. Y. Chen, X. Z. Mou, X. C. Du, and C. Xiang, "Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins," *Asian Pac J Trop Med*, vol. 8, no. 9, 2015, doi: 10.1016/j.apjtm.2015.07.022.
- [127] K. C. Elahi, G. Klein, M. Avci-Adali, K. D. Sievert, S. Macneil, and W. K. Aicher, "Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns," *Stem Cells International*, vol. 2016, 2016. doi: 10.1155/2016/5646384.
- [128] 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. doi: 10.1186/ar2116.
- [129] L. A. Costa *et al.*, "Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 78, no. 2, 2021. doi: 10.1007/s00018-020-03600-0.
- [130] A. Andrzejewska, B. Lukomska, and M. Janowski, "Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost," *Stem Cells*, vol. 37, no. 7, 2019. doi: 10.1002/stem.3016.
- [131] D. Jovic *et al.*, "A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy," *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 18, no. 5, 2022. doi: 10.1007/s12015-022-10369-1.

- [132] M. Gnecci, P. Danieli, G. Malpasso, and M. C. Ciuffreda, "Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair," in *Methods in Molecular Biology*, 2016. doi: 10.1007/978-1-4939-3584-0_7.
- [133] 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. doi: 10.1016/S1471-4914(01)02016-0.
- [134] N. Song, M. Scholtemeijer, and K. Shah, "Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 41, no. 9. 2020. doi: 10.1016/j.tips.2020.06.009.
- [135] A. Naji, M. Eitoku, B. Favier, F. Deschaseaux, N. Rouas-Freiss, and N. Suganuma, "Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 76, no. 17. 2019. doi: 10.1007/s00018-019-03125-1.
- [136] 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, doi: 10.1016/j.jcyt.2013.02.010.
- [137] Y. Shi *et al.*, "Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases," *Nature Reviews Nephrology*, vol. 14, no. 8. 2018. doi: 10.1038/s41581-018-0023-5.
- [138] C. Manferdini *et al.*, "Adipose stromal cells mediated switching of the pro-inflammatory profile of M1-like macrophages is facilitated by PGE2: in vitro evaluation," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 25, no. 7, 2017, doi: 10.1016/j.joca.2017.01.011.
- [139] S. Selleri *et al.*, "Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming," *Oncotarget*, vol. 7, no. 21, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.8623.
- [140] A. B. Vasandan, S. Jahnavi, C. Shashank, P. Prasad, A. Kumar, and S. Jyothi Prasanna, "Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE 2 -dependent mechanism," *Sci Rep*, vol. 6, 2016, doi: 10.1038/srep38308.
- [141] H. Munir, G. Ed Rainger, G. B. Nash, and H. McGettrick, "Analyzing the effects of stromal cells on the recruitment of leukocytes from flow," *Journal of Visualized Experiments*, no. 95, 2015, doi: 10.3791/52480.
- [142] L. Raffaghello *et al.*, "Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche," *Stem Cells*, vol. 26, no. 1, 2008, doi: 10.1634/stemcells.2007-0416.
- [143] A. J. Nauta, A. B. Kruisselbrink, E. Lurvink, R. Willemze, and W. E. Fibbe, "Mesenchymal Stem Cells Inhibit Generation and Function of Both CD34+-Derived and Monocyte-Derived Dendritic Cells," *The Journal of Immunology*, vol. 177, no. 4, 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2080.

- [144] X. X. Jiang *et al.*, "Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells," *Blood*, vol. 105, no. 10, 2005, doi: 10.1182/blood-2004-02-0586.
- [145] S. Beyth *et al.*, "Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness," *Blood*, vol. 105, no. 5, 2005, doi: 10.1182/blood-2004-07-2921.
- [146] Z. Tu, Q. Li, H. Bu, and F. Lin, "Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor h," *Stem Cells Dev*, vol. 19, no. 11, 2010, doi: 10.1089/scd.2009.0418.
- [147] G. Moll *et al.*, "Mesenchymal stromal cells engage complement and complement receptor bearing innate effector cells to modulate immune responses," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0021703.
- [148] G. M. Spaggiari, A. Capobianco, H. Abdelrazik, F. Becchetti, M. C. Mingari, and L. Moretta, "Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2," *Blood*, vol. 111, no. 3, 2008, doi: 10.1182/blood-2007-02-074997.
- [149] 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, 2006, doi: 10.1182/blood-2005-07-2775.
- [150] J. M. Brown, K. Nemeth, N. M. Kushnir-Sukhov, D. D. Metcalfe, and E. Mezey, "Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 41, no. 4, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03685.x.
- [151] A. Corcione *et al.*, "Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions," *Blood*, vol. 107, no. 1, 2006, doi: 10.1182/blood-2005-07-2657.
- [152] S. Glennie, I. Soeiro, P. J. Dyson, E. W. F. Lam, and F. Dazzi, "Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells," *Blood*, vol. 105, no. 7, 2005, doi: 10.1182/blood-2004-09-3696.
- [153] 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, doi: 10.1634/stemcells.2006-0228.
- [154] S. Ghannam, J. Pène, G. Torcy-Moquet, C. Jorgensen, and H. Yssel, "Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation and Function and Induce a T Regulatory Cell Phenotype," *The Journal of Immunology*, vol. 185, no. 1, 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0902007.
- [155] S. Aggarwal and M. F. Pittenger, "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses," *Blood*, vol. 105, no. 4, 2005, doi: 10.1182/blood-2004-04-1559.

- [156] A. Mobasheri, G. Kalamegam, G. Musumeci, and M. E. Batt, "Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions," *Maturitas*, vol. 78, no. 3, 2014. doi: 10.1016/j.maturitas.2014.04.017.
- [157] A. Uccelli *et al.*, "MEsenchymal StEm cells for Multiple Sclerosis (MESEMS): A randomized, double blind, cross-over phase I/II clinical trial with autologous mesenchymal stem cells for the therapy of multiple sclerosis," *Trials*, vol. 20, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s13063-019-3346-z.
- [158] H. J. Kim *et al.*, "Stereotactic brain injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer's disease dementia: A phase 1 clinical trial," *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, vol. 1, no. 2, 2015, doi: 10.1016/j.trci.2015.06.007.
- [159] M. Yousefifard, F. Nasirinezhad, H. Shardi Manaheji, A. Janzadeh, M. Hosseini, and M. Keshavarz, "Human bone marrow-derived and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for alleviating neuropathic pain in a spinal cord injury model," *Stem Cell Res Ther*, vol. 7, no. 1, 2016, doi: 10.1186/s13287-016-0295-2.
- [160] C. Sanina and J. M. Hare, "Mesenchymal Stem Cells as a Biological Drug for Heart Disease: Where Are We with Cardiac Cell-Based Therapy?," *Circulation Research*, vol. 117, no. 3, 2015. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.306306.
- [161] I. B. Copland, "Mesenchymal stromal cells for cardiovascular disease," *J Cardiovasc Dis Res*, vol. 2, no. 1, 2011, doi: 10.4103/0975-3583.78581.
- [162] J. M. Ryan, F. P. Barry, J. M. Murphy, and B. P. Mahon, "Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection," *Journal of Inflammation*, vol. 2, 2005. doi: 10.1186/1476-9255-2-8.
- [163] H. Tripathi *et al.*, "Combined Transplantation of Human MSCs and ECFCs Improves Cardiac Function and Decrease Cardiomyocyte Apoptosis After Acute Myocardial Infarction," *Stem Cell Rev Rep*, vol. 19, no. 2, 2023, doi: 10.1007/s12015-022-10468-z.
- [164] W. S. Lian *et al.*, "In vivo therapy of myocardial infarction with mesenchymal stem cells modified with prostaglandin I synthase gene improves cardiac performance in mice," *Life Sci*, vol. 88, no. 9–10, 2011, doi: 10.1016/j.lfs.2010.12.020.
- [165] T. P. Martens *et al.*, "Mesenchymal lineage precursor cells induce vascular network formation in ischemic myocardium," *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, vol. 3, no. SUPPL. 1, 2006, doi: 10.1038/ncpcardio0404.
- [166] D. Wang *et al.*, "Mesenchymal stem cell injection ameliorates the inducibility of ventricular arrhythmias after myocardial infarction in rats," *Int J Cardiol*, vol. 152, no. 3, 2011, doi: 10.1016/j.ijcard.2010.07.025.
- [167] J. O. Beitnes *et al.*, "Intramyocardial injections of human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction modulate scar formation and improve left ventricular function," *Cell Transplant*, vol. 21, no. 8, 2012, doi: 10.3727/096368911X627462.

- [168] N. Nagaya *et al.*, "Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 287, no. 6 56-6, 2004, doi: 10.1152/ajpheart.01071.2003.
- [169] J. G. Shake *et al.*, "Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: Engraftment and functional effects," *Annals of Thoracic Surgery*, vol. 73, no. 6, 2002, doi: 10.1016/S0003-4975(02)03517-8.
- [170] K. E. Hatzistergos *et al.*, "Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation," *Circ Res*, vol. 107, no. 7, 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.222703.
- [171] M. Cai *et al.*, "Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs) Improve Heart Function in Swine Myocardial Infarction Model through Paracrine Effects," *Sci Rep*, vol. 6, 2016, doi: 10.1038/srep28250.
- [172] E. Przybyt and M. C. Harmsen, "Mesenchymal Stem Cells: Promising for Myocardial Regeneration?," *Curr Stem Cell Res Ther*, vol. 8, no. 4, 2013, doi: 10.2174/1574888x11308040002.
- [173] D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti, D. M. Bodine, A. Leri, and P. Anversa, "Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium," in *Pediatric Transplantation*, 2003. doi: 10.1034/j.1399-3046.7.s3.13.x.
- [174] N. Noiseux *et al.*, "Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation," *Molecular Therapy*, vol. 14, no. 6, 2006, doi: 10.1016/j.ymthe.2006.05.016.
- [175] L. Bagno, K. E. Hatzistergos, W. Balkan, and J. M. Hare, "Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease: Progress and Challenges," *Molecular Therapy*, vol. 26, no. 7. 2018. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.05.009.
- [176] M. Mirosou *et al.*, "Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 5, 2007, doi: 10.1073/pnas.0610024104.
- [177] C. Mias *et al.*, "Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction," *Stem Cells*, vol. 27, no. 11, 2009, doi: 10.1002/stem.169.
- [178] L. Cai *et al.*, "IFATS Collection: Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Induce Angiogenesis and Nerve Sprouting Following Myocardial Infarction, in Conjunction with Potent Preservation of Cardiac Function," *Stem Cells*, vol. 27, no. 1, 2009, doi: 10.1634/stemcells.2008-0273.
- [179] H. Kamihata *et al.*, "Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines," *Circulation*, vol. 104, no. 9, 2001, doi: 10.1161/hc3501.093817.

- [180] V. Dayan *et al.*, "Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction," *Basic Res Cardiol*, vol. 106, no. 6, 2011, doi: 10.1007/s00395-011-0221-9.
- [181] D. I. Cho *et al.*, "Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages," *Exp Mol Med*, vol. 46, no. 1, 2014, doi: 10.1038/emm.2013.135.
- [182] B. Maitra *et al.*, "Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation," *Bone Marrow Transplant*, vol. 33, no. 6, 2004, doi: 10.1038/sj.bmt.1704400.
- [183] A. E. S. Shafei *et al.*, "Mesenchymal stem cell therapy: A promising cell-based therapy for treatment of myocardial infarction," *Journal of Gene Medicine*, vol. 19, no. 12, 2017. doi: 10.1002/jgm.2995.
- [184] J. D. Richardson, A. J. Nelson, A. C. W. Zannettino, S. Gronthos, S. G. Worthley, and P. J. Psaltis, "Optimization of the Cardiovascular Therapeutic Properties of Mesenchymal Stromal/Stem Cells-Taking the Next Step," *Stem Cell Rev Rep*, vol. 9, no. 3, 2013, doi: 10.1007/s12015-012-9366-7.
- [185] S. Rani, A. E. Ryan, M. D. Griffin, and T. Ritter, "Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Toward cell-free therapeutic applications," *Molecular Therapy*, vol. 23, no. 5, 2015. doi: 10.1038/mt.2015.44.
- [186] H. Xin, Y. Li, and M. Chopp, "Exosomes/miRNAs as mediating cell-based therapy of stroke," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 8, no. November, 2014. doi: 10.3389/fncel.2014.00377.
- [187] M. Yáñez-Mó *et al.*, "Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions," *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 4, no. 2015, 2015. doi: 10.3402/jev.v4.27066.
- [188] G. Raposo and W. Stoorvogel, "Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends," *Journal of Cell Biology*, vol. 200, no. 4, 2013. doi: 10.1083/jcb.201211138.
- [189] M. Samuel, M. Bleackley, M. Anderson, and S. Mathivanan, "Extracellular vesicles including exosomes in cross kingdom regulation: A viewpoint from plant-fungal interactions," *Front Plant Sci*, vol. 6, no. September, 2015, doi: 10.3389/fpls.2015.00766.
- [190] M. Colombo, G. Raposo, and C. Théry, "Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles," *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 30, 2014. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- [191] 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, doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.

- [192] H. Kalra, G. P. C. Drummen, and S. Mathivanan, "Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 2. 2016. doi: 10.3390/ijms17020170.
- [193] C. Théry, L. Zitvogel, and S. Amigorena, "Exosomes: Composition, biogenesis and function," *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 8. 2002. doi: 10.1038/nri855.
- [194] C. Arenaccio and M. Federico, "The multifaceted functions of exosomes in health and disease: An overview," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017. doi: 10.1007/978-981-10-4397-0_1.
- [195] R. J. Simpson and S. Mathivanan, "Extracellular microvesicles: The need for internationally recognised nomenclature and stringent purification criteria," *Journal of Proteomics and Bioinformatics*, vol. 5, no. 2. 2012. doi: 10.4172/jpb.10000e10.
- [196] 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, 2018, doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- [197] N. A. Garcia, J. Moncayo-Arlandi, P. Sepulveda, and A. Diez-Juan, "Cardiomyocyte exosomes regulate glycolytic flux in endothelium by direct transfer of GLUT transporters and glycolytic enzymes," *Cardiovasc Res*, vol. 109, no. 3, 2016, doi: 10.1093/cvr/cvv260.
- [198] 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, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0138849.
- [199] V. Börger, M. Bremer, A. Görgens, and B. Giebel, "Mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles as a new approach in stem cell therapy," *ISBT Sci Ser*, vol. 11, no. S1, 2016, doi: 10.1111/voxs.12212.
- [200] 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. doi: 10.1038/nrm.2017.125.
- [201] T. Wollert and J. H. Hurley, "Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes," *Nature*, vol. 464, no. 7290, 2010, doi: 10.1038/nature08849.
- [202] H. S. Joo, J. H. Suh, H. J. Lee, E. S. Bang, and J. M. Lee, "Current knowledge and future perspectives on mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic agent," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 3. 2020. doi: 10.3390/ijms21030727.
- [203] K. Trajkovic *et al.*, "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes," *Science (1979)*, vol. 319, no. 5867, 2008, doi: 10.1126/science.1153124.

- [204] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee, and J. O. Lötvall, "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells," *Nat Cell Biol*, vol. 9, no. 6, 2007, doi: 10.1038/ncb1596.
- [205] C. Bissig and J. Gruenberg, "ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland," *Trends in Cell Biology*, vol. 24, no. 1. 2014. doi: 10.1016/j.tcb.2013.10.009.
- [206] L. A. Mulcahy, R. C. Pink, and D. R. F. Carter, "Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake," *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 3, no. 1. 2014. doi: 10.3402/jev.v3.24641.
- [207] S. Mathivanan, H. Ji, and R. J. Simpson, "Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication," *Journal of Proteomics*, vol. 73, no. 10. 2010. doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.006.
- [208] C. Théry, M. Ostrowski, and E. Segura, "Membrane vesicles as conveyors of immune responses," *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, no. 8. 2009. doi: 10.1038/nri2567.
- [209] S. Mathivanan, J. W. E. Lim, B. J. Tauro, H. Ji, R. L. Moritz, and R. J. Simpson, "Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature," *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 9, no. 2, 2010, doi: 10.1074/mcp.M900152-MCP200.
- [210] C. Subra *et al.*, "Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins," *J Lipid Res*, vol. 51, no. 8, 2010, doi: 10.1194/jlr.M003657.
- [211] J. Conde-Vancells *et al.*, "Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes," *J Proteome Res*, vol. 7, no. 12, 2008, doi: 10.1021/pr8004887.
- [212] C. Subra, K. Laulagnier, B. Perret, and M. Record, "Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies," *Biochimie*, vol. 89, no. 2. 2007. doi: 10.1016/j.biochi.2006.10.014.
- [213] T. Skotland, N. P. Hessvik, K. Sandvig, and A. Llorente, "Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology," *Journal of Lipid Research*, vol. 60, no. 1. 2019. doi: 10.1194/jlr.R084343.
- [214] J. Donoso-Quezada, S. Ayala-Mar, and J. González-Valdez, "The role of lipids in exosome biology and intercellular communication: Function, analytics and applications," *Traffic*, vol. 22, no. 7. 2021. doi: 10.1111/tra.12803.
- [215] J. Ratajczak *et al.*, "Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery," *Leukemia*, vol. 20, no. 5, 2006, doi: 10.1038/sj.leu.2404132.
- [216] D. M. Pegtel *et al.*, "Functional delivery of viral miRNAs via exosomes," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 14, 2010, doi: 10.1073/pnas.0914843107.

- [217] V. R. Minciocchi *et al.*, "Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles," *Oncotarget*, vol. 6, no. 13, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.3598.
- [218] Y. Jia *et al.*, "Small extracellular vesicles isolation and separation: Current techniques, pending questions and clinical applications," *Theranostics*, vol. 12, no. 15. 2022. doi: 10.7150/thno.74305.
- [219] K. Takov, D. M. Yellon, and S. M. Davidson, "Comparison of small extracellular vesicles isolated from plasma by ultracentrifugation or size-exclusion chromatography: yield, purity and functional potential," *J Extracell Vesicles*, vol. 8, no. 1, 2019, doi: 10.1080/20013078.2018.1560809.
- [220] S. Gandham *et al.*, "Technologies and Standardization in Research on Extracellular Vesicles," *Trends in Biotechnology*, vol. 38, no. 10. 2020. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.05.012.
- [221] E. Pariset, V. Agache, and A. Millet, "Extracellular Vesicles: Isolation Methods," *Advanced Biosystems*, vol. 1, no. 5. 2017. doi: 10.1002/adbi.201700040.
- [222] J. Chen *et al.*, "Review on Strategies and Technologies for Exosome Isolation and Purification," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9. 2022. doi: 10.3389/fbioe.2021.811971.
- [223] C. Coughlan *et al.*, "Exosome Isolation by Ultracentrifugation and Precipitation and Techniques for Downstream Analyses," *Curr Protoc Cell Biol*, vol. 88, no. 1, 2020, doi: 10.1002/cpcb.110.
- [224] Y. Q. Koh, F. B. Almughlliq, K. Vaswani, H. N. Peiris, and M. D. Mitchell, "Exosome enrichment by ultracentrifugation and size exclusion chromatography," *Frontiers in Bioscience - Landmark*, vol. 23, no. 5, 2018, doi: 10.2741/4621.
- [225] S. Busatto *et al.*, "Tangential flow filtration for highly efficient concentration of extracellular vesicles from large volumes of fluid," *Cells*, vol. 7, no. 12, 2018, doi: 10.3390/cells7120273.
- [226] 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*, vol. 13, no. 6, 2017, doi: 10.1016/j.nano.2017.03.011.
- [227] J. Stam, S. Bartel, R. Bischoff, and J. C. Wolters, "Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods," *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 1169. 2021. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122604.
- [228] 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*, vol. 11, no. 4, 2015, doi: 10.1016/j.nano.2015.01.003.
- [229] S. La Shu *et al.*, "Purity and yield of melanoma exosomes are dependent on isolation method," *J Extracell Vesicles*, vol. 9, no. 1, 2020, doi: 10.1080/20013078.2019.1692401.

- [230] O. P. B. Wiklander, M. Brennan, J. Lötvall, X. O. Breakefield, and S. E. L. Andaloussi, "Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles," *Science Translational Medicine*, vol. 11, no. 492. 2019. doi: 10.1126/scitranslmed.aav8521.
- [231] X. Qian, N. An, Y. Ren, C. Yang, X. Zhang, and L. Li, "Immunosuppressive Effects of Mesenchymal Stem Cells-derived Exosomes," *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 17, no. 2. 2021. doi: 10.1007/s12015-020-10040-7.
- [232] M. Orecchioni, Y. Ghosheh, A. B. Pramod, and K. Ley, "Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages," *Frontiers in Immunology*, vol. 10, no. MAY. 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.01084.
- [233] 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, doi: 10.1002/sctm.16-0363.
- [234] 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, doi: 10.3389/fimmu.2018.00771.
- [235] X. Wang *et al.*, "Exosomal MIR-223 Contributes to Mesenchymal Stem Cell-Elicited Cardioprotection in Polymicrobial Sepsis," *Sci Rep*, vol. 5, 2015, doi: 10.1038/srep13721.
- [236] Y. Song *et al.*, "Exosomal miR-146a Contributes to the Enhanced Therapeutic Efficacy of Interleukin-1 β -Primed Mesenchymal Stem Cells Against Sepsis," *Stem Cells*, vol. 35, no. 5, 2017, doi: 10.1002/stem.2564.
- [237] M. Gómez-Ferrer *et al.*, "Hif-overexpression and pro-inflammatory priming in human mesenchymal stromal cells improves the healing properties of extracellular vesicles in experimental crohn's disease," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 20, 2021, doi: 10.3390/ijms222011269.
- [238] C. R. Harrell, N. Jovicic, V. Djonov, N. Arsenijevic, and V. Volarevic, "Mesenchymal stem cell-derived exosomes and other extracellular vesicles as new remedies in the therapy of inflammatory diseases," *Cells*, vol. 8, no. 12. 2019. doi: 10.3390/cells8121605.
- [239] C. S. Chamberlain *et al.*, "Extracellular Vesicle-Educated Macrophages Promote Early Achilles Tendon Healing," *Stem Cells*, vol. 37, no. 5, 2019, doi: 10.1002/stem.2988.
- [240] J. Li *et al.*, "Exosomes derived from mesenchymal stem cells attenuate the progression of atherosclerosis in ApoE $-/-$ mice via miR-let7 mediated infiltration and polarization of M2 macrophage," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 510, no. 4, 2019, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.02.005.
- [241] M. Taghavi-Farahabadi, M. Mahmoudi, N. Rezaei, and S. M. Hashemi, "Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Exosomes and Conditioned Media Increased

- Neutrophil Lifespan and Phagocytosis Capacity," *Immunol Invest*, vol. 50, no. 8, 2021, doi: 10.1080/08820139.2020.1801720.
- [242] J. T. Loh *et al.*, "Mechanism for the attenuation of neutrophil and complement hyperactivity by MSC exosomes," *Cytotherapy*, vol. 24, no. 7, 2022, doi: 10.1016/j.jcyt.2021.12.003.
- [243] M. Collin and V. Bigley, "Human dendritic cell subsets: an update," *Immunology*, vol. 154, no. 1. 2018. doi: 10.1111/imm.12888.
- [244] X. Liu *et al.*, "Immunomodulatory potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Targeting immune cells," *Frontiers in Immunology*, vol. 14. 2023. doi: 10.3389/fimmu.2023.1094685.
- [245] M. Reis, E. Mavin, L. Nicholson, K. Green, A. M. Dickinson, and X. N. Wang, "Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate dendritic cell maturation and function," *Front Immunol*, vol. 9, no. NOV, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02538.
- [246] X. qiang Wu, T. zhong Yan, Z. wei Wang, X. Wu, G. hui Cao, and C. Zhang, "BM- MSCs-derived microvesicles promote allogeneic kidney graft survival through enhancing micro-146a expression of dendritic cells," *Immunol Lett*, vol. 191, 2017, doi: 10.1016/j.imlet.2017.09.010.
- [247] S. McComb, A. Thirirot, B. Akache, L. Krishnan, and F. Stark, "Introduction to the Immune System," in *Methods in Molecular Biology*, 2019. doi: 10.1007/978-1-4939-9597-4_1.
- [248] 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, doi: 10.1089/hum.2016.057.
- [249] 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, doi: 10.1089/scd.2018.0015.
- [250] H. R. Martínez *et al.*, "Stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis patients: Methodological approach, safety, and feasibility," *Cell Transplant*, vol. 21, no. 9, 2012, doi: 10.3727/096368911X582769.
- [251] D. Khare, R. Or, I. Resnick, C. Barkatz, O. Almogi-Hazan, and B. Avni, "Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Affect mRNA Expression and Function of B-Lymphocytes," *Front Immunol*, vol. 9, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.03053.
- [252] 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, doi: 10.3727/096368911x582769b.
- [253] J. Liu, Q. Liu, and X. Chen, "The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells on Regulatory B Cells," *Frontiers in Immunology*, vol. 11. 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.01843.

- [254] 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, doi: 10.1007/s00125-014-3262-4.
- [255] J. H. An *et al.*, "TSG-6 in extracellular vesicles from canine mesenchymal stem/stromal is a major factor in relieving DSS-induced colitis," *PLoS One*, vol. 15, no. 2, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0220756.
- [256] K. Yaddanapudi *et al.*, "Exosomes from GM-CSF expressing embryonic stem cells are an effective prophylactic vaccine for cancer prevention," *Oncoimmunology*, vol. 8, no. 3, 2019, doi: 10.1080/2162402X.2018.1561119.
- [257] 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, doi: 10.3389/fimmu.2014.00556.
- [258] A. Del Fattore *et al.*, "Immunoregulatory effects of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles on T lymphocytes," *Cell Transplant*, vol. 24, no. 12, 2015, doi: 10.3727/096368915X687543.
- [259] M. Kou *et al.*, "Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool?," *Cell Death and Disease*, vol. 13, no. 7. 2022. doi: 10.1038/s41419-022-05034-x.
- [260] R. Takeuchi, W. Katagiri, S. Endo, and T. Kobayashi, "Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis," *PLoS One*, vol. 14, no. 11, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0225472.
- [261] 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, doi: 10.1089/scd.2014.0316.
- [262] J. Chen *et al.*, "Proangiogenic compositions of microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0115316.
- [263] C. Salomon *et al.*, "Exosomal Signaling during Hypoxia Mediates Microvascular Endothelial Cell Migration and Vasculogenesis," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0068451.
- [264] B. Zhang *et al.*, "Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Exosomes Enhance Angiogenesis Through the Wnt4/ β -Catenin Pathway," *Stem Cells Transl Med*, vol. 4, no. 5, 2015, doi: 10.5966/sctm.2014-0267.
- [265] 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, doi: 10.1089/scd.2012.0095.
- [266] J. H. Huang *et al.*, "Systemic Administration of Exosomes Released from Mesenchymal Stromal Cells Attenuates Apoptosis, Inflammation, and Promotes

- Angiogenesis after Spinal Cord Injury in Rats,” *J Neurotrauma*, vol. 34, no. 24, 2017, doi: 10.1089/neu.2017.5063.
- [267] Y. Lu *et al.*, “Extracellular vesicle-enclosed miR-486-5p mediates wound healing with adipose-derived stem cells by promoting angiogenesis,” *J Cell Mol Med*, vol. 24, no. 17, 2020, doi: 10.1111/jcmm.15387.
- [268] 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,” *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 37, no. 6, 2015, doi: 10.1159/000438594.
- [269] S. Bian, L. Zhang, L. Duan, X. Wang, Y. Min, and H. Yu, “Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model,” *J Mol Med*, vol. 92, no. 4, 2014, doi: 10.1007/s00109-013-1110-5.
- [270] P. Gangadaran *et al.*, “Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells activates VEGF receptors and accelerates recovery of hindlimb ischemia,” *Journal of Controlled Release*, vol. 264, 2017, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.08.022.
- [271] S. Tejedor *et al.*, “Oncostatin M-Enriched Small Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Prevent Isoproterenol-Induced Fibrosis and Enhance Angiogenesis,” *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 7, 2023, doi: 10.3390/ijms24076467.
- [272] N. C. Henderson, F. Rieder, and T. A. Wynn, “Fibrosis: from mechanisms to medicines,” *Nature*, vol. 587, no. 7835, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2938-9.
- [273] S. Fang *et al.*, “Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal MicroRNAs Suppress Myofibroblast Differentiation by Inhibiting the Transforming Growth Factor- β /SMAD2 Pathway During Wound Healing,” *Stem Cells Transl Med*, vol. 5, no. 10, 2016, doi: 10.5966/sctm.2015-0367.
- [274] G. Cao, B. Chen, X. Zhang, and H. Chen, “Human adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNA-19b promotes the healing of skin wounds through modulation of the CCL1/TGF- β signaling axis,” *Clin Cosmet Investig Dermatol*, vol. 13, 2020, doi: 10.2147/CCID.S274370.
- [275] Y. Qu *et al.*, “Exosomes derived from miR-181-5p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation,” *J Cell Mol Med*, vol. 21, no. 10, 2017, doi: 10.1111/jcmm.13170.
- [276] R. Sánchez-Sánchez *et al.*, “miR-4732-3p in Extracellular Vesicles From Mesenchymal Stromal Cells Is Cardioprotective During Myocardial Ischemia,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.734143.
- [277] H. Gonzalez-King, N. A. García, I. Ontoria-Oviedo, M. Ciria, J. A. Montero, and P. Sepúlveda, “Hypoxia Inducible Factor-1 α Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes,” *Stem Cells*, vol. 35, no. 7, 2017, doi: 10.1002/stem.2618.

- [278] X. Rong, J. Liu, X. Yao, T. Jiang, Y. Wang, and F. Xie, "Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/ β -catenin pathway," *Stem Cell Res Ther*, vol. 10, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s13287-019-1204-2.
- [279] Z. Shi, Q. Wang, Y. Zhang, and D. Jiang, "Extracellular vesicles produced by bone marrow mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis, in part by inhibiting the RhoA/ROCK pathway, in a UUO rat model," *Stem Cell Res Ther*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.1186/s13287-020-01767-8.
- [280] C. Ji *et al.*, "Exosomes derived from hucMSC attenuate renal fibrosis through CK1 δ / β -TRCP-mediated YAP degradation," *Cell Death Dis*, vol. 11, no. 5, 2020, doi: 10.1038/s41419-020-2510-4.
- [281] X. Wan, S. Chen, Y. Fang, W. Zuo, J. Cui, and S. Xie, "Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles suppress the fibroblast proliferation by downregulating FZD6 expression in fibroblasts via miRNA-29b-3p in idiopathic pulmonary fibrosis," *J Cell Physiol*, vol. 235, no. 11, 2020, doi: 10.1002/jcp.29706.
- [282] N. Mansouri *et al.*, "Mesenchymal stromal cell exosomes prevent and revert experimental pulmonary fibrosis through modulation of monocyte phenotypes," *JCI Insight*, vol. 4, no. 21, 2019, doi: 10.1172/jci.insight.128060.
- [283] 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, doi: 10.1186/s13287-019-1152-x.
- [284] Y. Zhao *et al.*, "Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Relieve Acute Myocardial Ischemic Injury," *Stem Cells Int*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/761643.
- [285] R. C. Lai *et al.*, "Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury," *Stem Cell Res*, vol. 4, no. 3, 2010, doi: 10.1016/j.scr.2009.12.003.
- [286] S. J. O. Tan, J. F. Floriano, L. Nicastro, C. Emanuelli, and F. Catapano, "Novel applications of mesenchymal stem cell-derived exosomes for myocardial infarction therapeutics," *Biomolecules*, vol. 10, no. 5, 2020. doi: 10.3390/biom10050707.
- [287] C. C., C. K.M., and S. J.-S., "Angiogenesis in the infarcted myocardium," *Antioxid Redox Signal*, vol. 18, no. 9, 2013.
- [288] Y. Pu *et al.*, "Extracellular Vesicles from NMN Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Ameliorated Myocardial Infarction via miR-210-3p Promoted Angiogenesis," *Stem Cell Rev Rep*, 2023, doi: 10.1007/s12015-022-10499-6.
- [289] F. Collino *et al.*, "Exosome and Microvesicle-Enriched Fractions Isolated from Mesenchymal Stem Cells by Gradient Separation Showed Different Molecular Signatures and Functions on Renal Tubular Epithelial Cells," *Stem Cell Rev Rep*, vol. 13, no. 2, 2017, doi: 10.1007/s12015-016-9713-1.

- [290] K. R. Vrijzen *et al.*, "Exosomes from Cardiomyocyte Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells Stimulate Angiogenesis Via EMMPRIN," *Adv Healthc Mater*, vol. 5, no. 19, 2016, doi: 10.1002/adhm.201600308.
- [291] X. Liang, L. Zhang, S. Wang, Q. Han, and R. C. Zhao, "Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a," *J Cell Sci*, vol. 129, no. 11, 2016, doi: 10.1242/jcs.170373.
- [292] J. Mayourian *et al.*, "Exosomal microRNA-21-5p Mediates Mesenchymal Stem Cell Paracrine Effects on Human Cardiac Tissue Contractility," *Circ Res*, vol. 122, no. 7, 2018, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312420.
- [293] J. D. Anderson *et al.*, "Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-kappaB signaling," *Stem Cells*, vol. 34, no. 3, 2016, doi: 10.1002/stem.2298.
- [294] H. Xu, Z. Wang, L. Liu, B. Zhang, and B. Li, "Exosomes derived from adipose tissue, bone marrow, and umbilical cord blood for cardioprotection after myocardial infarction," *J Cell Biochem*, vol. 121, no. 3, 2020, doi: 10.1002/jcb.27399.
- [295] P. A. J. Krijnen, R. Nijmeijer, C. J. L. M. Meijer, C. A. Visser, C. E. Hack, and H. W. M. Niessen, "Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 55, no. 11, 2002, doi: 10.1136/jcp.55.11.801.
- [296] L. P. Zhu *et al.*, "Hypoxia-elicited mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates cardiac repair through miR-125b-mediated prevention of cell death in myocardial infarction," *Theranostics*, vol. 8, no. 22, 2018, doi: 10.7150/thno.28021.
- [297] P. Huang *et al.*, "Atorvastatin enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells-derived exosomes in acute myocardial infarction via up-regulating long non-coding RNA H19," *Cardiovasc Res*, vol. 116, no. 2, 2020, doi: 10.1093/cvr/cvz139.
- [298] L. Liu, X. Jin, C. F. Hu, R. Li, Z. Zhou, and C. X. Shen, "Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Rescue Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury by Inducing Cardiomyocyte Autophagy Via AMPK and Akt Pathways," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 43, no. 1, 2017, doi: 10.1159/000480317.
- [299] X. H. Sun, X. Wang, Y. Zhang, and J. Hui, "Exosomes of bone-marrow stromal cells inhibit cardiomyocyte apoptosis under ischemic and hypoxic conditions via miR-486-5p targeting the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway," *Thromb Res*, vol. 177, 2019, doi: 10.1016/j.thromres.2019.02.002.
- [300] Z. Wen *et al.*, "Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate cardiomyocyte apoptosis in hypoxic conditions through microRNA144 by targeting the PTEN/AKT pathway," *Stem Cell Res Ther*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.1186/s13287-020-1563-8.
- [301] Z. Liu, Y. Xu, Y. Wan, J. Gao, Y. Chu, and J. Li, "Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells prevent cardiomyocyte apoptosis induced by oxidative stress," *Cell Death Discov*, vol. 5, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41420-019-0159-5.

- [302] X.-F. TIAN, M.-X. CUI, S.-W. YANG, Y.-J. ZHOU, and D.-Y. HU, "Cell death, dysglycemia and myocardial infarction," *Biomed Rep*, vol. 1, no. 3, 2013, doi: 10.3892/br.2013.67.
- [303] S. Firoozi *et al.*, "Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles alone or in conjunction with a SDKP-conjugated self-assembling peptide improve a rat model of myocardial infarction," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 524, no. 4, 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.009.
- [304] F. Arslan *et al.*, "Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury," *Stem Cell Res*, vol. 10, no. 3, 2013, doi: 10.1016/j.scr.2013.01.002.
- [305] J. Pan, M. Alimujiang, Q. Chen, H. Shi, and X. Luo, "Exosomes derived from miR-146a-modified adipose-derived stem cells attenuate acute myocardial infarction-induced myocardial damage via downregulation of early growth response factor 1," *J Cell Biochem*, vol. 120, no. 3, 2019, doi: 10.1002/jcb.27731.
- [306] Z. Wei *et al.*, "miRNA-181a over-expression in mesenchymal stem cell-derived exosomes influenced inflammatory response after myocardial ischemia-reperfusion injury," *Life Sci*, vol. 232, 2019, doi: 10.1016/j.lfs.2019.116632.
- [307] Y. Liu, R. Guan, J. Yan, Y. Zhu, S. Sun, and Y. Qu, "Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicle-Shuttled microRNA-302d-3p Represses Inflammation and Cardiac Remodeling Following Acute Myocardial Infarction," *J Cardiovasc Transl Res*, vol. 15, no. 4, 2022, doi: 10.1007/s12265-021-10200-1.
- [308] J. Liu *et al.*, "miR-93-5p-Containing Exosomes Treatment Attenuates Acute Myocardial Infarction-Induced Myocardial Damage," *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 11, 2018, doi: 10.1016/j.omtn.2018.01.010.
- [309] 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, doi: 10.1093/cvr/cvz040.
- [310] P. P. Y. Lui and Y. T. Leung, "Practical Considerations for Translating Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles from Bench to Bed," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 8. 2022. doi: 10.3390/pharmaceutics14081684.
- [311] T. T. Tan, R. C. Lai, J. Padmanabhan, W. K. Sim, A. B. H. Choo, and S. K. Lim, "Assessment of tumorigenic potential in mesenchymal-stem/stromal-cell-derived small extracellular vesicles (MSC-sEV)," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 4, 2021, doi: 10.3390/ph14040345.
- [312] 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, doi: 10.1007/s11373-004-8183-7.
- [313] J. Saint-Pol, F. Gosselet, S. Duban-Deweert, G. Pottiez, and Y. Karamanos, "Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles," *Cells*, vol. 9, no. 4. 2020. doi: 10.3390/cells9040851.

- [314] L. Alvarez-Erviti, Y. Seow, H. Yin, C. Betts, S. Lakhal, and M. J. A. Wood, "Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes," *Nat Biotechnol*, vol. 29, no. 4, 2011, doi: 10.1038/nbt.1807.
- [315] M. J. A. Wood, A. J. O'Loughlin, and S. Lakhal, "Exosomes and the blood-brain barrier: Implications for neurological diseases," *Therapeutic Delivery*, vol. 2, no. 9, 2011. doi: 10.4155/tde.11.83.
- [316] L. Chen *et al.*, "BMSCs-derived miR-223-containing exosomes contribute to liver protection in experimental autoimmune hepatitis," *Mol Immunol*, vol. 93, 2018, doi: 10.1016/j.molimm.2017.11.008.
- [317] B. Wang *et al.*, "Mesenchymal stem cells deliver exogenous MicroRNA-let7c via exosomes to attenuate renal fibrosis," *Molecular Therapy*, vol. 24, no. 7, 2016, doi: 10.1038/mt.2016.90.
- [318] M. Gómez-Ferrer *et al.*, "Hif-1 α and pro-inflammatory signaling improves the immunomodulatory activity of MSC-derived extracellular vesicles," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 7, 2021, doi: 10.3390/ijms22073416.
- [319] 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, doi: 10.5966/sctm.2016-0038.
- [320] 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," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 109, 2019, doi: 10.1016/j.biocel.2019.01.017.
- [321] B. Giebel, L. Kordelas, and V. Börger, "Clinical potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles," *Stem Cell Investigation*, vol. 4, no. 10, 2017. doi: 10.21037/sci.2017.09.06.
- [322] A. Gowen, F. Shahjin, S. Chand, K. E. Odegaard, and S. V. Yelamanchili, "Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Challenges in Clinical Applications," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 8, 2020. doi: 10.3389/fcell.2020.00149.
- [323] C. McKee and G. R. Chaudhry, "Advances and challenges in stem cell culture," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 159, 2017. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.051.
- [324] S. Wen *et al.*, "Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a radiation injury bone marrow murine model," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 21, 2019, doi: 10.3390/ijms20215468.
- [325] 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, doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.

- [326] I. V. Shilov *et al.*, "The paragon algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra," *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 6, no. 9, 2007, doi: 10.1074/mcp.T600050-MCP200.
- [327] M. I. Alcoriza-Balaguer, J. C. García-Cañaveras, M. Benet, O. Juan-Vidal, and A. Lahoz, "FAMetA: a mass isotopologue-based tool for the comprehensive analysis of fatty acid metabolism," *Brief Bioinform*, vol. 24, no. 2, 2023, doi: 10.1093/bib/bbad064.
- [328] A. Dorronsoro *et al.*, "Human mesenchymal stromal cells modulate T-cell responses through TNF- α -mediated activation of NF- κ B," *Eur J Immunol*, vol. 44, no. 2, 2014, doi: 10.1002/eji.201343668.
- [329] A. B. Lyons, "Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution," *J Immunol Methods*, vol. 243, no. 1–2, 2000, doi: 10.1016/S0022-1759(00)00231-3.
- [330] 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, 2008, doi: 10.1634/stemcells.2007-0484.
- [331] S. E. Litwin, S. E. Katz, J. P. Morgan, and P. S. Douglas, "Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat," *Circulation*, vol. 89, no. 1, 1994, doi: 10.1161/01.CIR.89.1.345.
- [332] S. Yang *et al.*, "Internalization of apoptotic cells during efferocytosis requires MerTK-mediated calcium influx," *Cell Death Dis*, vol. 14, no. 6, 2023, doi: 10.1038/s41419-023-05925-7.
- [333] F. N. Mohd Idrus *et al.*, "Differential polarization and the expression of efferocytosis receptor MerTK on M1 and M2 macrophages isolated from coronary artery disease patients," *BMC Immunol*, vol. 22, no. 1, 2021, doi: 10.1186/s12865-021-00410-2.
- [334] V. Kain, J. K. Jadapalli, B. Tourki, and G. V. Halade, "Inhibition of FPR2 impaired leukocytes recruitment and elicited non-resolving inflammation in acute heart failure," *Pharmacol Res*, vol. 146, 2019, doi: 10.1016/j.phrs.2019.104295.
- [335] M. A. Sugimoto, J. P. Vago, M. M. Teixeira, and L. P. Sousa, "Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance," *Journal of Immunology Research*, vol. 2016, 2016. doi: 10.1155/2016/8239258.
- [336] J. Ansari *et al.*, "Targeting the AnxA1/Fpr2/ALX pathway regulates neutrophil function, promoting thromboinflammation resolution in sickle cell disease," *Blood*, vol. 137, no. 11, 2021, doi: 10.1182/blood.2020009166.
- [337] S. Chengode, "Left ventricular global systolic function assessment by echocardiography," *Annals of Cardiac Anaesthesia*, vol. 19, no. 5, 2016. doi: 10.4103/0971-9784.192617.

- [338] 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, doi: 10.3389/fimmu.2018.02056.
- [339] J. K. Bar, A. Lis-Nawara, and P. G. Grelewski, "Dental pulp stem cell-derived secretome and its regenerative potential," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 21. 2021. doi: 10.3390/ijms222112018.
- [340] R. C. Lai *et al.*, "Proteolytic Potential of the MSC Exosome Proteome: Implications for an Exosome-Mediated Delivery of Therapeutic Proteasome," *Int J Proteomics*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/971907.
- [341] A. La Greca *et al.*, "Extracellular vesicles from pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells acquire a stromal modulatory proteomic pattern during differentiation," *Exp Mol Med*, vol. 50, no. 9, 2018, doi: 10.1038/s12276-018-0142-x.
- [342] R. Gadkari, L. Zhao, T. Teklemariam, and B. M. Hantash, "Human embryonic stem cell derived-mesenchymal stem cells: An alternative mesenchymal stem cell source for regenerative medicine therapy," *Regenerative Med*, vol. 9, no. 4, 2014, doi: 10.2217/rme.14.13.
- [343] Q. Zhan *et al.*, "Phosphatidylcholine-Engineered Exosomes for Enhanced Tumor Cell Uptake and Intracellular Antitumor Drug Delivery," *Macromol Biosci*, vol. 21, no. 8, 2021, doi: 10.1002/mabi.202100042.
- [344] S. R. Baglio *et al.*, "Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species," *Stem Cell Res Ther*, vol. 6, no. 1, 2015, doi: 10.1186/s13287-015-0116-z.
- [345] K. Essandoh, Y. Li, J. Huo, and G. C. Fan, "MiRNA-mediated macrophage polarization and its potential role in the regulation of inflammatory response," *Shock*, vol. 46, no. 2. 2016. doi: 10.1097/SHK.0000000000000604.
- [346] M. Yang *et al.*, "Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles loaded with miR-223 ameliorate myocardial infarction through P53/S100A9 axis," *Genomics*, vol. 114, no. 3, 2022, doi: 10.1016/j.ygeno.2022.110319.
- [347] R. Li *et al.*, "Exosomes from adipose-derived stem cells regulate M1/M2 macrophage phenotypic polarization to promote bone healing via miR-451a/MIF," *Stem Cell Res Ther*, vol. 13, no. 1, 2022, doi: 10.1186/s13287-022-02823-1.
- [348] Z. Wu, S. Cheng, S. Wang, W. Li, and J. Liu, "BMSCs-derived exosomal microRNA-150-5p attenuates myocardial infarction in mice," *International Immunopharmacology*, vol. 93. 2021. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107389.
- [349] A. Ngkelo, K. Meja, M. Yeadon, I. Adcock, and P. A. Kirkham, "LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and G α dependent PI-3kinase signalling," *J Inflamm*, vol. 9, 2012, doi: 10.1186/1476-9255-9-1.

- [350] Y. Tsuda, H. Takahashi, M. Kobayashi, T. Hanafusa, D. N. Herndon, and F. Suzuki, "Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Immunity*, vol. 21, no. 2, 2004, doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.006.
- [351] S. Bozinovski, D. Anthony, G. P. Anderson, L. B. Irving, B. D. Levy, and R. Vlahos, "Treating neutrophilic inflammation in COPD by targeting ALX/FPR2 resolution pathways," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 140, no. 3. 2013. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.07.007.
- [352] M. H. Petri *et al.*, "Resolution of Inflammation Through the Lipoxin and ALX/FPR2 Receptor Pathway Protects Against Abdominal Aortic Aneurysms," *JACC Basic Transl Sci*, vol. 3, no. 6, 2018, doi: 10.1016/j.jacbts.2018.08.005.
- [353] W. sheng Yang *et al.*, "Formyl peptide receptor 2 as a potential therapeutic target for inflammatory bowel disease," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 44, no. 1. 2023. doi: 10.1038/s41401-022-00944-0.
- [354] S. N. Cooray *et al.*, "Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, no. 45, 2013, doi: 10.1073/pnas.1308253110.
- [355] D. A. Bloes, M. Otto, A. Peschel, and D. Kretschmer, "Enterococcus faecium stimulates human neutrophils via the formyl-peptide receptor 2," *PLoS One*, vol. 7, no. 6, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0039910.
- [356] D. Kretschmer, N. Nikola, M. Dürr, M. Otto, and A. Peschel, "The virulence regulator agr controls the staphylococcal capacity to activate human Neutrophils via the formyl peptide receptor 2," *J Innate Immun*, vol. 4, no. 2, 2012, doi: 10.1159/000332142.
- [357] A. Manda-Handzlik and U. Demkow, "Neutrophils: The role of oxidative and nitrosative stress in health and disease," *Adv Exp Med Biol*, vol. 857, 2015, doi: 10.1007/5584_2015_117.
- [358] V. Kain, S. D. Prabhu, and G. V. Halade, "Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction," *Basic Research in Cardiology*, vol. 109, no. 6. 2014. doi: 10.1007/s00395-014-0444-7.
- [359] A. Saxena, I. Russo, and N. G. Frangogiannis, "Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: Learning from past failures to meet future challenges," *Translational Research*, vol. 167, no. 1. 2016. doi: 10.1016/j.trsl.2015.07.002.
- [360] Y. Xiong *et al.*, "Sequential transplantation of exosomes and mesenchymal stem cells pretreated with a combination of hypoxia and Tongxinluo efficiently facilitates cardiac repair," *Stem Cell Res Ther*, vol. 13, no. 1, 2022, doi: 10.1186/s13287-022-02736-z.
- [361] B. Wernly *et al.*, "Anti-CD3 Antibody Treatment Reduces Scar Formation in a Rat Model of Myocardial Infarction," *Cells*, vol. 9, no. 2, 2020, doi: 10.3390/cells9020295.

- [362] L. Sun *et al.*, "A 3D culture system improves the yield of MSCs-derived extracellular vesicles and enhances their therapeutic efficacy for heart repair," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 161, 2023, doi: 10.1016/j.biopha.2023.114557.
- [363] Y. Ning *et al.*, "Atorvastatin-pretreated mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote cardiac repair after myocardial infarction via shifting macrophage polarization by targeting microRNA-139-3p/Stat1 pathway," *BMC Med*, vol. 21, no. 1, 2023, doi: 10.1186/s12916-023-02778-x.
- [364] M. Tian, Y. Yuan, J. Li, M. R. Gionfriddo, and R. Huang, "Tumor necrosis factor- α and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review," *Chronic Dis Transl Med*, vol. 1, no. 1, 2015, doi: 10.1016/j.cdtm.2015.02.002.
- [365] T. Vajen *et al.*, "Blocking CCL5-CXCL4 heteromerization preserves heart function after myocardial infarction by attenuating leukocyte recruitment and NETosis," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-29026-0.
- [366] F. Montecucco *et al.*, "CC chemokine CCL5 plays a central role impacting infarct size and post-infarction heart failure in mice," *Eur Heart J*, vol. 33, no. 15, 2012, doi: 10.1093/eurheartj/ehr127.
- [367] P. Van Den Borne, P. H. A. Quax, I. E. Hofer, and G. Pasterkamp, "The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease," *BioMed Research International*, vol. 2014. 2014. doi: 10.1155/2014/893106.
- [368] M. Bujak *et al.*, "Induction of the CXC chemokine interferon- γ -inducible protein 10 regulates the reparative response following myocardial infarction," *Circ Res*, vol. 105, no. 10, 2009, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.199471.
- [369] D. Li *et al.*, "Maresin 1 alleviates the inflammatory response, reduces oxidative stress and protects against cardiac injury in LPS-induced mice," *Life Sci*, vol. 277, 2021, doi: 10.1016/j.lfs.2021.119467.
- [370] V. Kain *et al.*, "Resolvin D1 activates the inflammation resolving response at splenic and ventricular site following myocardial infarction leading to improved ventricular function," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 84, 2015, doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.04.003.
- [371] G. Liu *et al.*, "Early treatment with Resolvin E1 facilitates myocardial recovery from ischaemia in mice," *Br J Pharmacol*, vol. 175, no. 8, 2018, doi: 10.1111/bph.14041.
- [372] S. Pascual-Gil, G. Abizanda, E. Iglesias, E. Garbayo, F. Prósper, and M. J. Blanco-Prieto, "NRG1 PLGA MP locally induce macrophage polarisation toward a regenerative phenotype in the heart after acute myocardial infarction," *J Drug Target*, vol. 27, no. 5–6, 2019, doi: 10.1080/1061186X.2018.1531417.
- [373] F. Wang, M. Li, A. Zhang, H. Li, C. Jiang, and J. Guo, "PCSK9 Modulates Macrophage Polarization-Mediated Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction," *J Immunol Res*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/7685796.

- [374] Y. Liao *et al.*, "Cardiac Nestin + Mesenchymal Stromal Cells Enhance Healing of Ischemic Heart Through Periostin-Mediated M2 Macrophage Polarization," *SSRN Electronic Journal*, 2019, doi: 10.2139/ssrn.3377619.
- [375] J. C. Kovacic, D. W. M. Muller, and R. M. Graham, "Actions and therapeutic potential of G-CSF and GM-CSF in cardiovascular disease," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 42, no. 1. 2007. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.10.001.
- [376] A. Anzai *et al.*, "The infarcted myocardium solicits GM-CSF for the detrimental oversupply of inflammatory leukocytes," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 214, no. 11, 2017, doi: 10.1084/jem.20170689.
- [377] C. Seiler *et al.*, "Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled study," *Circulation*, vol. 104, no. 17, 2001, doi: 10.1161/hc4201.097835.
- [378] Z. Deng *et al.*, "Effects of GM-CSF on the stem cells mobilization and plasma C-reactive protein levels in patients with acute myocardial infarction," *Int J Cardiol*, vol. 113, no. 1, 2006, doi: 10.1016/j.ijcard.2006.06.014.